

**Nachweis spezifischer Bindungsstellen
für das Hypophysenhormon β_{H} -Lipotropin
auf dem Adhäsionsmolekül Vitronectin
und auf Monozyten der humanen Zelllinie THP-1**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ulrike Lindner
aus Würzburg

Gießen 2004

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. H. Schmidt

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Gutachter: PD Dr. M. Winking

Tag der Disputation: 29.06.2004

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Proopiomelanocortin und Proopiomelanocortinfragmente	1
1.1.1	Vorkommen und Struktur	1
1.1.2	Expression und Prozessierung	1
1.1.3	Funktion	4
1.2	β_H-Endorphin: Rezeptoren und Bindungsstellen	8
1.2.1	Opioidrezeptoren	8
1.2.2	Non-Opioid-Bindungsstellen	9
1.2.2.1	Non-Opioid-Bindungsstellen auf Makromolekülen	9
1.2.2.1.1	Vitronektin und Vitronektin-Komplexe	10
1.2.2.1.1.1	Vorkommen und Struktur	10
1.2.2.1.1.2	Funktionen	12
1.2.2.1.2	Chemokin-Rezeptoren:CCR5	16
1.2.2.2	Non-Opioid-Bindungsstellen auf Zellen des Immunsystems	18
1.3	β_H-Lipotropin: Rezeptoren und Bindungsstellen	19
2.	AUFGABENSTELLUNG	21
3.	METHODIK	23
3.1	Geräte, Chemikalien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme	23

3.1.1	Geräte und Arbeitsmaterial	23
3.1.2	Chemikalien	24
3.1.3	Substanzen	25
3.1.4	Lösungen	27
3.1.4.1	Puffer für Festphasen-Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin	28
3.1.4.2	Puffer für Flüssigphasen-Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung	28
3.1.4.3	Puffer für Zell-Bindungsversuche mit THP-1-Zellen in Suspension	28
3.1.5	Computerprogramme	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Untersuchungen zur Bindung von β-Lipotropin(1-89) [β_{H}-LPH(1-89)] an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin, an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung sowie an THP-1-Zellen in Suspension	30
3.2.1.1	Liganden	30
3.2.1.1.1	Nicht markierte Liganden.....	30
3.2.1.1.2	Radioaktiv markiertes β_{H} -LPH.....	31
3.2.1.1.2.1	Markierung mit 125 Jod.....	31
3.2.1.1.2.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität des (125 I) β_{H} -LPH(1-89).....	32
3.2.1.2	Binder	32
3.2.1.2.1	Oberflächen-assoziiertes Vitronektin.....	32
3.2.1.2.1.1	Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Vitronektin.....	32
3.2.1.2.1.2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen.....	33
3.2.1.2.2	Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung: Aktivierung der β_{H} -LPH(1-89)-Bindungsstelle auf Vitronektin durch Inkubation des Vitronektins mit Heparin.....	33
3.2.1.2.3	Die Monozyten-Zelllinie THP-1 des Menschen.....	33

3.2.1.2.3.1	Kultivierung der Zellen.....	33
3.2.1.2.3.2	Herstellung der Zellsuspension.....	34
3.2.1.3	Vorversuche zum Ausschluß einer direkten Interaktion zwischen β_{H}-LPH(1-89) und Heparin bzw. zwischen β_{H}-LPH(1-89) und den mit Vitronektin interagierenden Substanzen.....	34
3.2.1.4	Durchführung der Bindungsversuche.....	35
3.2.1.4.1	Durchführung des Festphasen-Bindungsversuches mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin.....	35
3.2.1.4.2	Durchführung des Flüssigphasen-Bindungsversuches mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung.....	37
3.2.1.4.3	Durchführung des Bindungsversuchs mit THP-1-Zellen in Suspension.....	39
3.2.1.5	Auswertung der Bindungsversuche.....	42
3.2.1.5.1	Auswertung der Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin.....	42
3.2.1.5.2	Auswertung der Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung und mit THP-1-Zellen in Suspension.....	43
3.2.1.6	Charakterisierung der Bindung von (125 I)β_{H}-LPH an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin, an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung sowie an THP-1-Zellen in Suspension.....	44
3.2.1.6.1	Prinzip der Charakterisierung.....	44
3.2.1.6.1.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik).....	44
3.2.1.6.1.2	Reversibilität (OFF-Kinetik).....	45
3.2.1.6.1.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen.....	45
3.2.1.6.1.4	Sättigbarkeit.....	46
3.2.1.6.1.5	Bindungsparameter K_{D} und B_{max}	46
3.2.1.6.1.6	Strukturspezifität.....	47
3.2.1.6.1.7	Lokalisation der Bindungsstelle.....	47
3.2.1.6.2	Oberflächen-assoziiertes Vitronektin.....	48
3.2.1.6.2.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik).....	48
3.2.1.6.2.2	Reversibilität (OFF-Kinetik).....	49

3.2.1.6.2.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen.....	49
3.2.1.6.2.4	Sättigbarkeit.....	49
3.2.1.6.2.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}	49
3.2.1.6.2.6	Strukturspezifität.....	50
3.2.1.6.2.7	Lokalisation der Bindungsstelle auf Vitronektin.....	50
3.2.1.6.2.7.1	Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung.....	50
3.2.1.6.2.7.2	Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung.....	51
3.2.1.6.3	Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung.....	51
3.2.1.6.3.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik).....	51
3.2.1.6.3.2	Reversibilität (OFF-Kinetik).....	51
3.2.1.6.3.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen.....	52
3.2.1.6.3.4	Sättigbarkeit.....	52
3.2.1.6.3.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}	52
3.2.1.6.3.6	Strukturspezifität.....	53
3.2.1.6.3.7	Lokalisation der Bindungsstelle auf Vitronektin.....	53
3.2.1.6.3.7.1	Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung.....	53
3.2.1.6.3.7.2	Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung.....	53
3.2.1.6.4	THP-1-Zellen in Suspension.....	54
3.2.1.6.4.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik).....	54
3.2.1.6.4.2	Reversibilität (OFF-Kinetik).....	54
3.2.1.6.4.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen.....	55
3.2.1.6.4.4	Sättigbarkeit.....	55
3.2.1.6.4.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}	55
3.2.1.6.4.6	Strukturspezifität.....	56
3.2.1.6.4.7	Lokalisation der Bindungsstelle auf THP-1-Zellen.....	56
3.2.1.6.4.7.1	Prüfung von polyklonalen Antisera und monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Vitronektins auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	56

3.2.1.6.4.7.2	Prüfung verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	56
3.2.1.6.4.7.3	Prüfung von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Chemokin-Rezeptors CCR5 auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	57
3.2.2	Untersuchungen zur Internalisierung von β_H-LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension.....	57
3.2.3	Untersuchungen zum Einfluss der β_H-LPH(1-89)-Interaktion mit CCR5 auf die Infektiosität bestimmter HIV-1-Stämme bei P4R5-Magi-Zellen.....	58
4.	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle für β_H-LPH(1-89) auf Vitronektin.....	59
4.1.1	Charakteristika der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin.....	59
4.1.1.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik).....	59
4.1.1.2	Reversibilität (OFF-Kinetik).....	59
4.1.1.3	Abhängigkeit von der Konzentration an Bindungsstellen.....	60
4.1.1.4	Sättigbarkeit.....	61
4.1.1.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}.....	62
4.1.1.6	Strukturspezifität.....	63
4.1.1.7	Lokalisation der Bindungsstelle auf Oberflächen-assoziiertem Vitronektin.....	65
4.1.1.7.1	Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung.....	65
4.1.1.7.2	Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung.....	66
4.1.2	Charakteristika der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung.....	68

4.1.2.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)	68
4.1.2.2	Reversibilität (OFF-Kinetik)	68
4.1.2.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen	69
4.1.2.4	Sättigbarkeit	69
4.1.2.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}	71
4.1.2.6	Strukturspezifität	72
4.1.2.7	Lokalisation der Bindungsstelle auf Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung	73
4.1.2.7.1	Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung.....	73
4.1.2.7.2	Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung.....	75
4.2	Nachweis spezifischer Bindungsstellen für β_H-LPH(1-89) auf THP-1-Zellen in Suspension	77
4.2.1	Charakteristika der Bindung von β_H-LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_H-LPH (85-89) an THP-1-Zellen in Suspension	77
4.2.1.1	Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)	77
4.2.1.2	Reversibilität (OFF-Kinetik)	78
4.2.1.3	Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen	79
4.2.1.4	Sättigbarkeit	79
4.2.1.5	Bindungsparameter K_D und B_{max}	80
4.2.1.6	Strukturspezifität	82
4.2.1.7	Lokalisation der Bindungsstellen auf THP-1-Zellen in Suspension	83
4.2.1.7.1	Hinweise auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin auf THP-1-Zellen.....	83
4.2.1.7.1.1	Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	83
4.2.1.7.1.2	Einfluss eines monoklonalen Antikörpers (23C6) gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_V\beta_3$ auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	84
4.2.1.7.1.3	Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die β_H -LPH(1-89) Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	85

4.2.1.7.2	Hinweise auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) an den Chemokin-Rezeptor CCR5.....	86
4.2.1.7.2.1	Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	87
4.2.1.7.2.2	Beeinflussung der HIV-Infektion von P4R5-Magi-Zellen über die β_H -LPH(1-89)-Bindung an den Chemokin-Rezeptor CCR5.....	88
4.2.2	Charakteristika der Bindung von β_H-LPH(1-89) über sein Fragment β_H-LPH (76-85) an THP-1-Zellen in Suspension.....	90
4.2.2.1	Sättigbarkeit.....	90
4.2.2.2	Bindungsparameter K_D und B_{max}	91
4.2.2.3	Strukturspezifität.....	92
4.2.2.4	Lokalisation der Bindungsstellen auf THP-1-Zellen in Suspension: Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 auf die β_H-LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension.....	94
4.3	Internalisierung von β_H-LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension.....	95
5.	DISKUSSION.....	97
5.1	Methodik.....	97
5.1.1	Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin.....	97
5.1.2	Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung.....	98
5.1.3	Bindungsversuche mit THP-1-Zellen in Suspension.....	100
5.2	Ergebnisse.....	104

5.2.1	Mechanismus der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit THP-1-Zellen	104
5.2.1.1	Bindung von β_H-LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension	104
5.2.1.1.1	Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin in unterschiedlichen Fixierungszuständen.....	106
5.2.1.1.2	Bindung von β_H -LPH(1-89) an den Chemokin-Rezeptor CCR5.....	108
5.2.1.2	Internalisierung von β_H-LPH(1-89) in THP-1-Zellen	109
5.2.2	Bedeutung der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit THP-1-Zellen	110
5.2.2.1	Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit Zellen des Immunsystems im Vergleich mit anderen immunologisch bedeutsamen POMC-Fragmenten	110
5.2.2.2	β_H-LPH(1-89) als endokriner Modulator immunologischer Funktionen	112
5.2.2.3	Funktionelle Bedeutung der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit Monozyten und Vitronektin für Migrationsprozesse	113
5.2.2.4	Funktionelle Bedeutung der Interaktion von β_H-LPH(1-89) mit Monozyten für HIV-Infektionen	114
6.	ZUSAMMENFASSUNG	117
	SUMMARY	119
7.	LITERATURVERZEICHNIS	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Dimensionen:

Ci	Curie
Da	Dalton
G	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar (Mol/l)
min	Minute
s	Sekunde
v/v	volume/volume (Konzentration eines flüssigen Stoffes in einer Flüssigkeit)
w/v	volume/weight (Konzentration eines gelösten Feststoffes in einer Flüssigkeit)
m	milli- (10^{-3})
μ	mikro- (10^{-6})
n	nano- (10^{-9})

Aminosäuren:

Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glutamin
Lys	Lysin
Phe	Phenylalanin
Tyr	Tyrosin

Weitere Abkürzungen:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AT III	Antithrombin III
B_{\max}	Konzentration der Bindungsstellen
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C5b-9(m)	membran-gebundener, zytolytischer Komplementkomplex bestehend aus den Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 und C9
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
cpm	gemessene Zerfälle eines Radioisotops in einer Minute (counts per minute)

CRF	Corticotropin Releasing Factor
cRGD	Cyclisches RGD (siehe RGD)
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles`s Medium
D-PBS	Dulbecco`s phosphate-buffered saline
dpm	radioaktive Zerfälle eines Radioisotops in einer Minute (desintegrations per minute)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	extracellular loop
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
β_H -Endorphin	humanes β -Endorphin
FCS	Fetales Kälberserum
HK	High molecular weight kininogen
Hka	High molecular weight kininogen in gespaltener Form
HIV	Human immunodeficiency virus
IL	Interleukin
JP	Joining peptide
K_D	Dissoziationskonstante
β_H -LPH	humanes β -Lipotropin
MCP	monocyte chemotactic protein
MC-Rezeptoren	Melanocortin-Rezeptoren
MIP	macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-POC	N-terminales POMC-Fragment
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PC	Prohormonconvertase
PN-1	Protease Nexin-1
POMC	Proopiomelanocortin
RANTES	regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
RGD	Arg-Gly-Asp im Einbuchstaben-Code der Aminosäuren
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Nährmedium für normale und neoplastische Leukozyten, entwickelt von Moore et al., Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
SC5b-9	nicht membran-gebundener, nicht zytolytischer terminaler Komplementkomplex bestehend aus den Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 und C9
suPAR	löslicher Urokinase-Rezeptor
uPa	Urokinase (urokinase-like Plasminogen activator)
uPAR	Urokinase-Rezeptor
U	Umdrehungen

1. EINLEITUNG

1.1 Proopiomelanocortin und Proopiomelanocortinfragmente

Erst vor wenigen Jahrzehnten wurde Proopiomelanocortin als gemeinsamer Precursor des seit langem bekannten ACTH und einer Reihe weiterer Peptidhormone entdeckt (MAINS et al., 1977; NAKANISHI et al., 1979). Inzwischen weiß man, dass das POMC-Gen phylogenetisch sehr alt ist: es findet sich von den höchsten bis zu den niedrigsten Wirbeltieren und wahrscheinlich sogar bei Wirbellosen (DENEFF and VAN BAEL, 1998; SALZET et al., 1997). Diese weite Verbreitung läßt auf eine wichtige biologische Funktion des POMC und seiner Fragmente schließen, die noch längst nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

1.1.1 Vorkommen und Struktur

Den Hauptort der Expression des Proopiomelanocortins stellt der Hypophysenvorderlappen dar. Auch in Teilen des zentralen Nervensystems, vor allem im Nucleus arcuatus des Hypothalamus und im Nucleus tractus solitarii des Hirnstamms konnte die Expression von POMC nachgewiesen werden. Eine Reihe peripherer Gewebe wie z.B. Nebenniere, Gonaden, Milz, Niere, Lunge, Schilddrüse, Leber und Gastrointestinaltrakt (DEBOLD et al., 1988) sowie Zellen des Immunsystems (OATES et al., 1988) stellen weitere Orte der POMC-Expression dar.

Die Struktur des POMC-Gens konnte 1983 von Takahashi aufgeklärt werden (TAKAHASHI et al., 1983). Es besteht aus 7665 Basenpaaren und umfaßt drei Exons (Exon 1: 86 bp, Exon 2: 152 bp, Exon 3: 833 bp) sowie zwei Introns (Intron A: 3708 bp, Intron B: 2886 bp). Die genetische Information für das gesamte POMC wird mit Ausnahme der Signalsequenz und der ersten 18 Aminosäuren, welche von Exon 2 kodiert werden, durch Exon 3 kodiert.

1.1.2 Expression und Prozessierung

Die Hypophyse als Ort der quantitativ bedeutendsten POMC-Synthese ist bezüglich der Spaltung und der posttranslationalen Modifikationen der entstehenden Fragmente am besten untersucht. Die Hypophyse von niederen

Säugetieren gliedert sich in drei Lappen, Vorder-, Zwischen- und Hinterlappen, in denen unterschiedliche Zellarten lokalisiert sind. POMC-Synthese findet sich sowohl in den kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens als auch in den melanotrophen Zellen des Zwischenlappens. In Abhängigkeit von der synthetisierenden Zellart finden sich Unterschiede in Quantität und Qualität der synthetisierten Fragmente.

In den kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens erfolgt die Spaltung in ACTH, β -Lipotropin (β -LPH) und pro- γ -Melanozytenstimulierendes Hormon (pro- γ -MSH). Ein geringer Teil des β -LPH wird nachfolgend in β -Endorphin und γ -Lipotropin (γ -LPH) gespalten. Hauptsächlich für die Spaltung verantwortlich ist das Enzym "prohormone convertase 1" (PC 1). In den melanotrophen Zellen des Zwischenlappens der Hypophyse entstehen die gleichen Fragmente wie in den kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens. Durch weitere Enzymsysteme erfolgt die Spaltung in kleinere Fragmente mit anderer biologischer Aktivität. ACTH wird gespalten in α -Melanozytenstimulierendes Hormon (α -MSH) und Corticotropin-like-intermediate-lobe-peptide (CLIP). Aus β -LPH entstehen β -Endorphin und γ -LPH. γ -LPH bildet die Vorstufe für β -MSH. Aus pro- γ -MSH geht eine Reihe kleiner Fragmente hervor wie z.B. γ -MSH und Joining-peptide (JP). Ein Teil der entstehenden Fragmente wird im Anschluß C-terminal amidiert oder N-terminal acetyliert (CASTRO and MORRISON, 1997).

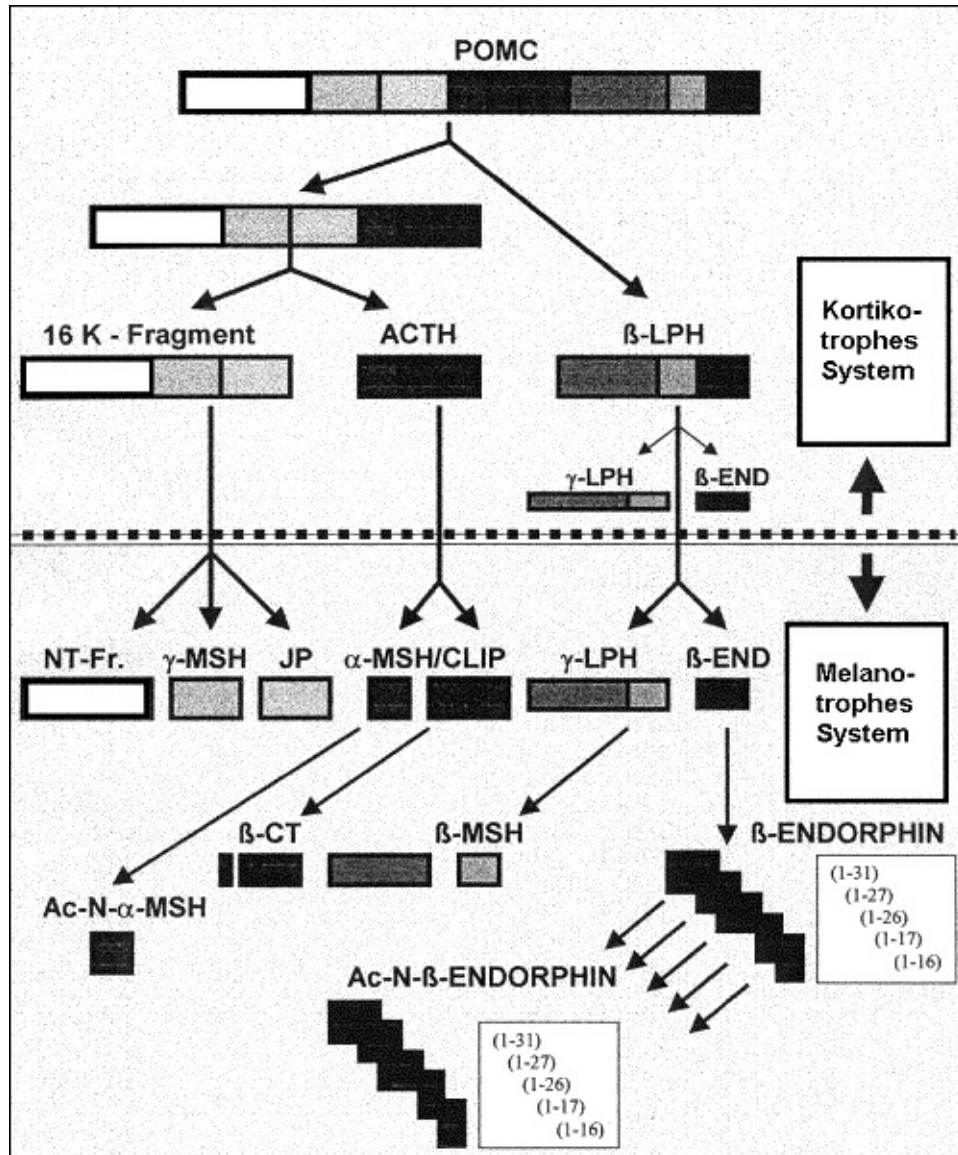


Abb.1: Struktur und Prozessierung des Proopi melanocortins.

ACTH: Adrenocorticotropes Hormon; β – bzw. γ -LPH: β – bzw. γ -Lipotropin; β -End: β -Endorphin(1-31); NT-Fr.: N-terminales POMC-Fragment; α -, β -oder γ -MSH: α -, β -oder γ -Melanozyten stimulierendes Hormon; JP: “Joining peptide”; CLIP: Corticotropin-like intermediate lobe peptide; β -CT: β -Cell-Tropin; Ac-N- α -MSH bzw. Ac-N- β -Endorphin: N-Acetyl- α -MSH bzw. N-Acetyl- β -Endorphin (modifiziert nach TESCHEMACHER, 2003).

Beim Menschen findet sich zumindest im Erwachsenenalter im Gegensatz zu niederen Säugetierspezies kein Hypophysenzwischenlappen. Daher ist eine strenge morphologische Zweiteilung in kortikotrophes und melanotrophes System in der adulten Hypophyse nicht zu finden. Es gibt jedoch Hinweise, dass die POMC-exprimierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens sowohl

über das kortikotrophe als auch über das melanotrophe Prozessierungssystem verfügen (EVANS et al., 1994).

Die verschiedenen Enzymsysteme unterliegen unterschiedlichen regulatorischen Einflüssen. In den kortikotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens wird die Synthese der POMC-Fragmente durch Glucokortikoide und Dopamin gehemmt. Im Gegensatz dazu wird die POMC-Synthese im Intermediärlappen durch Glucokortikoide nicht beeinflusst, zeigt aber unter Einwirkung von Dopamin ebenfalls einen Rückgang (MURBURG et al., 1993). Dass die POMC-Synthese im Sinne einer negativen feed-back-Kontrolle durch adrenale Steroide reguliert wird, konnte durch Zunahme der POMC-mRNA Spiegel nach Adrenalektomie gezeigt werden (BIRNBERG et al., 1983). LOEFFLER et al. (1985) fanden eine Zunahme des POMC-mRNA-Spiegels im Hypophysenvorderlappen von Ratten durch Corticotropin-Releasing-Faktor CRF. Eine Zunahme von POMC-Fragmenten unter CRF-Einfluss konnte auch für den Menschen nachgewiesen werden (STALLA et al., 1986).

1.1.3 Funktion

Die Tatsache, dass POMC-Synthese an derartig vielen und wesentlichen Positionen im menschlichen Organismus vorkommt, läßt auf eine weitreichende funktionelle Bedeutung der POMC-Systeme schließen. Allerdings gibt es über die Funktion von POMC und POMC-Fragmenten bisher wenig gesicherte Erkenntnisse.

Seit langem ist die vermehrte Freisetzung von POMC-Fragmenten aus der Hypophyse ins Blut unter Stressbedingungen nachgewiesen (LIM and FUNDER, 1983). Daraus leitete sich schon frühzeitig die Hypothese ab, dass POMC-Fragmente in der "Stress-Adaptation" des Organismus eine Rolle spielen könnten. ACTH als "Stresshormon" ist gut untersucht, ohne dass aber die Wirkungen vollständig geklärt werden konnten. Die Funktion der anderen hypophysären POMC-Fragmente ist wesentlich unklarer.

Für das hypothalamische POMC-System belegen neuere Forschungen eine funktionelle Bedeutung in der Regulierung des Körpergewichts durch Einfluss auf Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel (SATOH et al., 1998, FRIEDMANN and HALAAS, 1998; CONE, 1999).

Auch den peripheren POMC-Systemen kommt vermutlich eine spezifische funktionelle Bedeutung zu. So scheint z.B. von Hautzellen freigesetztes α -MSH im Rahmen des Pigmentschutzes der Haut und im lokalen Immunsystem eine Rolle zu spielen (SLOMINSKI et al., 2000).

Da das hypophysäre POMC-System zuerst entdeckt wurde und hypophysär exprimierte POMC-Fragmente quantitativ den bedeutendsten Teil ausmachen, konzentrierte sich eine Vielzahl von Untersuchungen auf Fragmente dieses POMC-Systems.

ACTH

Als Hauptziel des von den kortikotrophen Zellen synthetisierten ACTH ist seit langem die Nebennierenrinde bekannt. ACTH führt über spezifische Rezeptoren (MC2-Rezeptoren) zu gesteigerter Synthese und Freisetzung von Glucokortikoiden aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Über Glucokortikoide übt ACTH indirekt katabole Wirkungen auf den Stoffwechsel aus und bewirkt eine Steigerung der Lipolyse. Ein großer Teil der immunologischen Wirkungen von ACTH wie Entzündungshemmung und Immunsuppression wird ebenfalls indirekt durch Glucokortikoide vermittelt. Zusätzlich zu den Glucokortikoiden nimmt ACTH auch Einfluss auf die Freisetzung der Mineralokortikoide aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Über diese Mineralokortikoide greift ACTH indirekt in den Wasser- und Elektrolythaushalt ein.

Im Immunsystem sind neben den durch Glucokortikoide vermittelten indirekten ACTH-Wirkungen auch direkte Wirkungen bekannt. ACTH kann modulierend in die Funktion von drei Zellarten des Immunsystems eingreifen: T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen.

α -MSH

Seit mehr als 50 Jahren ist bekannt, dass α -MSH im Rahmen der Pigmentierung der Haut eine Rolle spielt. Erst kürzlich nachgewiesene Mutationen im POMC-Gen, die zur Entstehung des sog. POMC-Mangelsyndroms führen, bestätigen und ergänzen diese Entdeckungen. Dieses Krankheitsbild ist charakterisiert durch Nebenniereninsuffizienz, schwere

Fettsucht im Kindesalter, rote Pigmentierung der Haare und sehr helle Hautfarbe (KRUDE and GRÜTERS, 2000). Zusätzlich zur Hautpigmentierung scheint α -MSH auch an der Pigmentierung der Haare mitzuwirken. Diese Haut- und Haarpigmentierung wird über den MC1-Rezeptor in Melanozyten der Epidermis und der Haarfollikel vermittelt. Aktivierung dieses Rezeptors führt zu verstärkter Pigmentierung, während das Fehlen des Liganden (oder auch Defekte im Rezeptor) zu dem für das POMC-Mangelsyndrom typischen Phänotyp mit heller Haut und rotem Haar führt. Umgekehrt sind Fälle von Hyperpigmentierung nach exzessiver α -MSH-Sekretion aus der Hypophyse beschrieben worden (PEARS et al., 1992).

Für α -MSH sind auch Funktionen im Immunsystem bekannt. CATANIA and LIPTON (1994) zeigten α -MSH als wichtigen Modulator im Rahmen akuter und chronischer Entzündungen. Diese periphere antiinflammatorische Wirkung des POMC-Fragments wird sowohl über periphere als auch über zentrale Mechanismen vermittelt. Über zentrale Mechanismen wirkt α -MSH des Weiteren antipyretisch. Diese immunologischen Wirkungen des α -MSH beruhen auf einem hemmenden Einfluss auf die Wirkung verschiedener Zytokine (WEISS et al., 1991). Auf Grund dieser antagonistischen Wirkung auf Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor, Interferon γ) scheint α -MSH einen präventiven Effekt z.B. im Rahmen der rheumatoiden Arthritis auszuüben (CERIANI et al., 1994), in deren Pathogenese einem Teil der genannten Zytokine eine wesentliche Bedeutung zukommt (RIDDERSTAD et al., 1991).

β -Endorphin

GUILLEMIN et al. (1977) und LIM and FUNDER (1983) konnten nachweisen, dass unter mentalem und physischem Stress nicht nur ACTH, sondern auch β -Endorphin aus der Hypophyse vermehrt ausgeschüttet wird. Eine gesteigerte β -Endorphin-Freisetzung wurde auch unter dem Einfluss sog. moderner Stressoren wie Marathonlauf (HEITKAMP et al., 1993) und Bungee-Jumping (HENNING et al., 1994) beobachtet. Nähere Kenntnisse über die Funktion von β -Endorphin unter Stressbedingungen gibt es allerdings bisher nicht.

Vermutet wird für das sowohl von den kortikotrophen als auch von den melanotrophen Zellen gebildete β -Endorphin auch eine Rolle innerhalb des Immunsystems, da eine große Zahl von Untersuchungen Wirkungen von β -Endorphin auf verschiedene Zellen des Immunsystems zeigen konnten. Der Nachweis der Synthese von β -Endorphin in Zellen des Immunsystems, z.B. in Makrophagen (LOLAIT et al., 1984; LOLAIT et al., 1986), unterstützt diese Hypothese. β -Endorphin stellt einen chemotaktischen Faktor für Monozyten sowohl in vitro (VAN EPPS and SALAND, 1984) als auch in vivo dar (SALAND et al., 1983). Es stimuliert die Produktion von Superoxidanionen in myeloischen Zellen (SHARP et al., 1985) und fördert die Interferonproduktion (BROWN and VAN EPPS, 1986). Auch die Proliferation von Lymphozyten (GILMAN et al., 1982) sowie die Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten (CARR and KLIMPEL, 1986) wird durch β -Endorphin gefördert. MATHEWS et al. (1983) berichten von einer durch β -Endorphin gesteigerten Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Andere Arbeitsgruppen dagegen fanden im Tierversuch trotz erhöhter β -Endorphin-Spiegel verminderte Aktivität der NK-Zellen (SHAVIT et al., 1984). Neben diesen genannten Effekten von β -Endorphin, die durch ihre Antagonisierbarkeit mittels des Opiatantagonisten Naloxon gekennzeichnet und damit als über klassische Opioid-Rezeptoren vermittelt zu betrachten sind, konnten eine Reihe weiterer, nicht durch Naloxon antagonisierbare Interaktionen mit Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (siehe unter 1.2.2.2).

Neueste Untersuchungen konnten nachweisen, dass β -Endorphin auch im Rahmen des komplexen Prozesses der Wundheilung eine Rolle spielt: β -Endorphin stimuliert die Migration von Keratinozyten (BIGLIARDI et al., 2002), fördert die Expression von Cytokeratin 16 und transforming growth factor β Typ II (BIGLIARDI et al., 2003).

β -Lipotropin

β -Lipotropin besitzt als direktes Vorläufermolekül des β -Endorphins dessen für die Non-Opioid-Bindung an Immunzellen relevante Strukturen in Form des C-Terminus sowie des Mittelfragments, so dass auch für dieses Fragment Interaktionen mit Zellen des Immunsystems vermutet werden können. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung, dass β -Lipotropin den

bedeutendsten Anteil des β -Endorphin-immunoreaktiven Materials im Plasma gesunder Probanden darstellt (McLOUGHLIN et al., 1993). In akuten Stressepisoden wie septischer Schock und Herzstillstand konnte eine deutlich stärkere Zunahme der β -Lipotropin-Konzentration im Vergleich zur Zunahme der Konzentration von β -Endorphin nachgewiesen werden (McLOUGHLIN et al., 1988; WORTSMAN et al., 1985). Obwohl diese Befunde eine physiologische Bedeutung von β -Lipotropin im Rahmen von Stresssituationen vermuten lassen, wurden Untersuchungen zur Funktion von β -Lipotropin beim Menschen in der Vergangenheit selten durchgeführt. Die Funktion dieses Hypophysenhormons beim Menschen ist daher bis heute völlig unklar.

1.2 β -Endorphin: Rezeptoren und Bindungsstellen

1.2.1 Opioidrezeptoren

Die Kenntnisse über die Wirkung exogener Opiode sowie die Antagonisierbarkeit dieser Wirkungen durch den Opiat-Antagonisten Naloxon führte zur Suche nach spezifischen Rezeptoren für diese Substanzen.

Anfang der siebziger Jahre gelang erstmals der Nachweis solcher "Opioidrezeptoren" im Gehirn (PERT and SNYDER, 1973; SIMON et al., 1973; TERENIUS, 1973). Es stellte sich heraus, daß es "den" Opioidrezeptor nicht gibt, sondern dass vielmehr mehrere Typen von Rezeptoren existieren, die über ihre spezifische Affinität zu verschiedenen Liganden und die Unterschiede der durch sie vermittelten Wirkung definiert wurden (MARTIN et al., 1976; Lord et al., 1977).

Heute geht man von der Existenz dreier verschiedener Rezeptortypen aus, der μ -, δ - und κ -Rezeptoren, von denen zum Teil noch mehrere Subtypen bekannt sind (siehe bei PASTERNAK and WOOD, 1986; PORTOGHESE et al., 1992). Nach neuerer Nomenklatur werden die Opioidrezeptoren auch als OP_1 (δ -Rezeptor), OP_2 (κ -Rezeptor) und OP_3 (μ -Rezeptor) bezeichnet.

Die Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bewirken durch Hemmung der Adenylatzyklase eine Inhibition der Bildung von cAMP. Alle Opioidrezeptoren zeigen Affinität zu dem Opiat-Antagonisten Naloxon, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Interaktion von Naloxon mit Opioidrezeptoren bewirkt eine Hemmung der über sie vermittelten Wirkung.

Das POMC-Fragment β -Endorphin wirkt an allen drei Typen von Opioidrezeptoren als Agonist, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität. Die geringste Affinität besteht zu δ -Rezeptoren.

Agonisten an μ -Rezeptoren wirken analgetisch (überwiegend auf supraspinaler Ebene) und erzeugen Euphorie, Sedierung, Atemdepression sowie Abhängigkeit. Agonisten an δ - und κ -Rezeptoren wirken ebenfalls analgetisch (überwiegend auf spinaler Ebene), über den κ -Rezeptor werden zusätzlich atemdepressive sowie sedierende Effekte vermittelt.

1.2.2 Non-Opioid-Bindungsstellen

Neben diesen verschiedenen Typen von Opioidrezeptoren sind eine Reihe weiterer Bindungsstellen für Opioidpeptide bekannt, sog. Non-Opioid-Bindungsstellen. Non-Opioid-Bindungsstellen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung des Liganden nicht durch Opiat-Antagonisten wie Naloxon beeinflusst werden kann. Ein weiterer Unterschied zu den Opioidrezeptoren besteht in der für die Bindung relevanten Teilsequenz des Opioidpeptides. Während für die Bindung an Opioid-Rezeptoren die N-terminale Sequenz des β -Endorphins von Bedeutung ist, kommt die Bindung an Non-Opioid-Bindungsstellen über den C-Terminus oder das Mittelfragment (POLOCZEK, 2002) des β -Endorphins zustande.

Non-Opioid-Bindungsstellen finden sich auf einer Reihe von Makromolekülen (SCHWEIGERER et al., 1982; HILDEBRAND et al., 1989) sowie auf einer großen Zahl verschiedener Zellen (DAVE et al., 1985), insbesondere auf Zellen des Immunsystems (siehe 1.2.2.2).

1.2.2.1 Non-Opioid-Bindungsstellen auf Makromolekülen

Non-Opioid-Bindungsstellen aufweisende Makromoleküle konnten innerhalb des humoralen Immunsystems in Gestalt des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 sowohl in zytolytisch aktiver Form als C5b-9(m) als auch in der nicht zytolytisch aktiven Form SC5b-9 nachgewiesen werden (SCHWEIGERER et al., 1983). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit waren Untersuchungen von HILDEBRAND et al. (1989), die das Vitronektin (S-Protein) als Träger spezifischer Non-Opioid-Bindungsstellen für β_H -Endorphin(1-31) identifizieren konnten.

1.2.2.1.1 Vitronektin und Vitronektin-Komplexe

Vitronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, das im Blutplasma des Menschen (PREISSNER et al., 1985), aber auch in der extrazellulären Matrix verschiedener Gewebe (HAYMAN et al., 1983) nachweisbar ist. Durch die Gliederung in räumlich und funktionell voneinander getrennte Domänen ist das Vitronectin-Molekül zur Interaktion und Komplexbildung mit einer Vielzahl von Membranrezeptoren und Proteinen befähigt, was seinen multifunktionellen Charakter bedingt. Auf Grund seiner Multifunktionalität kann Vitronectin als Bindeglied zwischen Zelladhäsionsvorgängen, Gerinnungs- und Immunsystem fungieren.

1.2.2.1.1.1 Vorkommen und Struktur

Die Synthese von Vitronectin findet hauptsächlich in der Leber statt. Die Konzentration des von den Hepatozyten in die Blutbahn sezernierten Vitronectins beträgt 0,3 bis 0,5 mg/ml (PREISSNER et al., 1985). Neben der Leber konnte Vitronectin in einer Reihe zellulärer Strukturen wie Thrombozyten (PREISSNER et al., 1989) sowie Monozyten und Makrophagen (HETLAND et al., 1989), aber auch in der Extrazellulärmatrix verschiedener gesunder und pathologisch veränderter Gewebe nachgewiesen werden (DAHLBÄCK et al., 1986; FALK et al., 1987; NICULESCU et al., 1987; EIKELNBOOM et al., 1994; LORIDON-ROSA et al., 1988). Vitronectin ist ein saures α_1 -Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa. Im Blutkreislauf zirkulierendes Vitronectin kommt in zwei verschiedenen Formen vor, einer einkettigen (65 kDa) und einer zweikettigen (65 + 10 kDa) (BARNES et al., 1983). Die Sequenz des sezernierten Vitronectins umfaßt 459 Aminosäuren und läßt sich in verschiedene funktionelle Bereiche untergliedern.

Der Aminoterminus des Peptides mit 44 Aminosäuren ist identisch zur Sequenz des Somatomedin B (FRYKLUND and SIEVERTSON, 1978; SUZUKI et al., 1984), einem Serumpeptid, dem irrtümlicherweise Eigenschaften als Wachstumsfaktor zugesprochen wurden (FRYKLUND and SIEVERTSON, 1978).

Direkt benachbart der Somatomedin B-Domäne findet sich die sog. Zelladhäsionsdomäne, für deren adhäsive Fähigkeiten die ersten drei

Aminosäuren Arg-Gly-Asp verantwortlich sind, die sich auch in anderen Adhäsivproteinen wie Fibrinogen oder von-Willebrand-Faktor wiederfinden (PIERSCHBACHER and ROUSOLAHTI, 1984). Diese Aminosäuresequenz wird auch als RGD-Sequenz bezeichnet (entsprechend dem Einbuchstaben-Code für Aminosäuren).

Den größten Bereich des Moleküls nimmt die sog. Hämapexin-artige Domäne ein, deren Sequenz Homologien zu den Sequenzen des Hämapexins und interstitieller Kollagenase aufweist (STANLEY, 1986; JENNE and STANLEY, 1987).

Den C-terminalen Abschnitt des Vitronektins bildet die sog. Glykosaminoglykan-Bindungsdomäne, die durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren ausgezeichnet ist, was z. B. die Interaktion mit Heparin, einem polyanionischen Glykosaminoglykan, ermöglicht. Auch andere funktionell wichtige Liganden wie Plasminogen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und Komplementfaktoren üben ihre Interaktionen mit Vitronektin über diese Domäne aus (SUZUKI et al., 1984; PREISSNER et al., 1990; TSCHOPP et al., 1988; KOST et al., 1992).

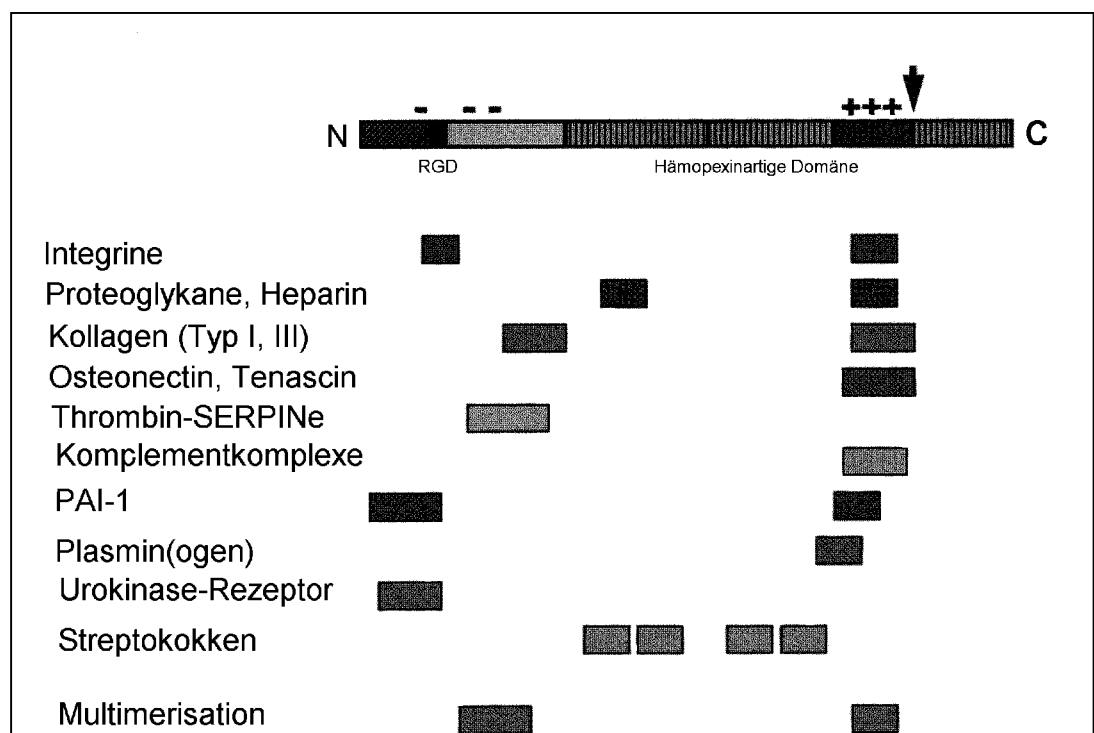


Abb.2: Struktur des Vitronektins mit Ligand-Bindungsdomänen. N: N -terminales Ende des Vitronektin-Moleküls; C: C-terminales Ende des Vitronektin-Moleküls; RGD: Zelladhäsionsdomäne; ---: saure

Aminosäuren in der N-terminalen Region; +++: basische Aminosäuren innerhalb der Glykosaminoglykan-Bindungsstelle (modifiziert nach PREISSNER and SEIFFERT, 1998).

Für die Funktion des Vitronektin kommt vor allem der Tertiärstruktur des Moleküls eine große Bedeutung zu. Der Hauptanteil des im Plasma vorkommenden Vitronektins liegt in gefalteter Form vor, wobei eine negativ geladene Region in der Nähe des N-Terminus mit einer stark positiv geladenen Region im Bereich des C-Terminus interagiert, was eine Einfaltung und intramolekulare Stabilisierung des Moleküls zur Folge hat (PREISSNER and MÜLLER-BERGHAUS, 1987; JENNE et al., 1989).

Eine Konformationsänderung des Vitronektin-Moleküls führt zur Freilegung von im gefalteten Protein nicht zugänglichen Bindungsstellen für verschiedene Liganden. Bedingungen, unter denen es zur Änderung der Konformation des Vitronektin-Moleküls kommt, sind z. B. die Denaturierung des Proteins, die Assoziation an Oberflächen, die Komplexbildung mit Thrombin bzw. Antithrombin III, die Inkubation mit Heparin in hohen Konzentrationen oder die Integration in die extrazelluläre Matrix (HAYASHI et al., 1985; TOMASINI and MOSHER, 1988; HILDEBRAND et al., 1989; PREISSNER et al., 1990).

1.2.2.1.1.2 Funktionen

Zelladhäsion

Erstmals als "serum-spreading-factor" mit auffallender Fähigkeit zur Adsorption an Glasoberflächen ("Vitro"- "Nektin") beschrieben (HOLMES, 1967), fördert Vitronektin die Anheftung und Ausbreitung von Zellen (BARNES et al., 1983). Diese Fähigkeiten werden über die Zelladhäsionsdomäne RGD vermittelt. Die Interaktion mit zellulären Strukturen findet über Vitronektin-Rezeptoren statt, sog. Integrine, die sich aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Einheit, zusammensetzen. Von beiden Untereinheiten existieren verschiedene Typen, deren Kombination das Vorhandensein mehrerer Vitronektin-Rezeptoren zur Folge hat. Diese sind durch unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Liganden definiert.

Die adhäsiven Eigenschaften des Vitronektins und die Zellausbreitung können durch Interaktion des Vitronektins mit verschiedenen Proteinen z.B. high

molecular weight kininogen (HK) sowie dem aus HK durch Kallikrein freigesetzten HKa (2-chain kinin-free HK) behindert werden (ASAKURA et al., 1992).

Blutgerinnung und Fibrinolyse

Auf Grund seiner Interaktion mit Heparin, Plasminogen und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) sowie auch mit Thrombin-Antithrombin III-Komplexen kommt Vitronektin eine funktionelle Bedeutung im Gerinnungssystem zu. Die Fähigkeit zur Neutralisierung der durch Heparin beschleunigten Inaktivierung von Thrombin (PREISSNER et al., 1985; PODACK et al., 1986) und Faktor Xa (PREISSNER and MÜLLER-BERGHAUS, 1987) verleiht Vitronektin prokoagulatorische Wirkungen. Diese Neutralisierung von Heparin durch Vitronektin beruht auf direkter Wechselwirkung der beiden Moleküle (PREISSNER and MÜLLER-BERGHAUS, 1987).

Das im Plasma vorhandene Vitronektin befindet sich zum größten Teil in gefalteter Form. In diesem Zustand ist die Bindung von Heparin an Vitronektin nicht möglich. Erst nach Konformationsänderung des Vitronektins durch Assoziation an Oberflächen oder durch Komplexbildung mit Thrombin bzw. Antithrombin III beispielsweise wird die Heparinbindungsstelle freigelegt und damit die Bindung von Heparin an Vitronektin ermöglicht.

Mit dem Thrombin-Antithrombin III-Komplex kann Vitronektin unabhängig von der Gegenwart von Heparin ternäre Assoziate bilden (PREISSNER et al., 1987). Auch dieses ternäre Assoziat scheint an der Heparin-Neutralisierung beteiligt zu sein.

Die antifibrinolytische Wirkung des Vitronektins wird über Interaktion mit Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) vermittelt, deren bekanntesten Vertreter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) darstellt. Durch Komplexbildung mit Vitronektin wird PAI-1 im Blut und in der extrazellulären Matrix stabilisiert (DECLERCK et al., 1988; MIMURO and LOSKUTOFF, 1989). Die Stabilisierung von PAI-1 hat möglicherweise die Funktion, eine zu frühzeitige Aktivierung des Fibrinolyseystems bereits während des Gerinnungsvorgangs zu verhindern (PREISSNER et al., 1990). Vitronektin scheint eines der bedeutendsten, vielleicht sogar das einzige PAI-1

Bindungsprotein zu sein. Die Interaktion der beiden Moleküle ist wahrscheinlich über mehrere Regionen des Vitronektin-Moleküls möglich. Eine Bindungsstelle für PAI-1 innerhalb der Heparinbindungsdomäne konnte von PREISSNER et al. (1990) sowie KOST et al. (1992) lokalisiert werden, während SEIFFERT and LOSKUTOFF (1991) eine Bindungsstelle für PAI-1 innerhalb der Somatomedin B-Domäne des Vitronektin-Moleküls fanden.

KANSE et al. (1996) erbrachten den Nachweis der Vitronektin-Bindung an Zellen des Gefäßendothels über den Urokinase-Rezeptor (uPAR), einem auf einer Vielzahl von Zellen exprimierten, über Glykolipide in der Zellmembran verankerten Rezeptor. Die Festigkeit der Vitronektin-Bindung an diesen Rezeptor wird durch Anwesenheit von Urokinase (oder urokinase-like-plasminogen-activator uPA), dem natürlichen Liganden des uPAR, erheblich gesteigert. Zusätzlich zu der zellmembrangebundenen Form des uPAR konnte von MIZUKAMI et al. (1995) die Existenz einer löslichen Form des Rezeptors (soluble Urokinase-Rezeptor suPAR) im Plasma nachgewiesen werden. Auch dieser lösliche uPAR ist in der Lage, sowohl mit uPA als auch mit Vitronektin zu interagieren. Durch die Bindung von uPAR/suPAR-Komplexen an zellassoziiertes oder in der extrazellulären Matrix befindliches Vitronektin kann die durch uPA induzierte Plasminogenaktivierung konzentriert und neu verteilt werden (CHAVAKIS et al., 1998). Auf diese Weise kommt es zur Akkumulierung von Plasminogenaktivatoren an Orten, die besonders hoher Plasminogenaktivator-Aktivität bedürfen, z.B. im Rahmen von Zellmigration oder Gewebeumbauprozessen.

Immunsystem

Auch innerhalb des Immunsystems konnten bedeutende funktionelle Einflüsse des Vitronektins nachgewiesen werden. Vitronektin in nativer Form bindet an bestimmte grampositive und gramnegative Bakterien, z.B. an Streptokokken-Species, Staphylokokkus aureus oder Escherichia coli. Für diese Wechselwirkungen des Vitronektin-Moleküls mit Bakterien scheinen zwei verschiedene Bindungsstellen innerhalb des Vitronektin-Moleküls verantwortlich zu sein (CHHATWAL et al., 1987). Diese Bindung von Vitronektin an Bakterien könnte eine Opsonisierung der Bakterien bewirken. Dadurch könnten die Bakterien besser von Makrophagen erkannt werden, was

eine beschleunigte Phagozytose im Rahmen entzündlicher Prozesse zur Folge haben könnte.

Zusätzlich zu dieser Interaktion mit Bakterien konnte die Bindung von Vitronektin an Komplementfaktoren gezeigt werden. Das "S-Protein", welches sich später als identisch mit Vitronektin herausstellte, wurde als inhibierende Komponente der terminalen Phase der Komplementreaktion entdeckt (KOLB and MÜLLER-EBERHARD, 1975; PODACK and MÜLLER-EBERHARD, 1978). Diese hemmende Wirkung beruht zum einen auf der Assoziation von Vitronektin mit dem C5b-7 Komplex, einer Vorstufe des terminalen Komplementkomplexes C5b-9, zum anderen auf der unter Vitronektin-Einfluss ausbleibenden Polymerisation von C9. Durch die in Abwesenheit von Vitronektin stattfindende Polymerisation von C9 entsteht eine die Zellmembran zerstörende Pore (PODACK et al., 1984). Auf diese Weise hemmt Vitronektin die Komplement-vermittelte Lyse von Zellen.

β -Endorphin

HILDEBRAND et al. (1988) konnten auch das Opioidpeptid β -Endorphin als Interaktionspartner von Vitronektin identifizieren. In nativer Form ist Vitronektin nicht zur Bindung von β -Endorphin fähig. Erst nach Konformationsänderung des Vitronektin-Moleküls durch Interaktion mit Heparin kommt es zur Exposition von zuvor verborgenen, hochspezifischen Bindungsstellen, welche die Bindung des Opioidpeptides β -Endorphin (über seinen C-Terminus) ermöglicht (HILDEBRAND et al., 1988). Die Bindungsstelle für β -Endorphin konnte im mittleren Bereich des Vitronektin-Moleküls ermittelt werden (WÖHNER, 1998).

Angesichts der fehlenden Kenntnisse über die Funktionen des β -Endorphins in der Peripherie können auch über die funktionelle Bedeutung einer Interaktion von β -Endorphin mit Vitronektin nur Hypothesen aufgestellt werden. Die für β -Endorphin vermuteten und für Vitronektin bekannten Effekte im Immunsystem lassen jedoch ein Zusammenspiel beider Substanzen im Rahmen immunologischer Prozesse möglich erscheinen.

Inwieweit auch andere POMC-Fragmente, die die C-terminale Sequenz des β -Endorphin enthalten, wie z.B. β -LPH, zur Bindung an Vitronektin in der Lage sind, ist bisher nicht untersucht.

1.2.2.1.2 Chemokin-Rezeptoren: CCR5

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die von einer Vielzahl von Zellen freigesetzt werden und die Migration von Makrophagen, T-Lymphozyten und Granulozyten an Orte der Entzündung bewirken.

Abhängig von der Anordnung der Cystein-Reste im Aminoterminus unterscheidet man verschiedene Klassen von Chemokinen, die CXC-Chemokine, deren Cystein-Reste durch eine Aminosäure getrennt sind, und die CC-Chemokine, denen diese Aminosäure fehlt.

Die Familie der CC-Chemokine, die MIP (makrophage-inflammatory-protein)-1 α , MIP-1 β , RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), MCP (monocyte chemotactic protein) 1-3 und Eotaxin umfaßt, wirkt in erster Linie chemotaktisch auf T-Zellen, Monozyten sowie eosinophile und basophile Granulozyten, während die Familie der CXC-Chemokine ihre chemotaktische Wirkung hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten ausübt.

Alle Chemokine binden an spezifische Chemokin-Rezeptoren, die der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören und aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt sind. Sie umfassen eine N-terminale Domäne, drei extra- und intrazelluläre Schleifen sowie ein zytoplasmatisches C-terminales Ende.

Für die Familie der CC-Chemokine sind fünf verschiedene Rezeptoren bekannt, die durch unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Chemokinen gekennzeichnet sind. Der CC-Chemokin-Rezeptor 1 (CCR1) bindet spezifisch MIP-1 α , RANTES und MCP-3, während CCR2a und CCR2b MCP-1 und MCP-3 binden. Der auf eosinophilen Granulozyten exprimierte Rezeptor CCR3 erkennt nur Eotaxin. CCR4, welcher auf basophilen Granulozyten gefunden wurde, erkennt MIP-1 α , RANTES und MCP-1. Liganden für den fünften, erst vor einigen Jahren entdeckten CC-Chemokin-Rezeptor CCR5 (RAPORT et al., 1996), stellen die Chemokine MIP-1 α , MCP-2, RANTES und MIP-1 β dar. CCR5 ist damit der einzige bekannte Rezeptor für MIP-1 β .

RAPORT et al. (1996) fanden CCR5-mRNA in hohen Konzentrationen in Thymus und Milz, in geringeren Konzentrationen in peripheren Blutleukozyten und im Dünndarm sowie in sehr geringen Konzentrationen in Ovar

und Lunge. Auch Zellen des hämatopoetischen Systems sowie T-Lymphozyten exprimieren den CCR5-Rezeptor. Die höchsten Konzentrationen an CCR5-mRNA konnten in Monozyten der Zelllinie THP-1 und auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten nachgewiesen werden (RAPORT et al., 1996; WU et al., 1997).

Chemokin-Rezeptoren dienen nicht nur als Rezeptoren für Chemokine zur Vermittlung proinflammatorischer Effekte wie Chemotaxis, Degranulation und Integrinaktivierung auf Leukozyten. Ihnen konnte auch eine bedeutende Rolle als Co-Rezeptoren im Rahmen der Infektion von T-Lymphozyten und Makrophagen mit HIV-1 Stämmen zugeschrieben werden. Während die Infektion von CD4⁺-T-Lymphozyten mit sog. T-tropischen HIV-1 Stämmen über den CXC-Chemokin-Rezeptor CXCR4 vermittelt wird (FENG et al., 1996), konnte für die Infektion von Makrophagen mit sog. M-tropischen HIV-1 Stämmen CCR5 als bevorzugter Co-Rezeptor identifiziert werden (ALKHATIB et al., 1996; DENG et al., 1996).

Die Bedeutung von CCR5 als Co-Rezeptor im Rahmen der HIV-Infektion wird unterstützt durch die Entdeckung, dass Individuen, die Mutationen im Gen des CCR5 in Form einer Deletion des Basenpaares 32 ($\Delta 32$) aufweisen, in geringerem Ausmaß durch eine HIV-Infektion gefährdet zu sein scheinen. Für diese Mutation homozygote Individuen sind nahezu resistent gegenüber der Infektion mit HIV-1 Stämmen (LIU et al., 1996; HUANG et al., 1996). Heterozygote Individuen scheinen in geringerem Ausmaß CCR5 zu exprimieren als für das Wildtyp-Allel homozygote Personen, wodurch die Krankheit langsamer fortschreitet, da die Viruslast geringer ist und die Abnahme der CD4⁺-T-Zellen langsamer erfolgt.

Der Einfluss der natürlichen Liganden des CCR5 auf die Interaktion mit dem HI-Virus ist trotz zahlreicher Untersuchungen unklar. Während COCCHI et al. (1995) von einer Hemmung der HIV-Infektion durch RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β berichten, konnte dieser Effekt in anderen Arbeiten nicht nachgewiesen werden (MORIUCHI et al., 1996).

HI-Viren und Chemokine binden offenbar an verschiedenen Bindungsstellen ("sub-sites") auf dem gemeinsamen Rezeptor CCR5, was durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des CCR5 nachgewiesen werden konnte (LEE et al., 1999;

OLSON et al., 1999). ALKATHIB et al. (1997) konnten die extrazellulären Schleifen (EL) 2 und 3 als wichtige Bindungsstellen für die Interaktion mit dem HI-Virus identifizieren, während die Rolle der übrigen CCR5-Fragmente geringer zu sein scheint.

Die viralen Determinanten, welchen für die Bindung an den CCR5 eine Bedeutung zukommt, sind im Hüllprotein gp 120 des HI-Virus innerhalb oder nahe der V₃-Schleife lokalisiert (CHOE et al., 1996).

Als weiterer Ligand des CCR5 konnte das Opioidpeptid β -Endorphin, das Strukturhomologien zum gp 120 Hüllprotein der HIV-1-Viren aufweist, nachgewiesen werden (POLOCZEK, 2002).

1.2.2.2 Non-Opioid-Bindungsstellen auf Zellen des Immunsystems

Neben Non-Opioid-Bindungsstellen auf Makromolekülen sind solche Bindungsstellen für β -Endorphin auch auf einer Reihe von Zellen bekannt. DAVE et al. (1985) beschrieben Non-Opioid-Rezeptoren in Leber, Niere, Nebenniere, Milz und Hoden von Ratten. Des Weiteren finden sich solche Rezeptoren auf einer großen Anzahl von Zellen des Immunsystems.

HAZUM et al. (1979) gelang erstmals der Nachweis derartiger Non-Opioid-Rezeptoren in Kulturen menschlicher Lymphozyten. Die β -Endorphin-Bindung an diese Zellen war weder durch Naloxon noch durch Opiat-Agonisten beeinflussbar, was die Charakterisierung als Non-Opioid-Bindungsstellen erlaubte. Neben Lymphozyten exprimieren eine ganze Reihe weiterer Immunzellen solche spezifischen Non-Opioid-Bindungsstellen. SCHWEIGERER et al. (1985) fanden Non-Opioid-Bindungsstellen für β -Endorphin auf EL4 Thymoma Zellen. Auch auf menschlichen Monozyten der Zelllinie U937 (SHAHABI et al., 1990) sowie auf murinen Makrophagen (GELFAND et al., 1995), Lymphozyten (GILMORE and WEINER, 1988) und Splenozyten (SHAHABI et al., 1990) konnten solche Naloxon-insensitiven Bindungsstellen für β -Endorphin nachgewiesen werden.

Die durch β -Endorphin stimulierte Proliferation von mononukleären Zellen (GILMAN et al., 1982), die Interleukin-2-Produktion (GILMORE and WEINER, 1988) sowie die Calcium-Aufnahme in diese Zellen (HEMMINCK and BIDLACK, 1987) konnten als Wirkungen identifiziert werden, die über Non-Opioid-Bindungsstellen vermittelt werden. BROWN and VAN EPPS

(1986) konnten eine Zunahme der Interferonproduktion in NK-Zellen in Gegenwart von β -Endorphin nachweisen. Dieser Effekt war nicht durch Naloxon antagonisierbar. Auch der hemmende Effekt von β -Endorphin auf die PHA-stimulierte Proliferation von Lymphozyten beruht auf einer Non-Opioid-Interaktion von β -Endorphin mit diesen Zellen (PUPPO et al., 1985).

1.3 β_H -Lipotropin: Rezeptoren und Bindungsstellen

Während für β -Endorphin hinsichtlich seiner Rezeptoren und Bindungsstellen relativ differenzierte Forschungsergebnisse vorliegen, wurde sein 1964 von LI et al. entdecktes Vorläufer-Molekül β -LPH in der Vergangenheit wenig untersucht.

Das β -LPH(1-89) des Menschen enthält die für die typische Opioid-Bindung an die klassischen Opioidrezeptoren benötigte Aminosäuresequenz TYR-GLY-GLY-PHE, jedoch nicht als N-Terminus wie sein Spaltprodukt β_H -Endorphin(1-31), sondern im mittleren Bereich des Moleküls. Da der für die Bindung an Opioidrezeptoren benötigte Tyrosinrest somit nicht frei vorliegt wie im Falle des β_H -Endorphin(1-31), kann β_H -LPH(1-89) nicht mit Opioidrezeptoren interagieren.

SCHWANDT et al. (1981) wiesen den Anstieg des Glycerols im Plasma von Kaninchen als Produkt der durch β -LPH gesteigerten Lipolyse als einen nicht durch Naloxon antagonisierbaren Prozess nach. Ebenso konnte im Rahmen der gleichen Arbeit eine Zunahme des Plasma-Insulinspiegels durch β -LPH als Naloxon-irreversibles Geschehen dargestellt werden. Über welche Rezeptoren β -LPH diese Wirkungen ausübt, ist nicht untersucht.

Während die Interaktion von β_H -Endorphin(1-31) mit Non-Opioid-Bindungsstellen in zahlreichen Experimenten (siehe 1.2.2) untersucht wurde, existiert keine Untersuchung über die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Non-Opioid-Bindungsstellen.

Zur Interaktion mit Non-Opioid-Bindungsstellen benötigt β_H -Endorphin(1-31) seinen C-Terminus (z.B. Bindung von β_H -Endorphin an Vitronektin; HILDEBRAND et al., 1988, Bindung von β_H -Endorphin an terminale Komplementkomplexe; SCHWEIGERER et al., 1983) oder sein Mittelfragment (z.B. Bindung an CCR5; POLOCZEK, 2002). Da beide Sequenzen innerhalb der Primärstruktur des Vorläufer-Moleküls β_H -LPH(1-89) enthalten sind, wäre

eine Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit solchen Non-Opioid-Bindungsstellen des β -Endorphins gut vorstellbar.

2.

AUFGABENSTELLUNG

Die Freisetzung von POMC-Fragmenten aus der Hypophyse ins Blut in Stresssituationen körperlicher wie auch psychischer Art ist seit vielen Jahren bekannt. Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der unter Stress freigesetzten Hypophysenhormone befassten sich neben ACTH und α -MSH in erster Linie mit β -Endorphin.

Für β -Endorphin konnten Interaktionen sowohl mit zellulären als auch mit humoralen Komponenten des Immunsystems nachgewiesen werden, was Anlass gab zu der Vermutung, dass β -Endorphin eine Rolle im Netzwerk immuno-neuroendokriner Vorgänge spielt.

Die Interaktionen mit Zellen des Immunsystems werden einerseits über klassische Naloxon-sensitive Opioid-Rezeptoren, andererseits aber auch über Naloxon-insensitive sog. Non-Opioid-Bindungsstellen vermittelt. Die Interaktionen mit Non-Opioid-Bindungsstellen finden über den C-Terminus und das Mittelfragment des β -Endorphins(1-31) statt.

Trotz Kenntnis dieser Interaktionen besteht hinsichtlich der physiologischen Funktion des unter Stress freigesetzten β -Endorphins in der Peripherie nach wie vor Unklarheit.

Als Vorläufer-Molekül des β -Endorphins umfaßt β -Lipotropin dessen komplette Aminosäuresequenz. Auf Grund des in beiden Molekülen identischen C-Terminus wären auch für β -Lipotropin immunologische Funktionen gut vorstellbar. Weiterhin könnte β _H-Lipotropin mit seinem nicht β -Endorphin identischen Fragment bislang völlig unbekannt Aufgaben in peripheren Geweben wahrnehmen. Diese Hypothese gewinnt Bedeutung durch die Tatsache, dass den größten Teil des unter Stress freigesetzten häufig anstatt β -Endorphin bestimmten "β-Endorphin-immunoreaktiven Materials" nicht, wie lange Zeit vermutet, β -Endorphin, sondern β -Lipotropin ausmacht.

Um Informationen über die funktionelle Bedeutung von β -Lipotropin im Immunsystem zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von β _H-Lipotropin mit Monozyten untersucht.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Bindung von β_H -Lipotropin an Monozyten. Als Modell für Monozyten wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 eingesetzt.

Der zweite Teil der Arbeit hatte die Identifizierung und die Lokalisation der β_H -Lipotropin-Bindungsstelle auf Monozyten der Zelllinie THP-1 zum Ziel.

Der im Verlauf der Untersuchungen geführte Nachweis, dass die Bindung von β_H -Lipotropin an Monozyten der Zelllinie THP-1 zum Teil über das multifunktionelle Glykoprotein Vitronektin zustande kommt, gab Anlass zur Untersuchung der Bindung von β_H -Lipotropin an verschiedene sterische Konformationen des Vitronektins.

Neben Vitronektin konnte im Laufe der Untersuchungen der CC-Chemokin-Rezeptor CCR5 als weiterer Interaktionspartner für β_H -Lipotropin auf Monozyten identifiziert werden. Da CCR5 im Rahmen einer Infektion mit M-tropen HIV-1-Stämmen als bevorzugter Co-Rezeptor fungiert, wurde im weiteren Verlauf der Einfluss von β_H -Lipotropin auf die Infektion von P4M5-Magi-Zellen mit HI-Viren untersucht.

Die vorliegende Arbeit stellt mit der Charakterisierung der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Zellen des Immunsystems einen ersten Vorstoß in eine bislang vernachlässigte Richtung der POMC-Forschung dar.

3. METHODIK

3.1 Geräte, Chemikalien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme

3.1.1 Geräte und Arbeitsmaterial

Brutschrank	Heraeus Instruments, Inc.
Dispenser Tips (0,1/0,5/1,0/2,5)	nerbe plus GmbH Winsen / Luhe
Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS	LKB Wallac, Turku ; Finnland
Glasmaterialien: Meßkolben, Erlenmeyerkolben, Glasbecher	Schott, Mainz
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Kelheim
Mikroprobenröhrchen(400µl) Typ “Beckman”	Beckman, Palo Alto
Mikroskop WILL	Wilovert S
Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno BreakApart, Typ MaxiSorp)	NUNC, Dänemark
Mischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Giessen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten (verstellbar)	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann, Laborgeräte
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen Cellstar (50 ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Roller-Flaschen (Roller-Bottles)	Corning, New York
Sarstedt-Röhrchen (3,5; 4,5; 13ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Varishaker AM 169	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Giessen
Taumler	Heidolph, Kelheim

Tischrührer (Vortexer) REAX 1 DR	Heidolph, Kelheim
Tischschüttler	Braun, Melsungen
Waagen:	
Feinwaage M5	Mettler, Zürich
Tischwaage AT 250	Mettler, Zürich
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Inc.
Mikrofuge B	Beckman, Palo Alto

3.1.2 Chemikalien

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
2-Desoxy-D-Glucose	Sigma, München
Gelatine	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salze:	
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Tris	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
Tween 80	Sigma, München

3.1.3

Substanzen

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
CCR5-Antikörper (monoklonal)	
2D7	PharMingen, International
3A9	PharMingen, International
45502.111	R&D Systems Inc.
45523.111	R&D Systems Inc.
45531.111	R&D Systems Inc.
45549.111	R&D Systems Inc.
Enzymhemmer:	
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Leupeptin N-1000	Bachem, Heidelberg
PEFA-Block SC 4-(2-Amino-ethyl)-benzosulfonylfluorid-Hydrochlorid	Boehringer, Mannheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe/ Marburg
Peptide:	
β_{H} -Endorphin (1-5)	Sigma, München
β_{H} -Endorphin (1-9)	Dr. U. Friedrich, Inst. Med. Virologie, Giessen
β_{H} -Endorphin (1-16)	Bachem, Heidelberg
β_{H} -Endorphin (1-27)	Novabiochem, Bad Soden
β_{H} -Endorphin (1-31)	Novabiochem, Bad Soden
β_{H} -Endorphin (27-31)	Dr. U. Friedrich, Inst. Med. Virologie, Giessen
β_{H} -Endorphin(18-27)	Dr. U. Friedrich, Inst. Med. Virologie, Giessen
β_{H} -Endorphin (18-31)	Dr. U. Friedrich, Inst. Med. Virologie, Giessen
RANTES (human, recombinant)	Sigma, München
Heparin	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
Na ¹²⁵	Amersham, Buchler, Braunschweig

Thiomerosal	Merck, Darmstadt
Vitronektin	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
Vitronektin-Antikörper (monoklonal)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
VN9	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
8E6	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
16A7	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
Vitronektin-Antiseren (polyklonal)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
as 6/7	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
as 66/67	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
Makromoleküle zur Prüfung auf Interferenz mit der β_H -LPH (1-89)/ Monozyten-Bindung	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
13H1 (monoklonaler Antikörper gegen Vitronektin)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
3936 (monoklonaler Antikörper gegen den Urokinase- Rezeptor)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
R3 (monoklonaler Antikörper gegen den Urokinase- Rezeptor)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
cRGD (zyklisches RGD-Peptid)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
PN-1 (Protease-Nexin-1)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
PAI-1 (Plasminogen-Aktivator- Inhibitor-1)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen

HK (high molecular weight Kininogen, native Form)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
Hka (high molecular weight Kininogen, gespaltene Form)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen
suPAR (löslicher Urokinase- Rezeptor)	Prof. Dr. K.T. Preissner, Biochem. Inst., Giessen

3.1.4 Lösungen

3.1.4.1 Puffer für Festphasen-Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

BSA (bovines Serumalbumin)-Lösung:

0,1 % BSA in Aqua bidest. (w/v)

Puffer C:

20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,01 % (w/v) bovines Serumalbumin, 0,1 % (w/v) Gelatine, 0,01 % (w/v) Thiomerosal, (pH 7,5)

Puffer D:

entspricht Puffer C, zusätzlich 0,1 % Triton X-100 (v/v)

Coating-buffer:

50 mM NaHCO₃, 50 mM Na₂CO₃, (pH 9,6)

PBS:

0,9 mM CaCl₂, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, (pH 7,4)

PBS defic (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺):

entspricht PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

PBS Tween:

PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

3.1.4.2 Puffer für Flüssigphasen-Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

BSA (bovines Serumalbumin)-Lösung:

0,1 % BSA in Aqua bidest. (w/v)

Puffer C:

20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, 0,01 % (w/v) bovines Serumalbumin, 0,1 % (w/v) Gelatine, 0,01 % (w/v) Thiomerosal, (pH 7,5)

Puffer D:

entspricht Puffer C, zusätzlich 0,1 % Triton X-100 (v/v)

PBS:

0,9 mM CaCl_2 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH_2PO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , (pH 7,4)

PBS defic (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}):

entspricht PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

3.1.4.3 Puffer für Zell-Bindungsversuche mit THP-1-Zellen in Suspension

Inkubationspuffer [KRTB (Krebs-Ringer-Tris-BSA)-Puffer mit Enzymhemmern]:

2,54 mM CaCl_2 , 4,75 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 130mM NaCl, 50 mM Tris, 11 mM Glucose, 0,1 % BSA, Leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PEFA-Block 1 mM, (pH 7,4)

Kompensationspuffer [KRTB-Puffer mit Enzymhemmern(doppelt konzentriert, zum Erhalt des osmot. Gleichgewichts im Inkubationsansatz)]:

5,08 mM CaCl₂, 9,5 mM KCl, 2,4 mM KH₂PO₄, 2,4 mM MgSO₄,
260 mM NaCl, 100 mM Tris, 22 mM Glucose, 0,1 % BSA, Leupeptin
2µg/ml, Aprotinin 2 µg/ml, PEFA-Block 2 mM, (pH 7,4)

Saccharose-Lösung:

20 % Saccharose in Aqua bidest. (w/v)

3.1.5 Computerprogramme:

Microcal ORIGIN 3.5

MicroCal Software, Inc.

Word für Windows 97

Microsoft Software, Inc.

LIGAND

Munson and Rodbard

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchungen zur Bindung von β -Lipotropin(1-89) [β_{H} -LPH(1-89)] an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin, an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung sowie an THP-1-Zellen in Suspension

3.2.1.1 Liganden

3.2.1.1.1 Nicht markierte Liganden

Proopiomelanocortin-Fragmente:

β_{H} -Endorphin (1-31)

β_{H} -LPH(1-89)

β_{H} -MSH (1-22)

β_{H} -Endorphin-Fragmente:

β_{H} -Endorphin (1-5)

β_{H} -Endorphin (1-9)

β_{H} -Endorphin (1-16)

β_{H} -Endorphin (1-27)

β_{H} -Endorphin (18-27)

β_{H} -Endorphin (18-31)

β_{H} -Endorphin (27-31)

Polyklonale Antiseren gegen Vitronektin:

aS 6/7

aS 66/67

Monoklonale Antikörper gegen Vitronektin:

8E6

VN9

16A7

Monoklonale Antikörper gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_{\text{V}}\beta_3$:

23C6

Mit Vitronektin interagierende Makromoleküle:

13H1 (monoklonaler Antikörper gegen Vitronektin)

3936 (monoklonaler Antikörper gegen den Urokinase-Rezeptor uPAR)

R3 (monoklonaler Antikörper gegen den Urokinase-Rezeptor uPAR)

CRGD (cyclisierte Zelladhäsionsdomäne des Vitronektin-Moleküls)

Heparin

PN-1 (Protease-Nexin1)

PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1)

HK (High molecular weight kininogen in nativer Form)

HKa (High molecular weight kininogen in gespaltener Form)

suPar (löslicher Urokinase-Rezeptor)

Monoklonale Antikörper gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5:

2D7 (Antikörper gegen die ECL 2a des CCR5)

3A9 (Antikörper gegen die N-Terminale Region des CCR5)

45502.111 (Antikörper gegen die N-Terminale Region des CCR5)

45523.111 (Antikörper gegen Multidomänenepitope des CCR5)

45531.111 (Antikörper gegen die ECL 2b des CCR5)

45549.111 (Antikörper gegen Multidomänenepitope des CCR5)

Natürliche Liganden des Chemokin-Rezeptors CCR5:

RANTES (regulated on activation normal T-cells expressed and secreted)

3.2.1.1.2 Radioaktiv markiertes β_H -LPH(1-89)

3.2.1.1.2.1 Markierung mit 125 Jod

Die Markierung des humanen β -Lipotropins mit 125 Jod erfolgte an den Tyrosin-Resten des Peptids nach der Chloramin-T-Methode (HUNTER and GREENWOOD, 1962; HAZUM et al., 1979) mit geringen Modifikationen (WIEDEMANN and TESCHEMACHER, 1983). In ein silikonisiertes 2 ml Glasröhrchen wurden nacheinander 50 μ l Phosphatpuffer

(0,5 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5), 10 µl β_H-Lipotropin-Lösung (5 x 10⁻⁵ M) und 10µl Na ¹²⁵I in NaOH (entsprechend 1 mCi) einpipettiert. Die Jodierungsreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Chloramin-T-Lösung (20 µg Chloramin T/10µl 0,05 M Phosphatpuffer) gestartet; das Gemisch wurde im Anschluß 30 s geschüttelt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Natriummetabisulfit-Lösung (20 µg Na₂S₂O₅/10 µl 0,05 M Phosphatpuffer) gestoppt. Alle Lösungen mit Ausnahme von Na¹²⁵I wurden eisgekühlt angesetzt und bereitgehalten, die Jodierungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.1.1.2.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität des (¹²⁵ I)β_H-LPH(1-89)

Die spezifische Aktivität des β_H-LPH(1-89)-Tracers wurde nach der Methode von DIAS und REICHERT (1982) bestimmt. Sie lag zwischen 370 und 455 Ci/mmol.

3.2.1.2 Binder

Als Binder kamen in den Experimenten Oberflächen-assoziertes Vitronektin, Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung sowie Monozyten der Zelllinie THP-1 zum Einsatz. Isoliertes Vitronektin (VN) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Preissner (Institut für Biochemie der JLU Giessen) zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung von Vitronektin aus humanem Blutplasma erfolgte nach der Methode von PREISSNER et al. (1985).

Die Monozyten der Zelllinie THP-1 wurden von der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen, erworben. Es handelt sich hierbei um immortalisierte Zellen in Suspension, die aus dem Blut eines an akuter Monozytenleukämie erkrankten Kindes gewonnen wurden.

3.2.1.2.1 Oberflächen-assoziertes Vitronektin

3.2.1.2.1.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Vitronektin

Die Beschichtung der Wells erfolgte mit 50 µl Vitronektin-Lösung der Konzentration 7,5 µg/ml (bzw. 1 µg/ml), gelöst in Coating-buffer (pH 9,6).

3.2.1.2.1.2 Blockung unspezifischer Bindungsstellen

Um die unspezifische Bindung des Tracers an die Wand der Wells so gering wie möglich zu halten, erfolgte nach dem Entfernen der Beschichtungslösung aus den Wells eine 1-stündige Inkubation mit 200 µl einer Lösung von bovinem Serumalbumin (3% BSA [w/v] in PBS defic.) bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung durch Auskippen und Ausklopfen der Platten aus den Wells entfernt. Im Anschluß wurde jedes Well dreimal mit 200 µl PBS-Lösung mit 0,1% Tween 20 gewaschen.

3.2.1.2.2 Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung: Aktivierung der β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle auf Vitronektin durch Inkubation des Vitronektins mit Heparin

Die Durchführung der Versuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin erfolgte nach der von HILDEBRAND et al. (1989) beschriebenen Methode mit geringen Modifikationen. Da die Bindungsfähigkeit des Vitronektins für β_H -Endorphin(1-31) und demzufolge auch für β_H -LPH(1-89) in nativem Zustand sehr gering ist, durch Interaktion mit Heparin jedoch eine erhebliche Zunahme erfährt (HILDEBRAND et al., 1989), wurde isoliertes Vitronektin mit Heparin in Puffer C bei 37°C für 1 h in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen vorinkubiert. Die Vitronektin-Konzentration in der Vorinkubations-Lösung lag abhängig vom Versuchstyp zwischen 10 und 20 µg Vitronektin/ml, die Konzentration des Heparins betrug 10 µg/ml.

3.2.1.2.3 Die Monozyten- Zelllinie THP-1 des Menschen

3.2.1.2.3.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der menschlichen Monozyten-Zelllinie THP-1 erfolgte in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 5% FCS, Penicillin (100 i.U./ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C in Rollerflaschen. Die Konzentration der Zellen lag im Bereich von 1×10^6 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Alle 4 bis 6 Tage wurden die Zellen umgesetzt, dazu wurden ca. 50 ml der Zellsuspension in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und sechs Minuten bei 1100 U/min abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das in der Spitze des Röhrchens verbliebene Pellet in 10 ml frischem RPMI-Medium unter

mehrmaliger Durchmischung mit einer Pipette resuspendiert und in die gleiche Roller-Flasche, aus der vorher die überschüssige Zellsuspension entfernt worden war, zurückgegeben. Zusätzlich wurden 140 ml RPMI addiert. Jeden zweiten Tag wurden 100 ml des Kulturmediums zugegeben. Die Rollerflaschen wurden im Abstand von 14 Tagen gewechselt.

3.2.1.2.3.2 Herstellung der Zellsuspension

Für die Bindungsversuche wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen aus den Rollerflaschen entnommen und 3 min bei 280 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit 10 ml Inkubationspuffer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend auf Eis gelagert. Nach Zugabe des Inkubationspuffers wurden die Zellen nochmals für 3 min bei 280 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das in der Spitze des Gefäßes verbleibende Pellet resuspendiert. Nach dem zweiten Waschgang wurde die Konzentration der Zellen durch Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und mit 50 µl einer 1%igen Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Suspension wurden 20 µl mit 180 µl Inkubationspuffer verdünnt. Nach Zählung der Zellen wurde das Pellet in einer definierten Menge Inkubationspuffer resuspendiert, so dass die Konzentration der Zellen ca. 30×10^6 Zellen/ml betrug.

3.2.1.3 Vorversuche zum Ausschluß einer direkten Interaktion zwischen β_H -LPH(1-89) und Heparin bzw. zwischen β_H -LPH(1-89) und den mit Vitronektin interagierenden Substanzen

Um Änderungen der Bindung von β_H -LPH(1-89) an die verschiedenen Binder auf die eingesetzten Substanzen zurückführen zu können, mußte die direkte Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit diesen Substanzen ausgeschlossen werden. Dazu wurden Vorversuche durchgeführt, in denen radioaktiv markiertes β_H -LPH(1-89) mit der jeweiligen Substanz in Abwesenheit und in Gegenwart von kaltem β_H -LPH(1-89) inkubiert wurde. Da in keinem Fall in Gegenwart des kalten β_H -LPH(1-89) ein Verdrängungseffekt beobachtet wurde, konnte

man davon ausgehen, dass eine direkte Interaktion zwischen β_H -LPH(1-89) und den Substanzen nicht stattfand.

Im Rahmen dieser Vorversuche konnte auch eine direkte Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Heparin ausgeschlossen werden, so dass die in den Versuchen mit Heparin-aktiviertem Vitronektin eingetretenen Änderungen in der Bindung des β_H -LPH(1-89) an die Vitronektin-Heparin-Komplexe auf Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Vitronektin zurück geführt werden konnte.

3.2.1.4 Durchführung der Bindungsversuche

3.2.1.4.1 Durchführung des Festphasen-Bindungsversuchs mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

Die Beschichtungslösung wurde für ca. 20 Stunden bei 4°C in den Wells belassen und anschließend durch Auskippen und Ausklopfen der Mikrotiterplatten aus den Wells entfernt. Um einen Überblick zu bekommen über den Anteil der Gesamtaktivität, welcher nicht durch Bindung des Tracers an Vitronektin hervorgerufen wurde, wurden in jedem Versuch sog. "Blank-Werte" mitgeführt. Zur Beschichtung der Wells für diese "Blank-Werte" kamen anstelle der Vitronektin-Lösung 50 μ l reinen Coating-buffers zum Einsatz. Die weitere Behandlung der Kontrollwerte verlief analog zu den mit Vitronektin-Lösung beschichteten Wells.

Nach der Blockung der unspezifischen Bindungsstellen (siehe 3.2.1.2.1.2) erfolgte das Pipettieren der Inkubationsansätze bei 0°C in auf Eis gelagerte Mikrotiterplatten. Entsprechend dem Volumen der Beschichtungslösung von 50 μ l betrug das Volumen der Ansätze 50 μ l. Abhängig vom jeweiligen Versuchstyp kamen unterschiedliche Inkubationsansätze zum Einsatz, folgende Ansätze wurden eingebracht (Zusammensetzung siehe Tabelle 1):

-Kontrollansätze (B₀): Zur Bestimmung der (spezifischen und unspezifischen) Bindung des Tracers an die mit Vitronektin beschichteten Wells in Abwesenheit von Bindungsinhibitoren.

-Blank-Ansätze (BL): Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Tracers an nicht mit Vitronektin beschichtete, ansonsten jedoch analog zu den

Kontrollansätzen behandelte Wells. Auch der Geräte-Leerwert des Gamma-Zählers konnte auf diese Weise in den Blank-Werten miterfasst werden.

-Kompetitionsansätze (VD): Zur Bestimmung desjenigen Anteils der Bindung des Tracers, der durch eine zweite, im Überschuß vorliegende Substanz aus seiner Bindung an Vitronektin verdrängbar war.

-Total-Counts-Ansätze (CT): Zur Bestimmung der für jeden Einzelansatz des Versuchs zur Verfügung stehenden Gesamtradioaktivität. Diese Ansätze bestanden lediglich aus einem den anderen Ansätzen entsprechenden Tracervolumen, welches direkt in ein 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen einpipettiert wurde. Das Gefäß wurde sofort mit einem Deckel verschlossen. Die Aktivität wurde nach Ablauf der Versuchszeit gemeinsam mit den anderen Ansätzen gemessen. Sie lag bei ca. 100000 cpm.

Alle Ansätze wurden anschließend für 4,5 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde der nicht gebundene Anteil des Tracers durch Absaugen der Flüssigkeit mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe aus den Wells entfernt. Im Anschluß daran wurde jedes Well viermal mit 200 µl einer PBS-Lösung mit 0,1% Tween 20 gewaschen. Zur Ermittlung der gebundenen Radioaktivität wurden die Wells einzeln in Zählröhrchen überführt und die Radioaktivität für 1 min im Gamma-Zähler gemessen.

Inkubationsansätze (Wells)				
	Kontroll- Ansatz (B ₀)	Blank- Ansatz (BL)	Kompetitions- Ansatz (VD)	Total-Counts- Ansatz (CT)
Puffer C	30 µl	30 µl	30 µl	-
Kompetitor in BSA 0,1%	-	-	10 µl	-
BSA 0,1%	10 µl	10 µl	-	-
Tracer in Puffer D	10 µl	10 µl	10 µl	-

Tab.1: Zusammensetzung der Inkubationsansätze für Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin auf Mikrotiterplatten

3.2.1.4.2 Durchführung des Flüssigphasen-Bindungsversuchs mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

Im Anschluß an die 60-minütige Vorinkubation des Vitronektins (10-20 µg/ml) mit Heparin (10 µg/ml) in Puffer C bei 37°C wurden die Eppendorf-Gefäße auf Eis überführt und auf 0°C heruntergekühlt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte dann bei 0°C unter Verwendung eisgekühlter Lösungen. Um den Anteil der Gesamtaktivität, welcher nicht auf die Bindung des Tracers an Vitronektin zurückging, von dem an Vitronektin gebundenen Anteil zu differenzieren, wurden in jedem Versuch sogenannte "Blank-Werte" als Kontrollen eingesetzt, welche anstatt des Heparin-aktivierten Vitronektins nur Puffer C und BSA 0,1% enthielten. Die weitere Behandlung der Kontrollansätze verlief analog zu den Vitronektin enthaltenden Ansätzen.

Wie bei den Bindungsversuchen mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuchstyp verschiedene Inkubationsansätze eingebracht (Zusammensetzung siehe Tabelle 2):

-Kontrollansätze (B₀): Zur Bestimmung der (spezifischen und unspezifischen) Bindung des Tracers an das Heparin-aktivierte Vitronektin in Lösung in Abwesenheit von Bindungsinhibitoren.

-Blank-Ansätze (BL): Zur Bestimmung der (unspezifischen) Bindung des Tracers an Komponenten des Inkubats mit Ausnahme des Vitronektin-Heparin-Komplexes. Auch der Geräteleerwert des Gamma-Zählers konnte auf diese Weise in den Blank-Werten miterfaßt werden.

-Kompetitionsansätze (VD): Zur Bestimmung desjenigen Anteils des Tracers, der durch eine zweite, im Überschuß vorliegende Substanz aus der Bindung an Heparin-aktiviertes Vitronektin verdrängbar war.

-Total-Counts-Ansätze (CT): Zur Bestimmung der für jeden Einzelansatz zur Verfügung stehenden Gesamtradioaktivität. Diese Ansätze bestanden lediglich aus Puffer C, BSA 0,1% und dem entsprechenden Volumen an radioaktiv-markiertem β_{H} -LPH(1-89). Die Behandlung verlief analog zu den Vitronektin enthaltenden Ansätzen. Die Aktivität lag bei ca. 10000 cpm.

Alle Ansätze wurden im Anschluß für 3 h bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das freie, nicht gebundene, radioaktiv markierte β_{H} -LPH(1-89) an Aktivkohle adsorbiert, indem zu jeder Probe 300 µl einer eisgekühlten Aktivkohlesuspension (1% Aktivkohle und 0,5% BSA in Puffer C) zugegeben wurden. In den CT-Ansatz wurde statt der Aktivkohle-Lösung 300 µl Puffer C einpipettiert. Anschließend wurden alle Proben 15 s auf einem Eppendorf-Tischschüttler gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation mit 8800 x g in der Eppendorf-Zentrifuge bei Raumtemperatur. Von dem Überstand, welcher das Vitronektin mit dem gebundenen (¹²⁵I) β_{H} -LPH(1-89) enthielt, wurden 360 µl in ein 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Die enthaltene Radioaktivität wurde im Gammazähler gemessen.

Inkubationsansätze (Eppendorfgefäße)				
	Kontroll-Ansatz (B ₀)	Blank-Ansatz (BL)	Kompetitions-Ansatz (VD)	Total-Counts-Ansatz (CT)
Puffer C	76 µl	100 µl	76 µl	100 µl
BSA 0,1%	10 µl	10 µl	-	10 µl
mit Heparin vorinkubierte Vitronektin-Lösung (in Puffer C)	24 µl	-	24 µl	-
Kompetitor in BSA 0,1%		-	10 µl	-
Tracer in Puffer D	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tab.2: Zusammensetzung der Inkubationsansätze für die Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

3.2.1.4.3 Durchführung des Bindungsversuchs mit THP-1-Zellen in Suspension

Die Durchführung der Zellbindungsversuche erfolgte nach der von SCHWEIGERER et al. (1985) beschriebenen Methode eines Zentrifugationsassays mit geringfügigen Modifikationen. Die Konzentrationsangaben für die Enzymhemmer beruhen auf Angaben von GELFAND et al. (1995), wobei auf Grund der geringeren Toxizität statt 1mM PMSF 1mM PEFA-Block eingesetzt wurde. Das Pipettieren der verschiedenen Inkubationsansätze erfolgte wie auch alle nachfolgenden Versuchsschritte auf Eis unter Verwendung eisgekühlter Lösungen. Mit Ausnahme des CT-Ansatzes, welcher direkt in 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen angesetzt wurde, wurden alle anderen Ansätze in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen angesetzt. Zur Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Tabelle 3.

Folgende Ansätze wurden eingebracht:

- Kontrollansätze (B_0):** Zur Bestimmung der Bindung (spezifische und unspezifische Bindung) des radioaktiv markierten Peptids an die Zellen in Abwesenheit von Bindungsinhibitoren.
- Blank-Ansätze (BL):** Zur Bestimmung der Menge an Tracer in Ansätzen ohne Zellen, die aber sonst genau wie Standardansätze behandelt wurden. Auch der Geräte-Leerwert des Gammazählers konnte in diesen Ansätzen erfasst werden.
- Kompetitionsansätze (VD):** Zur Bestimmung des Anteils der Bindung des radioaktiv markierten Peptides an Zellen, der sich durch Zugabe eines nicht markierten Liganden im Überschuß aus der Bindung verdrängen ließ.
- Total-Counts-Ansätze (CT):** Zur Ermittlung der in jedem Ansatz vorhandenen Gesamtradioaktivität. Hierbei wurde ein den anderen Ansätzen entsprechendes Tracervolumen direkt in ein 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde sofort verschlossen. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte gemeinsam mit den anderen Ansätzen nach Ablauf der Inkubationszeit im Gammazähler. Sie lag zwischen 120000 und 150000 cpm.
- Viabilitätsansätze (VIA):** Zur Bestimmung der Überlebensrate der Zellen nach Durchführung des Bindungsversuches. Die Viabilitätsansätze entsprachen in ihrer Zusammensetzung den Standardansätzen mit dem Unterschied, dass statt des Tracers lediglich Inkubationspuffer zugegeben wurde. Nach Ablauf des Versuches wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen durch Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer (siehe 3.2.1.2.3.2) ermittelt.

Inkubationsansätze (Eppendorfgefäße)					
	Kontroll-Ansatz (B ₀)	Blank-Ansatz (BL)	Kompetitions-Ansatz (VD)	Total-Counts-Ansatz (CT)	Viabilitäts-Ansatz (VIA)
Zellen in Inkubationspuffer	130 µl	-	130 µl	-	130 µl
Inkubations-Puffer	-	130 µl	-	-	50 µl
BSA 0,1%	20 µl	20 µl	-	-	20 µl
Kompetitor in BSA 0,1%	-	-	20 µl	-	-
Kompensations-Puffer	20 µl	20 µl	20 µl	-	20 µl
Tracer in Inkubationspuffer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	-

Tab.3: Zusammensetzung der Inkubationsansätze für die Bindungsversuche mit THP-1-Zellen in Suspension

Vor Aufgabe des Tracers wurden alle Ansätze (mit Ausnahme der CT-Ansätze) auf einem Eppendorf-Mischer 10 s durchmischt. Nach anschließender Zugabe des Tracers wurden die Inkubationsansätze 180 min bei 4°C auf einem Dynatech-Varishaker (Stufe 5-6) inkubiert.

Bei Einsatz von Antikörpern als Verdränger erfolgte vor Traceraufgabe eine Vorinkubation mit den Antikörpern von 30 min, ebenfalls auf dem Dynatech-Varishaker bei 4°C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 190 µl des Ansatzes unter Durchmischung mit einer Pipette aus dem Eppendorf-Gefäß entnommen und in ein 400 µl Mikroprobenröhrchen vom Typ "Beckman" überführt, in welchem sich 200 µl eisgekühlte 20%ige Saccharoselösung befanden. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde die Saccharoselösung zuvor 30 s abzentrifugiert. Zur

Trennung der zellgebundenen von frei vorliegender Radioaktivität wurden die Beckman-Röhrchen 10 min bei 8 000 x g in einer Beckman-Mikrofuge B zentrifugiert. Anschließend wurden die Spitzen der Beckman-Röhrchen, welche die Zellen enthielten, abgetrennt, in 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen überführt und die Radioaktivität in einem Gammazähler gemessen.

Die Viabilitätsansätze wurden analog zu den anderen Ansätzen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie während der Zeit, in der mit den anderen Ansätzen wie oben beschrieben verfahren wurde, auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen durch Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.1.5 Auswertung der Bindungsversuche

3.2.1.5.1 Auswertung der Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

Der Anteil des radioaktiv markierten $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$, welcher in den Bindungsversuchen an den Binder gebunden hatte, wurde als Bindung B bezeichnet. Die als "Blank-Werte" mitgeführten Werte, welche einen Überblick über den Anteil der Bindung geben sollten, die nicht durch Interaktion von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ mit Vitronektin zustande kam, gingen in die Auswertung der Bindungsversuche nicht mit ein.

Üblicherweise wurde nicht der Absolutwert der Bindung des Verdrängungsansatzes angegeben, sondern die im (VD) gemessene Bindung wurde als prozentualer Anteil (B_{VD}) der im Kontrollansatz (B_0) gemessenen Bindung angegeben (in Prozent der Kontrolle):

$$B_{\text{VD}} = [\text{VD} / B_0] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 1})$$

Gelegentlich, z.B. in den ON-/OFF-Kinetiken und Verdrängungsexperimenten, kam eine weitere Darstellungsart zur Anwendung: Die im Versuchsansatz ermittelten Kontroll (B_0) - und Verdrängerwerte (VD) wurden als prozentualer Anteil ($B_{0/\text{CT}}$ bzw. VD/CT) der insgesamt in den Inkubationsansatz eingebrachten Menge an Tracer ausgedrückt (in Prozent von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ im Ansatz):

$$B_{0/CT} = [B_0 / CT] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 2})$$

$$VD_{/CT} = [VD / CT] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 3})$$

Die im Folgenden angegebenen Ergebniswerte sind stets in Form von Mittelwert und Standardabweichung dargestellt und resultieren aus den Mittelwerten, die in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten aus jeweils zwei bis drei Einzelwerten erhalten wurden. Ausnahmen sind gesondert gekennzeichnet und erläutert.

3.2.1.5.2 Auswertung der Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung und mit THP-1-Zellen in Suspension

Der Anteil des radioaktiv markierten β_H -LPH(1-89), welcher in den Bindungsversuchen gebunden hatte, wurde als Bindung B bezeichnet. Da in diesen Bindungswert zusätzlich zur spezifischen und unspezifischen Bindung an den eigentlichen Binder in den Experimenten mit Heparin-aktiviertem Vitronektin und den THP-1-Zellen auch die unspezifische Bindung an extrazelluläre Komponenten, Pufferbestandteile und Verunreinigungen der Lösungen mit einging, mußte zum Erhalt der spezifischen und unspezifischen Bindung, d.h. der Gesamtbindung an den Binder der Wert des Blank-Ansatzes (BL) vom Wert des Kontrollansatzes (B_0) subtrahiert werden. In den mit THP-1-Zellen in Suspension durchgeführten Experimenten ging in diesen Bindungswert zusätzlich zur Gesamtbindung auch die Radioaktivität ein, die durch die am Versuchsende stattfindende Zentrifugation nicht von den Zellen getrennt werden konnte. Aus diesem Grund mußte auch in diesen Experimenten zum Erhalt der Gesamtbindung an den Binder der Wert des Blank-Ansatzes (BL), der diesen Anteil an nicht zellgebundener, abzentrifugierter Radioaktivität repräsentierte, vom Wert des Kontrollansatzes (B_0) bzw. Kompletionsansatzes (VD) subtrahiert werden

$$B = B_0 - BL \quad [\text{cpm}] \quad (\text{Formel 4})$$

Üblicherweise wurde nicht der Absolutwert der Bindung des Verdrängungsansatzes angegeben, sondern die im (VD) gemessene Bindung

wurde als prozentualer Anteil (B_{VD}) der im Kontrollansatz (B_0) gemessenen Bindung angegeben (in Prozent der Kontrolle):

$$B_{VD} = [(VD-BL) / (B_0 - BL)] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 5})$$

Gelegentlich, z.B. in den ON-/OFF- Kinetiken und Verdrängerkurven, kam eine weitere Darstellungsart zur Anwendung: Die im Versuchsansatz ermittelten Kontroll (B_0) - und Verdrängerwerte (VD) wurden als prozentualer Anteil ($B_{0/CT}$ bzw. $VD_{/CT}$) der insgesamt in den Inkubationsansatz eingebrachten Menge an Tracer ausgedrückt (in Prozent von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-LPH}$ (1-89) im Ansatz):

$$B_{0/CT} = [(B_0 - BL) / (CT - BL)] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 6})$$

$$VD_{/CT} = [(VD - BL) / (CT - BL)] \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Formel 7})$$

Die im Folgenden angegebenen Ergebniswerte sind stets in Form von Mittelwert und Standardabweichung dargestellt die wiederum aus Mittelwerten resultieren, welche aus mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten aus jeweils zwei bis drei Einzelwerten erhalten wurden. Ausnahmen sind gesondert gekennzeichnet und erläutert.

3.2.1.6 Charakterisierung der Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-LPH}$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin, an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung sowie an THP-1-Zellen in Suspension

Die im folgenden dargestellte Untersuchung der Bindungscharakteristika beruht auf den von BURT (1978) postulierten Kriterien einer Ligand-Binder-Interaktion.

3.2.1.6.1 Prinzip der Charakterisierung

3.2.1.6.1.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

In diesen auch als ON-Kinetiken bezeichneten Versuchen sollte der zeitliche Verlauf der Bindung des Tracers an die verschiedenen Binder dargestellt

werden. Üblicherweise werden auf der Ordinate der Graphiken die Bindung und auf der Abszisse die Zeit aufgetragen. Charakteristisch für eine spezifische Bindung ist hierbei ein exponentieller Verlauf der Bindungskurve. Ist der Gleichgewichtszustand der Reaktion erreicht, geht die Kurve in eine Parallele zur Abszisse über. Die Dauer der Inkubationszeit der Versuche sollte dann so gewählt werden, dass sie der Zeit entspricht, die bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes benötigt wird.

3.2.1.6.1.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Zu den Charakteristika einer spezifischen Bindung gehört des Weiteren die Reversibilität der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor. Um diese nachzuweisen, wurden die verschiedenen Binder für eine definierte Zeit mit (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) in Abwesenheit nicht markierter Liganden inkubiert. Nach 180 min Inkubation wurde der nicht markierte Ligand im Überschuß zugegeben und die Bindung des markierten Liganden in bestimmten Zeitabständen gemessen, d.h. die Ansätze wurden noch einmal zwischen 10 min und 180 min inkubiert. Definitionsgemäß sollte der nicht markierte Ligand den markierten Liganden vollständig von seiner Bindungsstelle verdrängen können. Die Reversibilität der Bindung hat eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen zur Voraussetzung, aus denen der markierte durch den nicht markierten Liganden verdrängt werden kann; Voraussetzung ist aber auch das Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichtes in der Interaktion zwischen Ligand und Binder, was bedeutet, dass ständig Moleküle des Liganden gebunden werden, während andere sich aus ihrer Bindung lösen. Die insgesamt gebundene Menge des Liganden bleibt im Gleichgewichtszustand konstant. Das Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichtes stellt eine wichtige Voraussetzung zur Berechnung der Bindungsparameter K_{D} und B_{max} dar.

3.2.1.6.1.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Diese Versuche sollten die Abhängigkeit der Bindung des radioaktiv markierten Liganden von der vorhandenen Menge an Bindungsstellen, d.h. von der Konzentration des Binders im Inkubationsansatz zeigen. Erreicht wurde dies durch Variation der Vitronektin-Konzentration in der Beschichtungslösung

und im Inkubat mit Heparin sowie durch den Einsatz einer unterschiedlichen Konzentration von THP-1-Zellen pro Versuchsansatz.

3.2.1.6.1.4 Sättigbarkeit

Da spezifische Bindungsstellen für einen bestimmten Liganden nur in begrenzter Anzahl auf dem als Binder eingesetzten Molekül bzw. auf der Zelle vorhanden sind, muß die Bindung des Liganden an diese Bindungsstellen sättigbar sein. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der unspezifischen Bindungsstellen unendlich groß und die Bindung an diese nicht sättigbar. Zum Nachweis der Sättigbarkeit der untersuchten Bindungsstelle enthielt jeder Inkubationsansatz die gleiche Menge des radioaktiv markierten Liganden, während die Gesamtmenge des Liganden durch Zugabe steigender Mengen des nicht markierten Liganden in den Ansätzen gesteigert wurde. Durch diese Verdünnung mit dem kaltem Liganden nahm die Konzentration des markierten Liganden im Ansatz kontinuierlich prozentual ab, so dass auch die am Ende des Versuchs gemessene gebundene Radioaktivität mit steigenden Konzentrationen des kalten Liganden reduziert wurde. Zusätzlich ist die Abnahme der Bindung des markierten Liganden auf Konkurrenz des markierten und des nicht markierten Liganden um die in begrenzter Anzahl vorliegenden Bindungsstellen zurückzuführen.

3.2.1.6.1.5 Bindungsparameter K_D und B_{max}

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D , die ein Maß für die Affinität eines Liganden zu seiner Bindungsstelle darstellt, sowie die Bestimmung der vorliegenden Konzentration an Bindungsstellen B_{max} im Ansatz erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND (MUNSON and RODBARD, 1980) aus den in den Sättigungsexperimenten gewonnenen Daten. Voraussetzung für die Ermittlung dieser Bindungsparameter ist das Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichts zwischen den Interaktionspartnern. Das Programm ermittelt die Bindungsparameter durch iterative Anpassung des jeweils gewählten Bindungsmodells an die Experimentaldaten. Des Weiteren können mit diesem Programm Modelle unterschiedlicher Komplexität mit einer oder mehreren Bindungsstellen statistisch verglichen werden. Die auf diese Weise gewonnenen Bindungsparameter wurden anschließend durch konventionelle

Scatchardanalyse auf ihre Plausibilität überprüft. Nach Auftragen des Quotienten aus den Konzentrationen des gebundenem zum freien Liganden (Ordinate) gegen die molare Konzentration des gebundenen Liganden (Abszisse) ergab sich die Dissoziationskonstante als negativer Reziprokwert aus der Neigung der durch die vorliegenden Punkte verlaufenden Geraden des “Scatchard-Plots”. Die Konzentration der Bindungsstellen konnte aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse abgelesen werden.

3.2.1.6.1.6 Strukturspezifität

Um die Spezifität der Interaktion bezüglich der Struktur des Liganden (β_H -LPH(1-89)) zu belegen, wurden verschiedene Substanzen, deren Sequenz identisch mit bestimmten Fragmenten des Peptids war, bezüglich ihres Einflusses auf die Bindung untersucht. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an Vitronektin über den C-terminalen Abschnitt des β_H -Endorphin(1-31)-Moleküls vermittelt wird (WÖHNER,1998), während die Bindung an THP-1-Zellen in Suspension über das Mittelfragment von β_H -Endorphin(1-31) vermittelt wird (POLOCZEK, 2002). Da β_H -Endorphin(1-31) identisch ist mit dem C-terminalen Abschnitt des POMC-Fragmentes β_H -LPH(1-89), kamen zur Ermittlung der Strukturspezifität der β_H -LPH(1-89)-Bindung neben der Aminosäuresequenz von β -MSH(1-22) Fragmente des β_H -Endorphin(1-31) zum Einsatz, die entweder im Bereich des C-Terminus, des N-Terminus oder des Mittelfragments des β_H -Endorphin(1-31)-Moleküls lagen.

3.2.1.6.1.7 Lokalisation der Bindungsstelle

Die durchgeführten Verdrängungsexperimente legten das Vorhandensein einer spezifischen Bindungsstelle für β_H -LPH(1-89) auf Vitronektin sowie das Vorhandensein mehrerer spezifischer Bindungsstellen für β_H -LPH(1-89) auf den Monozyten der Zelllinie THP-1 nahe. Zur näheren Lokalisation dieser Bindungsstellen wurde der Einfluss verschiedener Antikörper, deren Epitope als potentielle β_H -LPH(1-89)-Bindungsstellen in Frage kamen, auf die Bindung des β_H -LPH(1-89) untersucht. Neben dem Einfluss der Antikörper wurde auch der Einfluss einer Reihe von Makromolekülen, deren Interaktion mit den potentiellen β_H -LPH(1-89)-Bindungsstellen möglich schien, auf die Bindung

von β_{H} -LPH(1-89) an die verschiedenen Binder untersucht. Eine in Gegenwart dieser Antikörper oder Makromoleküle sichtbare Abnahme der Bindung wurde als Konkurrenz der getesteten Substanz und des Liganden um die Bindungsstelle interpretiert. Da die Epitope der Antikörper sowie mögliche Bindungsstellen der Makromoleküle bekannt waren, konnte die Lokalisation der Bindungsstelle für β_{H} -LPH(1-89) auf bestimmte Bereiche der Binder eingegrenzt werden.

Während mit Hilfe der polyklonalen Antiseren nur eine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob das als Bindungsstelle vermutete Molekül überhaupt bindungsrelevant war, war durch den Einsatz monoklonaler Antikörper die Charakterisierung bestimmter Teilbereiche dieses Moleküls als bindungsrelevant möglich.

Zum Einsatz kamen verschiedene gegen Vitronektin gerichtete polyklonale Antiseren (aS 6/7, aS 66/67) und monoklonale Antikörper (VN9, 8E6, 16A7) sowie einige Substanzen, deren Interaktion mit Vitronektin in anderen Zusammenhängen erwiesen war (suPAR, 3936, R3, HK, HKa, PN-1, Heparin, cRGD).

In den an THP-1-Zellen durchgeführten Experimenten wurde des Weiteren der Einfluss von verschiedenen gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 gerichteten monoklonalen Antikörpern sowie der Einfluss des natürlichen Liganden RANTES des CCR5 Rezeptors auf die β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an die THP-1-Zellen untersucht.

3.2.1.6.2 Oberflächen-assoziiertes Vitronektin

3.2.1.6.2.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

In die mit Vitronektin in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beschichteten Wells (siehe 3.2.1.2.1) wurden nacheinander 30 μl Puffer C, 10 μl BSA 0,1% und 10 μl des mit (^{125}I) markierten β_{H} -LPH(1-89) einpipettiert (siehe Tabelle 1, Kontrollansätze). Das Pipettieren erfolgte auf Eis, die eingesetzten Lösungen kamen alle in eisgekühltem Zustand zum Einsatz. Nach Zugabe des (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) wurden die Wells bei 4°C inkubiert, wobei zum Nachweis der Zeitabhängigkeit der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin die Inkubationszeit der einzelnen Werte zwischen

10 min und 180 min variiert wurde. Die weitere Durchführung des Versuchs erfolgte wie unter 3.2.1.4.1 beschrieben.

3.2.1.6.2.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Zum Nachweis der Reversibilität der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin wurden Kontrollansätze (siehe Tabelle 1) zusammengestellt, jedoch ohne die sonst eingesetzten 10 μl der 0,1%igen BSA-Lösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 180 min bei 4°C erfolgte die Zugabe von 10 μl unmarkiertem $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in BSA 0,1% in jedes Well. Anschließend wurden die Wells erneut bei 4°C inkubiert, wobei die Inkubationszeit zwischen 10 min und 180 min variiert wurde. Die weitere Behandlung der Wells erfolgte wie unter 3.2.1.4.1 beschrieben.

3.2.1.6.2.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Um die Abhängigkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin von der Menge der vorhandenen Bindungsstellen zu prüfen, wurde die Vitronektin-Konzentration in der Beschichtungslösung von 0,09 $\mu\text{g/ml}$ bis 200 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert. Mit den so beschichteten Wells wurde wie unter 3.2.1.4.1 geschildert weiterverfahren.

3.2.1.6.2.4 Sättigbarkeit

Für den Nachweis der Sättigbarkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin wurden Kontrollansätze, Blankansätze und Kompetitionsansätze wie in Tabelle 1 beschrieben zusammengestellt. In die Kompetitionsansätze wurde das nicht markierte $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in steigender Konzentration eingebracht. Die Konzentration im Inkubationsansatz lag zwischen 9×10^{-10} M und 2×10^{-6} M. Die weitere Behandlung der Proben entsprach dem üblichen Vorgehen (siehe 3.2.1.4.1).

3.2.1.6.2.5 Bindungsparameter K_{D} und B_{max}

Die Bindungsparameter K_{D} und B_{max} wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente bestimmt. Die auf diese Weise gewonnenen

Bindungsparameter wurden anschließend durch konventionelle Scatchard-Analyse auf ihre Plausibilität geprüft. Hierzu wurde der gebundene Anteil des Liganden (Abszisse) gegen den Quotienten aus gebundenem zu freiem Liganden (Ordinate) aufgetragen. Die Dissoziationskonstante konnte somit als negativer Reziprokwert aus der Steigung der durch die erhaltenen Punkte gelegten Geraden errechnet werden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse entsprach der Bindungsstellen-Konzentration B_{\max} .

3.2.1.6.2.6 Strukturspezifität

Die Strukturspezifität der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin konnte durch Einsatz verschiedener Verdränger, die in unterschiedlichem Ausmaß Strukturhomologien mit dem Liganden aufwiesen, dargestellt werden. Hierzu wurden Kontrollansätze, Blankansätze und Kompetitionsansätze wie in Tabelle 1 beschrieben, zusammengestellt. Die Konzentration der eingesetzten Kompetitoren lag bei 2×10^{-5} M im Inkubationsansatz. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.2.1.4.1 geschilderten.

3.2.1.6.2.7 Lokalisation der Bindungsstelle auf Vitronektin

3.2.1.6.2.7.1 Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung

Das Vorgehen während des Versuchs entsprach weitgehend dem unter 3.2.1.4.1 dargestellten Ablauf. Statt der in Tabelle 1 angegebenen 10 μ l des in BSA 0,1% gelösten Verdrängers wurden in die beschichteten Wells 10 μ l einer Lösung des polyklonalen Antiserums bzw. monoklonalen Antikörpers gelöst in BSA 0,1% einpipettiert. Vor der Aufgabe des Tracers wurde eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C durchgeführt. Im Anschluß daran erfolgte die Traceraufgabe und die übliche Inkubation von 4,5 h Dauer. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper lag im Inkubationsansatz zwischen 0,02 mg Protein/ml und 2,76 mg Protein/ml. Ansonsten entsprach der Versuchsablauf dem unter 3.2.1.4.1 geschilderten.

3.2.1.6.2.7.2 Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung

Um den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin zu prüfen, wurden Kompetitionsansätze wie in Tabelle 1 beschrieben zusammengestellt. Statt der 10 μl des in BSA 0,1% gelösten Verdrängers wurden den Ansätzen 10 μl der entsprechenden, ebenfalls in BSA 0,1% gelösten Substanzen zugesetzt. (Die einzelnen Substanzen kamen in folgenden Konzentrationen zum Einsatz: 13H1 0,9 $\mu\text{g/ml}$; 3936 0,9 $\mu\text{g/ml}$; R3 0,9 $\mu\text{g/ml}$; cRGD 9 $\mu\text{g/ml}$; Heparin 90 $\mu\text{g/ml}$; PN-1 200 nM; PAI-1 100 nM; HK 9 $\mu\text{g/ml}$; HKa 9 $\mu\text{g/ml}$; suPAR 2 $\mu\text{g/ml}$). Vor der Aufgabe des Tracers erfolgte wie auch in den mit Vitronektin-Antikörpern durchgeführten Versuchen eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C. Nach der Traceraufgabe wurden die Ansätze für 4,5 h bei 4°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Proben verlief wie unter 3.2.1.4.1 dargestellt.

3.2.1.6.3 Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung

3.2.1.6.3.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

Nach der wie unter 3.2.1.2.2 beschriebenen Vorinkubation des Vitronektins (20 $\mu\text{g/ml}$) mit Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) in Puffer C erfolgte die Zugabe der weiteren in Tabelle 2 genannten Lösungen zu den Kontrollansätzen sowie die Zusammenstellung der Blank- und CT-Ansätze auf Eis unter Verwendung eisgekühlter Lösungen. Im Inkubationsansatz, dessen Volumen 120 μl betrug, lag die Vitronektin-Konzentration bei 4 $\mu\text{g/ml}$. Nach Aufgabe des Tracers wurden die Proben bei 4°C inkubiert, wobei zur Darstellung der Zeitabhängigkeit der Bindung die Inkubationszeit zwischen 10 min und 180 min variiert wurde. Die Behandlung der Proben nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte wie unter 3.2.1.4.2 beschrieben.

3.2.1.6.3.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Nach der unter 3.2.1.2.2 beschriebenen Vorinkubation des Vitronektins (20 $\mu\text{g/ml}$) mit Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) in Puffer C erfolgte die weitere Zusammenstellung der Inkubationsansätze wie in Tabelle 2 aufgeführt, wobei bei der Herstellung der Kontrollansätze die Zugabe der 10 μl BSA 0,1%

unterlassen wurde. Im Anschluß an die Traceraufgabe wurden die Ansätze für 180 min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden jedem Kontrollansatz 10 µl in BSA 0,1% gelösten, eisgekühlten Verdrängers zugesetzt. Danach fand erneut eine Inkubation bei 4°C statt, wobei die Inkubationszeit zwischen 10 min und 180 min variiert wurde. Die Behandlung der Proben nach Ablauf dieser Inkubationszeit erfolgte wie unter 3.2.1.4.2 geschildert.

3.2.1.6.3.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Um die Abhängigkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Heparin-aktiviertes Vitronektin von der Konzentration der Bindungsstellen zu zeigen, wurde die Konzentration des mit Heparin (10 µg/ml) wie unter 3.2.1.2.2 geschildert vorinkubierten Vitronektins von 0,1 µg/ml bis zu 40 µg/ml gesteigert. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze erfolgte wie in Tabelle 2 angegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 180 min wurden die Proben wie unter 3.2.1.4.2 weiter behandelt.

3.2.1.6.3.4 Sättigbarkeit

Für den Nachweis der Sättigbarkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Heparin-aktiviertes Vitronektin wurden nach Durchführung der Vorinkubation des Vitronektins (10 µg/ml) mit Heparin (10 µg/ml) (siehe 3.2.1.2.2) die Inkubationsansätze wie in Tabelle 2 beschrieben pipettiert. In die Kompetitionsansätze wurde das nicht markierte $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in steigenden Konzentrationen (4×10^{-10} M bis 8×10^{-7} M) zugegeben. Der weitere Ablauf des Versuchs erfolgte wie unter 3.2.1.4.2 beschrieben.

3.2.1.6.3.5 Bindungsparameter K_{D} und B_{max}

Die Bindungsparameter K_{D} und B_{max} wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente bestimmt. Die auf diese Weise gewonnenen Bindungsparameter wurden anschließend durch konventionelle Scatchard-Analyse auf ihre Plausibilität geprüft. Hierzu wurde die Konzentration an gebundenem Liganden (M) (Abszisse) gegen den Quotienten aus der

Konzentration des gebundenem zum freien Liganden (Ordinate) aufgetragen. Die Dissoziationskonstante konnte somit als negativer Reziprokwert aus der Steigung der durch die erhaltenen Punkte gelegten Geraden errechnet werden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse entsprach der Bindungsstellen-Konzentration B_{\max} .

3.2.1.6.3.6 Strukturspezifität

Zur Ermittlung der Strukturspezifität der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Heparin-aktiviertem Vitronektin wurde isoliertes Vitronektin (10 $\mu\text{g/ml}$) wie unter 3.2.1.2.2 beschrieben mit Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze erfolgte wie in Tabelle 2 aufgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Kompetitoren betrug $8,3 \times 10^{-6}$ M im Inkubationsansatz. Der weitere Ablauf des Versuches erfolgte wie unter 3.2.1.4.2 geschildert.

3.2.1.6.3.7 Lokalisation der Bindungsstelle auf Vitronektin

3.2.1.6.3.7.1 Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung

Nach Vorinkubation des Vitronektins (10 $\mu\text{g/ml}$) mit Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) (siehe 3.2.1.2.2) kamen statt der in Tabelle 2 erwähnten 10 μl des in BSA 0,1% gelösten Verdrängers 10 μl der ebenfalls in BSA 0,1% gelösten Antiseren bzw. Antikörper zum Einsatz. Vor Aufgabe des Tracers erfolgte ebenfalls eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C. Der weitere Versuchsablauf gestaltete sich wie unter 3.2.1.4.2 beschrieben. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper wurde entsprechend der in den Festphasen-Versuchen eingesetzten Konzentration gewählt.

3.2.1.6.3.7.2 Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung

Um den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin zu prüfen, wurden nach der Vorinkubation von Vitronektin (10 $\mu\text{g/ml}$) mit Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) (siehe

3.2.1.2.2) Kompetitionsansätze wie in Tabelle 2 beschrieben zusammengestellt. Statt der 10 µl des in BSA 0,1% gelösten Verdrängers wurden den Ansätzen 10 µl der entsprechenden, ebenfalls in BSA 0,1% gelösten Substanz zugesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden entsprechend den in den Festphasen-Versuchen eingesetzten Konzentrationen gewählt. Vor der Aufgabe des Tracers erfolgte wie auch in den mit Vitronektin-Antikörpern durchgeführten Versuchen eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C. Nach Traceraufgabe wurden die Ansätze wie üblich für 180 min bei 4°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Proben verlief wie unter 3.2.1.4.2 dargestellt.

3.2.1.6.4 THP-1-Zellen in Suspension

3.2.1.6.4.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

Zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension wurden die verschiedenen Inkubationsansätze (Kontroll-, Blank- und CT-Ansätze) wie in Tabelle 3 beschrieben zusammengestellt. Die Konzentration der Zellen betrug 4×10^6 Zellen/ml. Nach Aufgabe des Tracers erfolgte die Inkubation der Ansätze bei 4°C auf einem Dynatech-Varishaker (Stufe 5-6). Um die zeitliche Assoziation des $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an die Zellen darzustellen, wurde die Inkubationszeit zwischen 10 min und 180 min variiert. Die weitere Behandlung der Ansätze verlief wie unter 3.2.1.4.3 geschildert.

3.2.1.6.4.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Die Zusammenstellung der Ansätze (Kontroll-, Blank- und CT-Ansätze) für die Prüfung der Reversibilität der $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ Bindung an THP-1-Zellen in Suspension erfolgte wie in Tabelle 3 beschrieben, wobei die Kontrollansätze ohne die in der Tabelle erwähnten 20 µl BSA 0,1% eingebracht wurden. Nach Aufgabe des Tracers erfolgte eine Inkubation von 180 min Dauer bei 4°C auf einem Dynatech-Varishaker. Anschließend wurden jedem Ansatz 20 µl nicht markiertes $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ im Überschuß zugesetzt. Nach Durchmischung auf einem Eppendorf-Tischschüttler wurden die Ansätze erneut für 10 min bis 180 min bei 4°C auf dem Varishaker inkubiert. Die Weiterbehandlung der

Ansätze nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte wie unter 3.2.1.4.3 geschildert.

3.2.1.6.4.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

In diesen Versuchen sollte die Abhängigkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension in Abhängigkeit von der Konzentration an THP-1-Zellen im Ansatz bestimmt werden. Dazu wurde die Zellkonzentration in den Ansätzen von 1×10^5 Zellen/ml auf 50×10^6 Zellen/ml gesteigert, die weitere Zusammensetzung der Ansätze entsprach den in Tabelle 3 aufgeführten Kontrollansätzen. Mit diesen Ansätzen wurde wie unter 3.2.1.4.3 beschrieben weiterverfahren.

3.2.1.6.4.4 Sättigbarkeit

Für den Nachweis der Sättigbarkeit der Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension wurden die Inkubationsansätze entsprechend Tabelle 3 zusammengestellt. In die Kompetitionsansätze wurde das nicht markierte $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in steigender Konzentration zugegeben ($4,5 \times 10^{-10}$ M bis 9×10^{-6} M). Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.2.1.4.3 erläutert.

3.2.1.6.4.5 Bindungsparameter K_D und B_{max}

Die Bindungsparameter K_D und B_{max} wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente bestimmt. Die auf diese Weise gewonnenen Bindungsparameter wurden anschließend durch konventionelle Scatchard-Analyse auf ihre Plausibilität geprüft. Hierzu wurde der gebundene Anteil des Liganden (Abszisse) gegen den Quotienten aus der Konzentration an gebundenem zu freiem Liganden (Ordinate) aufgetragen. Die Dissoziationskonstante konnte somit als negativer Reziprokwert aus der Steigung der durch die erhaltenen Punkte gelegten Geraden errechnet werden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse entsprach der Bindungsstellen-Konzentration B_{max} .

3.2.1.6.4.6 Strukturspezifität

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze erfolgte wie in Tabelle 3 beschrieben. Die Konzentration der eingesetzten Kompetitoren lag in der Regel bei 9×10^{-6} M, in Ausnahmefällen kamen auch höhere oder niedrigere Konzentrationen zum Einsatz. Die weitere Behandlung der Ansätze erfolgte wie unter 3.2.1.4.3 geschildert.

3.2.1.6.4.7 Lokalisation der Bindungsstelle auf THP-1-Zellen

3.2.1.6.4.7.1 Prüfung von polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Vitronektins auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Der Versuchsablauf entsprach im Wesentlichen dem unter 3.2.1.4.3 geschilderten Ablauf mit geringen Modifikationen. Statt der 20 μ l des in BSA 0,1% gelösten Verdrängers (Tabelle 3) kamen 20 μ l des ebenfalls in BSA 0,1% gelösten Antiserums bzw. Antikörpers zum Einsatz. Vor Aufgabe des Tracers erfolgte wie auch in den Vitronektin als Binder enthaltenden Versuchen eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C, um die Bindung des Antikörpers an die Zellen zu ermöglichen. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper lag im Inkubationsansatz zwischen 0,09 mg Protein/ml und 1,25 mg Protein/ml.

3.2.1.6.4.7.2 Prüfung verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie unter 3.2.1.4.3 beschrieben. Statt des Verdrängers wurden je 20 μ l der entsprechenden in BSA 0,1% gelösten Substanz zugegeben, anschließend erfolgte vor der Aufgabe des Tracers eine Vorinkubation von 30 min bei 4°C.

3.2.1.6.4.7.3 Prüfung von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Chemokin-Rezeptors CCR5 auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der β_{H} -LPH(1-89)- Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Der Versuchsablauf war identisch mit dem unter 3.2.1.6.4.7.1 geschilderten Vorgehen, wobei statt der gegen Vitronektin gerichteten Antiseren bzw. Antikörper die gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 gerichteten monoklonalen Antikörper eingesetzt wurden. Da einer der Antikörper in Na-Azid 0,1%, der andere in PBS gelöst war, wurden in den Experimenten jeweils in dreifacher Ausführung Ansätze mitgeführt, in denen Na-Azid 0,1% bzw. PBS statt eines Verdrängers eingesetzt wurde, um im Falle eines eintretenden Verdrängungseffekts ausschließen zu können, dass dieser auf die zur Lösung der Antikörper verwendeten Lösungskomponenten zurückzuführen war. Des Weiteren wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Lokalisation der β_{H} -LPH(1-89) Bindungsstelle der Einfluss des natürlichen CCR5-Liganden RANTES auf die Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit THP-1-Zellen in Suspension geprüft. Der Versuchsablauf dieser Bindungsexperimente war ebenfalls identisch mit dem unter 3.2.1.6.4.7.1 geschilderten Vorgehen. Da RANTES in PBS mit 0,1% BSA gelöst war, wurden in den Experimenten Proben mitgeführt, die PBS mit 0,1% BSA als Verdränger enthielten.

3.2.2 Untersuchungen zur Internalisierung von β_{H} -LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension

Zur Prüfung der Internalisierung von β_{H} -LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension wurden Inkubationsansätze wie in Tabelle 3 beschrieben zusammengestellt. Zusätzlich wurden Kompetitionsansätze hergestellt, welche statt der 20 μl des Verdrängers 20 μl einer Lösung aus Desoxy-D-Glucose (500 nM) und Na-Azid (10%ig) enthielten. Nach Aufgabe des Tracers erfolgte die Inkubation der Proben bei zwei Probensätzen (Kontroll-, Blank-, Kompetitions-, Desoxy-D-Glucose + Na-Azid- sowie Viabilitätsansätze): Der erste Probensatz wurde bei 4°C, jedoch nicht auf dem Varishaker, der zweite Probensatz (gleiche Zusammenstellung wie beim ersten Satz) wurde bei 37°C unter Verwendung des Varishakers inkubiert. Die Dauer der Inkubation variierte zwischen 10 min und 120 min. Während der Inkubationszeit wurden

die Proben des ersten Satzes mehrmals für ca. 10 s auf einem Eppendorf-Tischschüttler durchmischt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die bei 37°C inkubierten Proben für 5 bis 10 min auf Eis gelagert. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.2.1.4.3 geschilderten.

3.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der β_H -LPH(1-89)-Interaktion mit CCR5 auf die Infektiosität bestimmter HIV-1-Stämme bei P4R5-Magi-Zellen

Die Experimente zur Untersuchung des Einflusses der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit CCR5 auf die Infektiosität bestimmter HIV-1-Stämme wurden freundlicherweise von Jan Münch und Frank Kirchhoff, Institut für Klinische und Molekulare Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg, durchgeführt. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach der von DETHEUX et al. (2000) beschriebenen Methode. Die Kultivierung der Magi-P4R5-Zellen erfolgte in DMEM unter Zusatz von 10% FCS und 1 μ g/ml Puromycin. Die Zellen wurden auf Mikrotiter-Platten (96 Wells) ausgesät, über Nacht kultiviert und anschließend nach Zugabe von β_H -LPH(1-89) in unterschiedlichen Konzentrationen (zwischen 25 μ g/ml und 400 μ g/ml) für 4 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Infektion der Zellen mit dem HIV-1- Stamm Yu2. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend in frischem Medium weiterkultiviert. 3 Tage nach der Infektion der Zellen mit dem HIV-1-Stamm erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase, welches als Indikator für die HIV-1 Infektion benutzt wurde, mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Assays (Tropix, Bedford, USA).

4. ERGEBNISSE

4.1 Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle für β_{H} -LPH(1-89) auf Vitronektin

Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es, spezifische Bindungsstellen für β_{H} -LPH(1-89) auf Oberflächen-assoziiertem und auf Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung nachzuweisen. Die Experimente hatten einerseits zum Ziel, zu prüfen, ob die Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit Oberflächen-assoziiertem oder mit Heparin-aktiviertem Vitronektin die klassischen Kriterien einer spezifischen Ligand-Binder-Interaktion (BURT, 1978) erfüllten. Hierzu zählen u.a. Zeitabhängigkeit, Reversibilität, Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen und Sättigbarkeit der Bindung. Weiterhin sollten die – wie zu vermuten war – unterschiedlichen Charakteristika der β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an die verschiedenen Vitronektin-Formen bestimmt werden, wie z.B. die Strukturspezifität der Bindung.

4.1.1 Charakteristika der Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

4.1.1.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

Die Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin stellte sich als zeitabhängiger Prozeß dar. Die Bindungskurve zeigte während der 180-minütigen Inkubationszeit einen kontinuierlichen Anstieg, die halbmaximale Bindung war bereits innerhalb der ersten 30 min erreicht (Abb.3).

4.1.1.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Die Reversibilität der Bindung als weiteres wichtiges Kriterium für deren Spezifität konnte in Verdrängungsexperimenten durch nachträgliche Verdrängung des markierten β_{H} -LPH(1-89) mittels eines Überschusses des nicht radioaktiv markierten Peptids nachgewiesen werden. Unmittelbar nach der Zugabe des nicht markierten β_{H} -LPH(1-89) zeigte sich ein rascher Abfall der Bindungskurve. Im weiteren Verlauf nahm die Bindung bis zum Ende der

Inkubationszeit langsam weiter ab, was insgesamt einem exponentiellen Abfall der Bindung in Abhängigkeit von der Zeit entspricht (Abb.3).

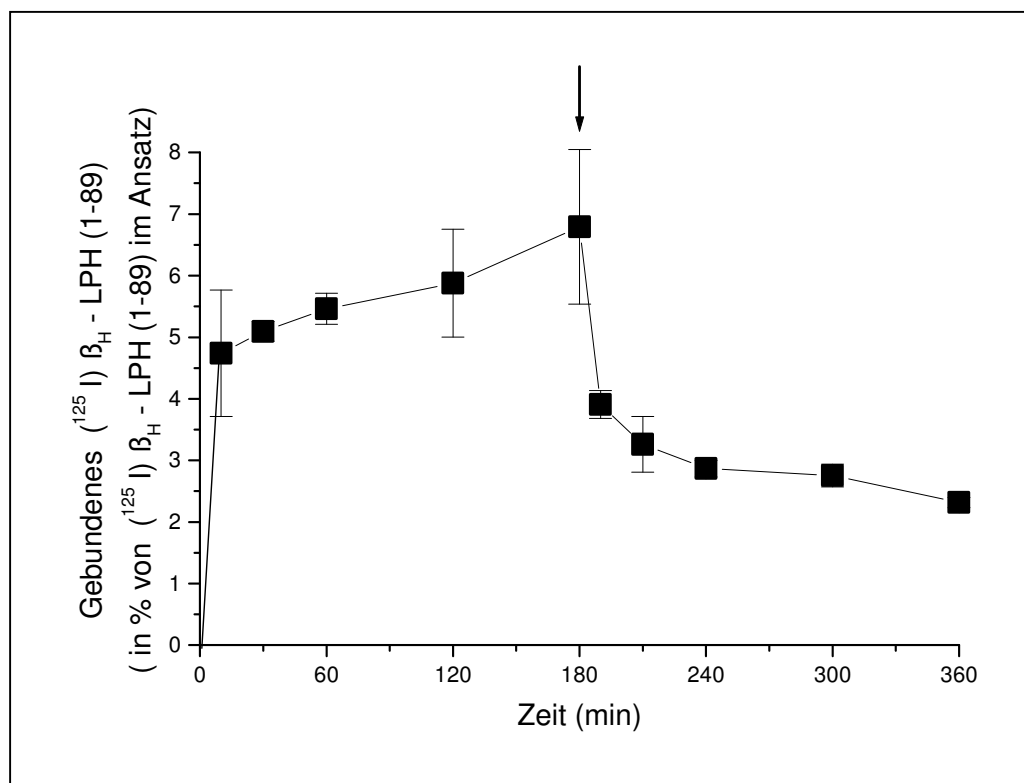


Abb.3: Darstellung der Zeitabhängigkeit und Reversibilität der Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin . Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von unmarkiertem β_H-LPH(1-89) [10⁻⁵ M]. Angabe der Bindung in Prozent der Gesamtradioaktivität im Ansatz. Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.1.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Die Bindung von β_H-LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen, was durch schrittweise Erhöhung der Vitronectin-Konzentration in den beschichteten Wells nachgewiesen werden konnte. Bei Vorgabe von jeweils 10000 cpm pro Ansatz und bei steigender Konzentration an Vitronectin in der Beschichtungslösung nahm die Bindung von β_H-LPH(1-89) bis zu einem Bindungsmaximum bei ca. 20 µg/ml Beschichtungslösung zu. Eine weitere Erhöhung der Vitronectin-Konzentration bewirkte keine wesentliche Zunahme der Bindung (Abb.4).

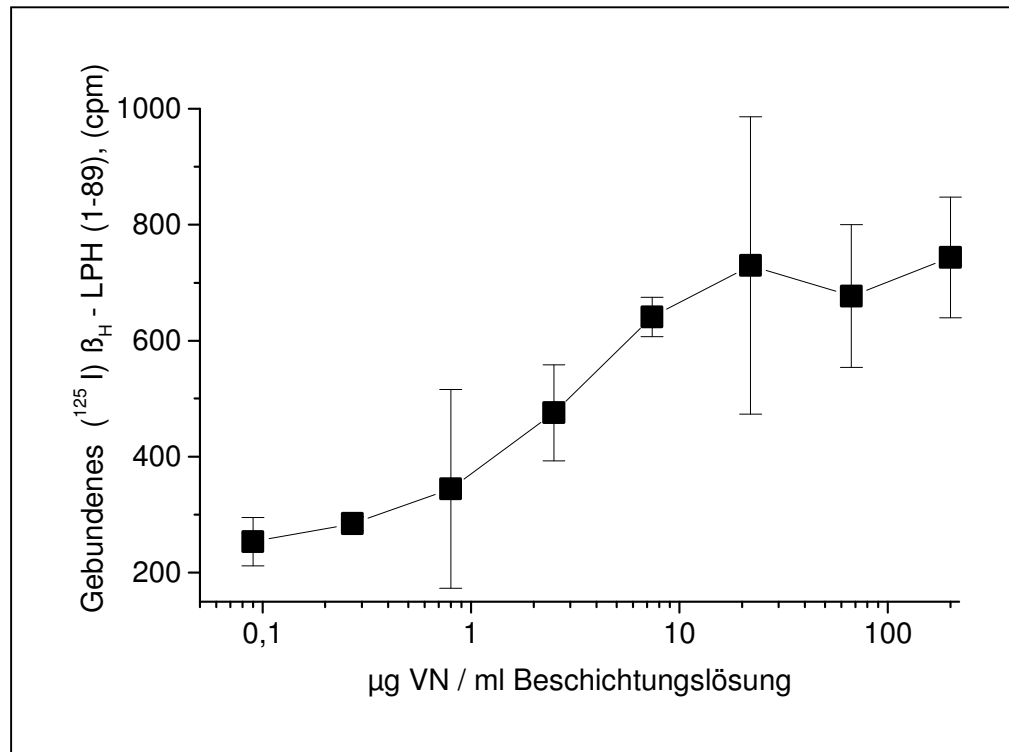


Abb.4: Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin in Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen (0,09 µg Vitronectin/ml bis 200 µg Vitronectin/ml Beschichtungslösung). Angabe der Bindung in cpm (counts per minute). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.1.4 Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit der Bindung von β_H-LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin konnte in Experimenten dargestellt werden, in welchen die Konzentration des nicht radioaktiv markierten β_H-LPH(1-89) variiert wurde. Das radioaktiv markierte Peptid repräsentierte dabei jeweils anteilmäßig das Bindungsverhalten der Gesamtmenge des (markierten und nicht markierten) Liganden. Der relative Anteil des gebundenen Liganden an der Gesamtmenge nahm mit steigender Konzentration des Liganden ab, da die Bindung auf Grund der endlichen Anzahl an spezifischen Bindungsstellen abgesättigt wurde.

Die maximale Bindung des markierten Liganden wurde bei Konzentrationen des nicht markierten Liganden im nanomolaren Bereich beobachtet, während der gebundene Anteil des markierten Liganden an der Gesamtbindung im mikromolaren Bereich nur noch sehr gering war. Der steilste Anstieg einer dem

gesamten Konzentrationsbereich zugeordneten Sättigungskurve lag im Konzentrationsbereich zwischen 1×10^{-8} M und 1×10^{-7} M. Unter Berücksichtigung eines zweistufigen Verlaufs, der mit der Existenz zweier Bindungsstellen kompatibel wäre, lägen die entsprechenden Werte darüber bzw. darunter (Abb.5).

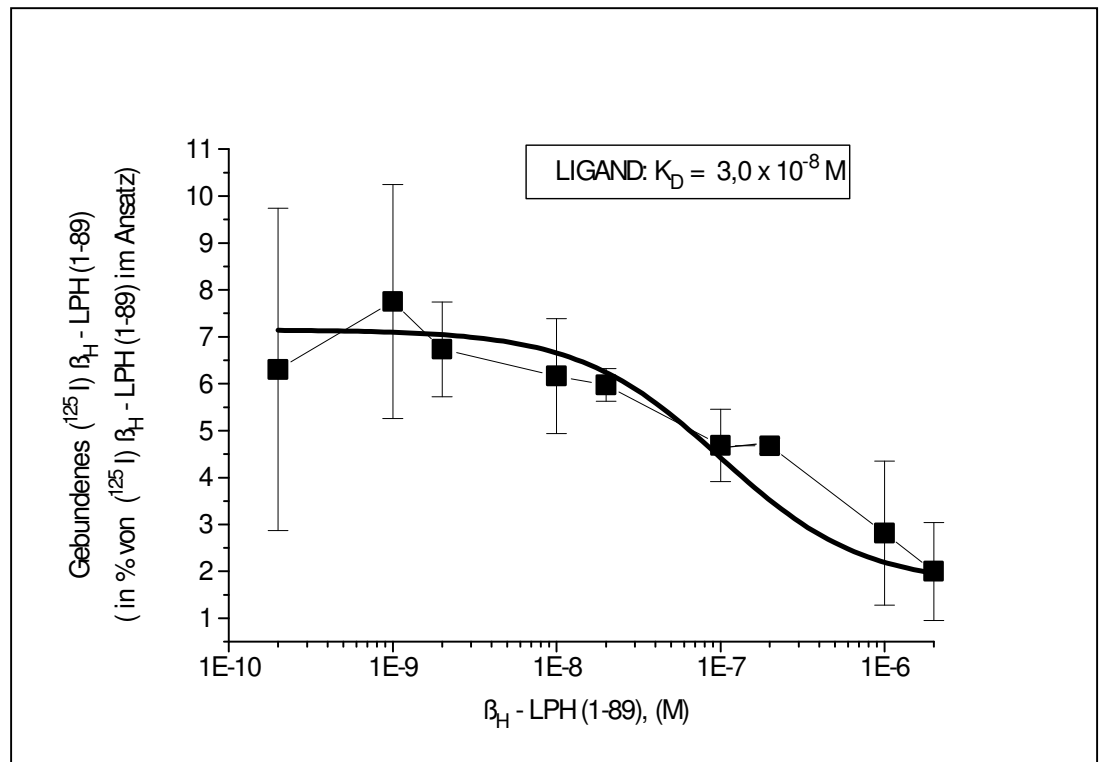


Abb.5: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin in Anwesenheit steigender Konzentrationen von nicht markiertem $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ [9×10^{-10} M bis 2×10^{-6} M]. Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität. (Mittelwerte) \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.1.5 Bindungsparameter K_{D} und B_{max}

Aus den Ergebnissen der unter 4.1.1.4 dargestellten Sättigungsexperimente konnten mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND die Bindungsparameter K_{D} (Dissoziationskonstante) und B_{max} (Konzentration der Bindungsstellen im Ansatz) berechnet werden. Die K_{D} für $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ lag im Durchschnitt (Mittelwert aus den Ergebnissen von drei Experimenten) bei $3,0 \times 10^{-8}$ M, die maximale Konzentration der Bindungsstellen B_{max} betrug durchschnittlich $4,2 \times 10^{-8}$ M.

Für eines der drei durchgeführten Experimente wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND zwei Bindungsstellen ermittelt. Eine dieser beiden Bindungsstellen entsprach auf Grund ihrer Bindungsparameter (K_D $1,7 \times 10^{-8}$ M; B_{max} $1,8 \times 10^{-10}$ M) der Bindungsstelle, welche auch bei Prüfung auf eine Bindungsstelle gefunden worden war. Die zweite Bindungsstelle entsprach einer geringeren Affinität (K_D $2,3 \times 10^{-7}$ M; B_{max} $2,4 \times 10^{-8}$ M).

Die auf diese Weise ermittelten Ergebnisse wurden mittels graphischer Auswertung überprüft (Abb.6). Hier lag die K_D im Durchschnitt bei $6,7 \times 10^{-7}$ M, die B_{max} betrug durchschnittlich $5,1 \times 10^{-8}$ M.

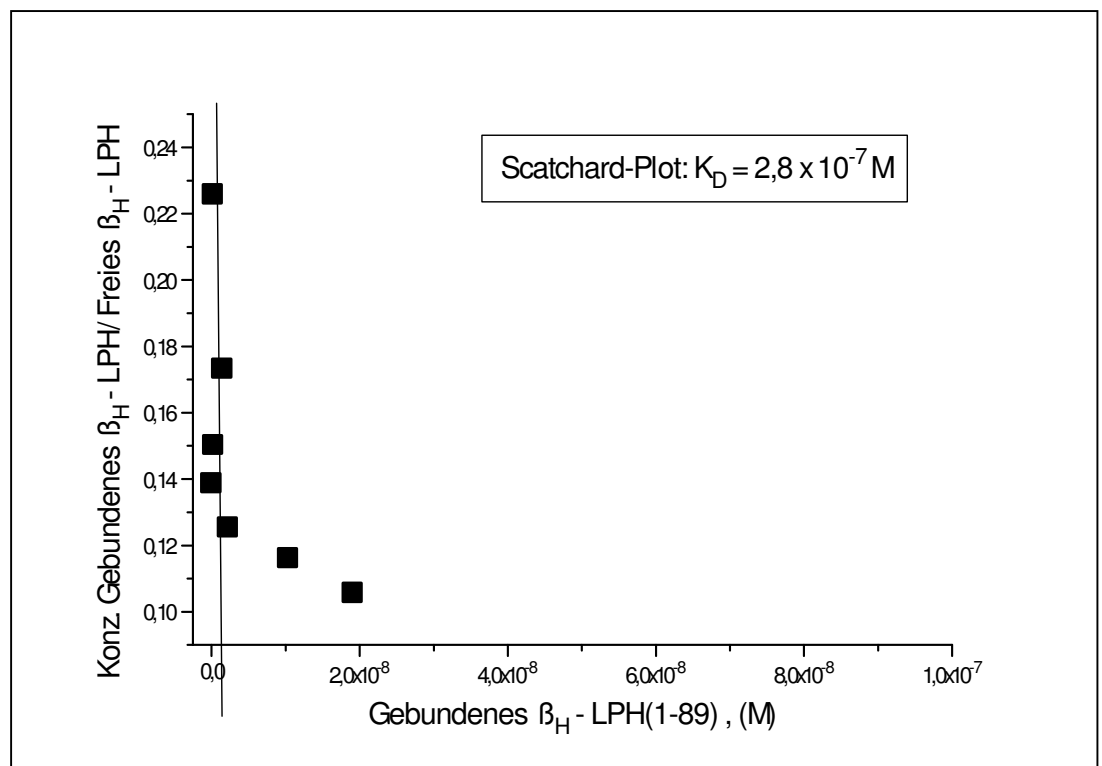


Abb.6: Scatchard-Diagramm zur graphischen Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{max} aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente. Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines der in Abbildung 5 eingegangenen Experimente.

4.1.1.6 Strukturspezifität

Um die Strukturspezifität der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin zu prüfen, wurde die Bindung von β_H -LPH (1-89) an das Oberflächen-assoziierte Vitronektin in Gegenwart verschiedener Fragmente des β_H -Endorphin(1-31) gemessen. Die Ergebnisse

zeigten, dass die Bindung über die C-terminale Aminosäuresequenz des β_{H} -Endorphin(1-31) vermittelt wird, welche identisch ist mit der C-terminalen Sequenz des β_{H} -LPH(1-89). Die inhibitorische Potenz war bei Fragmenten, die den C-Terminus enthielten, deutlich stärker ausgeprägt als bei Fragmenten, denen dieser C-Terminus fehlte. Sie wuchs mit Verlängerung des C-Terminus in N-terminale Richtung. Fragmente, welche nur die N-terminale Aminosäuresequenz enthielten, hatten keinen Einfluss auf die Bindung. Verlängerung dieser Fragmente in Richtung des C-terminalen Endes führte zu geringer, mit wachsender Länge des Fragments zunehmender, Abnahme der Bindung des radioaktiv markierten β_{H} -LPH(1-89). Das Mittelfragment des β_{H} -Endorphins (1-31), β_{H} -Endorphin (18-27), hatte keinen Einfluss auf die Bindung des β_{H} -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin (in der Abbildung nicht dargestellt) (Abb.7).

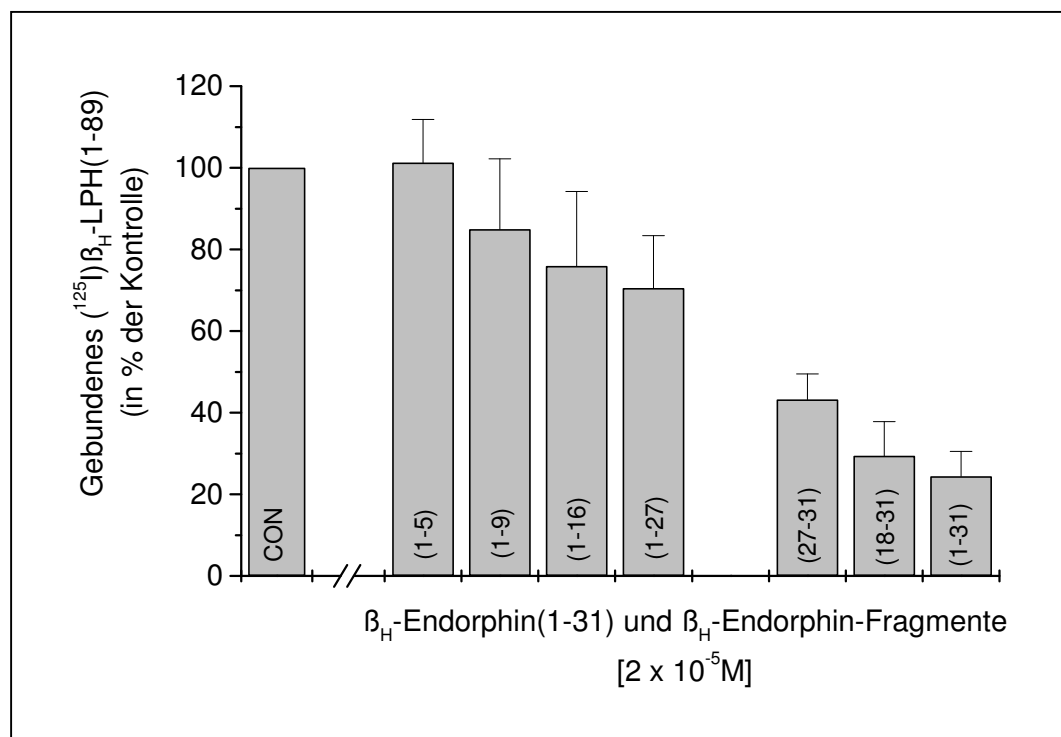


Abb.7: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ oder verschiedener $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin-Fragmente}$ (2×10^{-5} M im Inkubat). Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Aminosäurepositionen der $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)\text{-Fragmente}$. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte \pm Standardabweichung, jeweils von Mittelwerten aus drei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.1.7 Lokalisation der Bindungsstelle auf Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

4.1.1.7.1 Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung

Die Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin ließ sich durch Vorinkubation der mit Vitronektin beschichteten Wells (vor Zugabe des markierten Peptids) mit verschiedenen gegen Vitronektin gerichteten Antiseren verringern auf Werte, die zum Teil deutlich unter dem Kontrollwert ohne Antiserum lagen. Zum Einsatz kamen die Antiseren aS 6/7 und aS 66/67, deren inhibitorischer Effekt sehr unterschiedlich war. Während das Antiserum aS 6/7 nur geringen Einfluss auf die $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ Bindung an das Oberflächen-assoziierte Vitronektin nahm, konnte durch das Antiserum aS 66/67 eine Verringerung der Bindung bis auf ca. 60 % des Kontrollwertes ohne Antiserum erreicht werden.

Da die Bindung von $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin durch eines der polyklonalen Antiseren deutlich zu beeinflussen war, wurde im nächsten Schritt der Einfluss verschiedener monoklonaler, gegen bestimmte Epitope auf Vitronektin gerichteter Antikörper geprüft mit dem Ziel, die Lokalisation der $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ -Bindungsstelle auf dem Vitronektin-Molekül näher einzugrenzen. Zum Einsatz kamen drei verschiedene monoklonale Antikörper (VN9, 8E6 und 16A7). Während in Gegenwart des Antikörpers 16A7 die Bindung des $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ abzunehmen schien, zeigten die anderen beiden Antikörper keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung. Eine eindeutigen Zuordnung der $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ -Bindungsstelle zu einer bestimmten Domäne des Vitronektins war aufgrund dieser Ergebnisse somit nicht möglich (Abb.8).

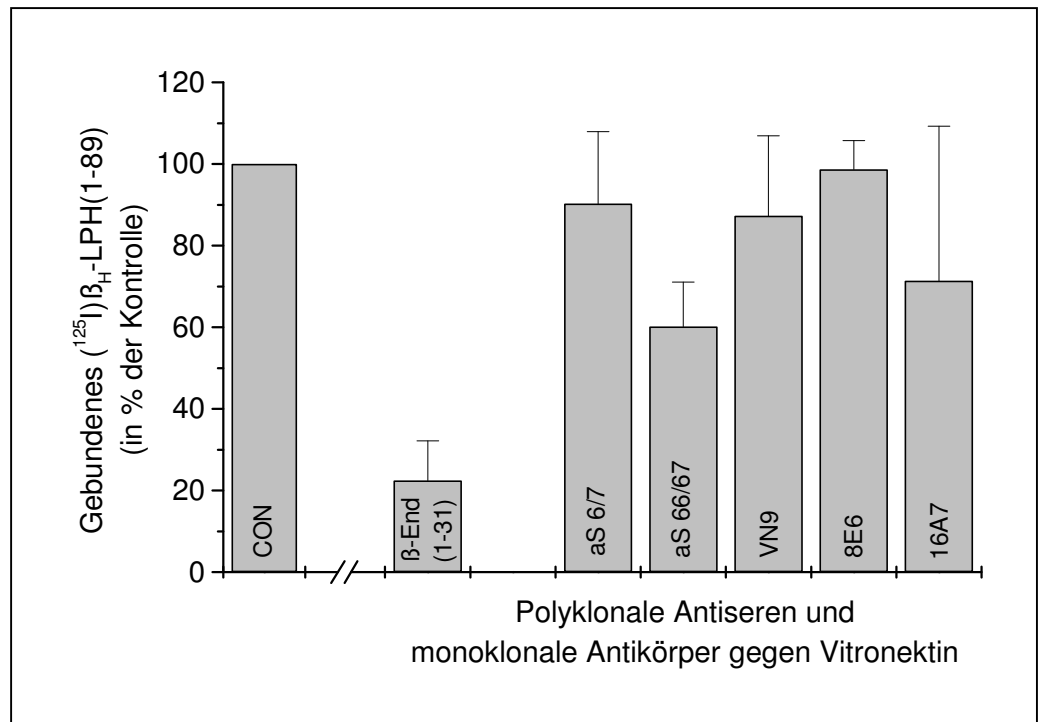


Abb.8: Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_H-Endorphin(1-31) und verschiedener gegen Vitronectin gerichteter Antiseren bzw. Antikörper. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper lag zwischen 0,02 mg Protein/ml und 2,76 mg Protein/ml im Inkubat. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.1.7.2

Einfluss verschiedener mit Vitronectin interagierender Substanzen auf die Bindung

Um weitergehende Informationen über die Bindung des β_H-LPH(1-89) an das Oberflächen-assoziierte Vitronectin zu gewinnen, wurden verschiedene mit Vitronectin interagierende Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf die Bindung untersucht. Durch Vorversuche (siehe 3.2.1.3) war ausgeschlossen worden, dass zwischen den Substanzen und β_H-LPH(1-89) eine direkte Interaktion erfolgte, die zu einem Rückgang der Bindung des β_H-LPH(1-89) an das Oberflächen-assoziierte Vitronectin hätte führen können. Es war also anzunehmen, daß eine Zu- bzw. Abnahme der gemessenen β_H-LPH(1-89)-Bindung durch Interaktion des Vitronectins mit den untersuchten Substanzen verursacht wurde. Von den zehn verschiedenen Substanzen führte lediglich die cyclisierte Zelladhäsionssequenz cRGD zu einer deutlichen Verminderung der

Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an das Oberflächen-assoziierte Vitronektin, die Bindung nahm bis auf ca. 60 % des Kontrollwertes ohne cRGD ab. Drei der untersuchten Substanzen, der monoklonale Vitronektin-Antikörper 13H1, Protease Nexin-1 (PN-1) und PAI-1 bewirkten eine geringfügige Abnahme der Bindung auf ca. 90 % des Kontrollwertes, während der Rest der Substanzen keinen Einfluss auf die Bindung des β_{H} -LPH(1-89) an das Oberflächen-assoziierte Vitronektin zeigte. Der lösliche Urokinase-Rezeptor suPAR führte sogar zu einem Anstieg der β_{H} -LPH(1-89) Bindung auf ca. 110 % des Kontrollwertes ohne suPAR (Abb.9).

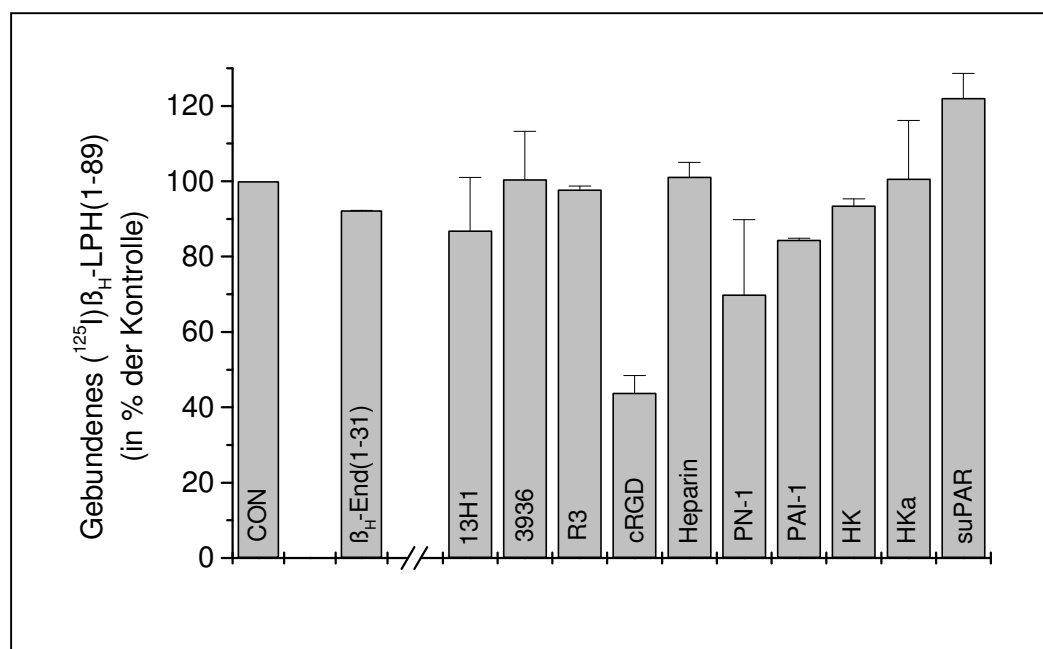


Abb.9: Bindung von (¹²⁵I) β_{H} -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_{H} -Endorphin(1-31) bzw. verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen. Zum Einsatz kamen ein gegen Vitronektin gerichteter monoklonaler Antikörper (13H1; 0,9 $\mu\text{g/ml}$), zwei monoklonale Antikörper gegen den Urokinase-Rezeptor (3936, R3; 0,9 $\mu\text{g/ml}$), zyklisches RGD Peptid (cRGD; 9 $\mu\text{g/ml}$), Heparin (90 $\mu\text{g/ml}$), Protease Nexin-1 (PN-1, 200 nM), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1; 100 nM), high molecular weight Kininogen in gespaltener und ungespaltener Form (Hka, HK; 9 $\mu\text{g/ml}$) sowie löslicher Urokinase-Rezeptor (suPAR; 2 $\mu\text{g/ml}$). Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwertenaus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.2 Charakteristika der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

4.1.2.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

Die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Heparin-aktiviertem Vitronektin stellte sich als zeitabhängiger Prozeß dar. Die Bindungskurve zeigte einen steilen Anstieg, die halbmaximale Bindung war bereits innerhalb der ersten 30 Minuten erreicht, im Anschluß zeigte die Bindungskurve einen kontinuierlichen Anstieg, bis sie nach ca. 180 min ihr Maximum erreichte (Abb.10).

4.1.2.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Die Reversibilität der Bindung stellt ein weiteres wichtiges Kriterium für ihre Spezifität dar. Sie konnte in Verdrängungsexperimenten durch nachträgliche Verdrängung mittels eines Überschusses von nicht radioaktiv markiertem β_H -LPH(1-89) nachgewiesen werden. Die aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente erstellte Bindungskurve zeigt einen Rückgang der Bindung des radioaktiv markierten β_H -LPH(1-89) direkt im Anschluß an die Zugabe des nicht markierten Liganden. Im weiteren Verlauf der Inkubation sanken die Werte weiter ab (Abb.10).

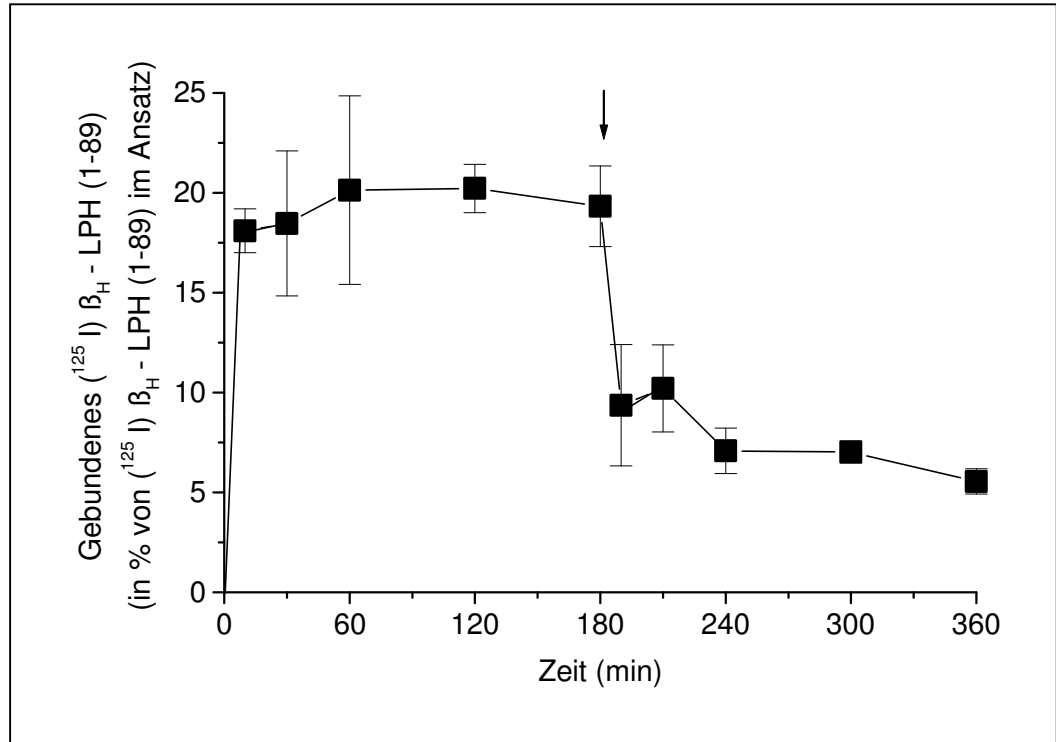


Abb.10: Darstellung der Zeitabhängigkeit und der Reversibilität der Bindung von ^{125}I β_{H} -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronectin in Lösung. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von unmarkiertem β_{H} -LPH(1-89) [10^{-5} M]. Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität. Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.2.3 Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Durch schrittweise Erhöhung der Konzentration an Heparin-aktiviertem Vitronectin in den einzelnen Ansätzen konnte die Abhängigkeit der Bindung des β_{H} -LPH(1-89) von der Konzentration der Bindungsstellen dargestellt werden. Mit steigender Vitronectin-Konzentration nahm die Bindung des radioaktiv markierten β_{H} -LPH(1-89) deutlich zu (Abb.11).

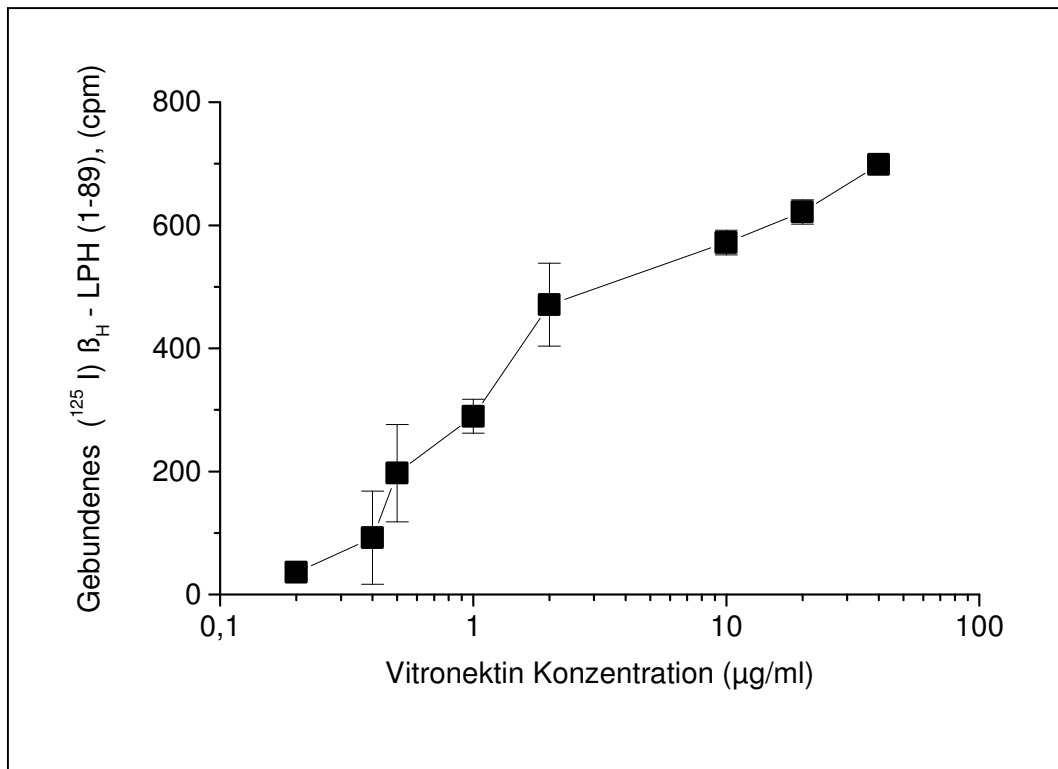


Abb.11: Bindung von (¹²⁵I) β_H-LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung in Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen (0,2 µg Vitronektin/ml bis 40 µg Vitronektin/ml im Ansatz).
 Angabe der Bindung in cpm (counts per minute).
 Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.2.4 Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit der Bindung von β_H-LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin konnte durch den Einsatz steigender Konzentrationen des nicht markierten β_H-LPH(1-89) bei konstanter Menge des radioaktiv markierten Peptides nachgewiesen werden. Mit steigenden Konzentrationen des nicht markierten Liganden nahm die Bindung des markierten β_H-LPH(1-89) immer weiter ab, was charakteristisch ist für eine spezifische Bindung, bei der nur eine endliche Anzahl an Bindungsstellen vorliegt, die Bindung also abgesättigt werden kann. Die zur vollständigen Sättigung der Bindungsstellen notwendigen sehr hohen Konzentrationen an nicht markiertem β_H-LPH(1-89) wurden nicht eingesetzt, da β_H-LPH(1-89) nicht in der notwendigen Menge zur Verfügung stand. Trotzdem zeigt die Sättigungskurve in halblogarithmischer Darstellung die für eine spezifische Bindung typische

Verlaufsform. Der zweistufige Verlauf läßt auf die Existenz zweier Bindungsstellen schließen (Abb.12).

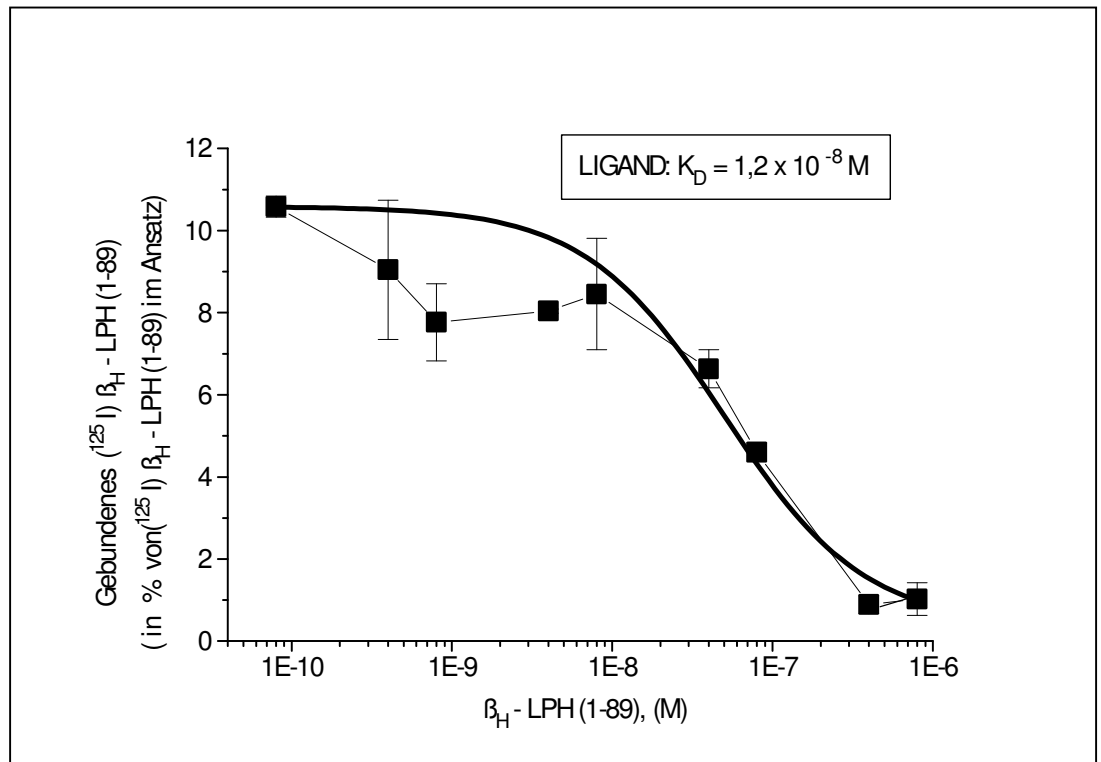


Abb.12: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_H\text{-LPH}(1-89)$ an Heparin-aktiviertes Vitronectin in Anwesenheit steigender Konzentrationen von $\beta_H\text{-LPH}(1-89)$, [4×10^{-10} M bis 8×10^{-7} M im Inkubat].
Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität.
Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.1.2.5 Bindungsparameter K_D und B_{\max}

Mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND konnten aus den Ergebnissen der unter 4.1.2.4 dargestellten Sättigungsexperimente die Dissoziationskonstante K_D und die Konzentration der Bindungsstellen im Ansatz, B_{\max} , berechnet werden. Die K_D für $\beta_H\text{-LPH}(1-89)$ lag im Durchschnitt (Mittelwert aus den Ergebnissen von zwei Experimenten) bei $1,2 \times 10^{-8}$ M, die maximale Konzentration der Bindungsstellen im Ansatz betrug durchschnittlich $3,7 \times 10^{-9}$ M. Die auf diese Weise ermittelten Ergebnisse wurden mittels graphischer Auswertung von Scatchard-Diagrammen verifiziert (Abb.13). Hier

lag die K_D im Durchschnitt bei $1,9 \times 10^{-8}$ M, die B_{max} betrug durchschnittlich $5,3 \times 10^{-9}$ M.

Trotz des gestuften Verlaufs der Bindungskurve der Sättigungsexperimente konnte für keines der beiden durchgeführten Experimente mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND eine zweite Bindungsstelle ermittelt werden.

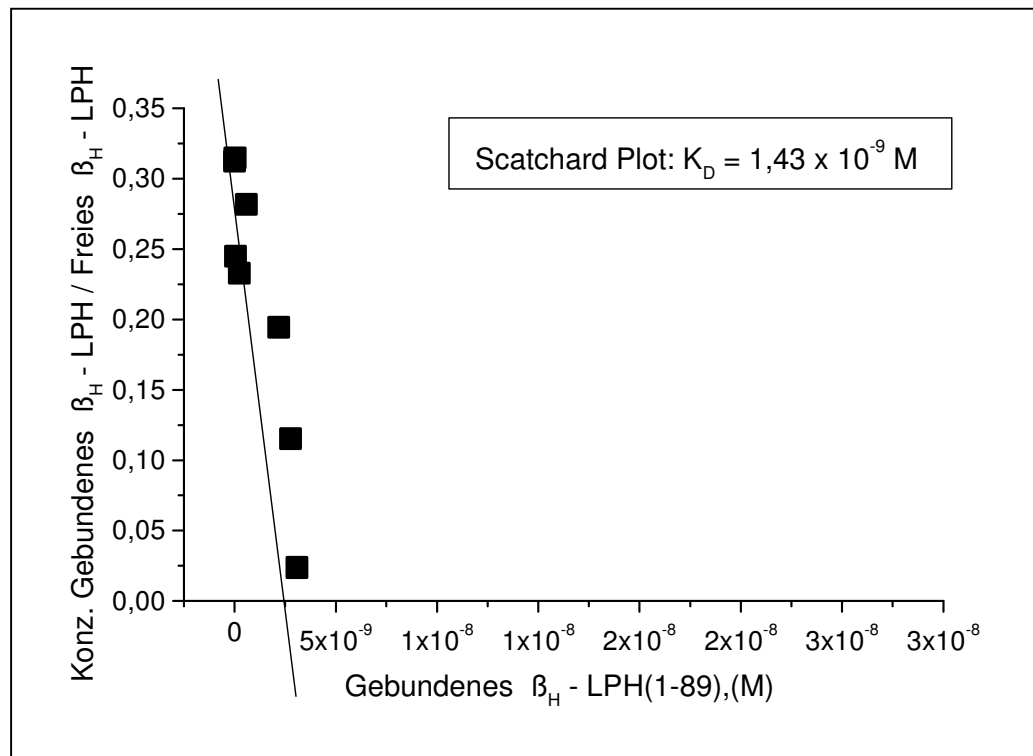


Abb.13: Scatchard-Diagramm zur Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{max} aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente. Exemplarische Darstellung der Daten aus einem der in Abbildung 5 eingegangenen Experimente.

4.1.2.6 Strukturspezifität

Zum Nachweis der Strukturspezifität der Bindung von β_H -LPH(1-89) kamen die gleichen Fragmente wie in den Untersuchungen zur Strukturspezifität der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin zum Einsatz. Auch hier sprachen die Ergebnisse für eine Interaktion über den C-Terminus des β_H -Endorphin(1-31). Fragmente, welche diese C-terminale Aminosäuresequenz enthielten, zeigten eine deutlich ausgeprägte inhibitorische Potenz, die mit Verlängerung der Fragmente in Richtung des N-Terminus sichtbar zunahm. Der stärkste Verdrängungseffekt konnte mit dem kompletten Molekül β_H -Endorphin(1-31) erreicht werden. Fragmente, denen

die C-terminale Sequenz fehlte, waren nicht in der Lage, das radioaktiv markierte $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ aus seiner Bindung an das Heparin-aktivierte Vitronektin zu verdrängen, sie schienen im Gegenteil die Bindung des radioaktiv markierten Peptides noch geringfügig zu verstärken. Auch das Mittelfragment des $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-27)$ zeigte keinen inhibitorischen Effekt (in der Abbildung nicht dargestellt) (Abb.14).

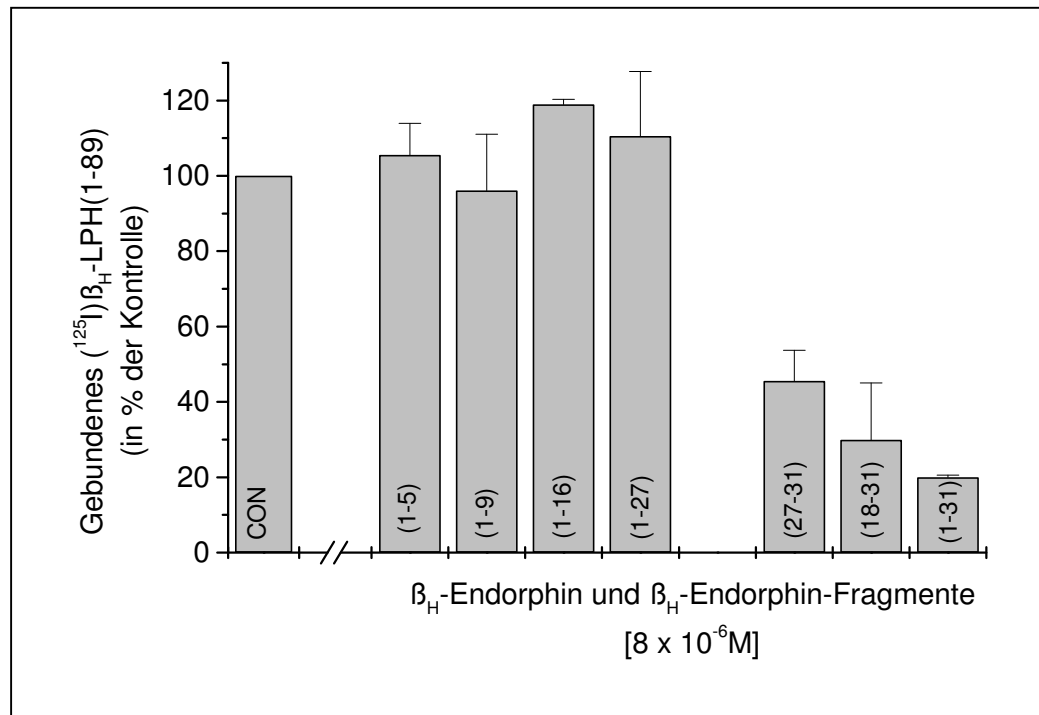


Abb.14: Bindung von (^{125}I) $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an Heparin-aktivierte Vitronektin in Lösung in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ bzw. verschiedener $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragmente ($8,3 \times 10^{-6}$ M im Inkubat). Die Angaben in Klammern entsprechen den jeweiligen Aminosäurepositionen der $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ (1 -31)-Fragmente. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment)

4.1.2.7 Lokalisation der Bindungsstelle auf Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

4.1.2.7.1 Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung

Zur näheren Charakterisierung der Bindung des $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an Heparin-aktivierte Vitronektin wurde der Einfluss verschiedener gegen Vitronektin

gerichteter polyklonaler Antiseren untersucht. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Antiseren, aS 6/7 und aS 66/67, die jeweils 30 min vor Zugabe des radioaktiv markierten $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ mit dem Heparin-aktivierten Vitronektin vorinkubiert wurden. Entgegen der Erwartung eines inhibitorischen Effektes der Antiseren führten beide zu einer exzessiven Verstärkung der Bindung im Vergleich zum Kontrollwert. Obwohl der Einsatz der gegen Vitronektin gerichteten polyklonalen Antiseren keinen inhibitorischen Effekt auf die Bindung des $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an das Heparin-aktivierte Vitronektin gezeigt hatte, wurde in einem nächsten Schritt, analog zu den Untersuchungen an Oberflächen-assoziiertem Vitronektin, der Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter monoklonaler Antikörper auf die Bindung untersucht. Die Antikörper wurden vor Zugabe des radioaktiv markierten $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ 30 min mit dem Heparin-aktivierten Vitronektin vorinkubiert. Zum Einsatz kamen drei gegen unterschiedliche Epitope des Vitronektin-Moleküls gerichtete monoklonale Antikörper (VN 9, 8E6, 16A7). Auch die monoklonalen Antikörper führten zumeist zu einer exzessiven Verstärkung der $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Bindung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Experimente war die Streuung der Werte aus zwei verschiedenen Experimenten beträchtlich. Es sind daher nicht die Mittelwerte der beiden Experimente, sondern die in beiden Experimenten erhaltenen Werte getrennt dargestellt (Abb.15).

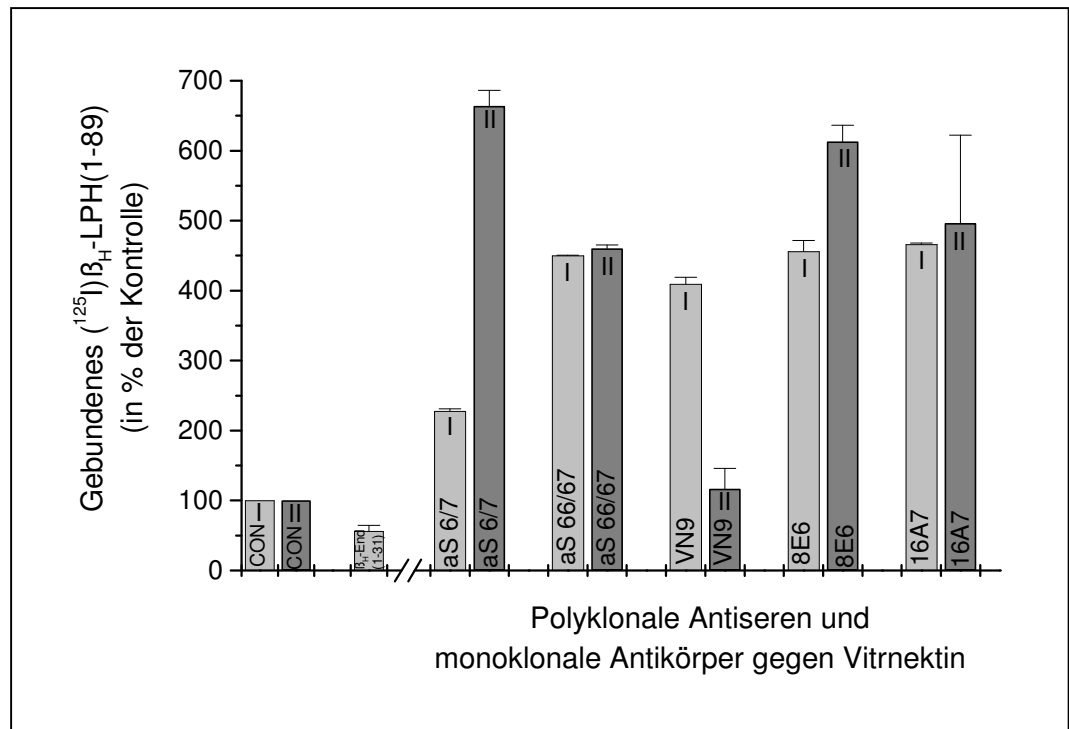


Abb.15: Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronectin in Lösung in Abwesenheit (CON) und in Anwesenheit von β_H-Endorphin(1-31) sowie verschiedener gegen Vitronectin gerichteter polyklonaler Antiseren bzw. monoklonaler Antikörper. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper lag zwischen 0,02 mg Protein/ml und 2,76 mg Protein/ml. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle. Darstellung des Mittelwerts I +/- Standardabweichung aus Experiment I und Mittelwert II +/- Standardabweichung aus Experiment II (Doppelwerte pro Experiment) in Form von Mittelwert +/- Standardabweichung.

4.1.2.7.2 Einfluss verschiedener mit Vitronectin interagierender Substanzen auf die Bindung

Zur Gewinnung weiterführender Informationen über die Bindung von β_H-LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronectin wurden verschiedene mit Vitronectin interagierende Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bindung untersucht. Da die direkte Interaktion zwischen Vitronectin und den Substanzen, wie unter 4.1.1.7.2 bereits erwähnt, in Vorversuchen (siehe 3.2.1.3) ausgeschlossen worden war, wurden die eintretenden Veränderungen im Bindungsverhalten des β_H-LPH(1-89) auf eine Interaktion des Vitronectins mit der jeweiligen Substanz zurückgeführt. Es kamen zehn verschiedene Substanzen zum Einsatz, deren Interaktion mit Vitronectin aus verschiedensten

Funktionsbereichen bekannt war. Ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf die β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an Heparin-aktiviertes Vitronektin zeigte sich in Gegenwart der Zelladhäsionssequenz cRGD, wie auch in den Experimenten, die Oberflächen-assoziiertes Vitronektin als Binder enthielten. Die Bindung nahm bis auf ca. 60 % des Kontrollwertes ohne cRGD ab. Keine der anderen eingesetzte Substanzen führte zu einer Inhibition der Bindung. Während der gegen den Urokinase-Rezeptor gerichtete Antikörper R3 und das Protease-Nexin-1 (PN-1) nahezu keinen Einfluss auf die Bindung des β_{H} -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin hatten, bewirkten die zusätzlich untersuchten Substanzen 13H1, 3936, HK, Hka und PAI-1 eine Steigerung der Bindung, welche in Gegenwart des monoklonalen Vitronektin-Antikörpers 13H1 und des PAI-1 am stärksten ausgeprägt war. Der lösliche Urokinase-Rezeptor suPAR bewirkte eine geringe Abnahme der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin (Abb.16).

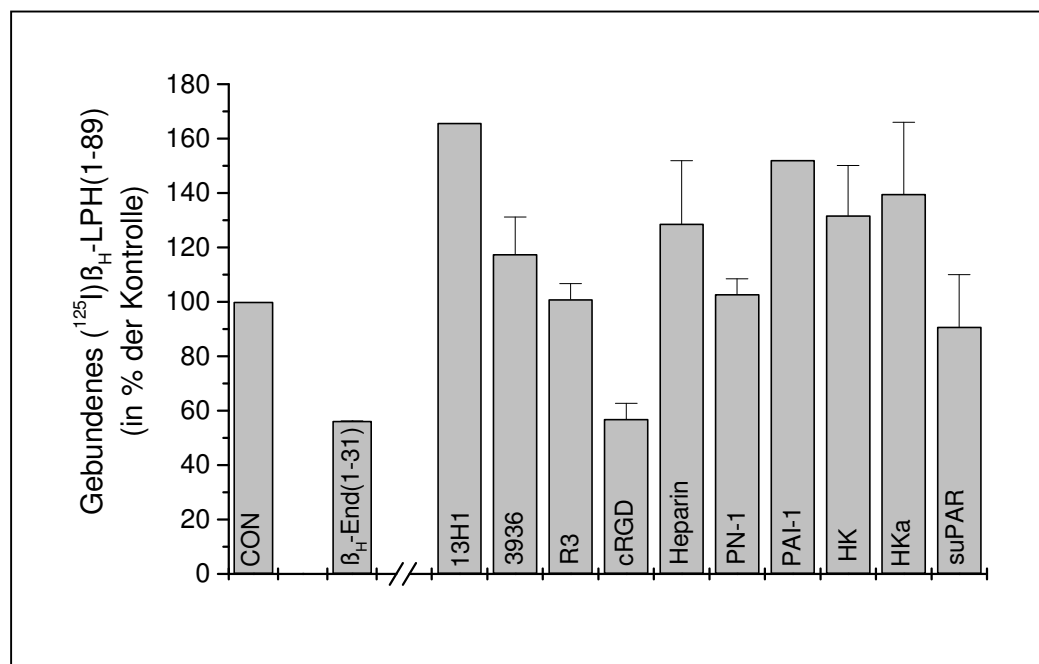


Abb.16: Bindung von (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin in Lösung in Abwesenheit (CON) und Anwesenheit von β_{H} -Endorphin (1-31) sowie verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen. Zum Einsatz kamen ein gegen Vitronektin gerichteter monoklonaler Antikörper (13H1; 0,9 $\mu\text{g/ml}$), zwei verschiedene Antikörper gegen den Urokinase-Rezeptor (3936, R3; 0,9 $\mu\text{g/ml}$), cyclisches RGD Peptid (cRGD; 9 $\mu\text{g/ml}$), Heparin (90 $\mu\text{g/ml}$), Protease Nexin-1 (PN-1; 200 nM), Plasminogen-Aktivator- Inhibitor-1 (PAI-1; 90 nM), high molecular weight Kininogen in gespaltener und ungespaltener Form (Hka, HK; 9 $\mu\text{g/ml}$) sowie löslicher Urokinase-Rezeptor (suPAR; 2 $\mu\text{g/ml}$).

Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2 Nachweis spezifischer Bindungsstellen für β_{H} -LPH(1-89) auf THP-1-Zellen in Suspension

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Bindung von (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) an die THP-1-Zellen in Suspension in Abhängigkeit von der Zellcharge sowohl über die C-terminale Aminosäuresequenz β_{H} -Endorphin(27-31) als auch über das Mittelfragment β_{H} -Endorphin(18-27) vermittelt werden kann. Innerhalb einer Zellcharge blieb der Bindungstyp jedoch konstant, was in jedem Experiment durch Mitführen von Kontrollansätzen überprüft wurde, die das C-terminale Fragment und das Mittelfragment als potentielle Verdränger enthielten. Die komplette Versuchsreihe zur vollständigen Ermittlung der Charakteristika der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension und zur Charakterisierung der Bindungsstelle auf den Zellen wurde nur mit einer Zellcharge vom C-terminalen Bindungstyp durchgeführt. Die Charakteristika der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen über das Mittelfragment wurden nicht vollständig bestimmt, die Ergebnisse der durchgeführten Experimente werden jedoch trotzdem kurz dargestellt.

4.2.1 Charakteristika der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_{H} -LPH(85-89) an THP-1-Zellen in Suspension

4.2.1.1 Zeitabhängigkeit (ON-Kinetik)

Die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_{H} -LPH(85-89) (identisch mit β_{H} -Endorphin(27-31) an THP-1-Zellen in Suspension erwies sich als zeitabhängiger Prozeß. Innerhalb der ersten 10 min zeigte die Bindungskurve einen steilen Anstieg, während der Kurvenverlauf nach dieser Phase in die Horizontale überzugehen schien. Dies deutete auf das Erreichen der maximalen Bindung hin. Trotz der beträchtlichen Streuung ist der charakteristische Verlauf der Bindungskurve erkennbar (Abb.17).

4.2.1.2 Reversibilität (OFF-Kinetik)

Die Reversibilität der Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an die THP-1-Zellen in Suspension als weiteres wichtiges Kriterium einer spezifischen Bindung konnte durch nachträgliche Verdrängung mittels eines Überschusses an nicht radioaktiv markiertem $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ nachgewiesen werden. Die Bindungskurve zeigte im Mittel einen deutlichen, für eine spezifische Bindung typischen Rückgang innerhalb der ersten 10 min, während sie im weiteren Verlauf keine wesentlichen Veränderungen mehr zu erfahren schien. Auf Grund der beträchtlichen Streuung der Werte ist jedoch der weitere Verlauf der Bindungskurve nur begrenzt beurteilbar (Abb.17).

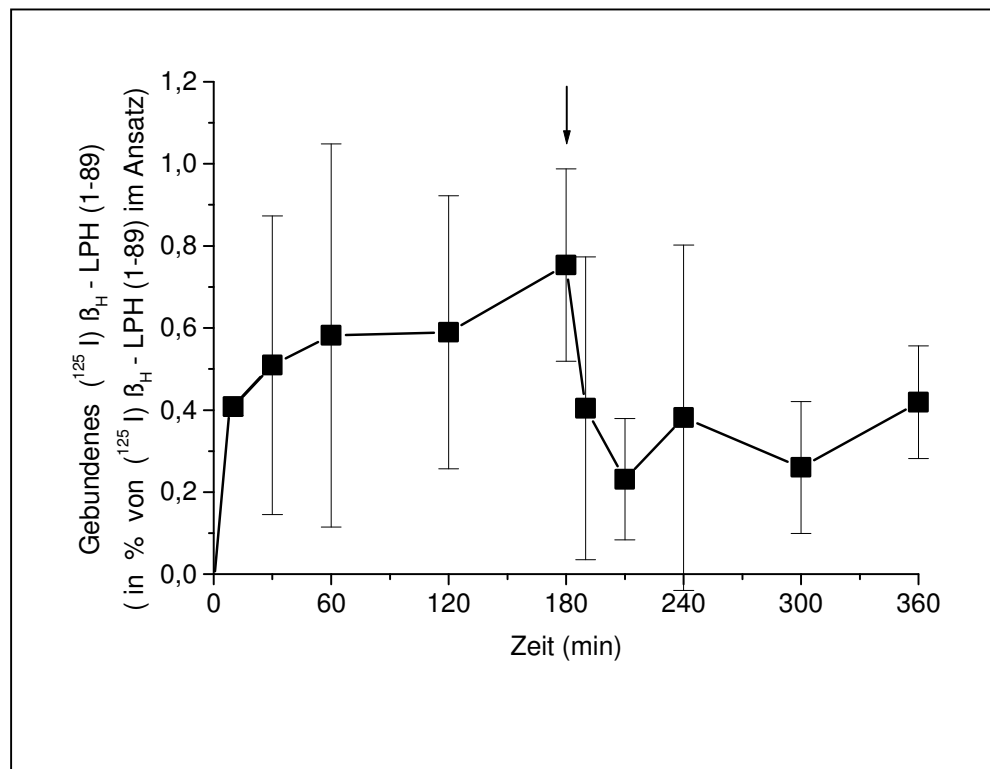


Abb.17: Zeitabhängigkeit und Reversibilität der Bindung von ^{125}I $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ über sein C-terminales Fragment $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von unmarkiertem $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ [10^{-5} M]. Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität. Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.3

Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen

Die Abhängigkeit der Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ an THP-1-Zellen in Suspension stellte sich als ein von der Konzentration der Bindungsstellen abhängiger Prozeß dar. Dies konnte durch stufenweise Erhöhung der Zellkonzentration und damit der Konzentration der Bindungsstellen in den Versuchsansätzen nachgewiesen werden. Die eingesetzten Zellkonzentrationen lagen zwischen 1×10^5 und 50×10^6 Zellen/ml. Mit steigender Zellkonzentration zeigte die Bindung eine deutliche Zunahme (Abb.18).

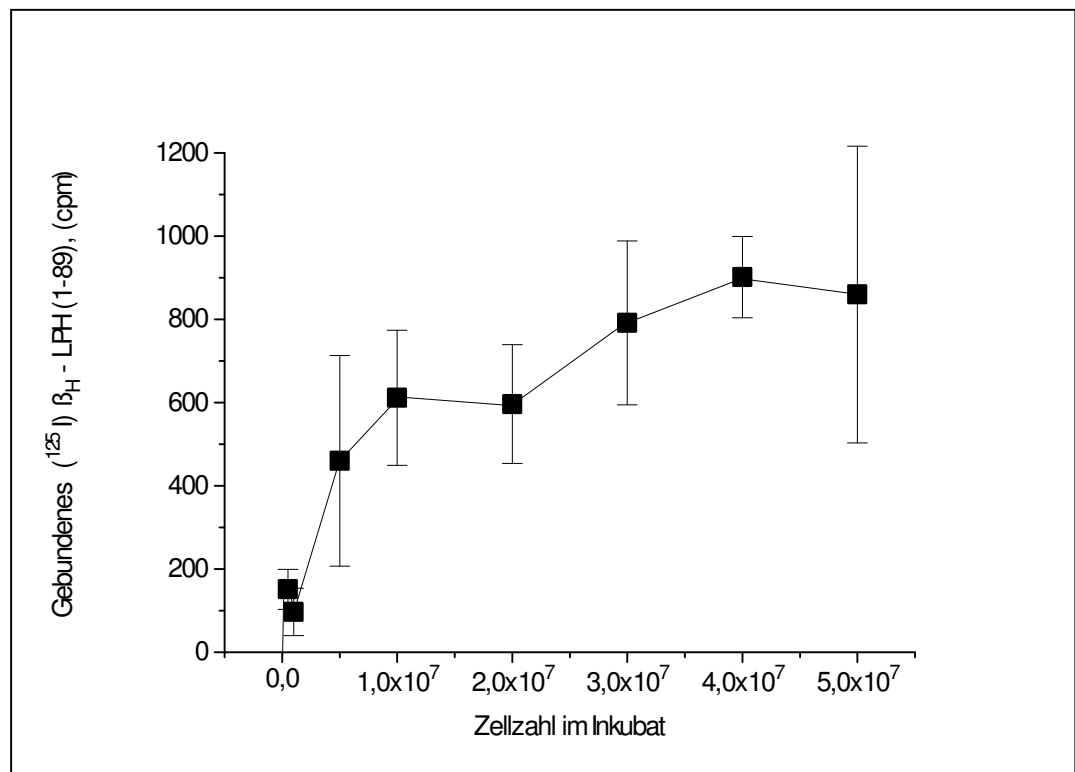


Abb.18: Bindung von (¹²⁵I) $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ über sein C-terminales Fragment $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85\text{-}89)$ an THP-1-Zellen in Suspension in Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen ($0,05 \times 10^6$ Zellen bis 5×10^6 Zellen im Inkubat).

Angabe der Bindung in cpm (counts per minute). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.4

Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit der Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ über sein C-terminales Fragment $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85\text{-}89)$ an THP-1 Zellen in Suspension konnte durch den Einsatz steigender Konzentrationen an nicht markiertem $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$

nachgewiesen werden. Entsprechend der für eine spezifische Bindung typischen endlichen Anzahl an Bindungsstellen nahm die Bindung des radioaktiv markierten $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ an die THP-1-Zellen mit steigender Konzentration des nicht markierten Peptides deutlich ab. Die Sättigungskurve läßt in halblogarithmischer Darstellung die typische Verlaufsform erkennen, obwohl die für eine vollständige Sättigung der Bindungsstellen notwendigen hohen Konzentrationen an $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ nicht eingesetzt werden konnten (Abb.19).

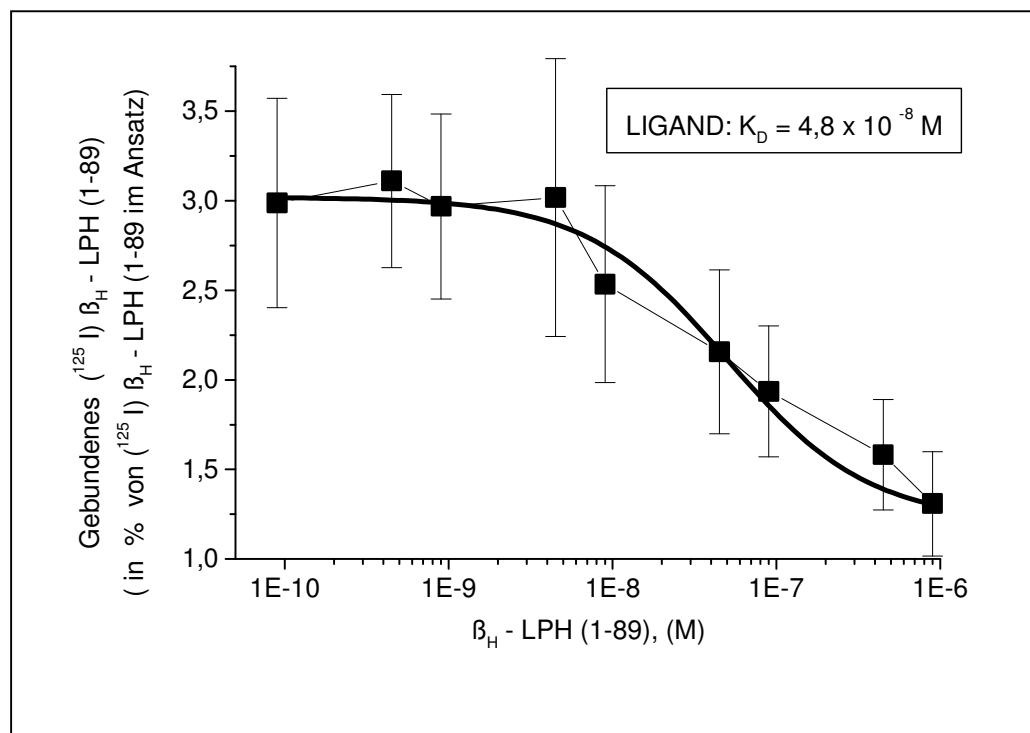


Abb.19: Bindung von (^{125}I) $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ über sein C-terminales Fragment $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85\text{-}89)$ an THP-1-Zellen in Suspension in Anwesenheit steigender Konzentrationen von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ [$4,5 \times 10^{-10}$ M bis 9×10^{-6} M im Inkubat]. Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität. Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus drei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.5 Bindungsparameter K_{D} und B_{max}

Mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND konnten aus den unter 4.2.1.4 dargestellten Daten der Sättigungsexperimente die Bindungsparameter K_{D} (Dissoziationskonstante) und B_{max} (Bindungsstellenkonzentration im Ansatz) ermittelt werden. Die K_{D} für die Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1\text{-}89)$ über sein

C-terminales Fragment β_H -LPH(85-89) (Mittelwert aus den Ergebnissen von zwei Experimenten) errechnete sich als $4,8 \times 10^{-8}$ M, die Konzentration der Bindungsstellen in Ansatz B_{\max} lag im Bereich von $1,5 \times 10^{-9}$ M. Die auf diese Weise ermittelten Ergebnisse wurden im Computerprogramm ORIGIN durch die graphische Auswertung von Scatchard-Diagrammen überprüft (Abb.20). Hier lag die K_D bei $1,9 \times 10^{-7}$ M, die B_{\max} betrug $1,3 \times 10^{-8}$ M.

Für eines der zwei durchgeführten Experimente wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND zwei Bindungsstellen ermittelt. Eine dieser beiden Bindungsstellen entsprach auf Grund ihrer Bindungsparameter (K_D : $1,1 \times 10^{-8}$ M; B_{\max} : $3,6 \times 10^{-10}$ M) der Bindungsstelle, welche auch bei Prüfung auf eine Bindungsstelle gefunden wurde. Die zweite Bindungsstelle zeigte geringere Affinität (K_D : $5,1 \times 10^{-7}$ M; B_{\max} : $1,2 \times 10^{-8}$ M) und entsprach somit den Daten der graphischen Auswertung.

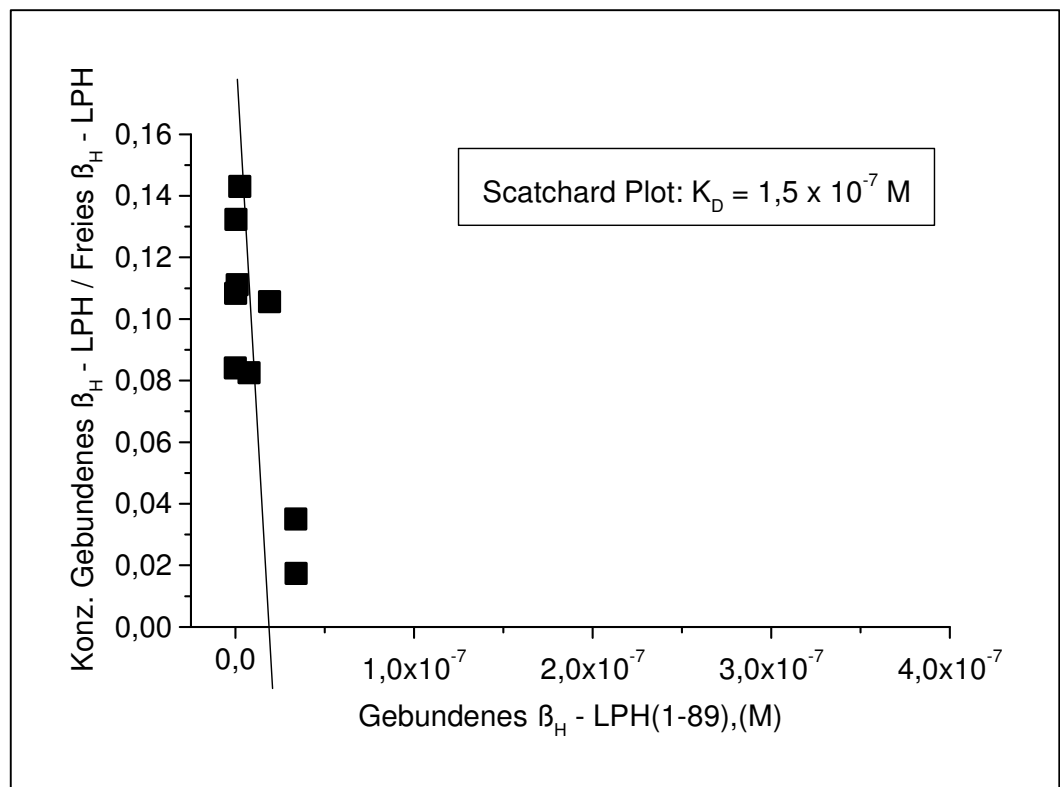


Abb.20: Scatchard-Diagramm zur Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{\max} aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente. Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines der in Abbildung 19 eingegangenen Experimente.

Zum Vergleich dieser Bindungsparameter mit den Bindungsparametern im Falle der Bindung von β_H -LPH(1-89) über sein Mittelfragment β_H -LPH(76-85) siehe Abbildung 29.

4.2.1.6 Strukturspezifität

Für den Nachweis der Strukturspezifität wurde die Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension in Gegenwart verschiedener Teilfragmente von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ gemessen. Die Ergebnisse der Experimente sprachen für eine Non-Opioid-Bindungsstelle, welche das C-terminale $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Fragment, $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85-89)$, das mit der C-terminalen Sequenz des $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins}$ identisch ist, bindet. Fragmente, die diese C-terminale Sequenz enthielten, führten zu einer starken Reduktion der Bindung des radioaktiv markierten $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension, wohingegen Fragmente, denen diese Sequenz fehlte, keinen oder nur minimalen Einfluss auf die Bindung nahmen. Eine Verlängerung der die C-terminale Sequenz enthaltenden Fragmente in Richtung des N-Terminus führte zu einer Zunahme des inhibitorischen Effektes. Das Mittelfragment $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-27)$ hatte keinerlei Einfluss auf die Bindung (in der Abbildung nicht dargestellt) (Abb.21).

(Zur Strukturspezifität der Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ über sein Fragment (76-85), welches mit dem Mittelfragment von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ identisch ist, an eine andere Charge der THP-1-Zellen, siehe 4.2.2.3).

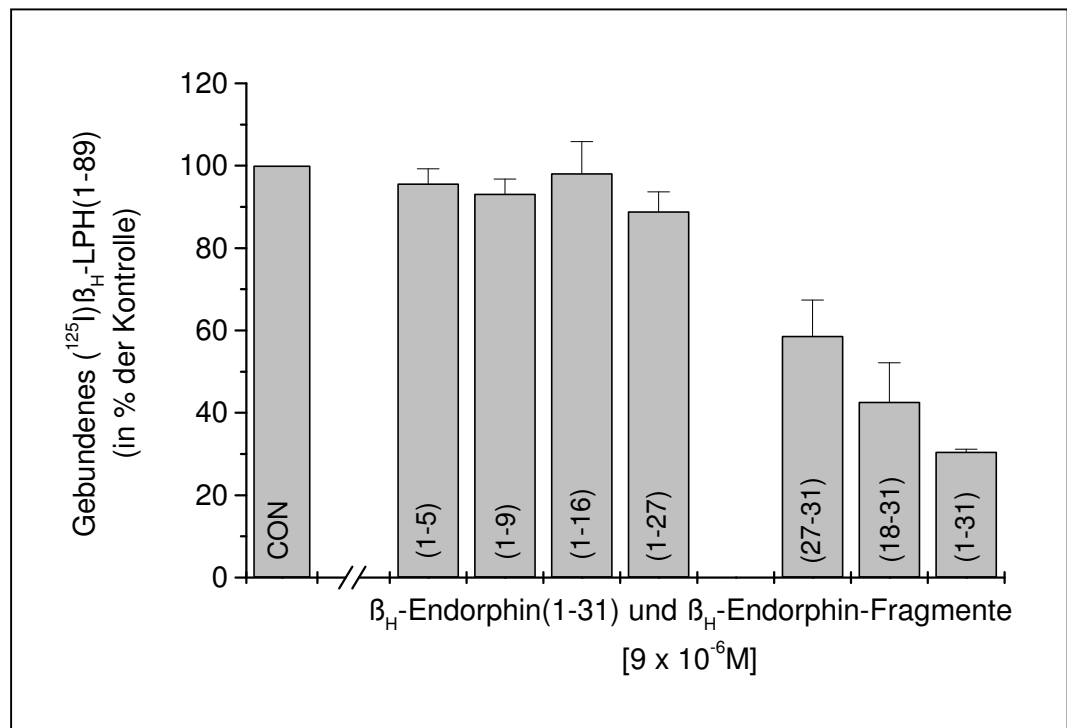


Abb.21: Bindung von (^{125}I) $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ über sein C-terminales Fragment $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(85-89)$ an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit

(CON) oder in Anwesenheit von β_{H} -Endorphin(1-31) bzw. verschiedener β_{H} -Endorphin Fragmente (9×10^{-6} M im Inkubat). Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Aminosäurepositionen der β_{H} -Endorphin(1-31)-Fragmente. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus drei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.7 Lokalisation der Bindungsstellen auf THP-1-Zellen in Suspension

4.2.1.7.1 Hinweise auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an Vitronektin auf THP-1-Zellen

Da die unter 4.2.1.6. erhaltenen Ergebnisse im Bindungsverhalten deutliche Parallelen zu den Ergebnissen der Versuche zeigten, welche statt mit THP-1-Zellen mit Vitronektin in Oberflächen-assoziiierter oder Heparin-aktivierter Form als Binder durchgeführt worden waren, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension untersucht.

4.2.1.7.1.1 Einfluss verschiedener gegen Vitronektin gerichteter Antikörper auf die β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Es wurde sowohl der Einfluss polyklonaler Antiseren als auch monoklonaler Antikörper untersucht. Die eingesetzten polyklonalen Antiseren zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension, was die Annahme unterstützte, die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an die THP-1-Zellen in Suspension könnte über Vitronektin vermittelt werden. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Antiseren, aS 6/7 und aS 66/67, die sich in ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Bindung nicht wesentlich unterschieden. Die Abnahme der Bindung betrug im Mittel etwa 85 % des Kontrollwertes ohne Antiserum.

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene monoklonale gegen Vitronektin gerichtete Antikörper hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension untersucht. Zum Einsatz kamen drei gegen verschiedene Epitope des Vitronektin-Moleküls gerichtete monoklonale Antikörper, VN9, 8E6 und 16A7. Die Antikörper bewirkten eine

mittlere Abnahme der β_{H} -LPH(1-89)-Bindung auf ca. 80 % des Kontrollwertes ohne Antikörper (Abb.22).

4.2.1.7.1.2 Einfluss eines monoklonalen Antikörpers (23C6) gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ auf die β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Mit Hilfe des monoklonalen gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ gerichteten Antikörpers 23C6 wurde die Abhängigkeit der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an THP-1-Zellen von diesem Vitronektin-Rezeptor untersucht. Bei Einsatz des Antikörpers kam es zu einem Rückgang der Bindung auf ca. 80 % des Kontrollwertes ohne Antikörper (Abb.22).

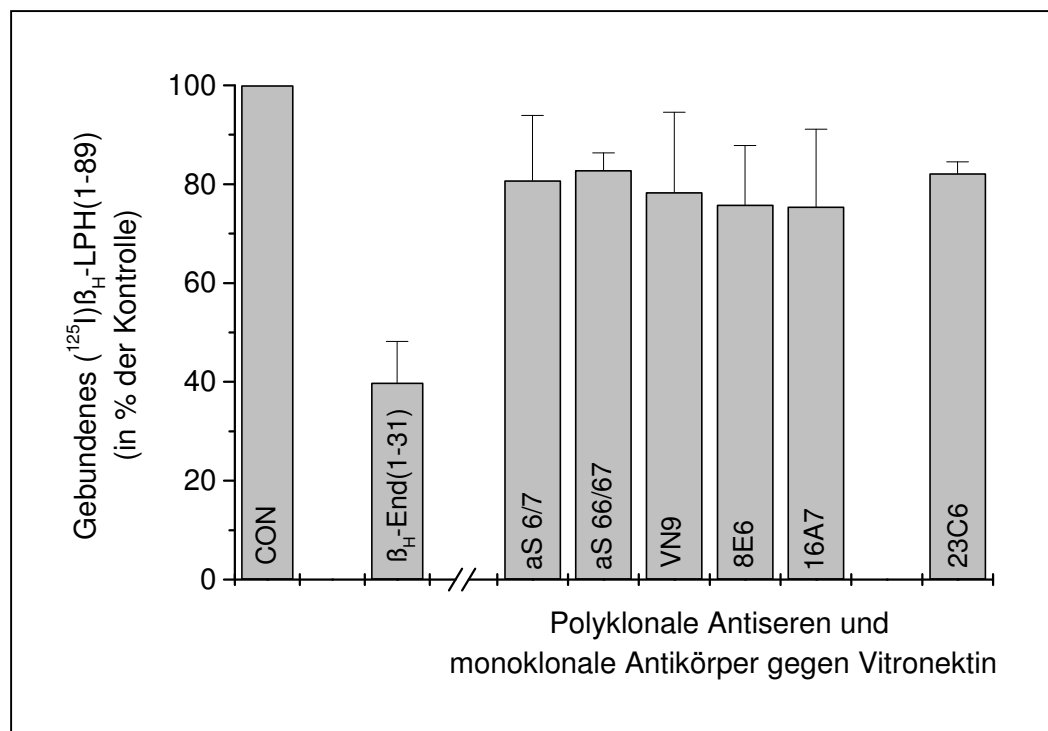


Abb.22: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_{H} -LPH(85-89) an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_{H} -Endorphin (1-31) sowie verschiedener gegen Vitronektin gerichteter polyklonaler Antiseren bzw. monoklonaler Antikörper. Die Konzentration der Antiseren bzw. Antikörper lag zwischen 0,09 mg Protein/ml im Inkubat und 1,25 mg Protein/ml im Inkubat. Die Konzentration eines weiterhin eingesetzten Antikörpers gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_{\text{v}}\beta_3$, 23C6, lag bei $36 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ im Inkubat. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus drei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.7.1.3 Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Um die Bindungsstelle von β_H -LPH auf THP-1-Zellen in Suspension näher zu charakterisieren, wurde das Bindungsverhalten von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen nach 30 min Vorinkubation der Zellen mit einer Reihe von Substanzen, deren Interaktion mit Vitronektin im Rahmen verschiedener Funktionen bekannt war, untersucht. Zum Einsatz kamen zwei gegen den Urokinase-Rezeptor gerichtete Antikörper (R3, 3936), löslicher Urokinase-Rezeptor (suPAR), high molecular weight Kininogen in nativer und gespaltener Form (HK, Hka), Protease-Nexin-1 (PN-1) und die Zelladhäsionsdomäne des Vitronektin-Moleküls in cyclisierter Form (cRGD).

In Gegenwart des gegen den Urokinase-Rezeptor gerichteten Antikörpers R3 zeigte sich ein Rückgang der Bindung des β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen auf ca. 80 % des Kontrollwertes ohne Antikörper. Der ebenfalls gegen den Urokinase-Rezeptor gerichtete Antikörper 3936 zeigte einen geringeren inhibitorischen Effekt. Die Bindung nahm auf etwa 90 % des Kontrollwertes ohne Antikörper ab. Die größte inhibitorische Potenz zeigte der lösliche Urokinase-Rezeptor suPAR. In seiner Gegenwart war eine Abnahme der Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen bis auf ca. 70 % des Kontrollwertes ohne Vorinkubation mit suPAR zu beobachten.

Weiterhin wurde im folgenden der Einfluss von high molecular weight Kininogen auf die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit THP-1-Zellen untersucht. Eingesetzt wurden zwei verschiedene Formen des high molecular weight Kininogens, die natürliche Form (HK) sowie die gespaltene Form (Hka). In Gegenwart beider Substanzen kam es zu einer Abnahme der Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen auf ca. 70-80 % des Kontrollwertes (Abb.23).

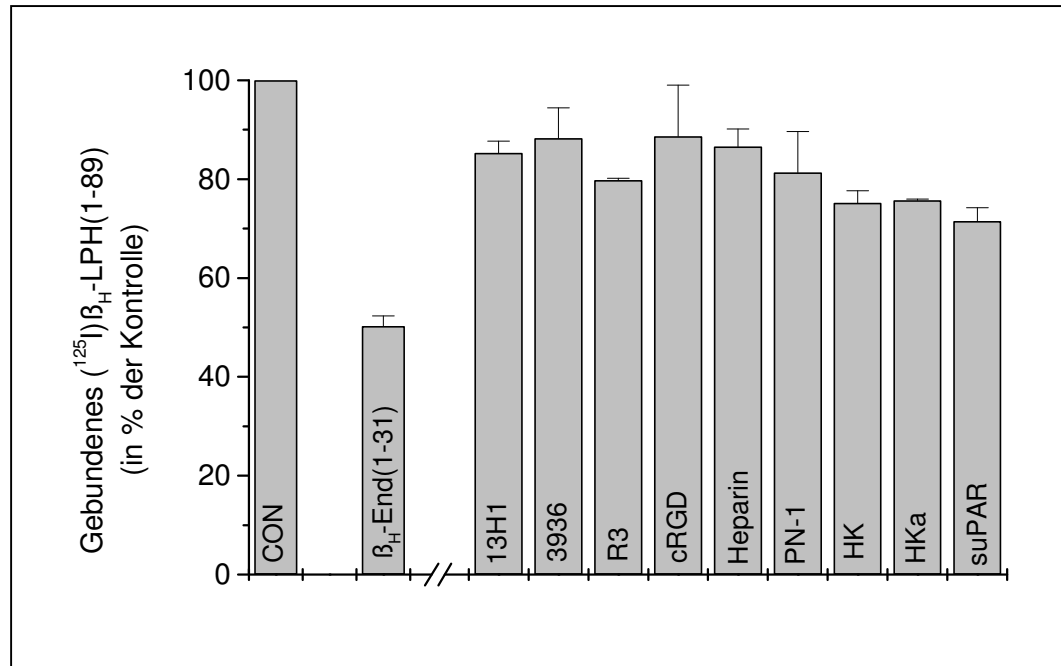


Abb.23: Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_H-LPH(85-89) an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_H-Endorphin(1-31) sowie verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen. Zum Einsatz kamen ein gegen Vitronektin gerichteter Antikörper (13H1; 0,9 μg/ml), zwei verschiedene gegen den Urokinase-Rezeptor gerichtete Antikörper (3936, R3; 0,9 μg/ml), zyklisches RGD Peptid (cRGD; 9 μg/ml), Heparin (90 μg/ml), Protease Nexin-1 (PN-1; 200 nM), high molecular weight Kininogen in gespaltener und ungespaltener Form (Hka, HK; 9 μg/ml) sowie löslicher Urokinase-Rezeptor (suPAR; 2 μg/ml). Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.7.2 Hinweise auf die Bindung von β_H-LPH(1-89) an den Chemokin-Rezeptor CCR5

Die Tatsache, dass weder durch den Einsatz der verschiedenen gegen Vitronektin gerichteten Antikörper noch durch den Einsatz des Vitronektin-Rezeptor-Antikörpers oder des Urokinase-Rezeptors sowie des gegen ihn gerichteten Antikörpers ein Verdrängungseffekt von mehr als 30 % des Kontrollwertes zu erreichen war, führten zu der Annahme, dass die Bindung von β_H-LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension nicht alleine über Vitronektin bzw. den Urokinase-Rezeptor zustande kommen konnte. Aus der

Arbeit von POLOCZEK (2002) war bekannt, dass β_H -Endorphin(1-31), das mit dem C-terminalen Fragment von β_H -LPH(1-89) identisch ist, über den Chemokin-Rezeptor CCR5 an die THP-1 Zellen bindet. Um festzustellen, ob die Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen ebenfalls durch Interaktion mit diesem Rezeptor zustande kam, wurden Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 gerichtet waren.

4.2.1.7.2.1 Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Zum Einsatz kamen sechs gegen verschiedene Epitope des Chemokin-Rezeptors CCR5 gerichtete monoklonale Antikörper, 2D7, 3A9, 45502.111, 45523.111, 45531.111 und 45549.111, welche in ihrer inhibitorischen Potenz deutliche Unterschiede zeigten. In Gegenwart des Antikörpers 2D7, dessen Epitop im Bereich der ECL 2 lokalisiert ist, kam es zu einer Abnahme der Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen bis auf unter 50 % des Kontrollwertes ohne Antikörper, während der Antikörper 3A9, dessen Epitop sich im Bereich der N-terminalen Region des CCR5 befindet, die Bindung nur auf ungefähr 90 % des Kontrollwertes reduzierte. Die Antikörper 45502.111 (Epitop in der N-terminalen Region), 45531.111 (Epitop innerhalb der ECL 2B), 45523.111 und 45549.111 (beide gegen Multidomänenepitope gerichtet, die aus mehr als einer extrazellulären Domäne zusammengesetzt waren) zeigten keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension. Der im weiteren untersuchte natürliche Ligand des Chemokin-Rezeptors CCR5 RANTES hatte ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Bindung (Abb.24).

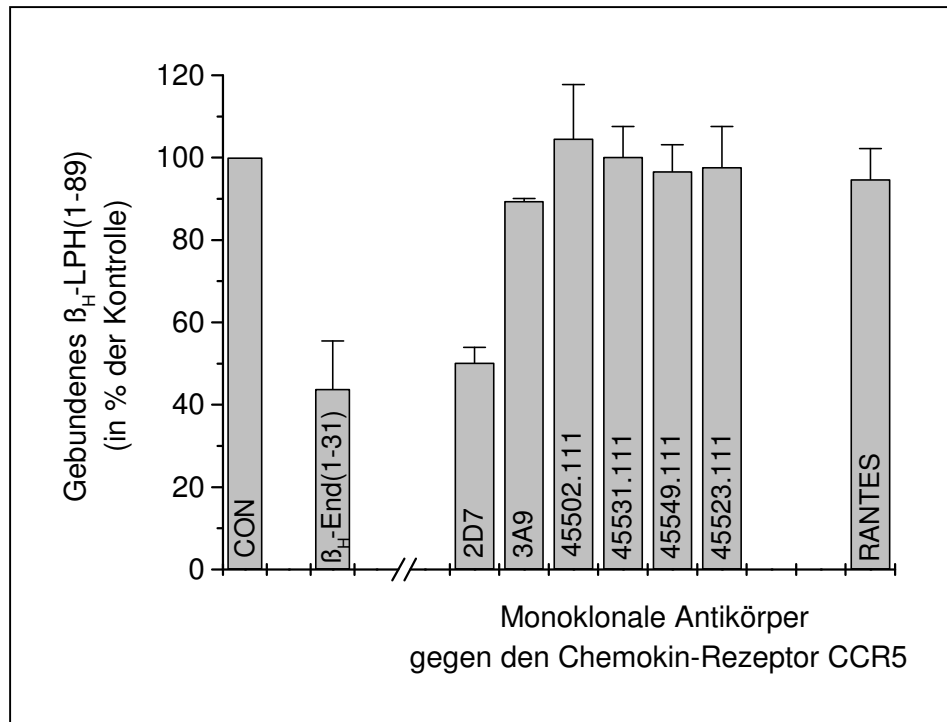


Abb.24: Bindung von (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) über sein C-terminales Fragment β_{H} -LPH(85-89) an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_{H} -Endorphin(1-31), verschiedener gegen CCR5 gerichteter monoklonaler Antikörper sowie des CCR5-Liganden RANTES. Die Konzentration der Antikörper lag bei 45,5 $\mu\text{g/ml}$ im Inkubat, die Konzentration von RANTES betrug $5,8 \times 10^{-7}$ M im Inkubat.

Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON).

Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten Doppelwerte pro Experiment).

4.2.1.7.2.2 Beeinflussung der HIV-Infektion von P4R5-Magi-Zellen über die β_{H} -LPH(1-89)-Bindung an den Chemokin-Rezeptor CCR5

Der Chemokin-Rezeptor CCR5 spielt eine wichtige Rolle als Co-Rezeptor im Rahmen der HIV-Infektion von CD4+-Zellen durch HIV-1-Stämme. Da von β_{H} -LPH(1-89) bekannt war (4.2.1.7.2.1), dass es mit diesem Rezeptor interagieren konnte, wurden Versuche zur Prüfung des Einflusses von β_{H} -LPH(1-89) auf die HIV-Infektion von P4R5-Magi-Zellen durchgeführt.

Anhand der Messung der β -Galaktosidase-Aktivität konnte der Anteil der HIV-infizierten Zellen an der Gesamtmenge der eingesetzten Zellen bestimmt werden. In einem Vorexperiment sowie in einem der beiden durchgeführten

Hauptexperimente zeigte sich mit steigender Konzentration von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ ein deutlicher Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität, was bedeutet, dass der Anteil der HIV-infizierten Zellen entsprechend zugenommen hatte. Bei Konzentrationen von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ von 400 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität bis auf ca. 250 % des Kontrollwertes. Im Gegensatz dazu wurde in einem zweiten Hauptexperiment in Gegenwart hoher Konzentrationen von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ eine Abnahme der HIV-infizierten Zellen beobachtet. Zur Klärung dieser diskrepanten Ergebnisse sind weitere Experimente erforderlich.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Ergebnisse der beiden Hauptexperimente.

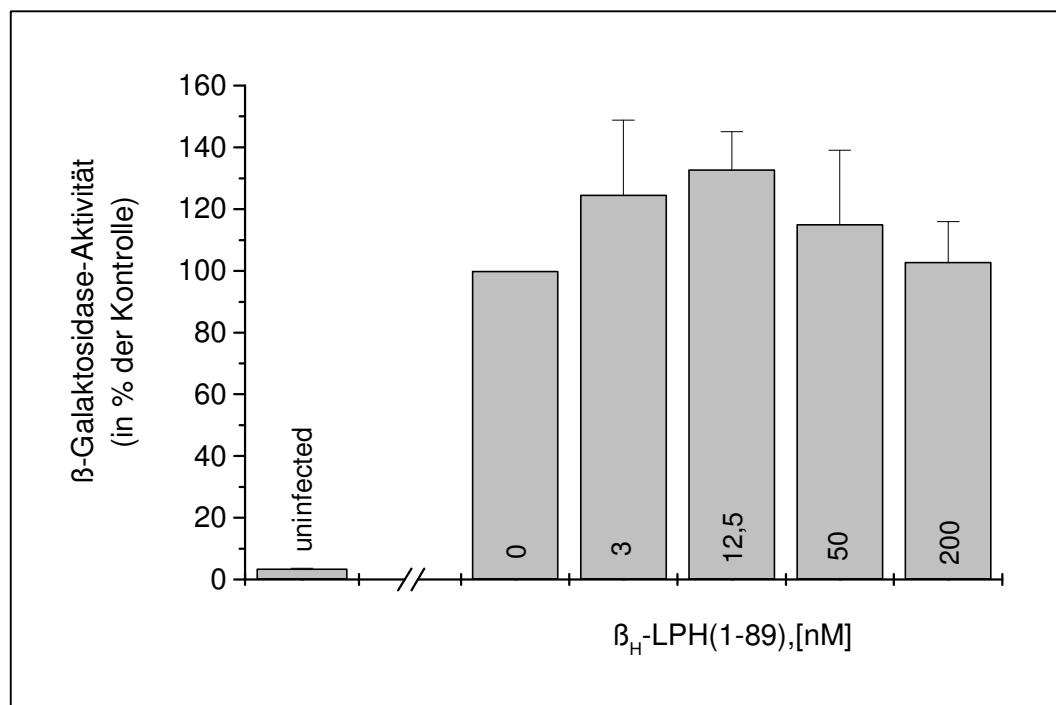


Abb.25: Darstellung der β -Galaktosidase-Aktivität als Indikator für die Infektion von P4R5-Magi-Zellen mit dem HIV-1-Stamm YU-2 in Abwesenheit (CON) und in Anwesenheit steigender Konzentrationen von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$. Angabe der β -Galaktosidase-Aktivität in Prozent der Kontrolle (CON).

Mittelwerte +/- Standardabweichung aus einem Experiment (Dreifachwerte pro Experiment).

Ganz links in der Abbildung ist β -Galaktosidase-Aktivität in nicht infizierten Zellen dargestellt.

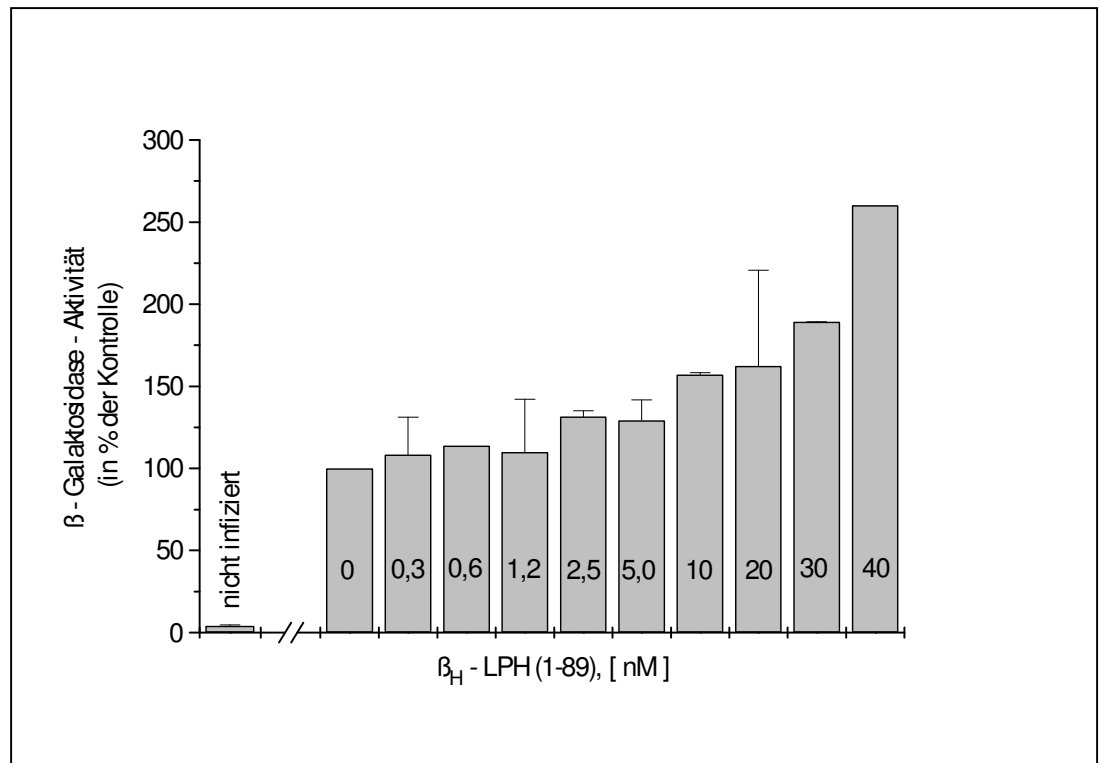


Abb.26: Darstellung der β -Galaktosidase-Aktivität als Indikator für die Infektion von P4M5-Magi-Zellen mit dem HIV-1-Stamm YU-2 in Abwesenheit (CON) und in Anwesenheit steigender Konzentrationen von β_H -LPH(1-89). Angabe der β -Galaktosidase-Aktivität in Prozent der Kontrolle (CON).
Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus einem Experiment (Dreifachwerte pro Experiment).
Ganz links in der Abbildung ist die β -Galaktosidase-Aktivität in nicht infizierten Zellen dargestellt.

4.2.2 Charakteristika der Bindung von β_H -LPH(1-89) über sein Fragment β_H -LPH(76-85) an THP-1-Zellen in Suspension

Wie unter 4.2 ausgeführt, banden gewisse Chargen der THP-1-Zellen das β_H -LPH(1-89) auch über das Fragment (76-85), das mit dem Mittelfragment des β_H -Endorphins identisch ist. Im Folgenden sind kurz die wichtigsten Charakteristika dieser Bindung dargestellt.

4.2.2.1 Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit der Bindung von β_H -LPH(1-89) über sein Fragment β_H -LPH(76-85) an THP-1-Zellen in Suspension konnte durch den Einsatz steigender Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem β_H -LPH(1-89) bei

konstanten Konzentrationen des radioaktiv markierten Peptids in den Bindungsexperimenten dargestellt werden. Die erhaltene Sättigungskurve ließ in halblogarithmischer Darstellung die für eine spezifische Bindung typische sigmoidale Verlaufsform erkennen, obwohl die für eine vollständige Verdrängung notwendigen hohen Konzentrationen an β_H -LPH(1-89) nicht zum Einsatz kamen. Die maximale Bindung des markierten Peptids lag im nanomolaren Bereich (Abb.27).

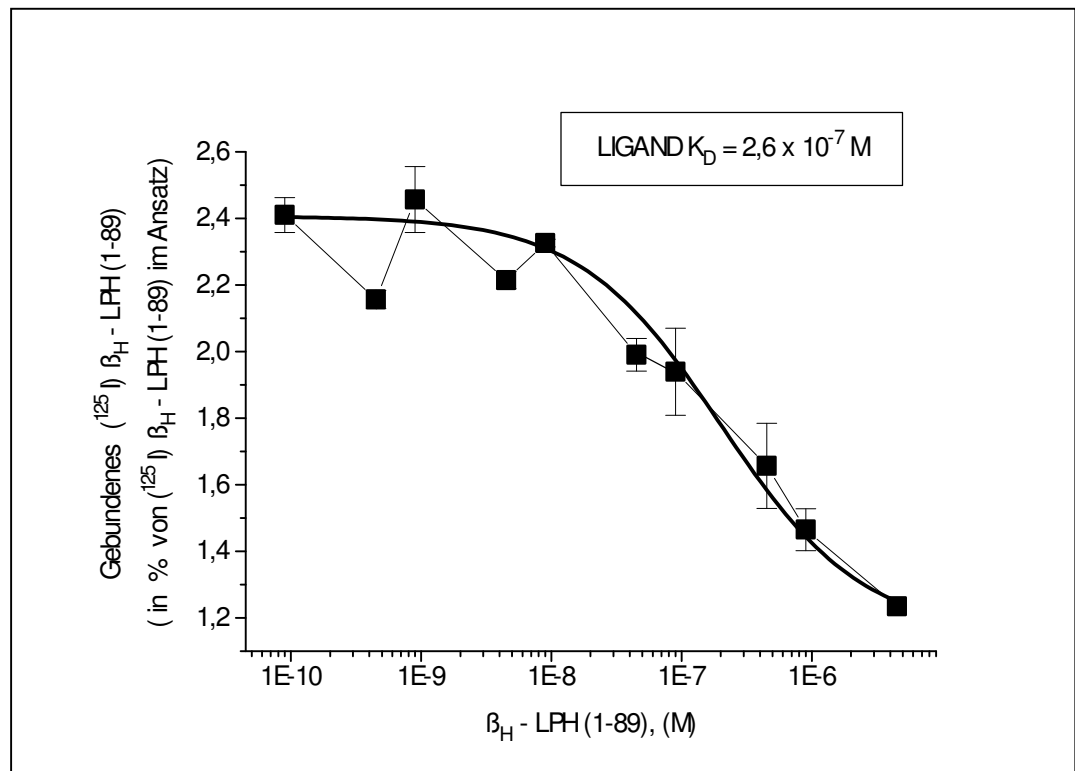


Abb.27: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_H$ -LPH(1-89) über sein Fragment β_H -LPH(76-85) an THP-1-Zellen in Suspension in Anwesenheit steigender Konzentrationen von β_H -LPH(1-89) [$4,5 \times 10^{-10}$ M bis 9×10^{-6} M im Inkubat]. Angabe der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität. Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.2.2 Bindungsparameter K_D und B_{\max}

Die zur Charakterisierung einer spezifischen Bindung notwendigen Bindungsparameter K_D (Dissoziationskonstante) und B_{\max} (Anzahl der Bindungsstellen im Ansatz) wurden mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND aus den unter 4.2.2.1 dargestellten Ergebnissen der Sättigungsexperimente ermittelt. Die K_D betrug (Mittelwerte aus den

Ergebnissen von zwei Experimenten) bei $2,6 \times 10^{-7}$ M, die B_{\max} betrug $7,2 \times 10^{-9}$ M.

Die auf diese Weise ermittelten Ergebnisse wurden im Computerprogramm ORIGIN über graphische Auswertung von Scatchard-Diagrammen geprüft (Abb.28). Hier lag die K_D im Durchschnitt bei $4,7 \times 10^{-7}$ M, die B_{\max} betrug durchschnittlich $1,9 \times 10^{-7}$ M.

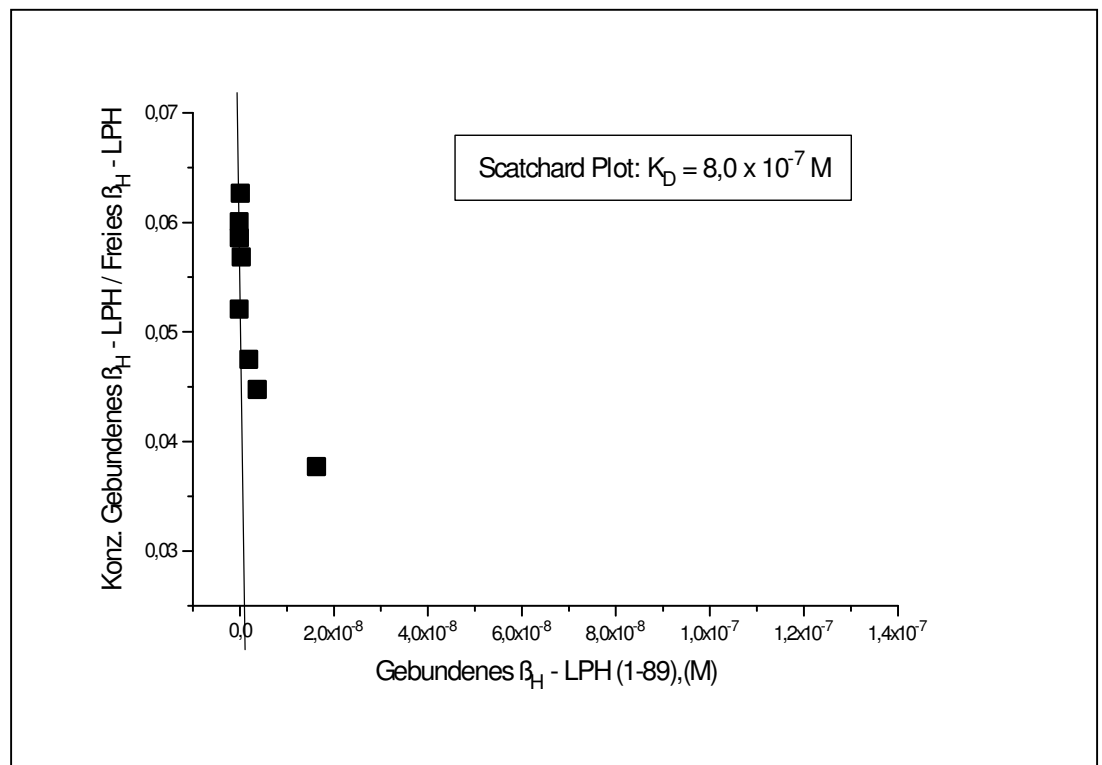


Abb.28: Scatchard-Diagramm zur Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{\max} aus den Ergebnissen der Sättigungsexperimente. Exemplarische Darstellung der Daten eines der in Abbildung 28 eingegangenen Experimente.

4.2.2.3 Strukturspezifität

Die durchgeführten Experimente geben auf Grund der wenigen eingesetzten Verdrängersubstanzen nur einen groben Überblick über die Strukturspezifität der Bindung von β_H -LPH(1-89) über sein Fragment (76-85) an die THP-1 Zellen in Suspension. Als Inhibitoren kamen Fragmente des β_H -LPH(1-89) bzw. des β_H -Endorphin(1-31)-Moleküls zum Einsatz. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente ergaben den Hinweis auf eine – bezogen auf die β_H -Endorphin-Sequenz über das Mittelfragment des β_H -Endorphins(1-31), d.h. β_H -Endorphin(18-27) – vermittelte Bindung. Der größte inhibitorische Effekt zeigte sich in Gegenwart des kompletten Moleküls von β_H -Endorphin(1-31);

die Bindung nahm bis auf ca. 35 % des Kontrollwertes ohne Inhibitor ab. In Gegenwart des kompletten β_{H} -LPH(1-89) Moleküls war ein deutlich geringerer Rückgang der Bindung auf ca. 65 % des Kontrollwertes ohne Inhibitor zu beobachten. Die Streuungen der Werte waren jedoch beträchtlich. Das Fragment β_{H} -Endorphin(18-27) bewirkte im Gegensatz zu den Experimenten mit einer über das C-terminale Fragment bindenden Zellcharge (4.2.1.6) eine Abnahme der Bindung auf ca. 90 % des Kontrollwertes ohne Verdränger. Das ebenfalls untersuchte β_{H} -LPH(35-56), welches β_{H} -MSH(1-22) entspricht, bewirkte einen Rückgang der β_{H} -LPH(1-89)-Bindung auf ca. 80 % des Kontrollwertes ohne Inhibitor (Abb.29).

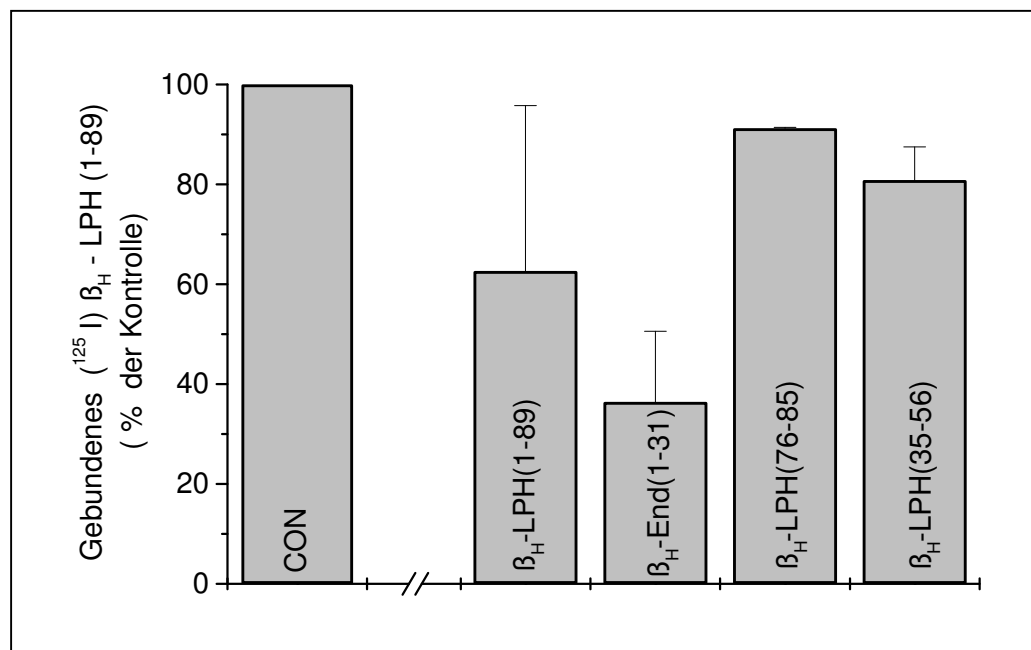


Abb.29: Bindung von (¹²⁵I) β_{H} -LPH(1-89) über sein Fragment β_{H} -LPH(76-85) an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_{H} -Endorphin (1-31) bzw. verschiedener β_{H} -Endorphin-Fragmente (5×10^{-6} M im Inkubat). Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Aminosäurepositionen der β_{H} -LPH(1-89)-Fragmente. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.2.2.4 Lokalisation der Bindungsstellen auf THP-1-Zellen in Suspension: Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an THP-1-Zellen in Suspension

Zur Lokalisation der Bindungsstelle von β_H -LPH(1-89) bei Bindung an THP-1-Zellen über sein Fragment β_H -LPH(76-85) kamen verschiedene gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 gerichtete monoklonale Antikörper, 2D7, 3A9, 45502.111, 45531.111, 45549.111 und 45523.111 zum Einsatz. Den stärksten Verdrängungseffekt bewirkte der Antikörper 2D7, dessen Epitop im Bereich der ECL 2a liegt. In Gegenwart dieses Antikörpers zeigte die β_H -LPH(1-89)-Bindung eine Abnahme auf ca. 60% des Kontrollwertes. Der gegen ein Epitop innerhalb der N-terminalen Region von CCR5 gerichtete Antikörper 3A9 führte zu einer geringfügigen Zunahme der Bindung von β_H -LPH(1-89). Im Gegensatz dazu erzeugte der Antikörper 45502.111, dessen Epitop ebenfalls innerhalb der N-terminalen Region des Rezeptors liegt, einen Rückgang der Bindung auf ca. 70% des Kontrollwertes. In Gegenwart von gegen Multidomänen-Epitope gerichteten Antikörpern (45523.111; 45549.111) konnte ebenfalls eine deutliche Hemmung der Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen beobachtet werden. Die β_H -LPH(1-89)-Bindung nahm auf etwa 70% (45549.111) bzw. 80% (45523.111) des Kontrollwertes ab. Auch der Antikörper 45531.111, dessen Epitop im Bereich der ECL 2b lag, bewirkte einen Rückgang der Bindung von β_H -LPH(1-89) auf ca. 80% des Kontrollwertes (Abb.30).

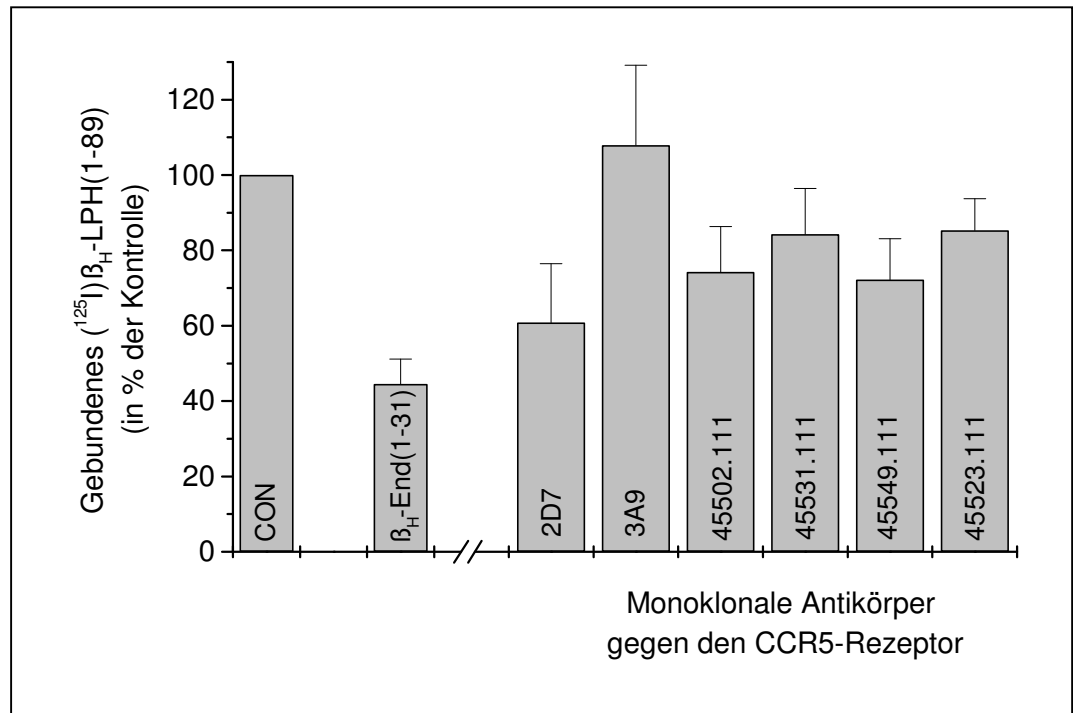


Abb.30: Bindung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) über sein Fragment β_H-LPH(76-85) an THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) oder in Anwesenheit von β_H-Endorphin(1-31) sowie verschiedener gegen CCR5 gerichteter monoklonaler Antikörper. Die Konzentration der Antikörper lag bei 45,5 µg/ml im Inkubat. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle (CON). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus drei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

4.3 Internalisierung von β_H-LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension

Da die Internalisierung von β_H-Endorphin(1-31) in verschiedene Zellarten, z.B. in Thymom-Zellen (SCHWEIGERER et al. 1983), bekannt ist, wurden auch Untersuchungen zur Internalisierung von β_H-LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension durchgeführt. Die Versuche erfolgten bei 37°C. Als Verdränger wurde β_H-Endorphin(1-31) eingesetzt. Zur Kontrolle wurden jeweils identische Ansätze bei 4°C im Versuch mitgeführt. Da im Falle einer Internalisierung von (¹²⁵I)β_H-LPH(1-89) dieses während der Inkubationszeit nicht wieder von den Zellen dem Modell des dynamischen Gleichgewichts entsprechend abdissoziieren konnte, war eine nach Abschluss der Inkubationsperiode gemessene höhere Radioaktivität bei 37°C im Vergleich zu den bei 4°C mitgeführten Proben im Sinne einer abgelaufenen Internalisierung zu

interpretieren. Sowohl bei 4°C als auch bei 37°C war ein inhibitorischer Effekt des β_H -Endorphins(1-31) auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung an die THP-1-Zellen in Suspension festzustellen. Da im Falle der bei 37°C inkubierten Versuchsansätze die am Versuchsende gemessene Radioaktivität, welche die Bindung von β_H -LPH(1-89) an die Zellen anzeigte, höher war, als im Falle der bei 4°C inkubierten Versuchsansätze, mußte man davon ausgehen, dass β_H -LPH(1-89) in die Zellen aufgenommen worden war (Abb.31). Verglichen mit den Ergebnissen von Experimenten mit radioaktiv markiertem β_H -Endorphin(1-31) (GROENHAGEN, Disseration in Vobereitung) war die Aufnahme rate, d.h. die Geschwindigkeit der Internalisierung von (125 I) β_H -LPH(1-89) jedoch sehr gering.

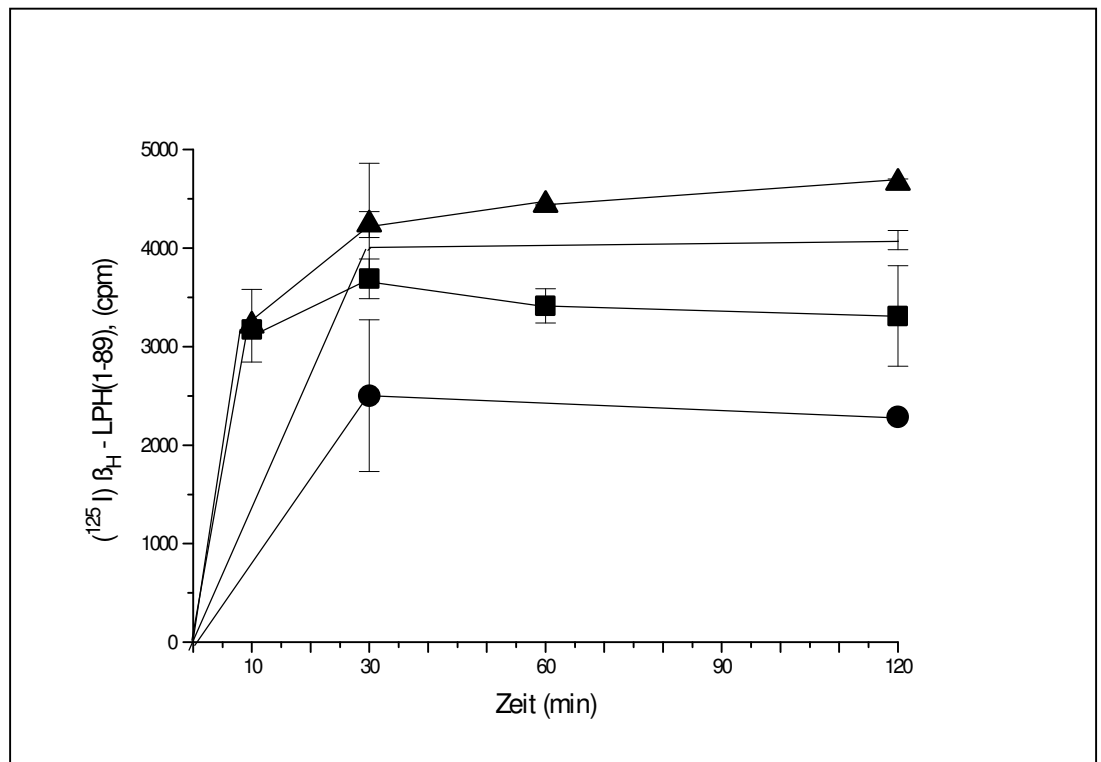


Abb.31: Internalisierung von (125 I) β_H -LPH(1-89) in THP-1-Zellen in Suspension in Abwesenheit (CON) (■ = Kontrolle 4°C; ▲ = Kontrolle 37°C) und in Anwesenheit von β_H -LPH(1-89) bei 4°C (●) und bei 37°C (ohne Symbol). Die Konzentration des β_H -LPH(1-89) betrug 10^{-5} M im Inkubat. Angabe der Bindung in cpm (counts per minute). Mittelwerte +/- Standardabweichung von Mittelwerten aus zwei Experimenten (Doppelwerte pro Experiment).

5. DISKUSSION

5.1 Methodik

5.1.1 Bindungsversuche mit Oberflächen-assoziiertem Vitronektin

Die Festphasen-Bindungsversuche zur Untersuchung der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin wurden nach der von WÖHNER (1998) eingesetzten Methode durchgeführt. Dieser Festphasen-Bindungsversuch stellt eine Modifikation von prinzipiell ähnlichen, allerdings in Form von ELISAs (enzyme linked immuno sorbent assay) durchgeführten "solid phase assays" dar, die von PREISSNER et al. (1990) im Rahmen von Untersuchungen zur Interaktion von PAI-1 mit Vitronektin eingesetzt worden waren.

Das Versuchssystem zeichnete sich durch relativ einfache technische Durchführbarkeit sowie durch eine relativ geringe Streuung der erzielten Ergebnisse aus.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Vitronektin

Das zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzte Vitronektin wurde freundlicherweise von Prof. Preissner, Institut für Biochemie der JLU Giessen, zur Verfügung gestellt. Es wurde nach der von PREISSNER et al. (1985) beschriebenen Methode gewonnen. Diese Methode beinhaltete Barium-Citrat-Absorption, Ammoniumsulfat-Präzipitation, DEAE-Sephacel- und Blue Sepharose-Chromatographie, Gelfiltration und Immunadsorption; das Isolierungsprodukt war homogen und zeigte keine Kreuzreaktivität mit Antiseren gegen Komplementproteine, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Inter- α -Trypsin-Inhibitor, α_2 -Plasmin-Inhibitor, α_2 -Makroglobulin, Antithrombin III, C₁-Inaktivator und Histidinreiches Glykoprotein (PREISSNER et al., 1985). Auch in den von WÖHNER (1998) durchgeführten Gelelektrophoresen konnte keine Verunreinigung des Vitronektins durch andere Proteine nachgewiesen werden.

UNDERWOOD et al. (1990) konnten zeigen, dass die Struktur der Oberfläche, welche mit Vitronektin beschichtet wurde, nicht von entscheidender Bedeutung für die Ligandenbindung an Oberflächen-assoziiertes Vitronektin war. In den

von WÖHNER (1998) durchgeführten Experimenten führten dagegen Mikrotiterplatten, deren Oberfläche eine große Anzahl hydrophiler Gruppen aufwies, zu den besten Ergebnissen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen Mikrotiterplatten der Firma NUNC, Typ MaxiSorp zum Einsatz, deren Oberfläche hohe Affinität zu Molekülen mit gemischten hydrophilen und hydrophoben Bereichen zeigt. Da mit diesen Platten gleich gute Ergebnisse erzielt wurden wie bei Wöhner, spielt die Plattenoberfläche offenbar eine untergeordnete Rolle. Offenbar ist eine Assoziation des Moleküls sowohl an hydrophile als auch an hydrophobe Oberflächen möglich.

Da unter Verwendung eines niedermolaren basischen Carbonatpuffers zur Herstellung der Vitronektin-Beschichtungslösung eine dreifach höhere Bindung als unter Verwendung von Puffer C gemessen werden konnte (WÖHNER, 1998) wurde auch in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten ein niedermolarer basischer Carbonatpuffer verwendet. Puffer C behinderte offensichtlich aufgrund seiner Proteinkomponenten (BSA, Gelatine) die Adhäsion von Vitronektin an die Oberfläche der Mikrotiterplatten.

5.1.2 Bindungsversuche mit Heparin-aktiviertem Vitronektin in Lösung

Der Flüssigphasen-Bindungsversuch zur Untersuchung der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Heparin-aktiviertes Vitronektin erfolgte in Anlehnung an die von Hildebrand (1988) eingesetzte Methode zur Untersuchung der Bindung von β_H -Endorphin an Vitronektin im Plasma.

Die Aktivierung der Bindungsstelle auf Vitronektin war notwendig, da spezifische Bindungsstellen für β_H -Endorphin(1-31) bzw. β_H -LPH(1-89) auf nativem Vitronektin in bindungsunfähiger Form vorliegen und erst durch Interaktion mit Glykosaminoglykanen oder Komplementkomponenten sowie durch Assoziation an Oberflächen in bindungsfähige Form übergeführt werden. Die Induktion der β_H -Endorphin/ β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle auf dem Vitronektin-Molekül zeigte sich als ein vom Sulfatierungsgrad der Glykosaminoglykane abhängiger Prozess (HILDEBRAND, 1988). Da mit Heparin, einem Molekül mit hohem Sulfatierungsgrad, die meisten Erfahrungen Vorliegen, wurde in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Heparin zur Aktivierung der Bindungsstellen eingesetzt.

Interaktion von Vitronektin mit Heparin führt zu charakteristischen Veränderungen in der Vitronektinstruktur, welche die Bereitstellung von β_H -Endorphin/ β_H -LPH(1-89)-Bindungsstellen zur Folge haben. Ursache hierfür könnte eine Änderung in der Affinität von bereits in nativem Zustand exponierten Bindungsstellen oder aber eine Exposition ursprünglich verborgener Bindungsstellen sein. Im Falle der Vitronektin-Heparin-Interaktion ist eine Zunahme der Konzentration an Bindungsstellen nachgewiesen (HILDEBRAND, 1988).

Während in "Festphasen-Methodik" durchgeführte Bindungsversuche eine relativ geringe Streuung zeigten, ergab sich mit der Methode des Flüssigphasen-Versuches eine deutlich größere Streuung der erzielten Ergebnisse. Man kann davon ausgehen, dass an Oberflächen assoziiertes Vitronektin eine definierte Konformation einnimmt, die auch durch Bindung eines Liganden keine Veränderungen erfährt. Dadurch steht zur Interaktion mit weiteren Liganden eine unveränderliche Zahl von Bindungsstellen ohne Affinitätsänderung zur Verfügung. Der flexible Zustand von gelöstem Vitronektin ermöglicht dagegen vielfältige Konformationsänderungen und Interaktionen des Moleküls, weil keine Fixierung des Moleküls vorliegt. Durch Interaktion mit einem Liganden kann die Konformation des Vitronektins Änderungen erfahren, welche dann auch Änderungen im Bindungsverhalten im Sinne einer Affinitätsveränderung, einer Exposition oder einer Reduktion von Bindungsstellen zur Folge haben können. Mit der unterschiedlichen Flexibilität der Vitronektin-Molekülstrukturen muss man sich wahrscheinlich auch die unterschiedliche Streuung in den Ergebnissen der Festphasen- und Flüssigphasen-Bindungsversuche erklären.

Bei der Wertung der Ergebnisse der Flüssigphasen-Experimente im Vergleich zu den Festphasen-Experimenten muss berücksichtigt werden, dass die erzielten Ergebnisse möglicherweise nicht nur Folge der direkten Interaktion zwischen Bindungsstelle und Ligand sind, sondern auch die beschriebene Exposition oder Reduktion von Bindungsstellen die Ergebnisse beeinflussen kann.

Auf Grund des fest fixierten Zustandes des Vitronektinmoleküls an Polystyrol-Oberflächen, der in der Natur nicht zu finden ist, kommt den Festphasen-Bindungsversuchen eine geringere physiologische Bedeutung zu. Von größerer physiologischer Relevanz sind Flüssigphasen-Bindungsversuche, da

Vitronektin in vivo in nicht-fixierter Form vorliegt. Für die semi-fixierte Form, die Vitronektin als Bestandteil einer Zellmembran einnimmt, stellen der Oberflächen-fixierte und der in Lösung vorliegende Zustand Grenzwerte dar, die beide, in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, Eigenschaften des membrangebundenen Moleküls reflektieren können.

5.1.3 Bindungsversuche mit THP-1-Zellen in Suspension

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuche beruhen auf der von SCHWEIGERER et al. (1985) beschriebenen Methode eines Zentrifugationsassays mit geringfügigen Modifikationen.

Die Enzymhemmer wurden in Konzentrationen wie von GELFAND et al. (1995) publiziert eingesetzt. Jedoch kam wegen geringerer Toxizität anstelle von Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) sein Analogon 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (PEFA-Block) zum Einsatz.

Die Versuchstemperatur lag bei 4°C. Aus diesem Grund darf angenommen werden, dass Zellstoffwechsel und Enzymaktivität weitgehend blockiert waren. Lediglich im Rahmen der Untersuchungen zur Internalisierung von β_H -LPH(1-89) in THP-1-Zellen erfolgte die Versuchsdurchführung unter höheren Temperaturen (37°C), da in diesem Fall intakte Stoffwechselfunktionen erwünscht waren.

Auswahl der Monozytenzelllinie THP-1

POLOCZEK (2002) konnte nachweisen, dass das POMC-Fragment β_H -Endorphin(1-31) über Non-Opioid-Bindungsstellen mit Monozyten der Zelllinie THP-1 interagiert. β_H -LPH(1-89) enthält als Vorläufer-Molekül des β_H -Endorphin(1-31) dessen komplette Aminosäuresequenz, so dass Interaktionen dieses Peptids mit den gleichen Interaktionspartnern möglich schienen.

Der vorliegenden Arbeit lag die Intention zugrunde, nähere Erkenntnisse über die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Zellen des Immunsystems zu erhalten. Monozyten der Zelllinie THP-1 schienen auf Grund ihrer Eigenschaften ein geeignetes Modell für dementsprechende Untersuchungen. Die Zellen dieser Zelllinie stammen aus dem Blut eines ein Jahr alten Jungen, der an akuter Monozytenleukämie (M5 nach FAB-Klassifikation der AML) erkrankt war. In

bezug auf ihre Morphologie, ihre sekretorischen Produkte, die Expression von Onkogenen, die Expression von Oberflächenantigenen sowie die Expression von in den Lipid-Stoffwechsel eingebundenen Genen gleichen Monozyten der Zelllinie THP-1 normalen menschlichen Monozyten (AUWERX, 1991).

Um die Bindungsstelle für $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ zu charakterisieren, war eine große Zahl von Experimenten mit Zellkonzentrationen im Bereich von 30×10^6 Zellen/ml notwendig. Da Monozyten der Zelllinie THP-1 in Suspension und somit in Roller-Flaschen kultivierbar sind, standen sie mit relativ wenig Aufwand in kurzer Zeit in den benötigten hohen Konzentrationen zur Verfügung. Auch ihre Widerstandsfähigkeit machte die THP-1-Zellen zu geeigneten Untersuchungsobjekten für diese Art von Experimenten. Die Mortalitätsrate der Zellen in den Bindungsversuchen lag unter 10%.

THP-1-Zellen sind zur Produktion von α -MSH (RAJORA et al., 1996) und somit wahrscheinlich auch anderer POMC-Fragmente wie $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in der Lage. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde besitzen also Relevanz im Sinne einer möglichen autokrinen Funktion des $\beta_{\text{H-LPH}}(1-89)$ in Bezug auf Monozyten. Des Weiteren bestehen Hinweise darauf, dass die THP-1-Zellen Opioid-Rezeptoren exprimieren können (BUCHNER et al., 1997). Beide Befunde könnten dahingehend interpretiert werden, dass Monozyten in das Netzwerk opioidpeptidger Modulationen eingebunden sein könnten, wenn auch in bis jetzt noch unklarer Form.

Der Hauptgrund für die Wahl der Monozyten-Zelllinie THP-1 war jedoch im Hinblick auf die von POLOCZEK (2002) erhobenen Befunde die Exprimierung des CC-Chemokin-Rezeptors CCR5 auf der Membranoberfläche dieser Zellen (RAPORT et al., 1996). THP-1-Zellen exprimieren des Weiteren den CXC-Chemokin-Rezeptor CXCR4 (SCHOLS et al., 1997) sowie eine Reihe von CD-Oberflächenantigenen (PASTERNAK and PASTERNAK, 1994), z.B. CD4, welches im Rahmen der HIV-Infektion mit HIV-1 Stämmen von entscheidender Bedeutung ist.

Zellpräparation

Die Präparation der Zellen erfolgte auf Eis. Der zum Waschen und Resuspendieren zugegebene Puffer hatte eine Temperatur von ca. 4°C. Diese niedrige Temperatur konnte eine Reduzierung der Stoffwechselaktivität der Zellen ab dem Augenblick bewirken, in dem kein Nährmedium mehr zur

Verfügung stand. Damit konnte die Autolyse der Zellen verhindert sowie einer Degradation der Rezeptoren entgegengewirkt werden. Auf Grund der am Ende jedes Versuchs bestimmten geringen Mortalitätsrate darf man davon ausgehen, dass die Zellen durch diese abrupte Temperaturänderung keinen Schaden nahmen.

Blockung unspezifischer Bindungsstellen

Um eine Anlagerung der eingesetzten Peptide an die Wände der Reaktionsgefäße zu verhindern, wurde allen Lösungen BSA in einer Konzentration von 0,1 % (w/v) zugesetzt; dadurch sollten unspezifische Bindungsstellen an den Wänden der Reaktionsgefäße abgesättigt werden. Außerdem sollte das Peptid dadurch infolge niederaffiner Adsorption an das BSA in Lösung gehalten werden.

Stabilisierung der Osmolarität

Zellsuspension und Tracer lagen für die Bindungsversuche in plasmaisotonomem Inkubationspuffer vor. Da die zugegebenen Peptide in BSA 0,1% gelöst waren bzw. Inkubationsansätzen, die keine Peptide enthielten (Kontrollansatz und Viabilitätsansätze), ein der Peptid-BSA-Lösung entsprechendes Volumen an reiner BSA-Lösung zugesetzt wurde, kam es zur Veränderung der Osmolarität. Soweit per Mikroskop beurteilbar, wirkte sich die Senkung der Osmolarität nicht negativ auf die Viabilität der Zellen aus. Da in der Literatur jedoch von einem Einfluss der Konzentration bestimmter Ionen (besonders Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+}) auf das Bindungsverhalten von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) an Monozyten der Zelllinie U937 berichtet wurde (SHAHABI et al., 1990), bestand das Ziel, die Versuche in plasmaisotonomem Milieu durchzuführen. Durch den Zusatz von Kompensationspuffer in gleichen Volumina wie BSA- oder BSA-Peptidlösung konnte die Osmolarität in den Versuchsansätzen plasmaisoton gehalten werden. Der Kompensationspuffer entsprach in seinen Bestandteilen dem Inkubationspuffer, jedoch lagen alle Bestandteile mit Ausnahme des BSA in doppelter Konzentration vor. Die Konzentration von BSA wurde in allen eingesetzten Lösungen, so auch im Kompensationspuffer, konstant bei 0,1% gehalten.

Auf Grund der hohen Konzentration der Komponenten des Kompensationspuffers ergaben sich Schwierigkeiten bezüglich der Löslichkeit

der einzelnen Bestandteile. Um eine vollständige Lösung der Komponenten zu erreichen, musste der pH-Wert beim Ansetzen stark in den sauren Bereich (ca. auf pH 2) verschoben werden. Anschließend wurde der pH auf den gewünschten Wert von 7,4 eingestellt. Dabei kam es zu keiner erneuten Ausfällung der Puffer-Bestandteile.

Konvektion der Inkubationsansätze

Nach Zusammenstellung aller Inkubationsansätze wurden diese für die Dauer von 180 min inkubiert, um die Interaktion der Reaktionspartner zu ermöglichen. Während der Inkubationszeit war es notwendig, die Reaktionsgefäße zu bewegen, da anderenfalls eine ausreichende Konvektion der Reaktionspartner nicht gewährleistet war.

Die Inkubationsansätze befanden sich in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen. Eine Bewegung der Ansätze auf Eppendorf-Mischern erwies sich jedoch auf Grund der mangelnden Regulierbarkeit der Bewegungsstärke als nicht sinnvoll.

Eine Alternative zeigte sich in der Durchmischung der Inkubationsansätze auf einem Dynatech-Varishaker. Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden in eine auf eine ELISA-Mikrotiterplatte aufgeklebte Plastikbox gestellt, welche auf dem Varishaker befestigt wurde. Die mit dieser Methode anfänglich hohe Mortalitätsrate der Zellen konnte durch Verschluss der Box mit einem schaumstoffgefütterten Deckel deutlich gesenkt werden, da auf diese Weise die Reaktionsgefäße innerhalb der Plastikbox fixiert waren.

In der beschriebenen Versuchsanordnung war sowohl die Mortalität der Zellen als auch die Streuung der Messwerte am geringsten. Andere Methoden zur Konvektion der Inkubationsansätze, z.B. die Inkubation der Ansätze in 13 ml Sarstedt-Röhrchen mit abgerundetem Boden und anschließende Durchmischung auf einem Taumler, zeigten keine geringere Mortalität der Zellen, jedoch höhere Streuung der Messergebnisse und wesentlich mehr Aufwand in der Durchführung und wurden deshalb letztlich nicht eingesetzt.

Zentrifugation der Inkubationsansätze

In Testversuchen mit Variation der Zentrifugationszeit zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen nach 10 min oder 15 min Zentrifugation. Die Zentrifugationszeit wurde deshalb auf 10 min festgelegt.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Mechanismus der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit THP-1-Zellen

5.2.1.1 Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Bindung von β_H -LPH(1-89) an Monozyten der Zelllinie THP-1 konnte entsprechend den von BURT (1978) postulierten Kriterien als spezifische Bindung charakterisiert werden. Als bindende Strukturen der Zelloberfläche konnten durch den Einsatz spezifischer Antikörper das multifunktionale Glykoprotein Vitronektin sowie der CC-Chemokin-Rezeptor CCR5 identifiziert werden. Der Hauptteil der Bindung erfolgte offensichtlich über CCR5, der kleinere Teil über Vitronektin. In beiden Fällen wurde der C-Terminus des β_H -LPH(1-89) als bindungsrelevante Struktur identifiziert.

In Bezug auf die Herkunft des als bindendes Element identifizierten Vitronektins sind verschiedene Überlegungen möglich. Es ist bekannt, dass Vitronektin von humanen Monozyten synthetisiert und sezerniert werden kann (HETLAND et al., 1989). Somit könnte es als Produkt der THP-1-Zellen in die Zellmembran gelangt sein. Substantielle Mengen an Vitronektin sind jedoch auch in Fetalem Kälberserum (FCS) enthalten (HAYMAN et al., 1983), das dem Nährmedium der Zellen zugesetzt wurde. Auch dieses Vitronektin könnte in die Zellmembran integriert oder durch adhäsive Vorgänge an die Zellmembran fixiert worden sein. Ob das als bindendes Element nachgewiesene Vitronektin ein Produkt der THP-1-Zellen war oder ob es über das FCS in die Zellwand gelangte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Vitronectin-Moleküle können einzeln oder in Form von Clustern an nicht definierter Stelle auf der Membranoberfläche lokalisiert sein. Auch eine Lokalisation an definierten Stellen, d.h. im Bereich von Rezeptoren wie z.B. im Bereich des CCR5 ist möglich. Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin kann grundsätzlich an jeder Position der Membranoberfläche erfolgen. Die Bindung an CCR5 könnte auf direkter Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit dem CCR5-Rezeptor beruhen. Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass

auf dem CCR5-Rezeptor gebundene Vitronektin-Moleküle als eigentliches bindungsrelevantes Element fungieren könnten. Sowohl im Falle der direkten Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit CCR5 als auch im Falle der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Vitronektin im Bereich des CCR5 ist eine Behinderung der Bindung durch CCR5-Antikörper möglich, so dass beide Modelle vorstellbar wären.

Gegen die Annahme, Vitronektin könne die bindungsrelevante Struktur innerhalb des CCR5 sein, spricht die Beobachtung, dass die RGD-Sequenz, welche sich für die Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin als bindungsrelevantes Element darstellen ließ (Abb.9, Abb.16), bei Bindung von β_H -LPH(1-89) an THP-1-Zellen in Suspension von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (Abb.23).

Die Bindung an CCR5 mit oder ohne Einbeziehung von Vitronektin scheint jedenfalls – betrachtet man die Verdrängungseffekte der gegen CCR5 gerichteten und der gegen Vitronektin gerichteten Antikörper – den Hauptteil der Bindung von β_H -LPH(1-89) an die THP-1-Zellen darzustellen. Über nicht CCR5-gekoppelte Vitronektin-Moleküle scheint nur ein geringer Teil der Bindung an die THP-1-Zellen zustande zu kommen.

Die verschiedenen Effekte der gegen Vitronektin gerichteten Antikörper in Abhängigkeit vom Fixierungszustand des Vitronektins lassen jedoch auch eine andere Interpretation der Ergebnisse zu.

Lag Vitronektin in Oberflächen-assoziiierter, fest fixierter Form vor, kam es in einem Fall zu einer deutlichen Hemmung der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin (Abb. 8). Lag Vitronektin frei in Lösung vor, wurde die Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin in Gegenwart der gegen Vitronektin gerichteten Antikörper verstärkt (Abb. 15). Mögliche Ursachen für dieses ungewöhnliche Phänomen werden in 5.2.1.1.1 diskutiert. Lag Vitronektin in semifixiertem, in die Membran der THP-1-Zellen integriertem Zustand vor, zeigte sich in Gegenwart der gegen Vitronektin gerichteten Antikörper ein geringfügiger Hemmeffekt (Abb. 22). Dieses Ergebnis beinhaltet mehrere Interpretationsmöglichkeiten. Zum einen wäre es denkbar, dass wirklich nur ein geringer Teil der Bindung von β_H -LPH(1-89) an die THP-1-Zellen über Vitronektin vermittelt wird. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass sich bei Vorliegen des Vitronektins in semifixierter Form in der Membran der

THP-1-Zellen die Einflüsse der Antikörper auf fixierte und nicht-fixierte Form aufheben, so dass vielleicht doch mehr β_H -LPH(1-89) an Vitronektin gebunden war, als es den Messwerten entspricht.

5.2.1.1.1 Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin in unterschiedlichen Fixierungszuständen

Die Untersuchung der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin zeigte, dass Vitronektin in verschiedenen Fixierungszuständen bzw. sterischen Konformationen spezifische Bindungsstellen für β_H -LPH(1-89) aufweist. Die Experimente zum Einfluss verschiedener mit Vitronektin interagierender Substanzen auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin in fixiertem und nicht-fixiertem Zustand ergaben Anhalt dafür, dass die RGD-Sequenz eine wesentliche Rolle in dieser Interaktion einnimmt (Abb.9, Abb.16).

In Abhängigkeit vom Fixierungsgrad des Vitronektins konnten jedoch Unterschiede im Bindungsverhalten aufgezeigt werden. Die Ursache dieser Unterschiede im Bindungsverhalten könnte zum einen eine Änderung in der Zahl der exponierten Bindungsstellen sein, zum anderen wären aber auch Unterschiede in der Affinität des Liganden zu seiner Bindungsstelle in Abhängigkeit vom Fixierungszustand des bindenden Moleküls vorstellbar.

Das physiologischerweise in der extrazellulären Matrix bzw. auf Zelloberflächen vorkommende Vitronektin nimmt hinsichtlich des Fixierungsgrads eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen untersuchten Vitronektin-Formen ein. Man kann annehmen, dass das Molekül trotz Fixierung in Zellmembran oder extrazellulärer Matrix einen Teil seiner Flexibilität behält. Bei Interaktion mit einem Liganden sind Änderungen in der Konformation und damit auch im Bindungsverhalten vorstellbar.

Im Falle des Oberflächen-assoziierten, komplett fixierten Vitronektins sind solche Konformationsänderungen kaum möglich. Eine Liganden-induzierte Exposition weiterer Bindungsstellen ist daher nicht zu erwarten. Ganz im Gegensatz dazu ist das in Lösung befindliche, Heparin-aktivierte Vitronektin in keiner Weise fixiert. Daher ist die Flexibilität des gelösten Moleküls hier im Vergleich der drei untersuchten Modelle am größten. Entsprechend nimmt auch die Wahrscheinlichkeit einer durch den Interaktionspartner induzierten

Konformationsänderung und die dadurch eröffnete Möglichkeit der Steigerung oder Verringerung der Affinität der Ligand-Binder-Interaktion oder die Möglichkeit zur Exposition weiterer Bindungsstellen oder deren Verringerung zu.

Änderungen der Affinität sind aufgrund folgender Vorstellungen denkbar. In fixiertem Zustand des Vitronektins ist kein "induced-fit", d.h. keine Verstärkung der Interaktion durch "Aneinanderanpassen" beider Moleküle vorstellbar, da das Molekül an einem festen Ort in einer starren Konformation vorliegt und durch die Interaktion mit einem Liganden nur geringe Änderungen erfährt. Liegt Vitronektin in nicht-fixiertem oder "semi-fixiertem" Zustand vor, so ist auf Grund der Flexibilität des Moleküls die Ausbildung eines "induced-fit" möglich, was zu einer höheren Affinität der Bindung führen würde als im Falle des Oberflächen-fixierten Moleküls.

Der Vergleich der Dissoziationskonstanten als Maß für die Affinität des Liganden β_H -LPH(1-89) an den jeweiligen Binder zeigte, dass es sich unabhängig vom Fixierungszustand des Vitronektins um eine hochaffine Bindung handelte (K_D /Oberflächen-assoziiertes Vitronektin: 3×10^{-8} M; K_D /Heparin-aktiviertes Vitronektin: $1,2 \times 10^{-8}$ M; K_D /Zellmembran gebundenes Vitronektin: $4,8 \times 10^{-8}$ M).

Eine Erklärung für die unerwartet hohe Affinität der Bindung von β_H -LPH(1-89) an Vitronektin in fixiertem Zustand liegt nicht vor.

Von besonderer Bedeutung ist der Fixierungsgrad von Vitronektin im Rahmen der Interaktion mit Antikörpern, da diese sehr hohe Affinitäten zu ihren Epitopen aufweisen (K_D im Bereich von 10^{-10} M) und deshalb besonders ausgeprägte "Verwindungen" des Epitop-tragenden Moleküls die Folge sein können. Im Falle des Oberflächen-assoziierten Vitronektins sind die potentiellen Bindungsstellen für jeden Interaktionspartner auf Grund der Fixierung des Vitronektin-Moleküls in einer bestimmten Konformation festgelegt. Im Gegensatz dazu kann es im Falle des nicht fixierten, in Lösung befindlichen Heparin-aktivierten Vitronektins durch die Bindung eines Antikörpers an sein Epitop zu Änderungen in der Konformation des Vitronektin-Moleküls kommen. Dadurch kann die Bindung weiterer Antikörper oder die des eigentlichen Liganden begünstigt oder verhindert werden. An die Zellmembran gebundenes Vitronektin kann durch Interaktion

mit einem Liganden zumindest teilweise seine Konformation ändern mit den gleichen Auswirkungen wie im Falle des Heparin-aktivierten Vitronektins. Durch die "Semi-Fixierung" in der Membran sind diese Vorgänge aber wohl in erheblich geringerem Ausmaß möglich. Auf diese Weise könnte der unterschiedliche Einfluss der Antikörper gegen Vitronektin auf die Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an die verschiedenen sterischen Konformationen des Vitronektins zu erklären sein, die zum Teil sogar zu extremen Anstiegen der β_{H} -LPH(1-89)-Bindung führte (Abb.8, Abb.15, Abb.16).

5.2.1.1.2 Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an den Chemokin-Rezeptor CCR5

In der Literatur findet sich eine Reihe von Arbeiten zum Einfluss monoklonaler gegen CCR5 gerichteter Antikörper auf die Bindung unterschiedlicher Liganden (WU et al., 1997; LEE et al., 1999; OLSON et al., 1999). Untersucht wurde das Bindungsverhalten natürlicher Liganden des CCR5-Rezeptors wie RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β in Gegenwart dieser Antikörper. Da CCR5 als wichtigster Co-Rezeptor im Rahmen der Infektion mit M-tropen HIV-1-Stämmen identifiziert werden konnte, sind Untersuchungen zum Einfluss gegen CCR5 gerichteter Antikörper auf die Infektion mit diesen HIV-Stämmen von besonderem Interesse.

Die in den erwähnten Arbeiten eingesetzten Antikörper zeigten unterschiedliche Effekte. Den stärksten Einfluss sowohl auf die Chemokin-Bindung als auch auf die HIV-Bindung über das Hüllprotein gp 120 an CCR5 zeigte der gegen die ECL 2a gerichtete Antikörper 2D7 (LEE et al., 1999). Die anderen Antikörper, deren Epitope zum Teil im Bereich des N-Terminus (3A9, 45502.111) des CCR5 und in der ECL 2b (45531.111) lagen, oder die an Multidomänen-Epitope banden (45523.111, 45549 111), zeigten nur geringen Einfluss auf die Bindung der Chemokine und des HI-Virus.

Bei der Untersuchung der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) an den Chemokin-Rezeptor CCR5 im Rahmen dieser Arbeit kamen die gleichen Antikörper (2D7, 3A9, 45523.111, 45531.111, 45549.111 und 45502.111) zum Einsatz. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde reflektierten die oben erwähnten Befunde aus der Literatur. In Gegenwart des Antikörpers 2D7 kam es zu einer deutlichen Abnahme der Bindung von β_{H} -LPH(1-89) auf ca. 50% der Kontrolle. Daraus war zu schließen, dass β_{H} -LPH(1-89) eine Bindungsstelle auf

CCR5 besitzt. Die β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle auf dem CCR5-Rezeptor könnte zum einen durch Vitronektin in Form von Clustern oder Einzelmolekülen in diesem Bereich repräsentiert werden, zum anderen wäre auch eine nicht Vitronektin-vermittelte Interaktion mit einer "sub-site" des Rezeptors möglich. Wie auch in den oben zitierten Publikationen beeinflussten die anderen eingesetzten CCR5-Antikörper die Bindung nur gering.

Betrachtet man den starken Effekt des Antikörpers 2D7 auf die β_H -LPH(1-89)-Bindung, so liegt die Vermutung nahe, dass die β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle innerhalb des Epitops dieses Antikörpers, also der ECL 2a, liegt. Andererseits wäre es auch möglich, dass sich die β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle auf einer benachbarten "sub-site" befindet, die durch Bindung des Antikörpers 2D7 an sein Epitop für andere Liganden unzugänglich gemacht wird. Beide Varianten wären mit dem Ergebnis vereinbar. Dementsprechend müsste man annehmen, dass die Epitope der anderen Antikörper nicht in unmittelbarer Nähe der β_H -LPH(1-89)-Bindungsstelle liegen, so dass sie die Bindung von β_H -LPH(1-89) nicht beeinflussen können.

Zur weiterführenden Untersuchung der Bindungsstelle von β_H -LPH(1-89) auf CCR5 kam neben den Antikörpern auch einer der natürlichen Liganden des Rezeptors, RANTES, zum Einsatz. Da der Einfluss auf die Bindung von β_H -LPH(1-89) in Gegenwart von RANTES nur sehr gering war, konnte die RANTES-Bindungsstelle als Bindungsstelle für β_H -LPH(1-89) ausgeschlossen werden.

5.2.1.2 Internalisierung von β_H -LPH(1-89) in THP-1-Zellen

Die Wirkung vieler biologisch aktiver Peptide erfolgt nach Aufnahme des Peptids in die Zelle durch Endozytose. Derartige endozytotische Vorgänge können adsorptiv (SILVERSTEIN et al., 1977) oder Rezeptor-vermittelt stattfinden (GOLDSTEIN et al., 1979). Im Falle der Rezeptor-vermittelten Internalisierung bindet der Ligand an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle und wird anschließend unter Bildung intrazellulärer Vesikel in die Zelle aufgenommen. Diese physiologischen Vorgänge sind nur bei einer Temperatur von 37°C möglich, da bei niedrigeren Temperaturen der Stoffwechsel der Zelle inaktiv ist.

Um zu untersuchen, ob β_H -LPH(1-89) in Monozyten der Zelllinie THP-1 internalisiert wird, wurde β_H -LPH(1-89) bei 37°C mit THP-1-Zellen inkubiert. Die erhaltenen Ergebnisse (siehe 4.3) sprachen für eine Internalisierung des Peptids in die Zellen, verglichen mit β_H -Endorphin(1-31) schien β_H -LPH(1-89) jedoch in weit geringerem Ausmaß internalisiert zu werden (GROENHAGEN, Dissertation in Vorbereitung). Dass β_H -LPH(1-89) im Gegensatz zu seinem Spaltprodukt β -Endorphin(1-31) nur in geringen Mengen internalisiert wird, könnte durch die Molekülgröße des β_H -LPH(1-89) bedingt sein. β_H -LPH(1-89) umfaßt 89 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 10000 Da, während das Molekulargewicht des β_H -Endorphin(1-31), welches 31 Aminosäuren umfaßt, nur bei ca. 3500 Da liegt.

5.2.2 Bedeutung der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit THP-1-Zellen

5.2.2.1 Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Zellen des Immunsystems im Vergleich mit anderen immunologisch bedeutsamen POMC-Fragmenten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Monozyten *in vitro* gezeigt werden. *In vivo* spielen Monozyten bzw. die aus ihnen hervorgehenden Makrophagen auf Grund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und Produktion von Zytokinen wie Interferon α , Tumornekrosefaktor α und Interleukinen (IL-1, IL-6) eine entscheidende Rolle im Rahmen von Abwehrprozessen. Modulierende Einflüsse auf diese Funktionen durch die Interaktion dieser Zellen mit β_H -LPH(1-89) können vermutet werden.

Neben der Interaktion mit Monozyten findet sich in der Literatur der Nachweis einer Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit NK-Zellen. KAY et al. (1982) konnten in Gegenwart von β_H -LPH(1-89) eine Steigerung der Funktion dieser Zellen zeigen, die spontane zytotoxische Aktivität besitzen. Somit könnte der Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit NK-Zellen eine wichtige Bedeutung im Rahmen von akuten Abwehrreaktionen bei viralen und anderen Infektionen sowie auch in der natürlichen Resistenz gegen Tumorzellen zukommen.

Weitere Interaktionen von β_H -LPH(1-89) mit Zellen des Immunsystems sind bisher nicht bekannt, aber sowohl mit zellulären als auch mit humoralen Komponenten des Immunsystems durchaus vorstellbar.

Im Vergleich mit β_H -LPH(1-89) ist sein Fragment β_H -Endorphin(1-31) bezüglich seiner Interaktionen mit Immunzellen gut untersucht.

Für β_H -Endorphin(1-31) konnte ein fördernder Effekt auf die Chemotaxis von Monozyten nachgewiesen werden (SALAND et al., 1983). Die Produktion von Chemokinen in mononukleären Zellen unterliegt ebenfalls modulierenden Einflüssen durch β_H -Endorphin(1-31). Neben dem Einfluss auf die Produktion von Interferon γ in humanen mononukleären Zellen (BROWN and VAN EPPS, 1986) und der Stimulation der Interleukin-2-Produktion in murinen Lymphozyten (GILMORE and WEINER, 1988) fördert β_H -Endorphin(1-31) die Proliferation von Lymphozyten (GILMAN et al., 1982) sowie die Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten (CARR and KLIMPEL, 1986).

Parallelen hinsichtlich des funktionellen Einflusses auf Zellen des Immunsystems zwischen β_H -Endorphin(1-31) und seinem Vorläufer-Molekül β_H -LPH(1-89) zeigen sich bezüglich des Effektes auf NK-Zellen. Wie β_H -LPH(1-89) bewirkt auch β_H -Endorphin(1-31) eine Steigerung der Aktivität dieser Zellen. Bis jetzt ist der Einfluss von β_H -LPH(1-89) auf die Funktionen von Zellen des Immunsystems kaum untersucht. Es ist ohne weiteres vorstellbar, dass sich eine ganze Reihe diesbezüglicher Befunde ergeben, wenn weitere Untersuchungen zur Funktion von β_H -LPH(1-89) im Immunsystem durchgeführt werden.

β_H -Endorphin(1-31) und β_H -LPH(1-89) scheinen entweder durch direkte Interaktion mit den jeweiligen Zellen oder indirekt über Zytokine die physiologische Immunantwort zu unterstützen bzw. zu modulieren. Im Gegensatz dazu zeigen andere immunologisch bedeutende POMC-Fragmente wie α -MSH und auch ACTH eher immunsuppressive Wirkungen. α -MSH nimmt wie auch β_H -Endorphin(1-31) und β_H -LPH(1-89) durch direkte Interaktion mit Zellen des Immunsystems wie Makrophagen (STAR et al., 1995) und neutrophilen Granulozyten (CATANIA et al., 1996) Einfluss auf periphere Entzündungen. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen fördern die Entzündungsreaktion durch Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Die antiinflammatorische Wirkung des α -MSH beruht auf einer Hemmung der Produktion dieser Entzündungsmediatoren (LIPTON and CATANIA, 1998). Durch Interaktion

mit neuronalen Rezeptoren induziert das Hormon Signale in absteigenden antiinflammatorischen Bahnen, wodurch ebenfalls entzündliche Prozesse in der Peripherie moduliert werden (TAHERZADEH et al., 1999). Die antiinflammatorische Wirkung von ACTH wird dagegen zum größten Teil nicht direkt, sondern durch Glucokortikoide vermittelt, wie seit langem bekannt ist. Zielstrukturen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurden, sind bislang für β_{H} -LPH(1-89) kaum bekannt geworden. Erst bei Kenntnis weiterer Zielstrukturen und Effekte läßt sich absehen, in wie weit β_{H} -LPH(1-89) eher immunstimulatorische oder immunsuppressive Funktionen haben dürfte.

5.2.2.2 β_{H} -LPH(1-89) als endokriner Modulator immunologischer Funktionen

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass β_{H} -LPH(1-89) mit Monozyten der Zelllinie THP-1 interagieren kann. Diese über Vitronektin und CCR5 vermittelte Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit Monozyten der Zelllinie THP-1 gibt Anlaß zu der Vermutung, daß β_{H} -LPH(1-89) in vivo von funktioneller Bedeutung innerhalb des Immunsystems ist. Die Tatsache, dass in Stresssituationen vermehrt β_{H} -LPH(1-89) aus der Hypophyse ins Blut freigesetzt wird, unterstützt die Annahme, dass dem Einfluss von β_{H} -LPH(1-89) auf Monozyten und möglicherweise andere Zellen des Immunsystems insbesondere in Stresssituationen eine physiologische Bedeutung zukommt.

In welcher Form endokrin gebildetes β_{H} -LPH(1-89) in das Immunsystem eingreift, ist bisher hypothetisch. Für β_{H} -Endorphin(1-31) wurde die Integration in einen endokrin-immunologischen Kreislauf vermutet. TESCHEMACHER et al. (1990) zeigten, dass Interleukine (IL-1 α und IL-1 β), Endotoxin und Vasopressin die Freisetzung von β -Endorphin-Immunoreaktivem-Material aus Zellen des Vorder- und Intermediärlappens von Rattenhypophysen in vitro induzieren können. Das freigesetzte β_{H} -Endorphin(1-31) könnte modulierend in das Immunsystem eingreifen, beispielsweise in Form einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Natürlichen Killerzellen (MATHEWS et al., 1983) oder einer gesteigerten Chemotaxis von Monozyten (SACERDOTE and PANERAI, 1989).

Die Einbindung in einen derartigen endokrin-immunmodulierenden Kreislauf wäre in gleicher Weise für β_{H} -LPH(1-89) als Vorläufer-Molekül des β_{H} -Endorphin(1-31) vorstellbar. Im Rahmen eines akuten Stressereignisses von Zellen des Immunsystems freigesetzte Zytokine könnten die Ausschüttung von β_{H} -LPH(1-89) aus der Hypophyse induzieren. Das Hormon könnte durch direkte Interaktion mit spezifischen Bindungsstellen modulierend auf Zellen des Immunsystems in der Peripherie eingreifen. Daraus resultierende Veränderungen in den Konzentrationen der Sekretionsprodukte dieser Zellen könnten im Sinne eines feed-back-Mechanismus die weitere Freisetzung von β_{H} -LPH(1-89) aus der Hypophyse regulieren.

Das Vorläufer-Molekül des β_{H} -LPH(1-89) POMC wird jedoch nicht nur in der Hypophyse synthetisiert. Für eine ganze Reihe von Zellen des Immunsystems konnte die Fähigkeit zur Synthese von POMC sowie die Freisetzung von POMC-Fragmenten nachgewiesen werden (Übersicht bei SIBINGA and GOLDSTEIN, 1988). Diese Entdeckung läßt vermuten, dass β_{H} -LPH(1-89) zusätzlich zu seinen endokrinen Wirkungen auch parakrin und autokrin auf Immunzellen wirken kann.

5.2.2.3 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit Monozyten und Vitronektin für Migrationsprozesse

Die Interaktionsmöglichkeit von β_{H} -LPH(1-89) mit Monozyten und Vitronektin, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, könnte im Rahmen immunologischer Prozesse von Bedeutung sein.

Unter Verletzungsstress an Orten der Gewebeschädigung autokrin oder parakrin sezerniertes β_{H} -LPH(1-89) könnte einen chemotaktischen Reiz darstellen, der die Migration von Monozyten/Makrophagen zum Ort der Verletzung fördert. Die Möglichkeit der Interaktion von β_{H} -LPH(1-89) mit dem Chemokinrezeptor CCR5, dessen natürliche Liganden RANTES, MIP 1- α und MIP 1- β als chemotaktisch wirkende Faktoren bekannt sind, unterstützt die Hypothese der Migrationsförderung von Monozyten/Makrophagen.

Gleichzeitig findet sich an Orten, an denen Umbauprozesse im Gewebe stattfinden, z.B. im Bereich von akuten Verletzungen das multifunktionelle Glykoprotein Vitronektin (GRINNELL et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass β_{H} -LPH(1-89) über seinen

C-Terminus mit Vitronektin interagieren kann. Eine derartige Interaktion könnte dazu führen, dass neben dem lokal gebildeten $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ auch endokrin freigesetztes $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an Orten der Gewebeschädigung fixiert werden könnte. Die erhöhte Konzentration von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an solchen Orten könnte einen verstärkten chemotaktischen Reiz für Monozyten/Makrophagen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ mit Monozyten über zwei verschiedene Bindungsstellen interagieren kann, eine C-terminale und eine innerhalb des Mittelfragments des $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Moleküls. Somit könnte an Orten der Verletzung über seinen C-Terminus an Vitronektin gebundenes $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ über die Möglichkeit der Interaktion über sein Mittelfragment Monozyten an solchen Orten fixieren. Erhöhte Konzentrationen phagozytotisch aktiver Zellen an Orten, an denen Zelldetritus und im Falle von Entzündungen auch Bakterien beseitigt werden müssen, könnten wesentlich zur Beschleunigung der Heilung von Verletzungen und Entzündungen beitragen.

Unter welchen Umständen welche Bindungsstelle von den Monozyten exprimiert wird, wurde nicht untersucht. Es wäre vorstellbar, dass Monozyten in Gegenwart von größeren Mengen Vitronektin- $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Komplexen die Mittelfragment-Bindungsstelle verstärkt exprimieren.

Ob die Anwesenheit von Vitronektin einen Einfluss auf die Expression der Bindungsstellen auf den Monozyten nimmt, bleibt ebenso weiteren Untersuchungen vorbehalten, wie die Frage, ob $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ die Migration von Immunzellen direkt beeinflusst.

5.2.2.4 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ mit Monozyten für HIV-Infektionen

Seit der Chemokin-Rezeptor CCR5 als wichtigster Co-Rezeptor im Rahmen der Infektion von CD4^+ -Zellen mit M-tropen HIV-1-Stämmen identifiziert werden konnte, wurde eine ganze Reihe von Untersuchungen zum Einfluss natürlicher Liganden dieses Rezeptors auf die HIV-Infektion durchgeführt. Gerade bei POMC-Fragmenten, deren vermehrte Freisetzung unter Stress mehrfach nachgewiesen wurde (GUILLEMIN et al., 1977; LIM and FUNDER, 1983) und deren Interaktion mit CCR5 belegt ist, wäre eine Funktion innerhalb

der Stresssituation "HIV-Infektion" durchaus denkbar. Unter diesem Stress freigesetzte POMC-Fragmente könnten durch Bindung an den Chemokin-Rezeptor CCR5 die HIV-Bindungsstelle blockieren und damit den Eintritt des Virus in die Zelle verhindern. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Monozyten und Makrophagen, welche die Zielstrukturen der M-tropen HIV-1-Stämme darstellen, zu den Interaktionspartnern einer ganzen Reihe von POMC-Fragmenten zu rechnen sind.

Um den Einfluss von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ auf die Infektion mit M-tropen HIV-1-Stämmen zu untersuchen, wurden Experimente mit P4M5-Magi-Zellen durchgeführt.

Entgegen den Erwartungen zeigten sich in einem von zwei Experimenten an P4R5-Magi-Zellen nach Vorinkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ eine Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die als Indikator der HIV-Infektion gilt. Die β -Galaktosidase-Aktivität zeigte einen Anstieg bis auf 250 % der Kontrolle. Dies würde eine Stimulation der HIV-Infektion durch $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ bedeuten. Im anderen der beiden durchgeführten Experimente konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Im Gegenteil zeigte sich hier sogar eine Abnahme der β -Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit steigender $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Konzentrationen im Sinne des erwarteten hemmenden Einflusses von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ auf die Infektion mit HIV-1-Stämmen.

Auf molekularbiologischer Ebene wäre auch eine Stimulation der HIV-Infektion durch $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ vorstellbar. Sie könnte einerseits dadurch zustande kommen, dass durch die Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ an seine "sub-site" auf CCR5 die Konformation des Rezeptors eine Änderung erfährt, so dass die als HIV-Bindungsstelle fungierende "sub-site" von den Viren besser erreicht werden kann. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die Endozytose bereits gebundener HI-Viren durch eine auf Grund der $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ -Bindung induzierten Änderung der Konformation des Rezeptors beschleunigt wird oder das $\beta_{\text{H}}\text{-LPH}(1-89)$ nach Internalisierung in die Zelle durch intrazelluläre Wirkungen die HIV-Infektion dieser Zellen begünstigt.

Welcher dieser beiden diskrepanten Befunde eher der physiologischen Wirkung entspricht, müßte durch weitere Experimente geklärt werden. Denkbar wäre auch, dass in Abhängigkeit von anderen bisher unbekanntem

Faktoren unter physiologischen Bedingungen Hemmung und Stimulierung der HIV-Infektion in Gegenwart von β_H -LPH(1-89) vorkommen können.

Falls in weiteren Experimenten die Hemmung der HIV-Infektion durch β_H -LPH(1-89) nachgewiesen werden könnte, ergäben sich interessante therapeutische Konsequenzen. β_H -LPH(1-89) könnte präventiv und kurativ zum Einsatz kommen, um die Infektion von Zellen bzw. die Ausbreitung der Erkrankung zu verhindern.

6.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Proopiomelanocortinfragment β_H -Lipotropin(1-89) (β_H -LPH(1-89)) wird unter Stress aus der Hypophyse ins Blut freigesetzt. Die Wirkungen des im Blut zirkulierenden β_H -LPH sind nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass β_H -LPH wie sein Spaltprodukt β_H -Endorphin(1-31) immunologische Bedeutung besitzt. Um Informationen zur Wirkung von β_H -LPH im Immunsystem zu gewinnen, wurde die Interaktion von β_H -LPH(1-89) mit Monozyten untersucht. Als Modell für menschliche Monozyten kam die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 zum Einsatz.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmals der Nachweis spezifischer Bindungsstellen für β_H -Lipotropin auf Monozyten. Die Interaktion von β_H -LPH mit den THP-1-Zellen in Suspension erfüllte wesentliche Kriterien einer spezifischen Ligand-Binder-Interaktion wie Sättigbarkeit, Zeitabhängigkeit, Reversibilität und Strukturspezifität. Durch Einsatz spezifischer Antikörper konnten als bindende Strukturen auf der Zelloberfläche der Monozyten das multifunktionelle Glykoprotein Vitronectin sowie der Chemokin-Rezeptor CCR5 nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde der C-Terminus des β_H -LPH-Moleküls als bindungsrelevante Sequenz identifiziert.

Weitere Experimente zeigten, dass die Bindung des β_H -LPH an Vitronectin vom Fixierungsgrad des Vitronectins abhängig ist: Bindungscharakteristika und Einfluss von Antikörpern gegen Vitronectin auf die β_H -LPH-Bindung waren unterschiedlich in Abhängigkeit davon, ob das Vitronectinmolekül an eine Oberfläche fixiert oder in Lösung freibeweglich oder ob es auf der Zellmembran in semifixiertem Zustand vorlag.

Physiologisch bedeutsame Interaktionen von β_H -Lipotropin sowohl mit Monozyten als auch mit Vitronectin sind z.B. im Falle von Gewebszerstörungen oder Entzündungsprozessen vorstellbar, in denen phagozytotische Aktivität erforderlich ist. β_H -LPH könnte die Migration phagozytotisch aktiver Zellen zum Ort der Gewebszerstörung oder Entzündung fördern: Das in entzündlichem Gewebe angereicherte Vitronectin könnte zirkulierendes β_H -LPH binden; β_H -LPH seinerseits könnte Monozyten am Ort

der Entzündung binden und somit dort phagozytotische Aktivität konzentrieren.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen somit, dass Monozyten als Zielstruktur für β_H -Lipotropin in Frage kommen, das unter Stress aus der Hypophyse in das kardiovaskuläre Kompartiment freigesetzt wird. Der Nachweis der Bindung von β_H -LPH an Monozyten stellt einen ersten Vorstoß auf das bislang vernachlässigte Forschungsgebiet der Wirkungen oder Funktionen von β_H -LPH dar, dem ähnlich wichtige Funktionen zuzuschreiben sind wie den übrigen POMC-Fragmenten.

Veröffentlichung auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit:

Lindner, U; Münch, J; Kirchhoff, F; Preissner, KT; Teschemacher, H:
Beta-Lipotropin interacts with specific binding sites on cells from a human monocytic cell line, THP-1.

Poster auf der 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13.-15. März 2001, Mainz.

Lindner, U; Münch, J; Kirchhoff, F; Preissner, KT; Teschemacher, H:
Beta-Lipotropin interacts with vitronectin and CCR5 on cells of a human monocytic cell line, THP-1, through different fragments of its amino acid sequence.

(in preparation)

SUMMARY

β_{H} -lipotropin (1-89) (β_{H} -LPH(1-89)), a fragment of POMC, is released from the pituitary into the cardiovascular compartment under stress. Although there is no valid information about effects of circulating β_{H} -LPH as yet, there is indication that β_{H} -LPH has immunological significance like its major fragment β_{H} -endorphin(1-31). In order to get information about effects of β_{H} -LPH on the immune system, the interaction between β_{H} -LPH(1-89) and monocytes was studied and a human monocytic cell-line, THP-1, was used as model system.

In fact, in this study specific binding sites for β_{H} -LPH were shown to exist on monocytes for the first time. The interaction between β_{H} -LPH and THP-1 cells proved to meet criteria of a specific ligand-binder interaction such as saturability, reversibility, structural specificity and dependence on time.

By use of monoclonal antibodies the multifunctional glycoprotein vitronectin and the chemokine receptor CCR5 were identified as β_{H} -LPH binding sites on the monocytes. The c-terminal fragment of β_{H} -LPH was demonstrated to be essential for β_{H} -LPH binding to CCR5 and vitronectin.

Further experiments showed that binding of β_{H} -LPH to vitronectin is dependent on the degree of mobility of the vitronectin molecule: Binding characteristics and effects of antibodies against vitronectin on β_{H} -LPH binding proved to be dependent on whether vitronectin was immobilized by surface-association, whether it was kept in a quasi-immobilized position while anchored in the cell membrane or whether it was allowed to freely move in solution.

Interactions of β_{H} -LPH with monocytes or vitronectin might be of physiological significance in case of tissue injury or inflammation requiring phagocytic activity. β_{H} -LPH could support monocyte migration to the sites of injury or inflammation: Vitronectin accumulating at sites of inflammation might bind circulating β_{H} -LPH and β_{H} -LPH again might attract monocytes prior to their differentiation to macrophages displaying phagocytic activity.

Findings of this study thus show that monocytes may be considered as target structures for β_{H} -LPH released from the pituitary into the cardiovascular system under stress. Demonstration of β_{H} -LPH binding to monocytes

represents a first approach to compensate for a gap of information on effects or functions of $\beta_{\text{H-LPH}}$.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALKATHIB G, AHUJA SS, LIGHT D, MUMMIDI S, BERGER EA, AHUJA SK (1997). CC Chemokine Receptor 5-Mediated Signaling and HIV-1 Co-receptor Activity Share Common Structural Determinants. *J. Biol. Chem.* 272: 19771-19776.
- ALKATHIB G, COMBADIÈRE C, BRODER CC, FENG Y, KENNEDY PE, MURPHY PM; BERGER EA (1996). CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958.
- ASAKURA S, HURLEY RW, SKORSTENGAARD K, OHKUBO I, MOSHER DF (1992). Inhibition of Cell Adhesion by High Molecular Weight Kininogen. *J. Cell. Biol.* 116: 465-476.
- AUWERX J (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 47: 22-31.
- BARNES DW, SILNUTZER J, SEE C, SHAFFER M (1983). Characterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1362-1366.
- BIGLIARDI PL, SUMANOVSKI LT, BÜCHNER S, RUFLI T, BIGLIARDI-QI M (2003). Different Expression of μ -Opiate Receptor in Chronic and Acute Wounds and the Effect of β -Endorphin on Transforming Growth Factor β Type II Receptor and Cytokeratin 16 Expression. *J. Invest. Dermatol.* 120: 145-152.
- BIGLIARDI PL, BÜCHNER S, RUFLI T, BIGLIARDI-QI M (2002). Specific stimulation of migration of human keratinocytes by μ -opiate receptor agonists. *J. of receptors and signal transduction* 22: 191-199.
- BIRNBERG NC, LISSITZKY JC, HINMAN M, HERBERT E (1983). Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6982-6986.
- BROWN SL, VAN EPPS DE (1986). Opioid Peptides Modulate Production of Interferon γ by Human Mononuclear Cells. *Cell. Immunol.* 103: 19-26.
- BUCHNER RR, VOGEN SM, FISCHER W, THOMAN ML, SANDERSON SD, MORGAN EL (1997). Anti-Human kappa opioid receptor antibodies: characterization of site-directed neutralizing antibodies specific for a peptide kappa R(33-52) derived from the predicted amino terminal region of the human kappa receptor. *J. Immunol.* 158: 1670-1680.

- BURT DR (1978). Criteria for Receptor Identification.
In: Yamura, Enna and Kuhar, editors. Neurotransmitter Binding. New York: Raven Press. pp 41-55.
- CARR DJJ, KLIMPEL GR (1986). Enhancement of the Generation of Cytotoxic T Cells by Endogeneous Opiates.
J. Neuroimmunol. 12: 75-87.
- CASTRO MG, MORRISON E (1997). Post-Translational Processing of Proopiomelanocortin in the Pituitary and in the Brain.
Crit. Rev. Neurobiol. 11: 35-57.
- CATANIA A, LIPTON JM (1994). The Neuropeptide Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone: A Key Component of Neuroimmunomodulation.
Neuroimmunomodulation 1: 93-99.
- CATANIA R, RAJORA N, CAPSONI F, MINONZIO F, STAR RA, LIPTON JM (1996). The Neuropeptide α -MSH Has Specific Receptors on Neutrophils and Reduces Chemotaxis In Vitro.
Peptides 17: 675-679.
- CERIANI G, DIAZ J, MURPHREE S, CATANIA A, LIPTON JM (1994). The Neuropeptide Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits Experimental Arthritis in Rats.
Neuroimmunomodulation 1: 28-32.
- CHAVAKIS T, KANSE SM, YUTZY B, LIJNEN HR, PREISSNER KT (1998). Vitronectin Concentrates Proteolytic Activity on the Cell Surface and Extracellular Matrix by Trapping Soluble Urokinase-Receptor-Urokinase Complexes.
Blood 91: 2305-2312.
- CHHATWAL GS, PREISSNER KT, MÜLLER-BERGHAUS G, BLOBEL H (1987). Specific Binding of the Human S Protein (Vitronectin) to Streptococci, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli.
Infection and Immunity 55: 1878-1883.
- CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACKAY CR, LAROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J (1996). The β -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates.
Cell 85: 1135-1148.
- COCCHI F, DEVICO AL, GARZINO-DEMO A, ARYA SK, GALLO RC, LUSSO P (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8⁺ T Cells.
Science 270: 1811-1815.
- CONE RD (1999). The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis.
TEM 10: 211-216.

- DAHLBÄCK K, LÖFBERG H, DAHLBÄCK B (1986). Localization of Vitronectin (S-protein of Complement) in Normal Human Skin. *Acta Derm. Venereol.* 66: 461-467.
- DAVE JR, RUBINSTEIN N, ESKAY RL (1985). Evidence that β -Endorphin Binds to Specific Receptors in Rat Peripheral Tissues and Stimulates the Adenylate Cyclase-Adenosine 3', 5'-Monophosphate System. *Endocrinology* 117: 1389-1396.
- DEBOLD CR, MENEFEY JK, NICHOLSON WE, ORTH DN (1988). Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome. *Mol. Endocrinol.* 2: 862-870.
- DECLERCK PJ, DE MOL M, ALESSI MC, BAUDNER S, PAQUES EP, PREISSNER KT, MÜLLER-BERGHAUS G, COLLEN D (1988). Purification and Characterization of a Plasminogen Activator Inhibitor 1 Binding Protein from Human Plasma. *J. Biol. Chem.* 263: 15454-15461.
- DENEFF C, VAN BAEL A (1998). A new family of growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of proopiomelanocortin (N-POMC). *Comp. Biochem. Biophys. Part C* 119: 317-324.
- DENG H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARCIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SCHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
- DETHEUX M, STÄNDKER L, VAKILI J, MÜNCH J, FORSSMANN U, ADERMANN K, PÖHLMANN S, VASSART G, KIRCHHOF F, PARMENTIER M, FORSSMANN WG (2000). Natural proteolytic processing of Human CC chemokine-1 generates a potent CCR1 and CCR5 agonist with anti-HIV properties. *J. Exp. Med.* 192: 1501-1508.
- DIAS JA, REICHERT LE (1982). Characterization of a Follitropin-binding Component Prepared from Immature Bovine Testes in the Absence of Detergent. *J. Biol. Chem.* 257: 613-620.
- EIKELENBOOM P, ZHAN SS, KAMPHORST W, VAN DER VALK P, ROZEMULLER JM (1994). Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Virchows Archiv* 424: 421-427.
- EVANS RV, MANNING AB, BERNARD LH, CHRONWALL BM, MILLINGTON WR (1994). α -Melanocyte-Stimulating Hormone and N-Acetyl- β -Endorphin Immunoreactivities Are Localized in the Human Pituitary but Are Not Restricted to the Zona Intermedia. *Endocrinology* 134: 97-106.

- FALK RJ, PODACK E, DALMASSO AP, JENNETTE JC (1987). Localization of S Protein and Its Relationship to the Membrane Attack Complex of Complement in Renal Tissue .
Am. J. Pathol. 127: 182-190.
- FENG Y, BRODER CC, KENNEDY PE, BERGER EA (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor.
Science 272: 872-877.
- FRIEDMAN JM, HALAAS JL (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals.
Nature 395: 763-770.
- FRYKLUND L, SIEVERTSON H (1978). Primary structure of somatomedin B. A growth hormone-dependent serum factor with protease inhibiting activity.
FEBS Lett. 87: 55-60.
- GELFAND RA, WEPSIC HT, PARKER LN, JADUS MR (1995). Prostaglandin E₂ induces up-regulation of murine macrophage β -endorphin receptors.
Immunology Letters 45: 143-148.
- GILMAN SC, SCHWARTZ JM, MILNER RJ, BLOOM FE, FELDMAN JD (1982). β -Endorphin enhances lymphocyte proliferative responses.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 79: 4226-4230.
- GILMORE W, WEINER LP (1988). β -Endorphin enhances interleukin-2 (IL-2) production in murine lymphocytes.
J. Neuroimmunol. 18: 125-138.
- GOLDSTEIN JL, ANDERSON RGW, BROWN MS (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis.
Nature 279: 679-685.
- GRINNELL F, HO CH, WYSOCKI A (1992). Degradation of Fibronectin and Vitronectin in Chronic Wound Fluid: Analysis by Cell Blotting, Immunoblotting, and Cell Adhesion Assays.
J. Invest. Dermatol. 98: 410-416.
- GUILLEMIN R, VARGO T, ROSSIER J, MINICK S, LING N, RIVIER C, VALE W, BLOOM F (1977). β -Endorphin and Adrenocorticotropin Are Secreted Concomitantly by the Pituitary Gland.
Science 197: 1367-1369.
- HAYASHI M, AKAMA T, KONO I, KASHIWAGI H (1985). Activation of Vitronectin (Serum Spreading Factor) Binding of Heparin by Denaturing Agents.
J. Biochem. 98: 1135-1138.
- HAYMAN EG, PIERSCHBACHER MD, ÖHGREN Y, RUOSLATHI E (1983). Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 4003-4007.

- HAZUM E, CHANG KJ, CUATRECASAS P (1979). Specific Nonopiate Receptors for β -Endorphin.
Science 205: 1033-1035.
- HEITKAMP HC, SCHMID K, SCHEIB K (1993). β -Endorphin and adrenocorticotrophic hormone production during marathon and incremental exercise.
Eur. J. Appl. Physiol. 66: 269-274.
- HEMMICK LM, BIDLACK JM (1987). β -Endorphin Modulation of Mitogen-Stimulated Calcium Uptake by Rat Thymocytes.
Life Sci. 41: 1971-1978.
- HENNING J, LASCHEFSKI U, OPPER C (1994). Biopsychological Changes after Bungee Jumping: β -Endorphin Immunoreactivity as a Mediator of Euphoria?
Neuropsychobiology 29: 28-32.
- HETLAND G, PETTERSON HB, MOLLNES TE, JOHNSON E (1989). S-Protein Is Synthesized by Human Monocytes and Macrophages in Vitro.
Scand. J. Immunol. 29: 15-21.
- HILDEBRAND A (1988). Charakterisierung und Identifizierung von S-Protein (=Vitronectin) als spezifisches Bindungsprotein für β -Endorphin im Plasma des Menschen.
Dissertation/ Fachbereich Humanmedizin der JLU Gießen.
- HILDEBRAND A, PREISSNER KT, MÜLLER-BERGHAUS G, TESCHEMACHER H (1989). A Novel β -Endorphin Binding Protein. Complement S Protein (=Vitronectin) Exhibits Specific Non-opioid Binding Sites for β -Endorphin upon Interaction with Heparin or Surfaces.
J. Biol. Chem. 264: 15429-15434.
- HILDEBRAND A, SCHWEIGERER L, TESCHEMACHER H (1988). Characterization and Identification of Heparin-induced Nonopioid-binding Sites for β -Endorphin in Human Plasma.
J. Biol. Chem. 263: 2436-2441.
- HOLMES R (1967). Preparation from Human Serum of an Alpha-One Protein which Induces the Immediate Growth of Unadapted Cells in Vitro.
J. Cell Biol. 32: 297-308.
- HUANG Y, PAXTON WA, WOLINSKY SM, NEUMANN AU, ZHANG L, HE T, KANG S, CERADINI D, JIN Z, YAZDANBAKHS K, KUNSTMAN K, ERICKSON D, DRAGON E, LANDAU NR, PHAIR J, HO DD, KOUP RA (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression.
Nat. Med. 2: 1240-1243.
- HUNTER WM, GREENWOOD FC (1962). Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity.
Nature 194: 495-496.

- JENNE D, HILLE A, STANLEY KK, HUTTNER WB (1989). Sulfation of two tyrosine-residues in human complement S-protein (vitronectin).
Eur. J. Biochem. 185: 391-395.
- JENNE D, STANLEY KK (1987). Nucleotide Sequence and Organization of the Human S-Protein Gene: Repeating Peptide Motifs in the "Pexin" Family and a Model for Their Evolution.
Biochemistry 26: 6735-6742.
- KANSE SM, KOST C, WILHELM OG, ANDREASEN PA, PREISSNER KT (1996). The Urokinase Receptor Is a Major Vitronectin-Binding Protein on Endothelial Cells.
Exp. Cell Res. 224: 344-353.
- KAY N, ALLEN J, MORLEY JE (1984). Endorphins Stimulate Normal Human Peripheral Blood Lymphocyte Natural Killer Activity.
Life Sci. 35: 53-59.
- KOLB WP, MÜLLER-EBERHARD HJ (1975). The Membrane Attack Mechanism of Complement.
J. Exp. Med. 141: 724-735.
- KOST C, STÜBER W, EHRlich HJ, PANNEKOEK H, PREISSNER KT (1992). Mapping of Binding Sites for Heparin, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Plasminogen to Vitronectin's Heparin-binding Region Reveals a Novel Vitronectin-dependent Feedback Mechanism for the Control of Plasmin Formation.
J. Biol. Chem. 267: 12098-12105.
- KRUDE H, GRÜTERS A (2000). Implications of Proopiomelanocortin (POMC) Mutations in Humans: The POMC Deficiency Syndrome.
TEM 11: 15-22.
- LEE B, SHARRON M, BLANPAIN C, DORANZ BJ, VAKILI J, SETOH P, BERG E, LIU G, GUY HR, DURELL SR, PARMENTIER M, CHANG CN, PRICE K, TSANG M, DOMS RW (1999). Epitope Mapping of CCR5 Reveals Multiple Conformational States and Distinct but Overlapping Structures Involved in Chemokine and Coreceptor Function.
J. Biol. Chem. 274: 9617-9626.
- LI CH (1964). Lipotropin, a New Active Peptide from Pituitary Glands.
Nature 201: 924.
- LIM ATW, FUNDER JW (1983). Stress-Induced Changes in Plasma, Pituitary and Hypothalamic Immunoreactive β -Endorphin: Effects of Diurnal Variation, Adrenalectomy, Corticosteroids, and Opiate Agonists and Antagonists.
Neuroendocrinology 36: 225-234.
- LIPTON JM, CATANIA A (1998). Mechanisms of Antiinflammatory Action of the Neuroimmunomodulatory Peptide α -MSH.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 840: 373-380.

- LIU R, PAXTON WA, CHOE S, CERADINI D, MARTIN SR, HORUK R, MACDONALD ME, STUHLMAN H, KOUP RA, LANDAU NR (1996). Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* 86: 367-377.
- LOEFFLER JP, KLEY N, PITTIUS CW, HÖLLT V (1985). Corticotropin-Releasing Factor and Forskolin Increase Proopiomelanocortin Messenger RNA Levels in Rat Anterior and Intermediate Cells in Vitro. *Neurosci. Lett.* 62: 383-387.
- LOLAIT SJ, CLEMENTS JA, MARKWICK AJ, CHENG C, McNALLY M, SMITH AI, FUNDER JW (1986). Pro-opiomelanocortin Messenger Ribonucleic Acid and Posttranslational Processing of Beta Endorphin in Spleen Macrophages. *J. Clin. Invest.* 77: 1776-1779.
- LOLAIT SJ, LIM ATW, TOH BH, FUNDER JW (1984). Immunoreactive β -Endorphin in a Subpopulation of Mouse Spleen Macrophages. *J. Clin. Invest.* 73: 277-280.
- LORD JAH, WATERFIELD AA, HUGHES J, KOSTERLITZ HW (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.
- LORIDON-ROSA B, VIELH P, CUADRADO C, BURTIN P (1988). Comparative Distribution of Fibronectin and Vitronectin in Human Breast and Colon Carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 90: 7-16.
- MAINS RE, EIPPER BA, LING N (1977). Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3014-3018.
- MARTIN WR, EADES CG, THOMPSON JA, HUPPLER RE, GILBERT PE (1976). The Effects of Morphine- and Nalorphine-like Drugs in the Nondependent and Morphine-dependent Chronic Spinal Dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-532.
- MATHEWS PM, FROELICH CJ, SIBBITT WL, BANKHURST AD (1983). Enhancement of Natural Cytotoxicity by β -Endorphin. *J. Immunol.* 130: 1658-1662.
- McLOUGHLIN L, MEDBAK S, GROSSMANN AB. Circulating Opioids in Man. In: HERZ A, AKIL H, SIMON EJ, editors. *Handbuch Exp. Pharm.* 104/II (Opioids II). Berlin: Springer;1993: P 673-696.
- McLOUGHLIN L, EVANS SF, WATSON JD, HINDS CJ, REES LH (1988). Characterization of circulating pro-opiomelanocortin-related peptides in human septic shock. *J. Endocrinol.* 119: 159-165.

- MIMURO J, LOSKUTOFF DJ (1989). Purification of a Protein from Bovine Plasma That Binds to Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor and Prevents Its Interaction with Extracellular Matrix.
J. Biol. Chem. 264: 936-939.
- MIZUKAMI IF, FAULKNER NE, GYETKO MR, SITRIN RG, TODD III RF (1995). Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay Detection of a Soluble Form of Urokinase Plasminogen Activator Receptor In Vivo.
Blood 86: 203-211.
- MORIUCHI H, MORIUCHI M, COMBADIÈRE C, MURPHY PM, FAUCI AS (1996) CD8⁺ T-Cell-derived soluble factor(s), but not β -chemokines RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β , suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15341-15345.
- MUNSON PJ, RODBARD D (1980): LIGAND: A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems.
Analytical Biochemistry 107: 220-239.
- MURBURG MM, WILKINSON CW, RASKIND MA, VEITH RC, DORSA DM (1993). Evidence for two Differentially Regulated Populations of Peripheral β -Endorphin-Releasing Cells in Humans.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 77: 1033-1040.
- NAKANISHI S, INOUE A, KITA T, NAKAMURA M, CHANG ACY, COHEN SN, NUMA S (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor.
Nature 278: 423-427.
- NICULESCU F, RUS HG, VLAICU R (1987). Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis.
Atherosclerosis 65: 1-11.
- OATES EL, ALLAWAY GP, ARMSTRONG GR, BOYAJIAN RA, KEHRL JH, PRABHAKAR BS (1988). Human Lymphocytes Produce Pro-opiomelanocortin Gene-related Transcripts.
J. Biol. Chem. 263: 10041-10044.
- OLSON WC, RABUT GEE, NAGASHIMA KA, TRAN DNH, ANSELMA DJ, MONARD SP, SEGAL JP, THOMPSON DAD, KAJUMO F, GUO Y, MOORE JP, MADDON PJ, DRAGIC T (1999). Differential Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion, gp 120 Binding, and CC-Chemokine Activity by Monoclonal Antibodies to CCR5.
J. Virology 73: 4145-4155.
- PASTERNAK G, PASTERNAK L (1994). Behavior in Vitro of Long-Term Cultured Bone Marrow or Blood Cells from Chronic Myeloid Leukemia: Adhesion Molecules and Differentiation Antigens as Detected by Immunocytochemistry.
Folia Biologica 40: 430-454.

- PASTERNAK GW, WOOD PJ (1986). Multiple Mu Opiate Receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898.
- PEARS JS, JUNG RT, BARTLETT W; BROWNING MC, KENICER K, THODY AJ (1992). A case of skin hyperpigmentation due to α -MSH hypersecretion. *Br. J. Dermatol.* 126: 286-289.
- PERT CB, SNYDER SH (1973). Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- PIERSCHBACHER MD, RUOSLAHTI E (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33.
- PODACK ER, MÜLLER-EBERHARD HJ (1978). Binding of desoxycholate, phosphatidylcholine vesicles, lipoprotein and of the S-protein to complexes of terminal complement components. *J. Immunol.* 121: 1025-1030.
- PODACK ER, PREISSNER KT, MÜLLER-EBERHARD HJ (1984). Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Suppl.* 284: 89-96.
- PODACK ER, DAHLBÄCK B, GRIFFIN JH (1986). Interaction of S-protein of Complement with Thrombin and Antithrombin III during Coagulation. *J. Biol. Chem.* 261: 7387-7392.
- POLOCZEK A (2002). Lokalisation einer β -Endorphin-Bindungsstelle im Bereich des Chemokinrezeptors CCR5 auf Monozyten der Zelllinie THP-1. *Dissertation/ Fachbereich Humanmedizin der JLU Gießen.*
- PORTHOGESE PS, SULTANA M, NAGASE H, TAKEMORI AE (1992). A highly selective δ_1 -opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 195-196.
- PREISSNER KT, GRULICH-HENN J, EHRLICH HJ, DECLERCK P, JUSTUS C, COLLEN D, PANNEKOEK H, MÜLLER-BERGHAUS G (1990). Structural Requirements for the Extracellular Interaction of Plasminogen Activator Inhibitor 1 with Endothelial Cell Matrix-associated Vitronectin. *J. Biol. Chem.* 265: 18490-18498.
- PREISSNER KT, HOLZHÜTER S, JUSTUS C, MÜLLER-BERGHAUS G (1989). Identification and Partial Characterization of Platelet Vitronectin: Evidence for Complex Formation With Platelet-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Blood* 74: 1989-1996.
- PREISSNER KT, MÜLLER-BERGHAUS G (1987). Neutralization and Binding of Heparin by S Protein/Vitronectin in the Inhibition of Factor Xa by Antithrombin III. *J. Biol. Chem.* 262: 12247-12253.

- PREISSNER KT, WASSMUTH R, MÜLLER-BERGHAUS G, (1985). Physiochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system.
Biochem. J. 231: 349-355.
- PREISSNER KT, ZWICKER L, MÜLLER-BERGHAUS G (1987). Formation, characterization and detection of a ternary complex between S protein, thrombin and antithrombin III in serum.
Biochem. J. 243: 105-111.
- PREISSNER KT, SEIFFERT D (1998). Role of Vitronectin and Its Receptors in Haemostasis and Vascular Remodeling.
Thrombosis Research 89: 1-21.
- PUPPO F, CORSINI G, MANGINI P, BOTTARO L, BARRECA T (1985). Influence of β -Endorphin on Phytohemagglutinin-Induced Lymphocyte Proliferation and on the Expression of Mononuclear Cell Surface Antigens In Vitro.
Immunopharmacology 10: 119-125.
- RAJORA N, CERIANI G, CATANIA A, STAR RA, MURPHY MT, LIPTON JM (1996). α -MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line .
J. Leukoc. Biol. 59: 248-253.
- RAPORT CJ, GOSLING J, SCHWEICKART VL, GRAY PW, CHARO IF (1996). Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Human CC Chemokine Receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α .
J. Biol. Chem. 271: 17161-17166.
- RIDDERSTAD A, ABEDI-VALUGERDI M, MÖLLER E (1991). Cytokines in Rheumatoid Arthritis.
Ann. Med. 23: 219-223.
- SACERDOTE P, PANERAI AE (1989). Analysis of Beta-Endorphin Structure-Related Activity on Human Monocyte Chemotaxis: Importance of the N-and C-Terminal.
Peptides 10: 565-569.
- SALAND LC, VAN EPPS DE, ORTIZ E, SAMORA A (1983). Acute Injections of Opiate Peptides into the Rat Cerebral Ventricle: A Macrophage-Like Cellular Response.
Brain Res. Bull. 10: 523-528.
- SALZET M, SALZET-RAVEILLON B, COCQUERELLE C, VERGER-BOCQUET M, PRYOR SC, RIALAS CM, LAURENT V, STEFANO GB (1997). Leech immunocytes contain proopiomelanocortin: nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing.
J. Immunol. 159: 5400-5411.

- SATOH N, OGAWA Y, KATSUURA G, NUMATA Y, MASUZAKI H, YOSHIMASA Y, NAKAO K (1998). Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci. Lett.* 249: 107-110.
- SCHOLS D, STRUYF S, VAN DAMME J, ESTE JA, HENSON G, DE CLERCQ E (1997). Inhibition of T-tropic HIV Strains by Selective Antagonization of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* 186: 1383-1388.
- SCHWANDT P, RICHTER WO, KERSCHER P, BOTTERMANN P (1981). β -Lipotropin Increases Plasma Insulin Immunoreactivity. *Life Sci.* 29: 345-349.
- SCHWEIGERER L, BHAKDI S, TESCHEMACHER H (1982). Specific non-opiate binding sites for human β -endorphin on the terminal complex of human complement. *Nature* 296: 572-574.
- SCHWEIGERER L, TESCHEMACHER H, BHAKDI S, LEDERLE M (1983). Interaction of Human β -Endorphin with Nonopiate Binding Sites on the Terminal SC5b-9 Complex of Human Complement. *J. Biol. Chem.* 258: 12287-12292.
- SCHWEIGERER L, SCHMIDT W, TESCHEMACHER H, GRAMSCH C (1985). β -Endorphin: Surface binding and internalization in thymoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5751-5755.
- SEIFFERT D, LOSKUTOFF DJ (1991). Evidence That Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Binds to the Somatomedin B Domain of Vitronectin. *J. Biol. Chem.* 266: 2824-2830.
- SHAHABI NA, LINNER KM, SHARP BM (1990). Murine Splenocytes Express a Naloxone-Insensitive Binding Site for β -Endorphin. *Endocrinology* 126: 1442-1448.
- SHAHABI NA, PETERSON PK, SHARP BM (1990). β -Endorphin Binding to Naloxone-Insensitive Sites on a Human Mononuclear Cell Line (U937): Effects of Cations and Guanosine Triphosphate. *Endocrinology* 126: 3006-3015.
- SHARP BM, KEANE WF, SUH HJ, GEKKER G, TSUKAYAMA D, PETERSON PK (1985). Opioid Peptides Rapidly Stimulate Superoxide Production By Human Polymorphonuclear Leucocytes and Makrophages. *Endocrinology* 117: 793-795.
- SHAVIT Y, LEWIS JW, TERMAN GW, GALE RP, LIEBESKIND JH (1984). Opioid Peptides Mediate the Suppressive Effect of Stress on Natural Killer Cell Cytotoxicity. *Science* 223: 188-190.

- SIBINGA NES, GOLDSTEIN A (1988). Opioid Peptides and Opioid Receptors in Cells of the Immun System.
Ann. Rev. Immunol. 6: 219-249.
- SILVERSTEIN SC, STEINMAN RM; COHN ZA (1977). Endocytosis.
Ann. Rev. Biochem. 46: 669-722.
- SIMON EJ, HILLER JM, EDELMAN I (1973). Stereospecific Binding of the Potent Narcotic Analgesic [³H] Etorphine to Rat-Brain Homogenate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1947-1949.
- SLOMINSKI A, WORTSMAN J, LUGER T, PAUS R, SOLOMON S (2000). Corticotropin Releasing Hormone and Proopiomelanocortin Involvement in the Cutaneous Response to Stress.
Physiol. Rev. 80: 979-1020.
- STALLA GK, STALLA J, SCHOPOHL J, VON WERDER K, MULLER OA (1986). Corticotropin-releasing factor in humans. I. CRF stimulation in normals and CRF radioimmunoassay.
Horm. Res. 24: 229-245.
- STANLEY KK (1986). Homology with hemopexin suggests a possible scavenging function of S-protein/vitronectin.
FEBS Lett. 199: 249-253.
- STAR RA, RAJORA N, HUANG J, STOCK RC, CATANIA A, LIPTON JM (1995). Evidence of the autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by α -melanocyte-stimulating hormone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8016-8020.
- SUZUKI S, PIERSCHBACHER MD, HAYMAN EG, NGUYEN K, ÖHGREN Y, RUOSLAHTI E (1984). Domain Structure of Vitronectin.
J. Biol. Chem. 259: 15307-15314.
- TAKAHASHI H, HAKAMATA Y, WATANABE Y, KIKUNO R, MIYATA T, NUMA S (1983). Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipotropin-precursor gene.
Nucleic. Acids Res. 11: 6847-6858.
- TAHERZADEH S, SHARMA S, CHHAJLANI V, GANTZ I, RAJORA N, DEMITRI MT, KELLY L, ZHAO H, ICHIYAMA T, CATANIA A, LIPTON JM (1999). α -MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor- α production by human monocyte/macrophages.
Am. J. Physiol. 276: R1289-R1294.
- TERENIUS L (1973). Stereospecific Interaction Between Narcotic Analgesics and a Synaptic Plasma Membrane Fraction of Rat Cerebral Cortex.
Acta pharmacol. et toxicol. 32: 317-319.

- TESCHEMACHER H (2003). Proopiomelanocortin. Welche Rolle spielt dieser ACTH- und Endorphin-Präkursor für die Stressadaptation?
Arzneim.-, Therapie-Kritik 35: 233-242.
- TESCHEMACHER H, KOCH G, SCHEFFLER H, HILDEBRAND A, BRANTL V (1990). Opioid Peptides Immunological Significance.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 594: 66-77.
- TOMASINI BR, MOSHER DF (1988). Conformational States of Vitronectin: Preferential Expression of an Antigenic Epitope When Vitronectin is Covalently and Noncovalently Complexed With Thrombin-Antithrombin III or Treated With Urea .
Blood 72: 903-912.
- TSCHOPP J, MASSON D, SCHÄFER S, PEITSCH M, PREISSNER KT (1988). The Heparin Binding Domain of S-Protein/Vitronectin Binds to Complement Components C7, C8, and C9 and Perforin from Cytolytic T-Cells and Inhibits Their Lytic Activities.
Biochemistry 27: 4103-4109.
- UNDERWOOD PA, STEELE JG, DALTON BA, BENNETT FA (1990). Solid-phase monoclonal antibodies. A novel method of directing the function of biologically active molecules by presenting a specific orientation.
J. Immunol. Methods 127: 91-101.
- VAN EPPS DE, SALAND L (1984). β -Endorphin and Met-Enkephalin Stimulate Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Chemotaxis.
J. Immunol. 132: 3046-3053.
- WEISS JM, SUNDAR SK, CIERPIAL MA, RITCHIE JC (1991). Effects of interleukin-1 infused into brain are antagonized by α -MSH in a dose-dependent manner.
Eur. J. Pharmacol. 192: 177-179.
- WIEDEMANN K, TESCHEMACHER H (1983). beta-Endorphin immunoreactive materials in human plasma determined by a multiple radioimmunoassay system.
Life Sci. 33: Suppl.1: 89-92.
- WÖHNER S (1998). Charakteristika der Interaktion des Opioidpeptides β -Endorphin mit dem multifunktionellen Adhäsivprotein Vitronektin.
Dissertation/ Fachbereich Humanmedizin der JLU Gießen.
- WORTSMAN J, FRANK S, WEHRENBURG WB, PETRA PH, MURPHY JE (1985). gamma 3-Melanocyte-stimulating hormone immunoreactivity is a component of the neuroendocrine response to maximal stress (cardiac arrest).
J. Clin. Endocrinol. Metab.61: 355-360.

WU L, LAROSA G, KASSAM N, GORDON CJ, HEATH H, RUFFING N, CHEN H, HUMBLIAS J, SAMSON M, PARMENTIER M, MOORE JP, MACKAY CR (1997). Interaction of Chemokine Receptor CCR5 with its Ligands: Multiple Domains for HIV-1 gp120 Binding and a Single Domain for Chemokine Binding.
J. Exp. Med. 186: 1373-1381.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Ulrike Lindner
Geburtsdatum/-ort: 06.01.1977, Würzburg
Eltern: Dr. F. Lindner, Arzt für Allgemein-
und Gefäßchirurgie, Dr. R. Lindner,
Ärztin für Allgemeinmedizin
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang:

1983 – 1988 Freie Waldorfschule Würzburg
1988 – 1996 Rudolf-Steiner-Schule Loheland/Fulda
29.06.1996 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr:

09.1996 – 02.1997 Stiftung Juliusspital Würzburg,
Neurologie

Studium der Humanmedizin:

SS 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Justus-Liebig-Universität Giessen
04.1999 Ärztliche Vorprüfung
04.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
SS 2000 Beginn der vorliegenden Dissertation
04.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.2002 – 09.2003 Praktisches Jahr am Hôpital régional de
Martigny, Schweiz (Chirurgie),
Universitätsklinikum Gießen (Pädiatrie,
Innere Medizin)
11.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Teschemacher, Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie der Universität Gießen, für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten, für seine sorgfältige wissenschaftliche Anleitung und seine stete konstruktive Unterstützung in allen Fragestellungen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. K.T. Preissner, Institut für Biochemie der Universität Gießen für die Überlassung von Vitronektin und anderer Substanzen sowie für seine konstruktiven Ratschläge.

Herrn Dr. J. Münch und Herrn Dr. F. Kirchhoff, Institut für Klinische und Molekulare Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die Durchführung der Experimente mit HIV-infizierten Zellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Beate Dickopf für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung in praktischen Fragestellungen sowie bei allen Mitarbeitern des Labors für die gute Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre.