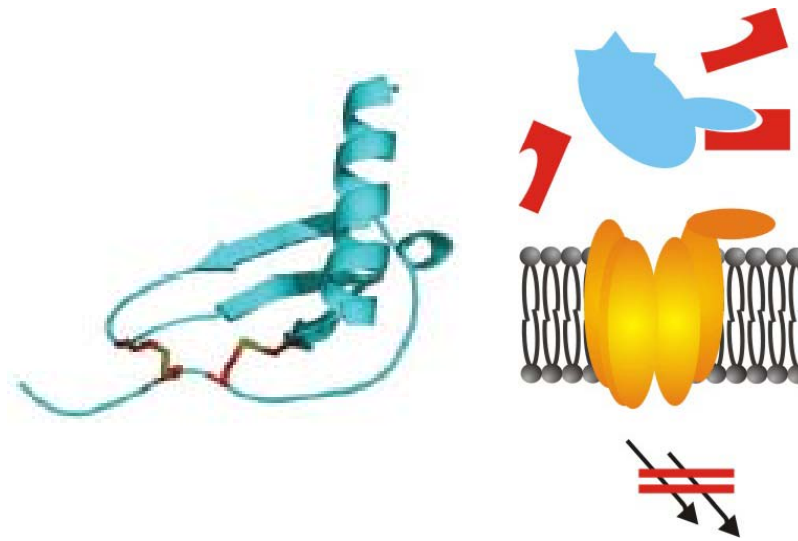


Research Group „Rezeptor-Ligand-Interaktionen“

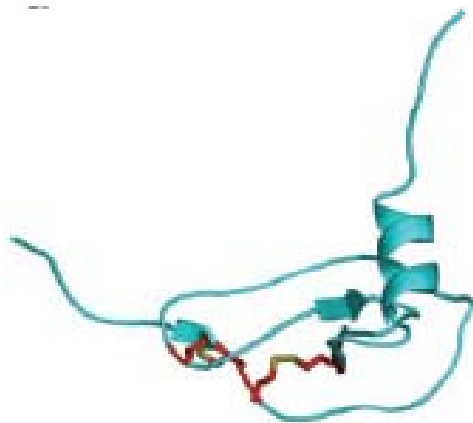
Design und Test kleiner Moleküle für die Manipulation von Leukozyten



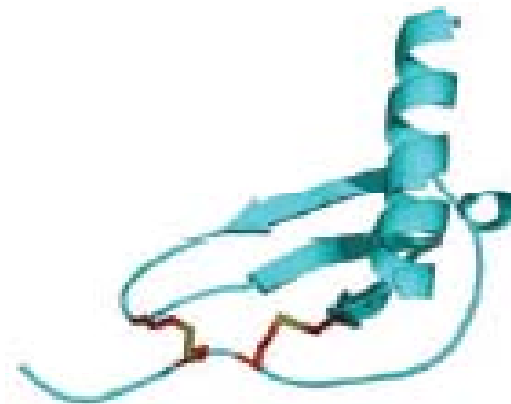
Dr. Katja Schmitz, 18.02.09

Chemokine und Chemokinrezeptoren

- Chemotaktische Cytokine
- Kleine, lösliche Proteine (80-120 AS)
- ca. 50 menschliche Chemokine
- 20 verschiedene Rezeptoren



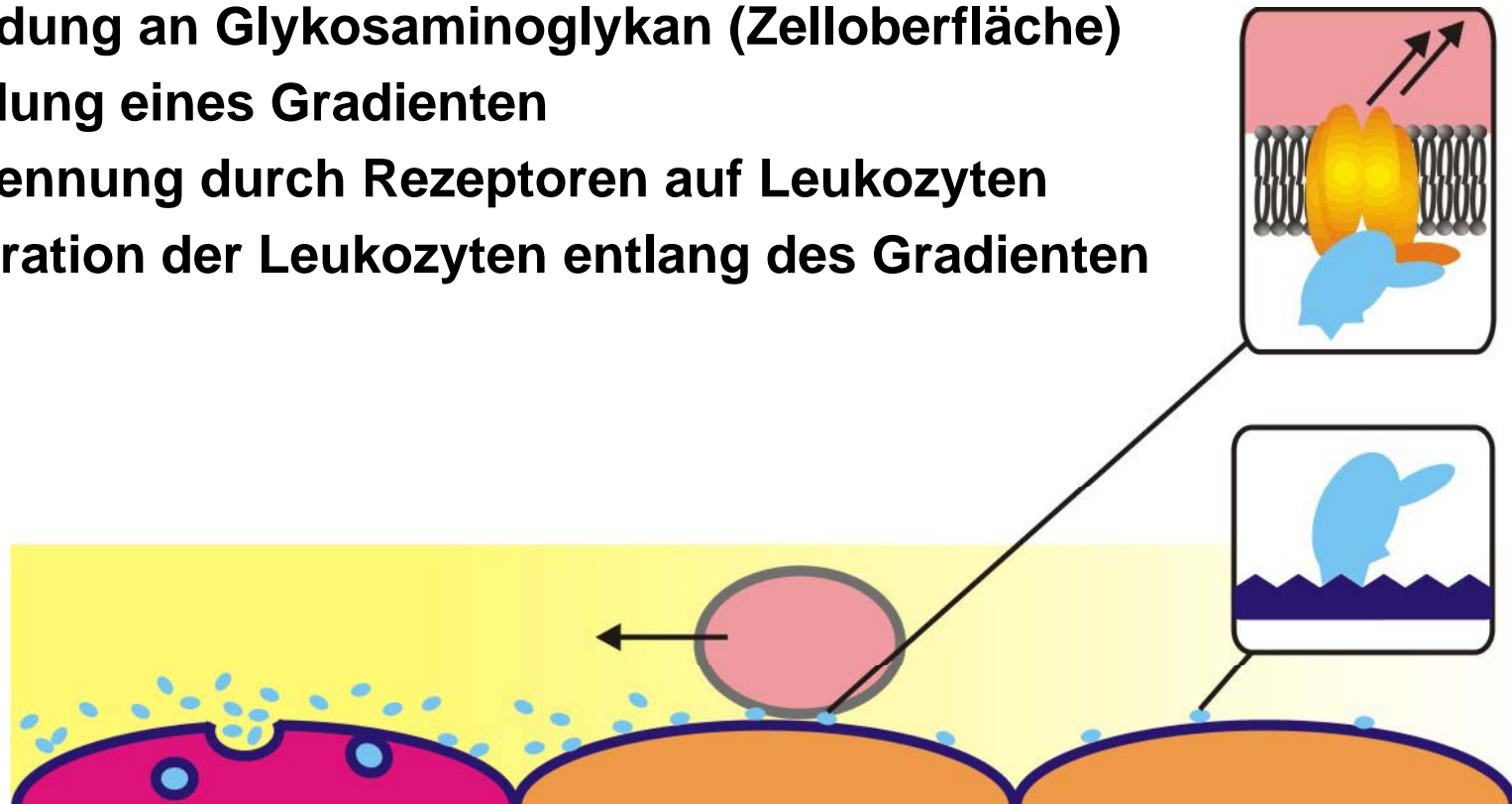
CCL2 Chemokin (MCP-1)



CXCL8 Chemokin (IL-8)

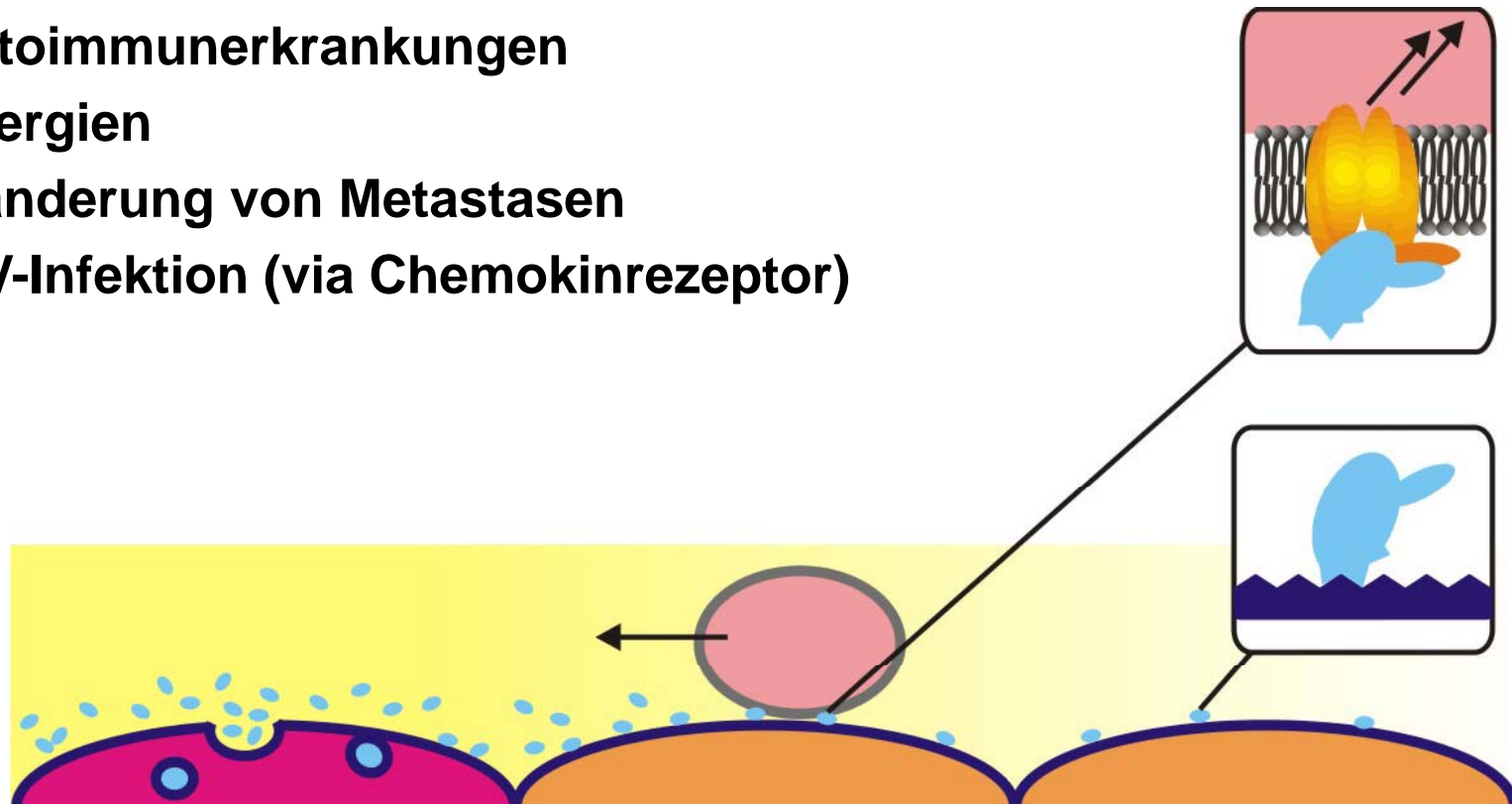
Chemokine steuern die Migration von Leukozyten

- Sekretion z.B. in entzündetem Gewebe
- Bindung an Glykosaminoglykan (Zelloberfläche)
- Bildung eines Gradienten
- Erkennung durch Rezeptoren auf Leukozyten
- Migration der Leukozyten entlang des Gradienten



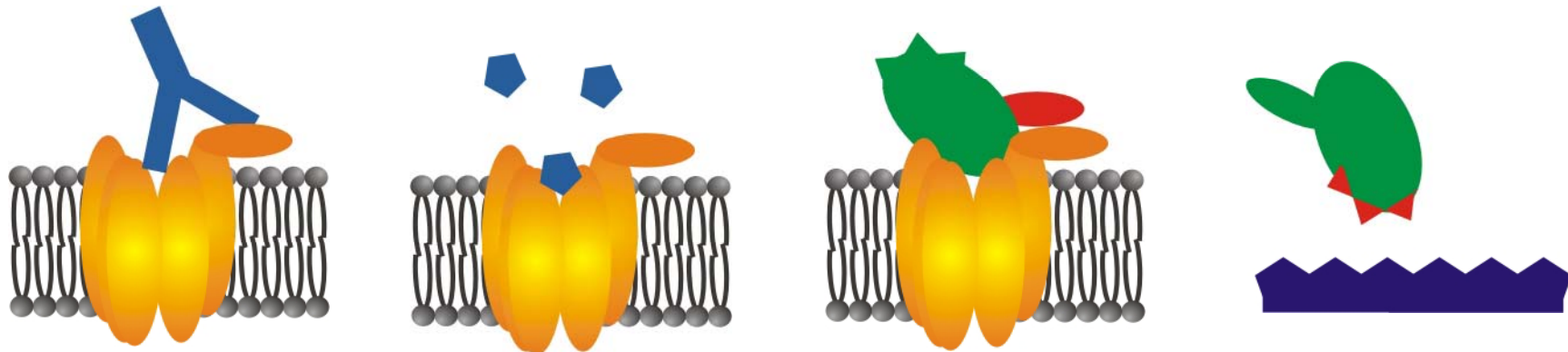
“Nebenwirkungen” von Chemokinen

- Chronische Entzündungen
- Autoimmunerkrankungen
- Allergien
- Wanderung von Metastasen
- HIV-Infektion (via Chemokinrezeptor)



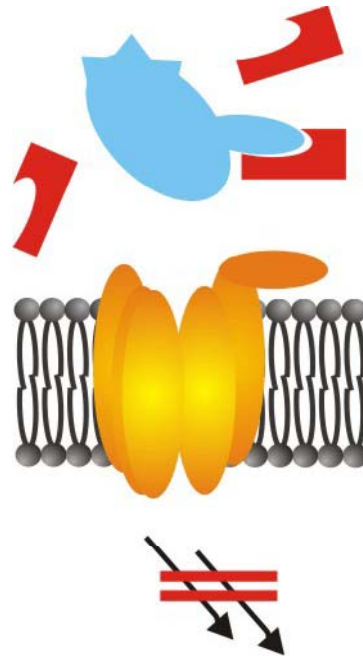
Ansätze zur Modulation der Chemokinfunktion

- Antikörper gegen Chemokinrezeptoren
- Kleine Moleküle als Inhibitoren der Chemokinrezeptoren
- Chemokine mit Deletion des N-Terminus
- Chemokine mit Mutationen in der GAG-Bindungsstelle



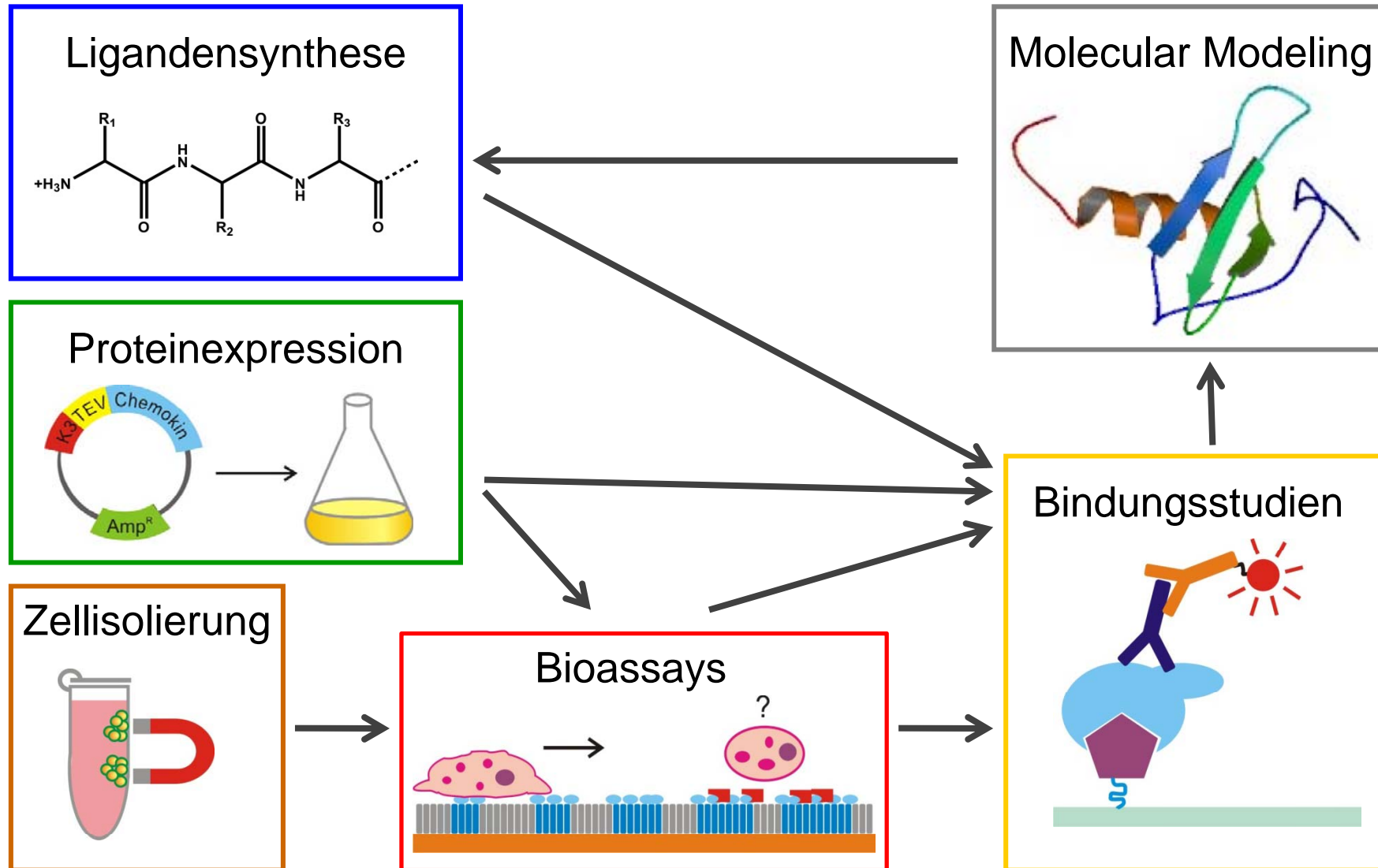
Alternativer Ansatz

Kleine Moleküle, die an Chemokine binden, und damit deren Wechselwirkung mit dem Rezeptor verändern



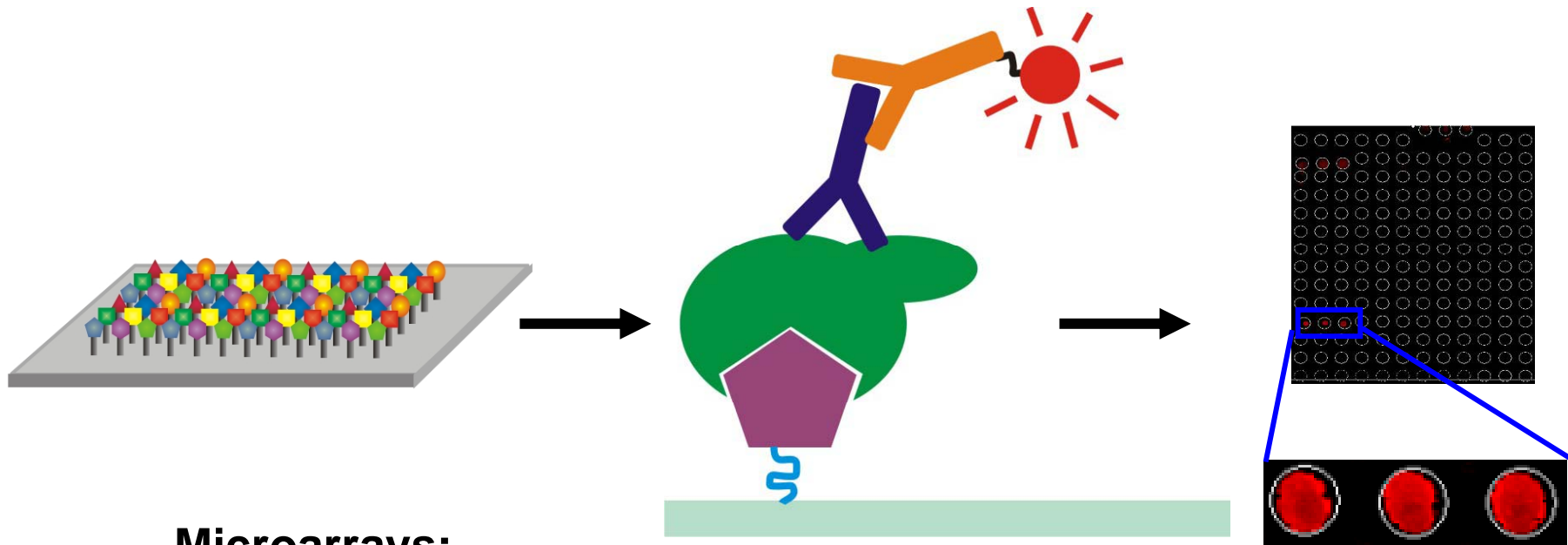
**Inhibierung der
Rezeptorbindung**

Design, Test und Synthese von Liganden



Bindungsassays zur Validierung von Computermodellen

Bindungsexperimente im Arrayformat



Microarrays:

< 10.000 kleine Moleküle

Miniarrays

< 400 Peptide

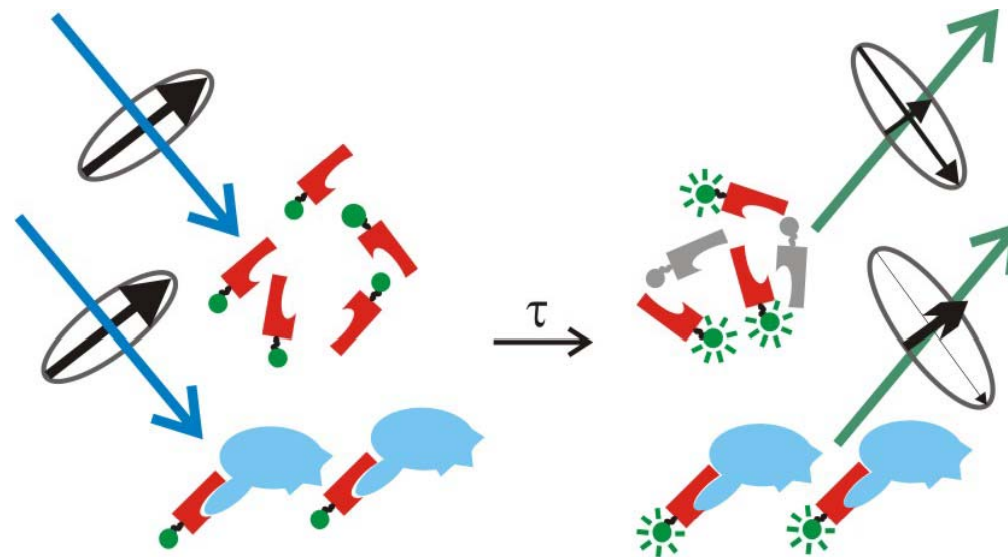
Bindungsassay mit Chemokinen und Antikörpern

< 0,5 µg Protein/Versuch

Detektion über
Fluoreszenz
oder Chemi-
luminiszenz

Fluoreszenzpolarisation (FP)

- Fluoreszierende Moleküle, die mit polarisiertem Licht angeregt werden, emittieren polarisiertes Licht.
- Kleine bewegliche Fluorophore: große Depolarisation
- An große, weniger bewegliche Proteine gebundene Fluorophore: geringere Depolarisation

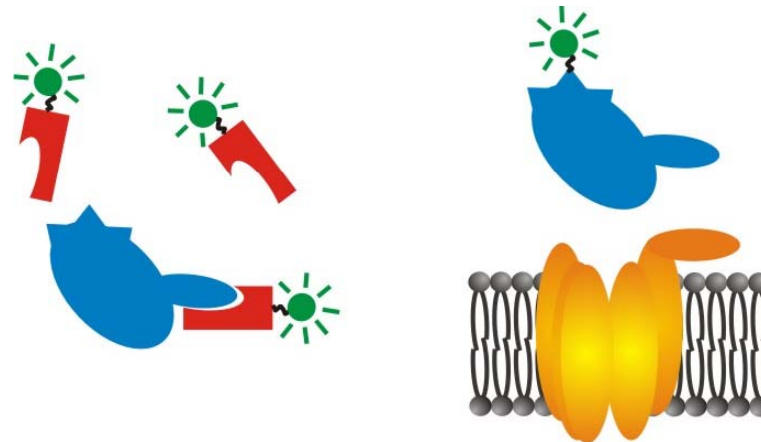


- Die gemessene Polarisation spiegelt das Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Liganden wieder.

Tina Schröder

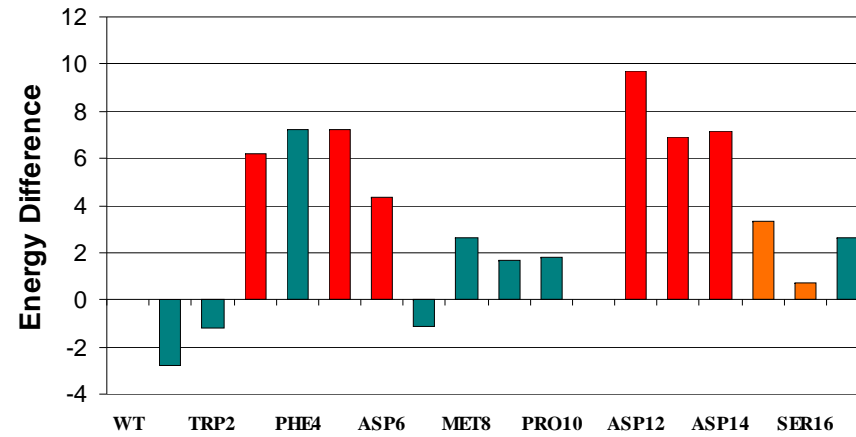
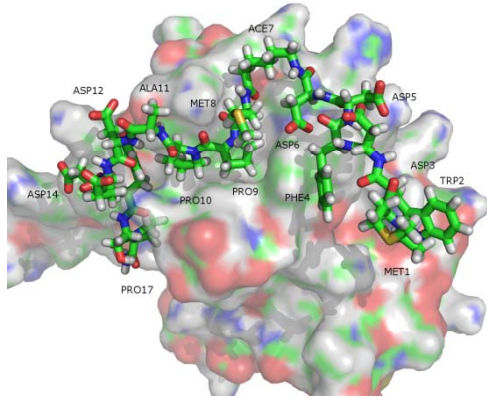
Vorteile der Fluoreszenzpolarisation

- **Gebundene und ungebundene Spezies müssen nicht getrennt werden.**
- **Nur ein Bindungspartner muss fluoreszent markiert werden.**



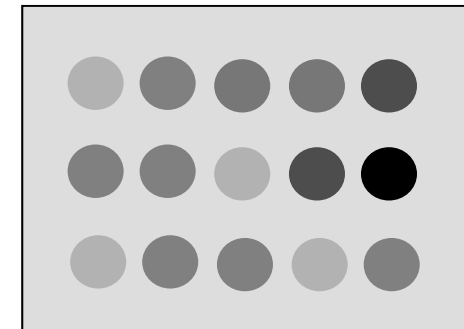
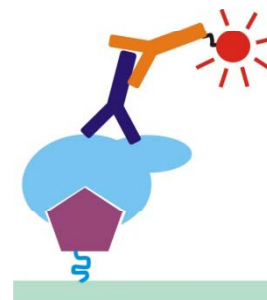
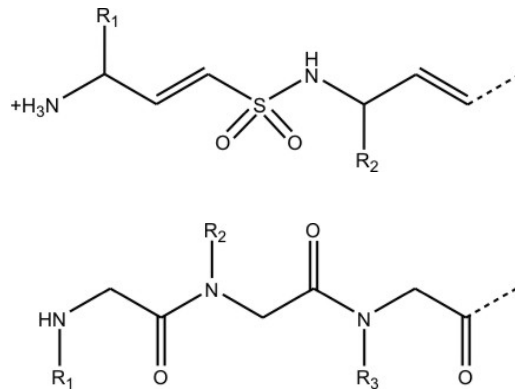
- **Chemokine können aufgrund ihrer Größe in FP-Assays sowohl als Rezeptoren als auch als Liganden fungieren.**

Leitstruktur für Interleukin-8 Liganden



Proteinstruktur aus Datenbank

Computational Alanine Scan



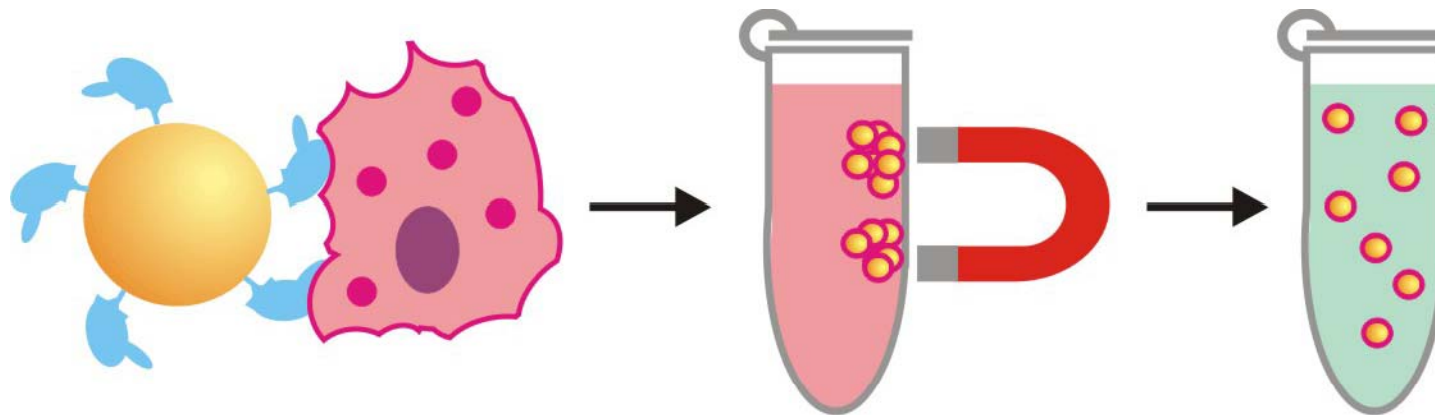
Synthese von Peptidanaloga

Bindungsexperimente zur Überprüfung

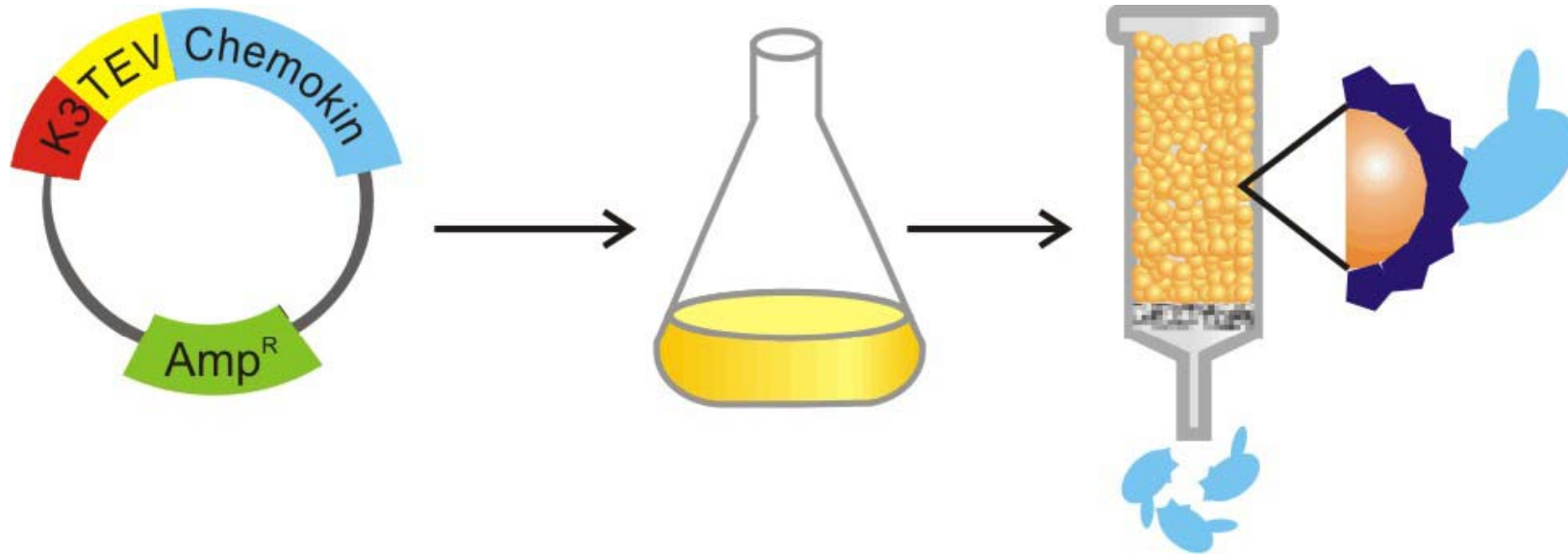
Chemokin funktionalisierte Magnetpartikel zur Isolierung von Leukozyten

Immobilisierte Chemokine zur Isolierung von Leukozyten

- **Magnetische Mikropartikel mit immobilisierten Chemokinen**
- **Bindung von Leukozyten z.B. aus Blutprobe**
- **Magnetische Abtrennung der Mikropartikel**



Rekombinante Expression von Chemokinen



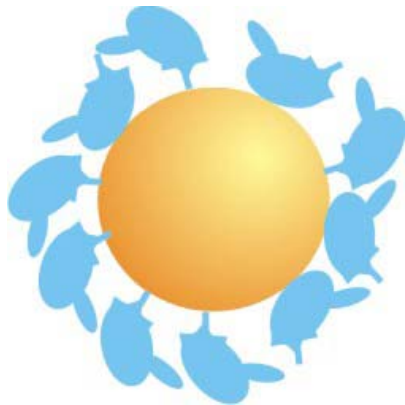
Transformation des Expressionsvektors in *E. coli* BL21

Fermentation (Proteinexpression)

Proteinreinigung über Affinitätschromatographie

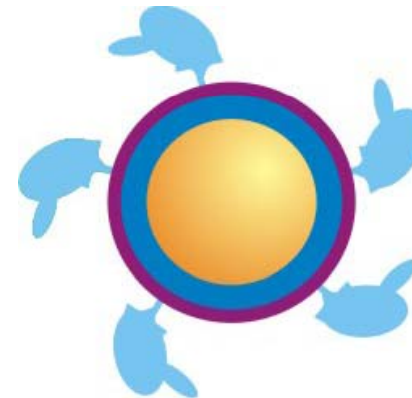
Bindung von Chemokinen an Mikropartikel

Ziel: stabile Bindung der Chemokine an die Partikel, so dass die Rezeptorbindungsseite präsentiert wird



Adsorption an nicht-funktionalisierte Partikel:

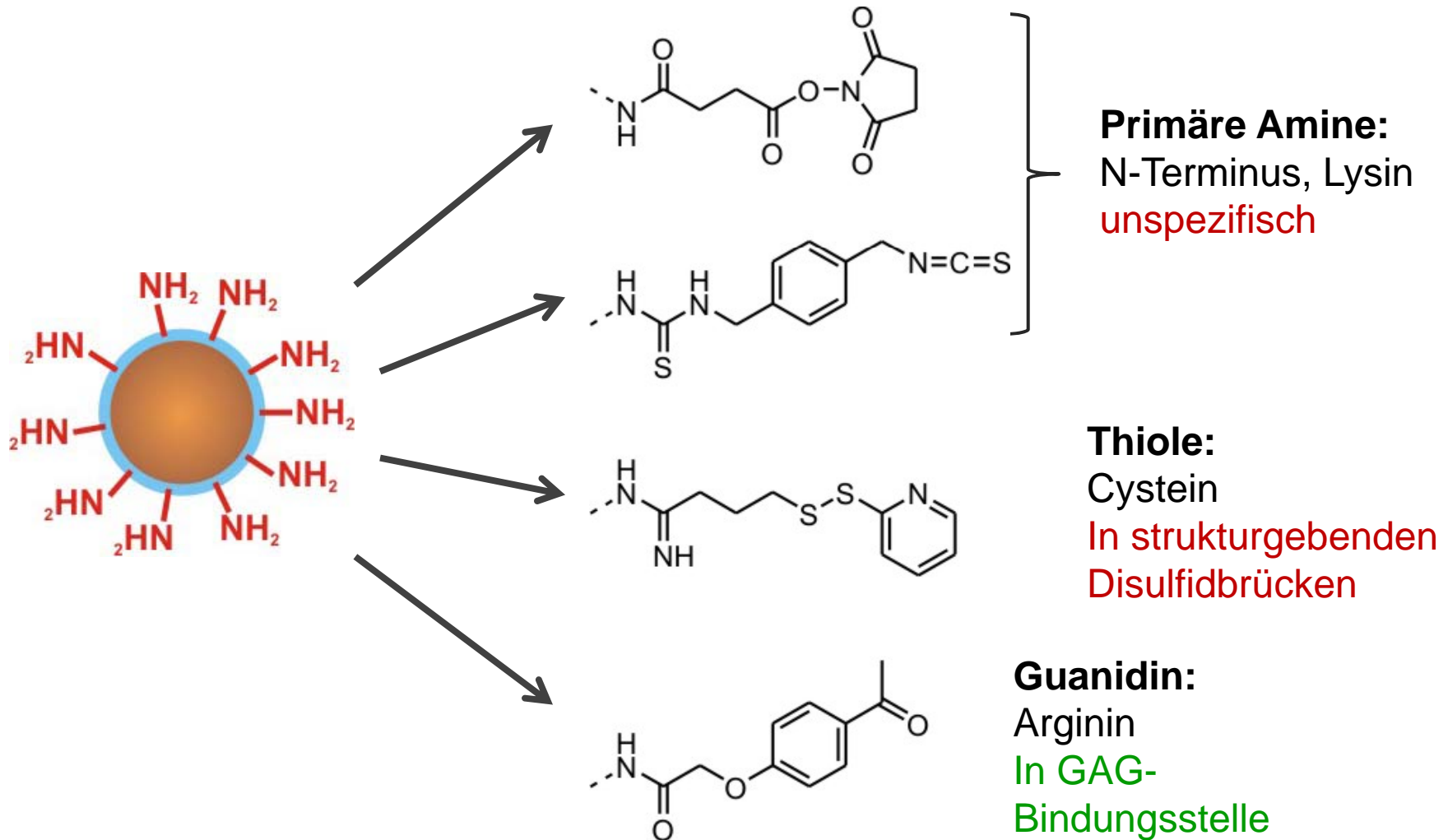
- nicht-kovalente Bindung
- Orientierung entsprechend Ladungen der Partikeloberfläche



Kovalente Bindung an funktionalisierte Partikel:

kovalente Bindung
Orientierung entsprechend Partikelfunktionalisierung

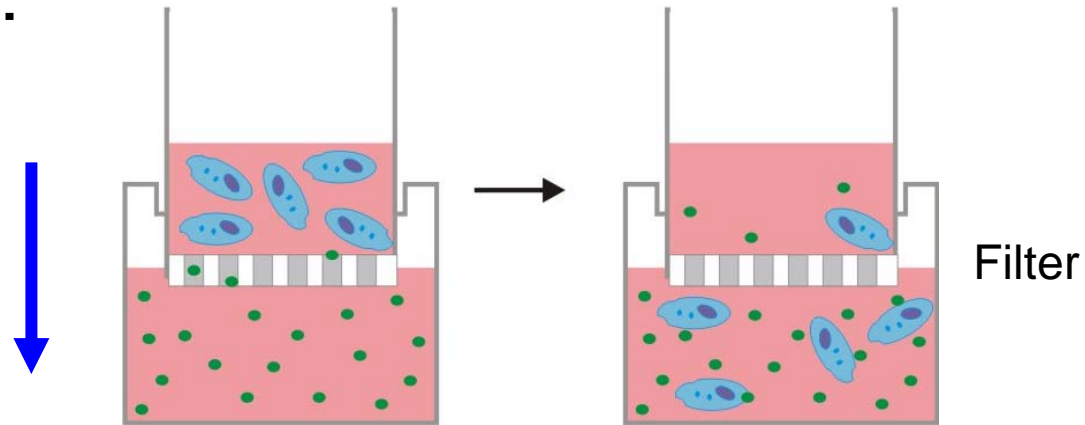
Reaktive Gruppen zur Proteinimmobilisierung



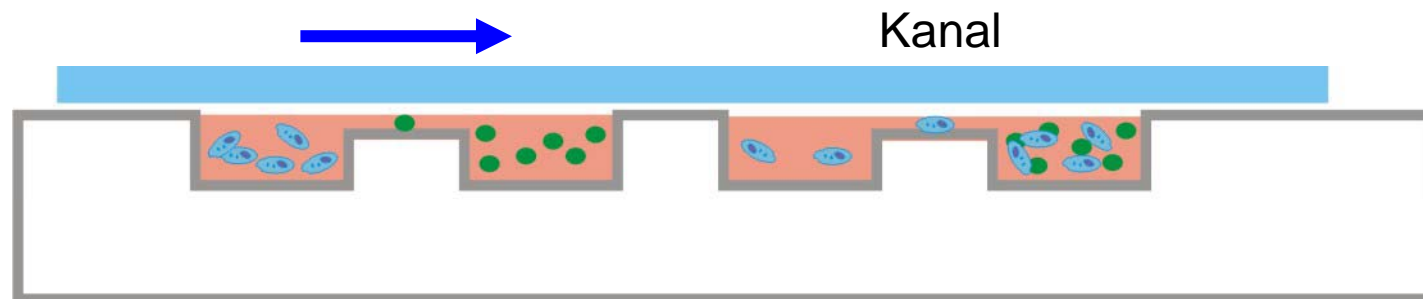
Aktivitätsassays zur Bestätigung der biologischen Aktivität der Liganden

Migrationsassays

■ Boyden-Kammer:

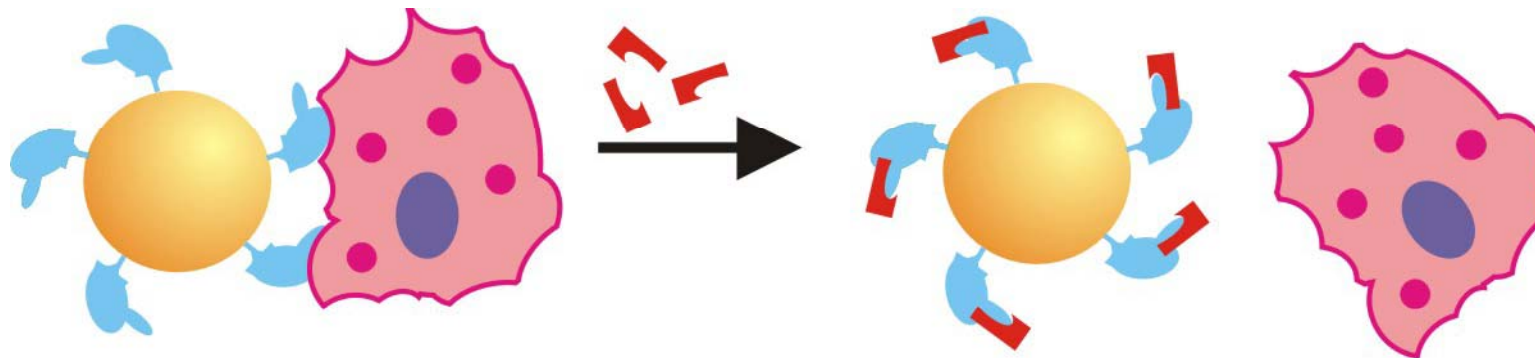


■ Dunn-Kammer:

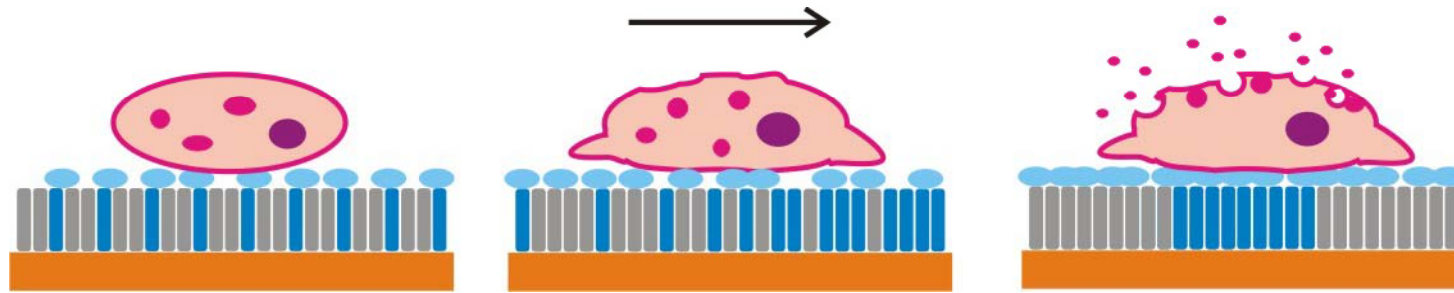


Leukozytenbindungsassay

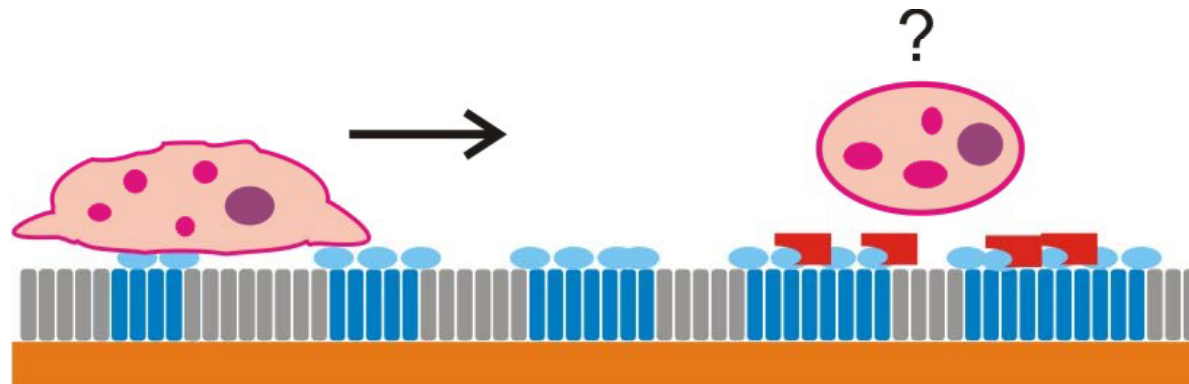
- Chemokine an magnetischen Mikropartikeln immobilisiert
- Inkubation mit Liganden
- Magnetische Abtrennung der Mikropartikel
- Auszählung freigesetzter Leukozyten
- Evaluierung der Reaktion der Leukozyten auf blockierte Chemokine



Aktivitätstests und Anwendungen



Abhängigkeit der Leukozytenreaktion von der Oberflächenbeladung



Chemokin funktionalisierte Oberflächen für Migrationsassays

Wo finde ich die RG Schmitz ???



FZK – Institut für funktionelle Grenzflächen

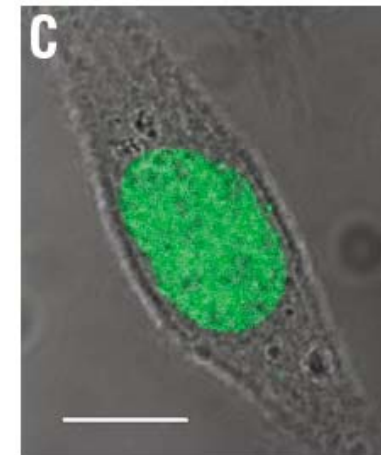
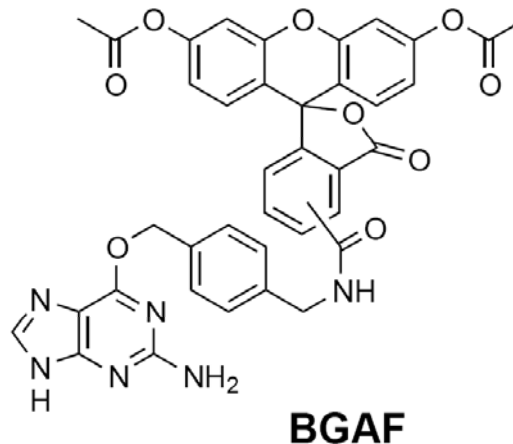
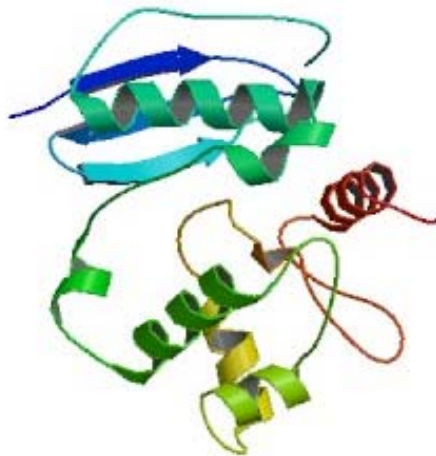


UKA – Institut für organische Chemie

Vorankündigung

Chemische Biologie II im Sommersemester 2009

- Vorlesung: Dienstag 8.00-9.30
- Seminar: Donnerstag 11.30-12.30



Chemische Biologie II

Design und Synthese biofunktionaler Moleküle

- Molecular Modelling
- Ribozyme und Aptamere
- Enzymatische Antikörper
- Biologisch aktive Peptide
- Künstliche Rezeptoren
- Chemische Sensoren
- Drug Delivery
- Glykokonjugate

Teilnahme auch ohne
Kenntnisse aus
Chemische Biologie I
möglich!

Dank

Dana Wiese

Irene Meliciani

Ebru Diler

Dr. Tina Schröder

Dr. Daniel Maisch

Marion Döbele

Alisha Oster

Am IFG, FZK:

Prof. Sonja Berensmeier

PD Matthias Franzreb

Dr. Thomas Schwartz

Am IOC, UKA:

Prof. Stefan Bräse

Am INT, FZK:

PD Wolfgang Wenzel

Am IBG, FZK:

Dr. Kai Hilpert