



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# **Peptide und Peptoide als Bindepartner für Chemokine**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**genehmigte Dissertation  
von Julia Susanne Wack**

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar

Darmstadt 2023

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Tag der Einreichung: 30. September 2022

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2023

Wack, Julia Susanne : Peptide und Peptoide als Bindepartner für Chemokine  
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,  
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2024  
Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2023

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International  
<https://creativecommons.org/licenses/>

---



## Erklärungen:

### **Erklärung gemäß §8 Abs. 1 (c) der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass die elektronische Version meiner Dissertation mit der schriftlichen Version übereinstimmt und für die Durchführung des Promotionsverfahrens vorliegt.

### **Erklärung gemäß §8 Abs. 1 (d) der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass zu einem vorherigen Zeitpunkt noch keine Promotion versucht wurde und zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht wurde.

### **Erklärung gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen verfasst wurde.

### **Erklärung gemäß §9 Abs. 2 der Promotionsordnung der TU Darmstadt**

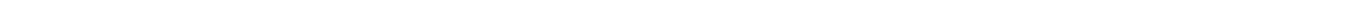
Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Darmstadt, den 30. September 2022

---

(Julia Susanne Wack, M. Sc.)

---



---

## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich allen danken, ohne deren Mitwirkung und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Katja Schmitz, die mir die Möglichkeit gab diese Arbeit durchzuführen, mich dabei sowohl fachlich als auch persönlich weiterzuentwickeln und die mich stets durch ihre Ideen und Ratschläge unterstützt und neu motiviert hat. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich für die großartige Unterstützung und den Beistand auf den letzten Metern dieser Arbeit, ohne die eine rechtzeitige Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Harald Kolmar für die freundliche Übernahme des Korreferats dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung einiger Geräte seines Arbeitskreises, die zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis Schmitz für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Insbesondere danke ich Kevin Brahm, von dem ich fachlich viel lernen konnte, der mir in den schweren Phasen dieser Arbeit beigestanden hat und immer ein offenes Ohr hatte. Victoria Engemann und Stefanie Eckes danke ich für die gute Zusammenarbeit und vor allem die lustigen Tequila-Abende. Ich hoffe die (I)TPGirls können auch in Zukunft noch den ein oder anderen lustigen Abend zusammen verbringen. Johannes Pilakowski danke ich für die schönen gemeinsamen Pausen bei einer Fritz-Cola und Andreas Baumruck, der mich im Studium als Praktikumpartner, während der Promotion als Laborpartner und nun im Job als Kollege begleitet, danke ich für die vielen aufbauenden Gespräche. Ein großes Dankeschön geht auch an Michelle Kilb, die mir in den letzten Monaten eine gute Freundin geworden ist und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei allen Praktikanten bedanken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders erwähnen möchte ich hier Pascal Wiegand, Nico Hüttmann, Anna Charalampidou, Maximilian Repity und Annika Lill. Außerdem bedanke ich mich bei Anke Imrich, die durch die „kleinen“ Dinge wie Pipettenspitzen stecken, Puffer ansetzen, oder IL-8 exprimieren erheblich zu dieser Arbeit beigetragen hat. Auch dem Team der MS-Abteilung möchte ich meinen Dank aussprechen, besonders Gül Sahinalp, für die Durchführung der MALDI-Messungen. Des Weiteren möchte ich mich beim AK Heckel der Uni Frankfurt für die Möglichkeit zur Durchführung von CD-Messungen bedanken, sowie bei Prof. Przybylski und Pascal Wiegand vom Steinbeis-Center for Analytical Biochemistry and Biomedical Mass Spectrometry in Rüsselsheim für den stetigen Austausch und die Möglichkeit zur Kooperation.

---

---

Ein großer Dank geht auch an meine Arbeitskollegen bei KFT, die zum Teil aus eigener Erfahrung wissen wie anstrengend die Fertigstellung einer Doktorarbeit neben einem Vollzeitjob ist und die mich in den letzten Wochen stark entlastet haben. Insbesondere gilt mein Dank Julia Müller und Daphné Houiller, die zwischenzeitlich die Betreuung einiger Kunden übernommen haben.

Zu guter letzt möchte ich mich noch bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Mein größter Dank gilt dabei meinem Vater, der mir in den stressigen Phasen der Arbeit den Rücken frei gehalten hat und mich stets unterstützt hat. Auch bei meinem Partner Falko Böhm möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Du hast immer daran geglaubt, manchmal mehr als ich, dass diese Arbeit noch einmal fertig werden wird und ich hoffe, dass wir jetzt all die Dinge machen können, die solange aufgeschoben wurden, bis „die Doktorarbeit fertig ist“.

---

---

*` Pass on what you have learned.  
Strength, mastery.  
But weakness, folly, failure also.  
Yes, failure most of all.  
The greatest teacher failure is. ´*

*-Jedi Master Yoda-*

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	i
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Chemokine	4
2.1.1 Das Chemokin Interleukin-8 (CXCL8)	7
2.1.2 CXCL8 Rezeptorbindung	9
2.1.3 Monomer-Dimer Gleichgewicht von CXCL8	11
2.1.4 Biologische Funktion von CXCL8	12
2.1.5 Die Rolle von CXCL8 bei Krankheiten	15
2.1.6 Inhibitoren für CXCL8	16
2.2 Peptide und Peptidomimetika	18
<b>3 Zielsetzung</b>	<b>22</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>24</b>
4.1 Bindungsstudien mit Rezeptorpeptiden und CXCL8-Varianten	24
4.1.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der CXCL8-Varianten	26
4.1.2 Bindungsstudien mit dem <i>site I</i> -Peptid CXCR1-p1 (1)	32
4.1.3 Bindungsstudien mit dem <i>site II</i> -Peptids IL8RPLoops (2)	37
4.2 Ein sulfatiertes Bindepeptid für CXCL8	44
4.2.1 Synthese, Reinigung und Charakterisierung von sY-CXCR1-p1 (9)	44
4.2.2 Bindungsstudien von sY-CXCR1-p1(9) mit CXCL8wt (3)	49
4.3 Cyclische Bindepeptide für CXCL8	55
4.3.1 Proteasestabilitäts-Assay	60
4.4 Peptoide als Binder für Albumin	62
4.4.1 Synthese und Screening der Peptoidbibliothek	62
4.4.2 Resynthese der „Hits“ und Bindungsstudien	66
<b>5 Fazit und Ausblick</b>	<b>73</b>
5.1 Bindungsstudien mit Rezeptorpeptiden und CXCL8-Varianten	73
5.2 Ein sulfatiertes Bindepeptid für CXCL8	75
5.3 Cyclische Bindepeptide für CXCL8	76
5.4 Peptoide als Binder für Albumin	77

---

6	<b>Material und Methoden</b>	79
6.1	Allgemeine Chemikalien und Materialien	79
6.2	Puffer	79
6.3	Geräte und Software	80
6.4	Peptid- und Peptidsynthese	81
6.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Peptid- und Peptidsynthese	81
6.4.2	Synthese geschützter primärer Amine für die Peptidsynthese	86
6.4.3	Peptide und Peptoide	89
6.5	Proteinbiochemische Methoden	103
6.5.1	Proteinexpression	103
6.5.2	Proteinreinigung	104
6.5.3	Konzentrationsbestimmung	104
6.5.4	SDS-PAGE	105
6.6	Bindungsstudien mittels Fluoreszenzpolarisation	107
6.7	Proteasestabilitäts-Assay	110
6.8	CD Spektroskopie	110
7	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	111
8	<b>Literaturverzeichnis</b>	114
9	<b>Anhang</b>	124
9.1	Expression und Reinigung der CXCL8-Varianten	124
9.2	Proteasestabilitäts-Assay	129

---

## 1 Zusammenfassung

---

Chemokine sind kleine Signalproteine des menschlichen Immunsystems, die wesentlich an der Steuerung und Regulierung von Entzündungsprozessen beteiligt sind. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankheiten. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse die Wechselwirkung der Chemokine mit ihren korrespondierenden Rezeptoren gezielt zu inhibieren. In diesem Zusammenhang sind Peptide und Peptidomimetika besonders interessant, da sie direkt aus der Rezeptorsequenz abgeleitet werden können. Eine Voraussetzung für die Identifikation von inhibierenden Sequenzen im Rezeptor ist ein genaues Verständnis der Interaktion zwischen Chemokin und Rezeptor. Der in der Literatur beschriebene Mechanismus der Chemokin-Rezeptor-Interaktion geht von einem zweistufigen Modell aus, bei dem es im ersten Schritt zu einem Kontakt des Rezeptor-N-Terminus mit einer Schleife am N-Terminus des Chemokins (*site I*) kommt. Daran schließt sich in einem zweiten Schritt die Interaktion des äußeren N-Terminus des Chemokins mit den extrazellulären Schleifen des Rezeptors (*site II*) an, wodurch es zur Rezeptoraktivierung kommt.

Im Arbeitskreis wurde in einer früheren Arbeit ein Bindepeptid aus der *site II*-Bindestelle des Rezeptors CXCR1 für das inflammatorische Chemokin Interleukin-8 (CXCL8) entwickelt. Zur Kontrolle der Experimente wurde ein literaturbekanntes Peptid aus der *site I*-Bindestelle von CXCR1 genutzt. Neben ihrer Bindung an CXCL8 sind beide Peptide auch dazu in der Lage zelluläre Antworten auf das Chemokin CXCL8 zu inhibieren. Das erste Ziel dieser Arbeit war es die Bindung dieser Peptide an das Chemokin CXCL8 genauer zu untersuchen. Für CXCL8 ist die konzentrationsabhängige Ausbildung von Dimeren bekannt. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass aus dem N-Terminus (*site I*) von CXCR1 abgeleitete Peptide mit einer hohen Affinität an monomere Varianten von CXCL8 binden, jedoch gegenüber dem Dimer nur eine geringe Affinität aufweisen. Dieses Verhalten konnte mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen auch für das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *site I*-Peptid CXCR1-p1 mit Hilfe der vorwiegend als Monomer vorliegenden Variante CXCL8 V27P/E29P und der über eine Disulfidbrücke kovalent zum Dimer verbundenen Variante CXCL8 R26C gezeigt werden. Die Bindung von CXCL8 an die *site II* Bindestelle des Rezeptors erfolgt primär über den unstrukturierten N-Terminus von CXCL8, der das ELR-Motiv enthält. Da der N-Terminus sowohl im monomeren als auch im dimeren Zustand von CXCL8 freiliegt wurde erwartet, dass monomere und dimere Varianten von CXCL8 mit der gleichen Affinität an die *site II* Bindestelle des Rezeptors binden. Ein experimenteller Beweis für diese Hypothese wurde bisher noch nicht erbracht. Während dieser Arbeit konnte mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen gezeigt werden, dass das *site II*-Peptid IL8RPLoops mit ungefähr der gleichen Affinität an die monomere Variante CXCL8 V27P/E29P wie auch an die

---

dimere Variante CXCL8 R26C bindet, wodurch die Hypothese bestätigt werden konnte. Bindungsversuche mit einem Peptid aus den ersten zehn Aminosäuren des N-Terminus von CXCL8 und dem *site II*-Peptid IL8RPLoops bestätigten, dass der N-Terminus des Chemokins an der Bindung beteiligt ist, legten aber auch nahe, dass noch weitere Aminosäuren zu dieser Interaktion beitragen. Die Vermutungen über die Bindungsstelle für das *site II*-Peptid konnten also im Rahmen dieser Arbeit erstmalig experimentell untermauert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Einbaus von Sulfotyrosin in die Sequenz des *site I*-Peptids CXCR1-p1 auf die Bindung an CXCL8 zu untersuchen, da für einige Chemokinrezeptoren bekannt ist, dass sie am N-Terminus sulfatiert vorliegen können und dass Chemokine in der Regel eine höhere Affinität zu ihren sulfatierten Rezeptoren aufweisen. Auch für CXCR1 wird eine Sulfatierung am N-Terminus vermutet. Außerdem konnte in Studien, die während der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation publiziert wurden, gezeigt werden, dass CXCL8 Tyrosinsulfat bindet. Darum wurde das vom N-Terminus des CXCR1 abgeleitete *site I*-Peptid CXCR1-p1 in seiner am Tyrosin sulfatierten Form hergestellt. Mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnte gezeigt werden, dass sich durch den Einbau von Sulfotyrosin die Affinität für CXCL8, im Vergleich zum nicht sulfatierten Peptid, um den Faktor 10 erhöht, was die Vermutung, dass CXCR1 ebenfalls sulfatiert vorliegt, bekräftigt.

In einer vorausgehenden Dissertation im Arbeitskreis wurden cyclisierte und mit dem Fluorophor Tetramethylrhodamin (TAMRA)-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops synthetisiert. In Fluoreszenzanisotropie-Messungen dieser cyclischen Peptide mit CXCL8 wurden inverse Bindungsisothermen erhalten. Die hohen Fluoreszenzanisotropiewerte legten nahe, dass der Fluorophor im ungebundenen Peptid stark in seiner Beweglichkeit eingeschränkt ist. Nach Bindung des cyclischen Peptids an das Chemokin CXCL8 wurden geringere Fluoreszenzanisotropiewerte gemessen, was auf eine Erhöhung der Beweglichkeit des Fluorophors hinweist. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens ist, dass der über einen flexiblen Linker mit dem Peptid-Makrozyklus verbundene Fluorophor im ungebundenen Zustand mit dem Peptid interagiert und durch eine Bindung des Chemokins verdrängt wird. Auf diese Fluorophor-Peptid-Interaktion weisen auch MD-Simulationen hin. Um dieses ungewöhnliche Verhalten genauer zu beleuchten, wurden im Rahmen dieser Arbeit lineare mit TAMRA-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops hergestellt und mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen die Bindung an CXCL8 untersucht. Die erhaltenen Bindungsisothermen zeigen den erwarteten, ansteigenden Verlauf, wobei auch hier für das ungebundene Peptid hohe Fluoreszenzanisotropiewerte gemessen wurden, die auf eine Interaktion des Fluorophors mit der Peptidstruktur hindeuten. Für lineare mit Fluorescein-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops konnte dieses Verhalten nicht in dieser Ausprägung festgestellt werden. Die

---

cyclischen Peptide haben entsprechend den Erwartungen in einem Proteasestabilitäts-Assay eine hohe Stabilität gegenüber dem Abbau durch das Enzym Trypsin gezeigt. Interessanterweise konnte hier auch für die linearen mit TAMRA-markierten Peptide eine Erhöhung der Proteasestabilität gezeigt werden, nicht jedoch für die mit Fluorescein-markierten. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Interaktion zwischen TAMRA und der Peptidsequenz auch zu einer Stabilisierung der linearen Peptide kommt. Durch CD-Spektroskopie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die linearen, mit TAMRA-markierten Peptide keine Sekundärstrukturelemente ausbilden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Interaktion von TAMRA mit peptidbasierten Liganden nicht nur, wie bereits bekannt, zu Artefakten führt, sondern auch zur Stabilisierung von Peptiden beitragen kann.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Strategien, Peptide für den therapeutischen Einsatz besser nutzbar zu machen, da dieser nach wie vor durch bestimmte Nachteile, wie z.B. eine geringe Plasmahalbwertszeit durch den raschen Abbau durch Proteasen im Blut oder eine schnelle Ausscheidung über die Nieren aufgrund ihrer geringen Größe, limitiert ist. Um den proteolytischen Abbau von Peptiden zu unterbinden, können zum Beispiel die Cyclisierung, oder die Überführung der Peptidsequenz in ein sogenanntes Peptoid, ein N-substituiertes Oligoglycin, genutzt werden. Die rasche Ausscheidung über die Nieren kann verzögert werden, in dem durch das Anhängen bestimmter Peptidsequenzen oder hydrophober Anker die Bindung an Serumalbumin vermittelt wird. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher Peptoidsequenzen zu finden, welche an humanes Serumalbumin (HSA) binden können. Dazu wurde im Zuge einer von mir betreuten Masterarbeit eine One-Bead-One-Compound (OBOC)-Bibliothek aus Peptoidhexameren synthetisiert und mittels fluoreszenzbasiertem Screening auf Binder für humanes Serumalbumin durchmustert. Dabei konnten in einem mehrstufigen Screening-Prozess 22 „Hits“ isoliert und mittels MALDI-TOF-MS-MS untersucht werden. Dabei konnten am Ende nur sechs Sequenzen eindeutig identifiziert werden. Diese Sequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit resynthetisiert und mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen auf ihre Bindung an HSA untersucht. Dabei konnte eine Bindung an HSA, im niedrigen mikromolaren Bereich, nur für einen „Hit“ nachgewiesen werden. Dies belegt, dass Peptoide grundsätzlich als proteasestabile HSA-Anker geeignet sind, mit denen die Plasmahalbwertszeit von Peptiden verlängert werden könnte. In einer Wiederholung des Screenings mit verbesserten Bedingungen zur Abspaltung des HSA sollten in zukünftigen Arbeiten mehr HSA-Bindesequenzen aufgeklärt werden können, um eine Konsensussequenz für peptoidbasierte HSA-Binder zu erhalten.

---

## 2 Einleitung

---

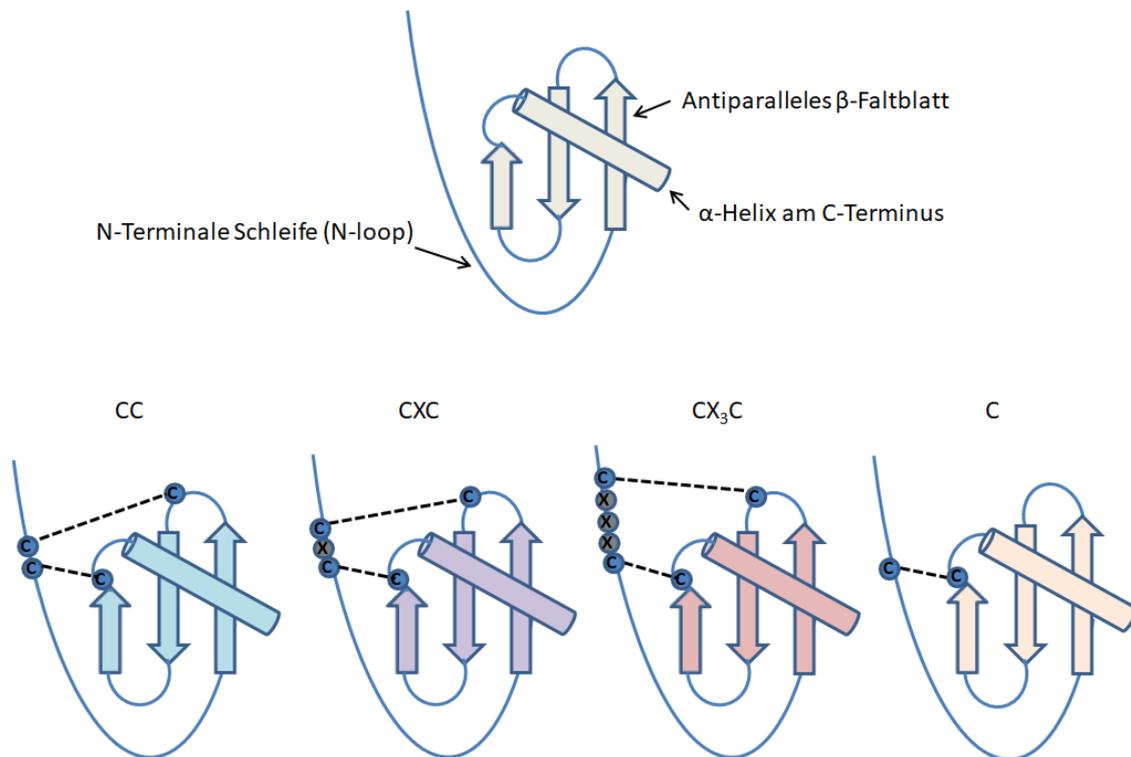
In allen lebenden Organismen nehmen Peptide und Proteine eine Schlüsselrolle bei der Steuerung und Regulation fundamentaler biochemischer Prozesse ein, zum Beispiel bei der Signalübertragung, der Homöostase, der Fortpflanzung, aber auch bei der Verteidigung gegenüber Fremdorganismen, wie zum Beispiel bei der Immunantwort auf Pathogene, wie Bakterien oder Viren. Das menschliche Immunsystem kann in zwei Hauptbereiche unterteilt werden, das adaptive oder spezifische Immunsystem und das angeborene oder unspezifische Immunsystem. Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Zellen, den weißen Blutkörperchen, oder Leukozyten, von denen die neutrophile Granulozyten die bedeutsamsten sind.[1, 2] Sie sind für die erste Immunantwort bei Entzündungsprozessen verantwortlich, jedoch müssen sie dafür zunächst aus dem Blutkreislauf zum Entzündungsherd im Gewebe gelangen. Dieser Prozess der gerichteten Migration von Leukozyten wird durch die Proteinklasse der Chemokine vermittelt.[3, 4]

### 2.1 Chemokine

Chemokine, oder auch chemotaktische Zytokine, sind kleine, extrazellulär wirkende Signalproteine, mit einer Masse von von 8 bis 12 kDa und einer Länge von 60-100 Aminosäuren, die unter physiologischen Bedingungen meist positiv geladen sind. Sie können bei Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren eine Wanderungsbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration auslösen. Dieses Prinzip wird auch als Chemotaxis (löslicher Gradient) bzw. Haptotaxis (oberflächengebundener Gradient) bezeichnet und spielt vor allem für die Rekrutierung von Immunzellen, wie Leukozyten, bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle.[3] Neben Ihrer Beteiligung an Abwehr- und Immunreaktionen steuern Chemokine auch weitere Prozesse, wie zum Beispiel Wundheilung, Angiogenese oder Organogenese.[5]

Bisher konnten im Menschen 50 verschiedene Chemokine identifiziert werden. Sie weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine variable Homologie von 20 bis zu 90 % auf.[4, 6] Auch strukturell weisen die verschiedenen Chemokine eine große Ähnlichkeit auf und lassen sich allgemein in drei Strukturelemente unterteilen: Auf den unstrukturierten N-Terminus folgt eine flexible Schleife (N-Loop), daraufhin folgen drei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und am C-Terminus befindet sich eine  $\alpha$ -Helix (siehe **Abbildung 2-1 oben**). Diese Tertiärstruktur wird durch eine bzw. zwei Disulfidbrücken stabilisiert.[7] Anhand der Position und Anzahl der im Chemokin vorhandenen Cysteinreste werden Chemokine in vier Familien eingeteilt. Es wird unterschieden zwischen CC-Chemokinen, bei denen die beiden Cysteinreste am N-Terminus direkt aufeinander folgen, CXC- bzw. CX3C-Chemokinen, bei denen die beiden Cysteinreste am N-Terminus durch eine bzw. drei weitere Aminosäuren getrennt sind

und C-Chemokine, die nur über einen Cysteinrest am N-Terminus verfügen (siehe **Abbildung 2-1 unten**).[4, 7] Die Familien der CC- bzw. CXC-Chemokine sind am bedeutsamsten, sowie am umfangreichsten und können weiter unterteilt werden. CXC-Chemokine, auch als  $\alpha$ -Chemokine bezeichnet, können am N-Terminus das Aminosäuremotiv ELR aufweisen. Dieses Motiv aus den Aminosäuren Glutamat, Leucin und Arginin (ELR) liegt vor dem ersten Cysteinrest am N-Terminus. ELR-positive Chemokine ( $\text{ELR}^+$ ) wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und sind angiogenetisch, während ELR-negative Chemokine ( $\text{ELR}^-$ ) eine chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten aufweisen und angiostatisch wirken.[8, 9] CC-Chemokine, auch als  $\beta$ -Chemokine bezeichnet, können aufgrund ihrer Struktur weiter unterteilt werden in die MCP-Eotaxin-Familie und alle anderen CC-Chemokine. Sie wirken chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten, sowie eosinophile und basophile Granulozyten.[10]



**Abbildung 2-1:** Allgemeine Struktur von Chemokinen und die verschiedenen Chemokinklassen.

**Oben:** Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur von Chemokinen. Der unstrukturierte N-Terminus geht über in eine N-Schleife, darauf folgen drei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und am C-Terminus befindet sich eine  $\alpha$ -Helix.

**Unten:** Die Chemokinklassen. CC-Chemokine: Die disulfidbrückenbildenden Cysteinreste (C) am N-Terminus liegen direkt hintereinander; CXC-Chemokine: Die disulfidbrückenbildenden Cysteinreste (C) am N-Terminus sind durch eine Aminosäure (X) voneinander getrennt; CX<sub>3</sub>C-Chemokine: Die disulfidbrückenbildenden Cysteinreste (C) am N-Terminus sind durch drei Aminosäuren (X) voneinander getrennt; C-Chemokine: Verfügen nur über einen Cysteinrest am N-Terminus und somit auch nur über eine Disulfidbrücke.

---

Chemokine binden einerseits an, unter physiologischen Bedingungen negativ geladene, Glykosaminoglykane (GAGs) auf der Zelloberfläche. Dadurch können sie stabile Chemokingradienten ausbilden.[11] Daneben üben Chemokine ihre Wirkung durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus. Es sind bisher 20 Chemokinrezeptoren bekannt, von denen die meisten mehrere verschiedene Chemokine binden können. Chemokinrezeptoren besitzen eine Sequenzhomologie von bis zu 80 % und treten auf der Oberfläche unterschiedlicher Zelltypen auf, so z.B. auf Leukozyten Epithelzellen, Neuronen, Astrozyten, Mikroglia, sowie einigen Tumorzellen. Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren erfolgt analog zu ihren Liganden (z.B. CXCR für einen CXC-Chemokin bindenden Rezeptor R). Dabei ist zu beachten, dass in der Regel keine klassenübergreifende Bindung von Liganden erfolgt. So binden z.B. CXCRs nur CXC-Chemokine und CCRs nur CC-Chemokien[8, 12-15]

Die Bindung der Chemokine an den Chemokinrezeptor und dessen Aktivierung erfolgt in einem zweistufigen Mechanismus.[16] Hierbei bindet das positiv geladene Chemokin zunächst durch elektrostatische Wechselwirkungen an den N-Terminus des Rezeptors und die N-terminale Schleife des Chemokins geht dabei eine Interaktion mit dem N-Terminus des Rezeptors ein (site I). Anschließend erfolgt eine Interaktion der extrazellulären Domänen des Rezeptors mit dem N-Terminus des Chemokins (site II). Durch Wechselwirkung positiv geladener Aminosäuren im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter des Chemokins mit negativ geladenen Aminosäuren im Rezeptor wird die Bindung unterstützt.[16-18] Die Affinität zwischen Chemokin und Rezeptor wird dabei sowohl vom N-Terminus, als auch von der N-terminalen Schleife des Chemokins bestimmt, wohingegen die Rezeptorselektivität hauptsächlich von der N-terminalen Schleife des Chemokins bestimmt wird und die Rezeptoraktivierung vom N-Terminus des Chemokins abhängt.[16]

Für einige Chemokinrezeptoren konnte in den vergangenen Jahren eine Sulfatierung der Tyrosinreste im N-Terminus gezeigt werden.[19-21] Die Tyrosinsulfatierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen im Golgi-Apparat, bei der durch das Enzym Tyrosylproteinsulfotransferase (TPST) eine Sulfatgruppe auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrests übertragen wird. Dabei bevorzugt das Enzym exponierte, zusammenhängende Sequenzen bei denen die Tyrosinreste von den Aminosäuren Aspartat und Glutamat umgeben sind. Üblicherweise enthalten die Zielproteine in diesen Regionen mehrere Tyrosinreste und die Sulfatierung ist unvollständig und heterogen.[22-25] Trotz der beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den N-terminalen Regionen der verschiedenen Chemokinrezeptoren enthalten fast alle Sequenzen Cluster der negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat in der Nähe von Tyrosinresten, was das Erkennungsmotiv für die Tyrosylproteinsulfotransferase darstellt.[23-25] Dies deutet darauf hin, dass die meisten Chemokinrezeptoren *in vivo* tyrosinsulfatiert

---

sind. Die Tyrosinsulfatierung mehrerer Chemokinrezeptoren wurde durch den biosynthetischen Einbau von <sup>35</sup>S-Sulfat nachgewiesen und durch Mutationsstudien konnten die sulfatierten Tyrosinreste innerhalb der sauren Sequenzen identifiziert werden.[26-29] Durch die Tyrosinsulfatierung in der N-terminalen Region der Chemokinrezeptoren wird die Affinität zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren beeinflusst.[19, 20, 30-35]

Die Aktivierung der Chemokinrezeptoren durch Chemokinbindung führt unter anderem zur Zellmigration (Chemotaxis) durch Aktinpolymerisation und Integrin-Aktivierung oder zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), sowie zur Degranulation und damit zur Freisetzung verschiedener Enzyme.[36]

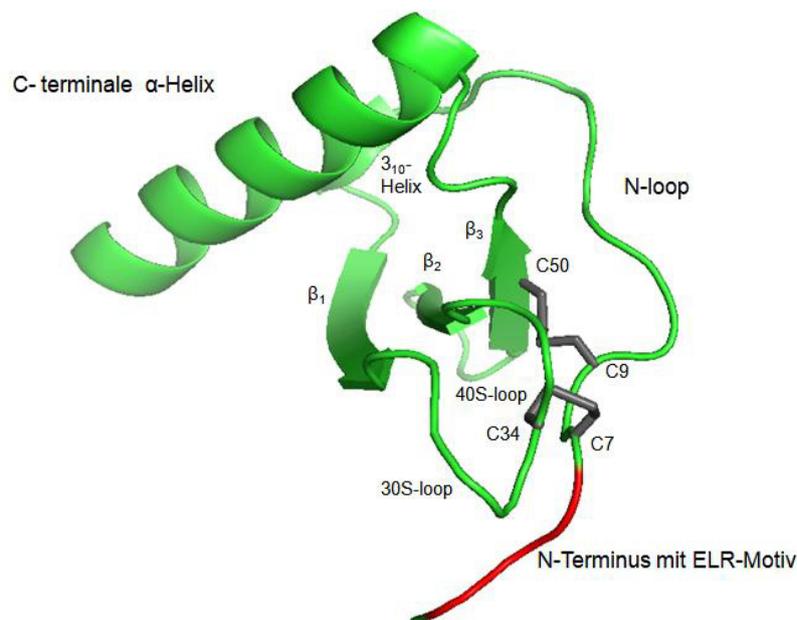
### 2.1.1 Das Chemokin Interleukin-8 (CXCL8)

Interleukin-8 (IL-8 bzw. CXCL8) wurde erstmals 1987 unter dem Namen *Neutrophil-activating Peptide-1* beschrieben, da es eine hohe spezifische Aktivität gegenüber neutrophilen Granulozyten besitzt.[37] Es ist ein Chemokin aus der Familie der ELR-positiven CXC-Chemokine und wird nach der systematischen Nomenklatur als CXCL8 bezeichnet.[38] CXCL8 kann als Reaktion auf z.B. entzündliche Prozesse von verschiedenen Zelltypen, wie Monozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen, aber auch von Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten, ausgeschüttet werden.[39] Auch einige Tumorzellen sind in der Lage CXCL8 zu produzieren.[40] CXCL-8 wird als 99 Aminosäuren lange, inaktive Vorläufersequenz translatiert, wobei bei der Sekretion eine 20 Aminosäuren lange Signalsequenz abgespalten wird. Nach unterschiedlicher extrazellulärer Prozessierung am N-Terminus, können verschiedene aktive Isoformen vorliegen, wobei die biologisch bedeutsamste Variante aus 72 Aminosäureeinheiten besteht. Diese Isoform hat ein Molekulargewicht von 8383 Da und weist einen pI von 8,3 auf. Damit ist CXCL8, wie die meisten Chemokine, unter physiologischen Bedingungen positiv geladen. Außerdem zeichnet sich CXCL8 durch eine sehr ausgeprägte Stabilität gegenüber Plasmaproteasen, Hitze und extremen pH-Werten aus, wird jedoch durch Reduktionsmittel schnell inaktiviert.[41]

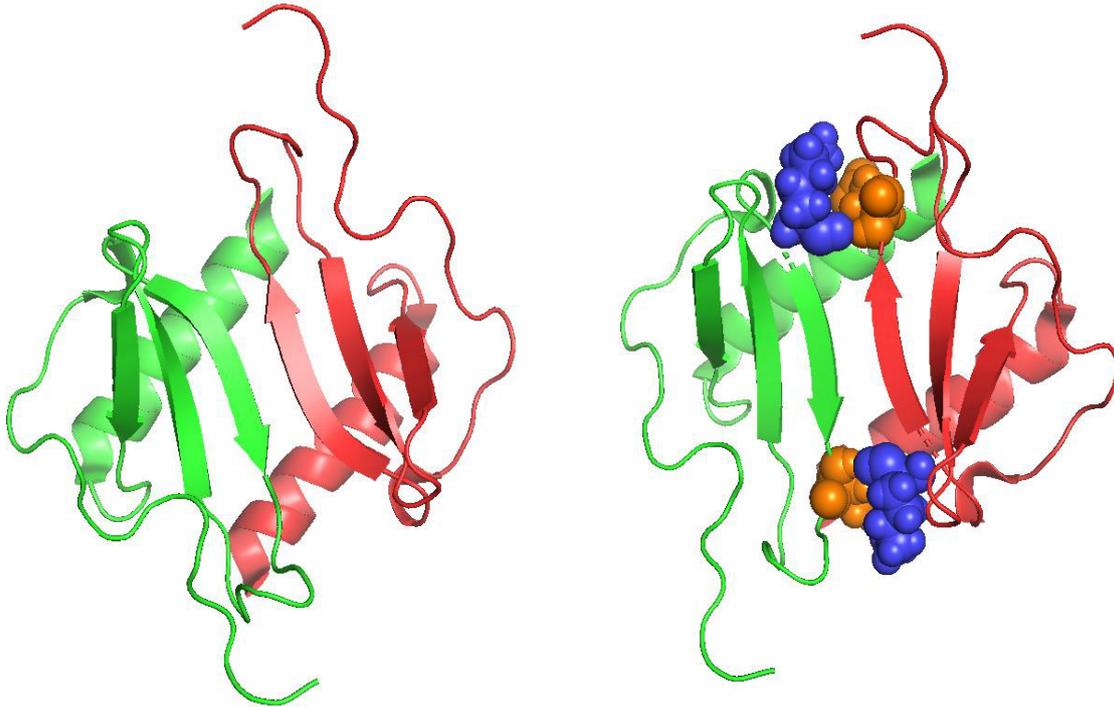
CXCL8 bildet konzentrationsabhängig Dimere und liegt in seiner nativen Form als Homodimer vor. Die Dimerisierungskonstante wird mit Werten zwischen 0,1  $\mu$ M[42] und 20  $\mu$ M[43, 44] angegeben, wobei sie stark von der Temperatur, sowie den jeweiligen Pufferbedingungen wie Salzgehalt und pH-Wert abhängig ist.[43] Lange stand zur Diskussion, welche Variante die aktive Form des Chemokins darstellt. Schließlich konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl das Monomer als auch das Dimer die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bewirken kann.[45]

Monomeres CXCL8 besitzt die für Chemokine typische Struktur. Der N-Terminus mit dem ELR-Motiv geht hinter dem CXC-Motiv zunächst in die N-Schleife (N-loop) über. Darauf folgt eine  $3_{10}$ -Helix, die in ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt übergeht. Die Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sind über die 30S-Schleife, die Stränge  $\beta_2$  und  $\beta_3$  über die 40S-Schleife miteinander verbunden. Am C-Terminus befindet sich die  $\alpha$ -Helix. Die stabilisierenden Disulfidbrücken werden zwischen den Cysteinresten Cys7 und Cys34, sowie Cys9 und Cys50, ausgebildet. Dadurch wird der N-Terminus mit der 30S Schleife bzw. mit dem  $\beta_3$  Strang verknüpft. Die Struktur des monomeren CXCL8 ist in **Abbildung 2-2** dargestellt.

Die Dimerisierung zweier Monomereinheiten findet jeweils über die  $\beta_1$ -Stränge der  $\beta$ -Faltblätter statt, wobei ein stabiles sechssträngiges  $\beta$ -Faltblatt ausgebildet wird. Bei der Dimerisierung wechselwirken die Aminosäurereste Lys23 und Glu29 auf entgegengesetzten Monomeren miteinander. Die sich direkt gegenüberstehenden Arginine Arg26 bilden jeweils eine Ionenpaarbindung zu den benachbarten Glutamatresten Glu24 (siehe **Abbildung 2-3**). [46-48]



**Abbildung 2-2:** CXCL8 Monomer. Das ELR-Motiv ist rot hervorgehoben, Disulfidbrücken sind grau markiert. (PDB ID: 5D14; Die N-terminalen Aminosäuren Ser1 und Ala2 sind nicht in der Sequenz enthalten.)

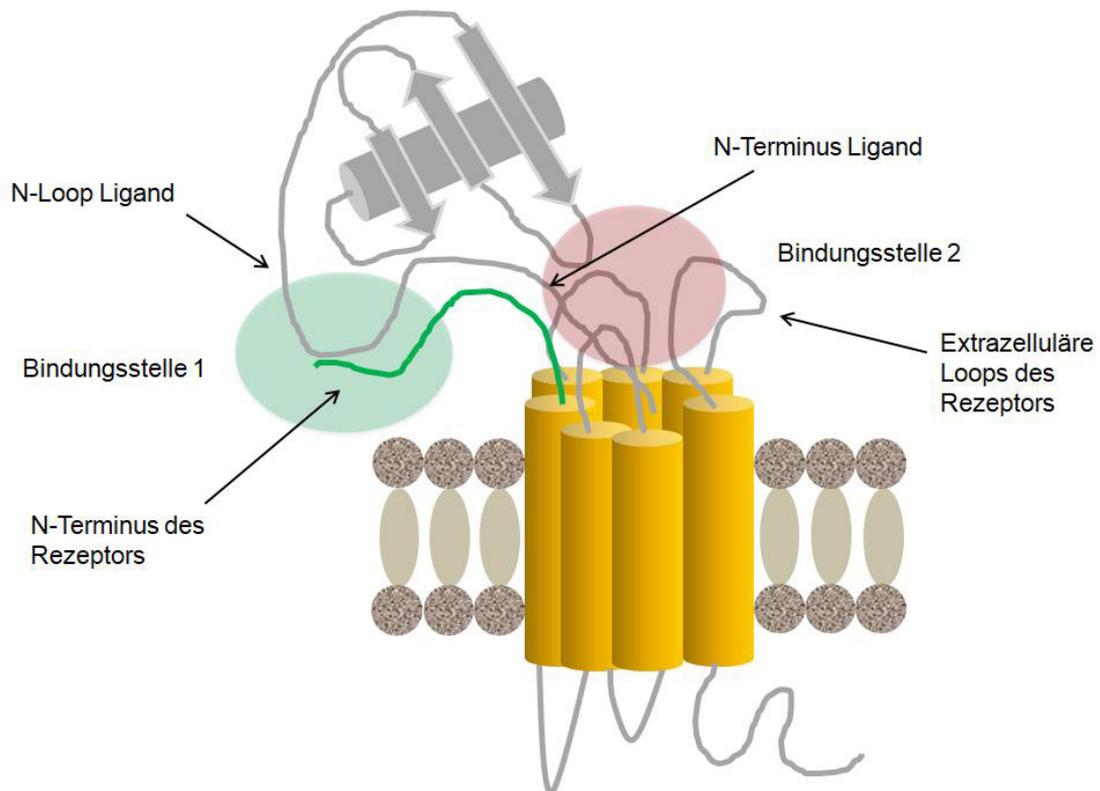


**Abbildung 2-3:** CXCL8 Dimer mit sechssträngigem  $\beta$ -Faltblatt. Die unterschiedlichen Monomereinheiten sind grün bzw. rot eingefärbt. Rechts: Die wechselwirkenden Aminosäurereste Lys23 (blau) und Glu29 (orange) auf entgegengesetzten Monomereinheiten sind hervorgehoben. (PDB ID: 1IL8; Die N-terminale Aminosäure Ser1 ist nicht in der Sequenz enthalten.)

### 2.1.2 CXCL8 Rezeptorbindung

CXCL8 bindet mit einer Affinität zwischen 1 und 7 nM an seine Rezeptoren CXCR1 bzw. CXCR2. Diese beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind zu 77 % Sequenzhomolog. Sie kommen unter anderem auf der Oberfläche von Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen Granulozyten, sowie Monozyten, Endothelzellen und bestimmten Krebszellen, vor. [17, 41, 49-51] Während CXCR2 durch eine Vielzahl von CXC-Chemokinen aktiviert wird bindet CXCR1 spezifisch die beiden Chemokine CXCL8 und CXCL6. Neutrophile Granulozyten tragen sowohl den Rezeptor CXCR1, als auch den Rezeptor CXCR2 in gleichem Verhältnis auf ihrer Zelloberfläche, wodurch ihre hohe Aktivierungsspezifität gegenüber CXCR8 erklärt werden kann.[52, 53]

Für die Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren wird der für Chemokine typische zweistufige Mechanismus vorgeschlagen (siehe **Abbildung 2-4**). Dabei kommt es im ersten Schritt zur Wechselwirkung der N-terminalen Schleife von IL-8 (*site I*) mit dem N-Terminus des Rezeptors. Im zweiten Schritt kommt es zur Wechselwirkung des ELR-Motivs am N-Terminus von CXCL8 (*site II*) mit den extrazellulären Domänen 3 und 4 (ECD 3 und ECD 4) des Rezeptors. Die Rezeptoraktivierung erfolgt dabei durch die Bindung des N-Terminus von CXCL8.[16, 17, 54-57]



**Abbildung 2-4:** Bindung von CXCL-8 an seine Rezeptoren Die N-Schleife von IL-8 interagiert mit dem N-Terminus des Rezeptors (site 1). Der N-Terminus von CXCL8 mit dem ELR-Motiv interagiert mit den extrazellulären Domänen ECD3 und ECD4 des Rezeptors. (Abbildung in Anlehnung an Rajagopalan und Rajarathnam [17]).

Um den vorgeschlagenen Bindemechanismus zu bestätigen wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Mithilfe einer Deletionsvariante von CXCL8 (CXCL8 6-72) konnten gezeigt werden, dass das ELR-Motiv wesentlich an der Rezeptorbindung beteiligt ist, da sich die Affinität zum Rezeptor durch die Deletion deutlich verringerte. Auch eine Beteiligung des ELR-Motivs an der Rezeptoraktivierung konnte mit Hilfe der Deletionsvariante gezeigt werden.[9, 58] Außerdem konnte durch Alanin-Scans der extrazellulären Domänen von CXCR1 nachgewiesen werden, dass die in den extrazellulären Domänen ECD3 und ECD4 liegenden Reste Arginin R199, Arginin R203 und Aspartat D265, sowie Glutamat E275 und Arginin R280, für die hohe Affinität von CXCL8 zu CXCR1 verantwortlich sind.[59] Eine Wechselwirkung dieser Aminosäurereste mit dem ELR-Motiv wird diskutiert.[51] Frühe Mutationsstudien an CXCR1/CXCR2-Chimären zeigten, dass der N-Terminus des Rezeptors für die Chemokinspezifität verantwortlich ist und daher als mögliche Bindestelle für CXCL8 in Frage kommt.[60] Mit <sup>15</sup>N-markiertem CXCL8 (CXCL8 1-72) und dem N-Terminus von CXCR1, sowie dem N-terminalen Peptid CXCR1 1-40, durchgeführte NMR-Studien legen die N-Schleife, die <sub>310</sub>-Helix, die 40S-Schleife, den  $\beta_3$ -Strang und auch die C-terminale  $\alpha$ -Helix von CXCL8 als mögliche Interaktionsstellen zwischen CXCL8 und dem Rezeptor CXCR1 nahe. Durch Untersuchungen mit verkürzten CXCL8-Varianten (CXCL8 1-51 und CXCL8 1-66) konnte die C-terminale  $\alpha$ -Helix jedoch als

---

Rezeptorbindungsstelle ausgeschlossen werden.[9, 48, 49, 61, 62] In neueren NMR-Studien mit Teilen des CXCR1 in Lipidmembranen konnte keine Interaktion zwischen den extrazellulären Schleifen des Rezeptors und dem ELR-Motiv von CXCL8 nachgewiesen werden.[63] Mit Hilfe von CROSS-Proteinen (*chemokine receptor elements on soluble scaffold*) konnte die native Struktur der Bindungsstelle des Chemokinrezeptors nachgeahmt werden. Durch Synthese eines solchen CROSS-Proteins, bestehend aus dem N-Terminus und der extrazellulären Domäne ECD4 des CXCR1, konnte eine Verstärkung der Bindungsaffinität des CXCR1 N-Terminus an CXCL8 durch die extrazelluläre Schleife ECD4 gezeigt werden. Während ECD4 allein nicht an CXCL8 bindet, zeigte das CROSS-Protein eine Affinität von  $K_D = 0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , was wiederum eine Interaktion von CXCL8 mit den extrazellulären Schleifen bei der Rezeptorbindung nahelegt.[64]

Durch das bisherige zweistufige Modell für die Rezeptoraktivierung durch CXCL8 können weder Unterschiede in der Ligand-Rezeptor-Selektivität erklärt werden noch die Aktivierung verschiedener Signalwege. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass das hoch konservierte GP (Glycin-Prolin)-Motiv, das sich in der Nähe der N-terminalen und N-Loop-Reste von CXCL8 befindet, die *site I* und *site II* Wechselwirkungen koppelt und dadurch verschiedene Rezeptorfunktionen ermöglicht. Mutationen im GP-Motiv verursachten verschiedene Unterschiede von der nativen Funktion bis zum vollständigen Aktivitätsverlust.[57]

Eine jüngere Studie konnte mittels NMR-Spektroskopie eine Bindung zwischen CXCL8 und Sulfotyrosin zeigen, was eine Rezeptorsulfatierung für CXCR1 und CXCR2 nahelegt, wie sie bereits für andere Chemokinrezeptoren bekannt ist.[21, 65] Auch computergestützte Modellierungen von CXCR1 zeigen eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der N-terminale Tyrosinrest Tyr27 sulfatiert ist, wohingegen die zwei infrage kommenden Tyrosinreste des CXCR2 Rezeptors wahrscheinlich keine Sulfatierung aufweisen. Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sowohl CXCR1 als auch CXCR2 *in vivo* eine Sulfatierung aufweisen.[66, 67]

### 2.1.3 Monomer-Dimer Gleichgewicht von CXCL8

Um den Einfluss des Monomer-Dimer Gleichgewichts von CXCL8 auf die Rezeptorbindung und Aktivierung zu untersuchen, wurden neben dem Wildtyp verschiedene Mutationen von CXCL8 untersucht. Da die Dimerisierung über die Aminosäuren im  $\beta_1$ -Faltblatt erfolgt, besonders die Aminosäurereste Lys23 bis Glu29, wurden hier bestimmte Mutationen eingefügt welche die Dimerisierung unterdrücken sollen. Durch die Mutationen Leu25Phe, Val27Phe, Leu25Phe/Val27Phe und Val27Ala konnte insbesondere gezeigt werden, dass auch die Aminosäurereste Leu25 und Val27

---

im  $\beta_1$ -Faltblatt von CXCL8 an der Dimerisierung beteiligt sind. Für diese Mutanten zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich reduziertes Potential zur Ausbildung von Dimeren. Rezeptoraffinitäten und chemotaktische Aktivitäten *in vitro* unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen dem Wildtyp und den Mutanten.[68] Auch für die Mutanten Glu24Leu/Leu25Glu und Leu25Tyr/Val27Arg konnte gezeigt werden, dass sie noch bei Konzentrationen von bis zu 10 mM als Monomer vorliegen, wobei für Leu25Tyr/Val27Arg nur eine schwache Affinität für N-terminale Rezeptorpeptide von CXCR1 nachgewiesen werden konnte.[69, 70] Bei der Doppelmutante Val27Pro/Glu29Pro wurde durch Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat die Dimerisierung unterdrückt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutante tatsächlich als Monomer vorliegt und eine mit dem CXCL8 Wildtyp vergleichbare Aktivität aufweist.[71] Das Einführen einer Methyl-Gruppe an Leu25 in das Proteinerückgrat von CXCL8 führt zum Verlust der  $\alpha$ -helikalen Struktur der Reste 67-72 und zu der Monomervariante Leu25Me. Es wurde daraus gefolgert, dass die C-terminale-Helix lediglich in der dimeren Struktur vollständig stabil ist.[72] Mit einer Affinität zu CXCR1 von  $K_D = 0.8 \pm 0.3$  nM entsprach die Affinität und Aktivität der Mutante dem Wildtyp.[73, 74] Durch Deletion der entsprechenden Aminosäuren 67-72 wurde eine weitere monomere Variante von CXCL8 generiert.[75, 76] Eine reine Dimervariante von CXCL8 wurde durch die Mutation Arg26Cys generiert, bei der die Dimere kovalent durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden  $\beta_1$ -Strängen gebildet werden. Sie zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Affinität zu CXCR1 von  $K_D = 55 - 172$  nM.[70, 74]

Zahlreiche Studien mit verschiedenen monomeren und dimeren Varianten von CXCL8 sowie dem Wildtyp wurden mit N-terminalen Peptiden des CXCR1 durchgeführt. Dabei konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Affinität der monomeren Varianten von CXCL8 zu den N-terminalen Peptiden deutlich höher ist als die der dimeren Mutante oder des Dimers des Wildtyps. Dennoch konnte auch für Dimere eine Bindung nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die Experimente, dass die Wechselwirkung zwischen CXCL8 und dem Rezeptor N-Terminus das CXCL8-Monomer-Dimer-Gleichgewicht hin zur monomeren Variante verschiebt, also die Bindung mit einer Dissoziation des Dimers verbunden ist. Basierend auf diesen Ergebnissen wird diskutiert, dass die IL-8-Dimerisierung als negativer Regulator für die Rezeptorfunktion fungiert[70, 77, 78]

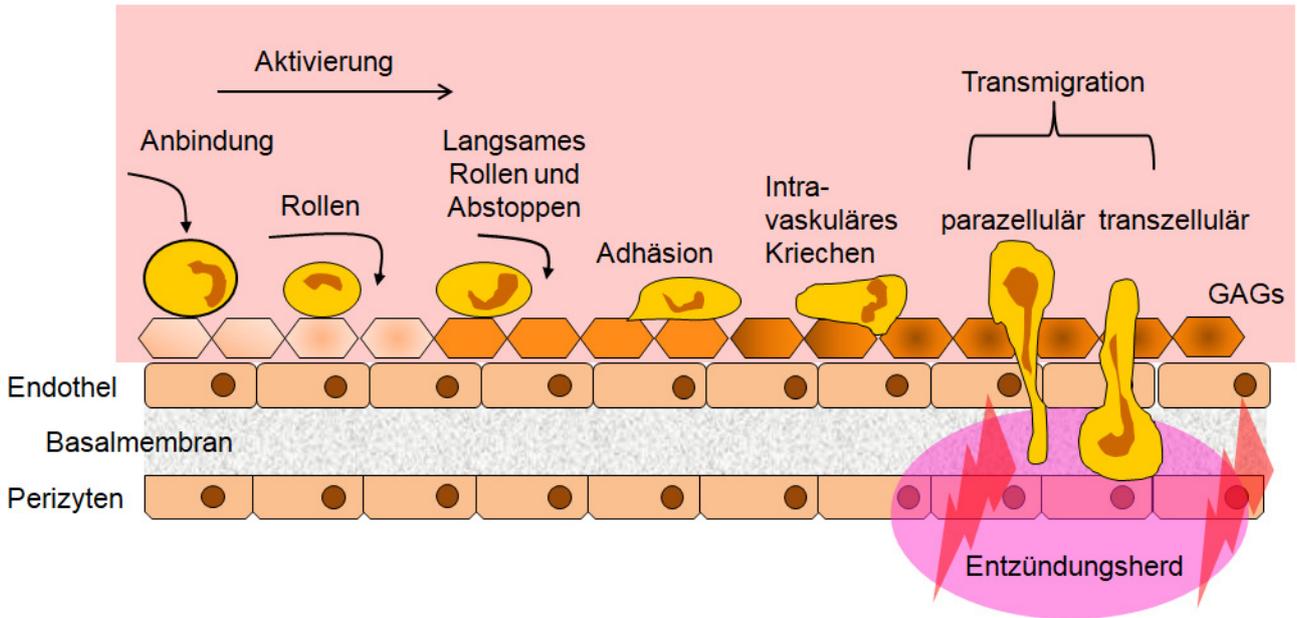
#### **2.1.4 Biologische Funktion von CXCL8**

Eine wesentliche Funktion des Chemokins CXCL8 ist seine Wirkung als Entzündungsmediator bei der Bekämpfung von Infektionen im Gewebe. Dabei wird CXCL8 als Reaktion auf die Anwesenheit von pathogenassoziierten molekularen Signaturen (PAMS), z.B. Lipopolysacchariden auf der äußeren

---

Membran gramnegativer Bakterien, oder Cytokinen, wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin-1, ausgeschüttet. Dies bewirkt die chemotaktische Einwanderung von Leukozyten, vorwiegend Neutrophilen Granulozyten, aus dem Blutstrom zum Ort der Entzündung.[39] Dafür ist die Ausbildung stabiler Gradienten von CXCL8 notwendig. Dabei spielt die Bindung an auf Zelloberflächen befindliche, Glykosaminoglykane (GAGs) eine wesentliche Rolle.[79-82] Das am häufigsten im tierischen Organismus vorkommende GAG ist das Heparansulfat. Die Bindung von CXCL8 an Heparin, ein gut untersuchtes Heparansulfat-Analogon, wird primär durch die basischen Aminosäuren Arg60, Lys64, Lys67 und Arg68 in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix von CXCL8 gewährleistet. [79, 83-86] Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der  $\alpha$ -Helix zum totalen Verlust der Bindungsaffinität von CXCL8 an GAGs führt.[86] Es wurden einige übereinstimmende Sequenzen in der Form XBBBXXBX, wobei B für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer basischen Aminosäure steht, in verschiedenen Proteinen gefunden, die für die Bindung an GAGs verantwortlich sind.[87, 88] Bei Chemokinen sorgen diese GAG-Bindesequenzen für die Ausbildung stabiler Chemokingradienten, welche andernfalls durch den Blutstrom schnell zerstört werden würden.[82, 89, 90] Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Bindung zwischen Chemokin und GAG die Oligomerisierung von Chemokinen induziert wird.[89, 91]

Chemotaxis ist das Ergebnis einer Fülle an zellulären Prozessen, die durch lokalisierte Aktivierung von Rezeptoren mittels bestimmter Signalmoleküle auf der Zelloberfläche ausgelöst wird. Sie ist von einer Vielzahl an Faktoren in der intrazellulären Signalweiterleitung abhängig.[92-94] Um den Entzündungsherd zu erreichen müssen die Neutrophilen Granulozyten aus dem Blutstrom durch die Endothelschicht wandern. Bei diesem, als Extravasation bezeichneten mehrstufigen Prozess, spielen Interaktionen von Endothelzellen und Neutrophilen Granulozyten, welche durch verschiedene Adhäsionsproteine und deren Liganden auf der Zelloberfläche vermittelt werden, eine wichtige Rolle.[95-97]. Die Extravasation wird in die folgenden sechs Schritte unterteilt: Anbindung, Rollbewegung entlang der Zelloberfläche, Aktivierung, Adhäsion an die Zelloberfläche, Kriechbewegung und Transmigration durch die Endothelschicht (siehe **Abbildung 2-5**).[93, 98, 99]



**Abbildung 2-5:** Extravasation von Neutrophilen Granulozyten. Die Anbindung der Neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn an das Endothel und die sich anschließende Rollbewegung wird durch Selektine ausgelöst, welche sich sowohl auf den Neutrophilen, als auch auf den Endothelzellen befinden. Chemokine, wie CXCL8, welche auf GAGs immobilisiert (Gradient von hellorange bis braun) sind, lösen durch Bindung an ihre Rezeptoren eine Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten aus. Das hat eine Konformationsänderung der Integrine zur Folge, wodurch diese mittels Bindung an ihre Liganden auf dem Endothel die Adhäsion der Neutrophilen Granulozyten unterstützen und eine Kriechbewegung hervorrufen. Die Transmigration der Neutrophilen ins Gewebe wird von vielen weiteren Proteinen unterstützt. (Abbildung in Anlehnung an Kolaczowska et al. [99])

Die Anbindung der neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn wird durch Selektine ausgelöst. Die Bindung zwischen den Selektinen auf dem Endothel und Glykoproteinen auf den Neutrophilen ist reversibel und wird ununterbrochen gelöst und neu gebildet. Dies führt zur charakteristischen Rollbewegung der Neutrophilen mit dem Blutstrom, wodurch die Erkennung oberflächengebundener Chemokingradienten erleichtert wird.[98, 100-102] Die Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten erfolgt durch die Bindung von auf GAGs immobilisiertem Chemokin an seine Rezeptoren auf der Oberfläche der Neutrophilen.[82, 90, 103] Die folgende Transmigration ins entzündete Gewebe wird durch die Perizyten unterstützt, welche durch Ausschüttung von Chemokinen die Bewegung der Neutrophilen zum Entzündungsherd verstärken.[104-106] Dort akkumulieren die Neutrophilen und beseitigen die infektiösauslösenden Keime z.B. durch Phagozytose oder durch die Ausschüttung von Enzymen oder reaktiven Sauerstoffspezies.[39]

---

### 2.1.5 Die Rolle von CXCL8 bei Krankheiten

Neben der wichtigen Funktion bei der Abwehr von Keimen und der Wundheilung wird CXCL8 auch mit verschiedenen chronisch-entzündlichen, sowie Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist jedoch in vielen Fällen noch unklar, ob die vermehrte Ausschüttung des Chemokins zur entsprechenden Krankheit führt, oder ob die Krankheit die vermehrte Chemokinausschüttung auslöst.

Autoimmunerkrankungen die mit CXCL8 assoziiert werden sind unter anderem Schuppenflechte (Psoriasis), rheumatoide Arthritis, sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen.[4, 107-110] Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte CXCL8 in hohen Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit bzw. im Gelenkgewebe nachgewiesen werden und durch eine Injektion von CXCL8 in gesunde Gelenke konnte sogar rheumatoide Arthritis ausgelöst werden.[111]

Auch für die Volkskrankheit Arteriosklerose konnte eine Beteiligung von CXCL8 gezeigt werden. So konnte in fibrösen Plaques eine deutlich erhöhte Konzentration an CXCL8 nachgewiesen werden. Dies lässt sich auf die erhöhte CXCL8 Produktion von Monozyten im arteriosklerotischen Gewebe zurückführen.[112, 113]

Daneben ist CXCL8 auch am schweren Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS), sowie an COVID-19 beteiligt. [114-117]

Überdies ist CXCL8 durch seine Wirkung als Angiogenesefaktor auch maßgeblich am Wachstum und der Metastasierung von bestimmten Tumoren beteiligt. Im Tumorgewebe herrscht durch das schnelle Wachstum ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Viele Tumorzellen können CXCL8 ausschütten und besitzen gleichzeitig die Rezeptoren CXCR1 bzw. CXCR2 für CXCL8. In diesem Fall wirkt CXCL8 autokrin, also auf die Tumorzellen selbst, wodurch die Neubildung von Blutgefäßen induziert wird, welche den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und somit das Tumorstadium fördern.[40] Eine solche autokrine Wirkung von CXCL8 wurde bisher für bestimmte Krebsarten wie das Melanom, Darmkrebs, Leberkrebs, Pankreaskrebs und Prostatakrebs beschrieben.[40, 118, 119] Darüber hinaus werden weitere durch CXCL8 vermittelte Effekte diskutiert, wie zum Beispiel die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren durch Tumor-assoziierte Makrophagen, die das Wachstum und Überleben, sowie die Migration und Metastasierung der Tumorzellen fördern sollen.[40]

---

## 2.1.6 Inhibitoren für CXCL8

Aufgrund der Vielzahl entzündlicher Erkrankungen, welche mit einem erhöhten Spiegel an CXCL8 und somit der verstärkten Einwanderung von Leukozyten einhergehen, sowie der Beteiligung am Wachstum einiger Tumore, stellt CXCL8 ein interessantes Zielprotein für die Entwicklung neuer Inhibitoren dar. Um die Wirkung von Chemokinen zu verhindern gibt es zwei Herangehensweisen. Entweder wird der Rezeptor, oder das Chemokin selbst, inhibiert. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels mehrere Chemokine, welche an den gleichen Rezeptor binden können, hat eine Inhibierung des Chemokinrezeptors weitreichende Auswirkungen und beeinflusst die Funktion aller anderen an diesen Rezeptor bindenden Chemokine. Daher ist eine Inhibierung des Chemokins selbst zu favorisieren.

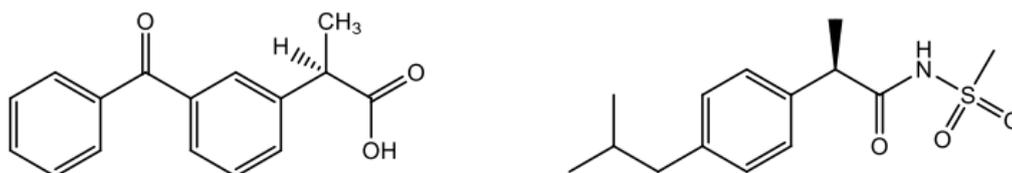
Bereits 1993 wurden die ersten Peptide zur Unterdrückung der Wirkung von CXCL8 untersucht. Es zeigte sich zunächst, dass der N-Terminus von CXCL8 (CXCL8 3-25) selbst die Bindung von Interleukin-8 an Neutrophile Granulozyten und deren chemotaktische Aktivität hemmt.[120] Zahlreiche weitere Bindepeptide für CXCL8 wurden in der darauf folgenden Zeit beschrieben. Das kurze Peptid Ac-RRWWCR-NH<sub>2</sub>, auch „Antileukinat“ genannt, wurde durch Screening einer kombinatorischen Bibliothek aus Hexapeptiden gefunden und inhibiert die Bindung von IL-8 an Neutrophile Granulozyten, sowie die Chemotaxis.[121] Weitere Studien ergaben, dass das Peptid auch die durch Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) induzierte Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge unterdrücken kann und dass es in der Lage ist, die Bindung von CXCL1 an Melanomzellen zu verhindern.[122, 123] Durch Phagendisplay konnten weitere kurze Peptide isoliert werden, welche die Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, sowie die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten ins Gewebeunterdrücken können. Dazu gehören unter anderem die Sequenzen Ac-FWLDFW-NH<sub>2</sub>, Ac-FWDDFW-NH<sub>2</sub> und Ac-SAMWDF-NH<sub>2</sub>. Sie wirken im unteren mikromolaren Bereich. Es ist hier jedoch noch nicht geklärt, ob diese Sequenzen an das Chemokin oder den Rezeptor binden.[124]

Neben diesen screeningbasierten Ansätzen wurden auch rationale Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren für CXCL8 verfolgt. So wurde zum Beispiel das Peptid Ac-MWDFDDLNFTGMPPADEDYSP-NH<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>=13 μM) aus der extrazellulären N-terminalen Sequenz des CXCR1 abgeleitet. Durch weitere Optimierung, indem für die Bindung unwichtige Aminosäuren durch einen Aminohexansäure-Linker ersetzt wurden, konnte das Peptid zu Ac-MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-NH<sub>2</sub> (CXCR1-p1; K<sub>i</sub>=7 μM) verkürzt werden.[125, 126] Durch NMR-Experimente wurde dieses Peptid im Komplex mit IL-8 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass CXCR1-p1 unstrukturiert ist und mit der N-terminalen Schleife, der 3<sub>10</sub>-Helix, der 40S-Schleife und dem β<sub>3</sub>-Strang von CXCL8 interagiert.[54, 61, 63] Ein Austausch des Aminohexansäure-Linkers

---

von CXCR1-p1 durch einen starren Aminomethylbenzoesäure-Linker führte zu einer weiteren Verbesserung ( $K_i=2,3 \mu\text{M}$ ) des Bindepeptids.[126] Ein weiteres aus der Rezeptorstruktur von CXCR1 abgeleitetes Bindepeptid ist das von Dorothea Helmer im Arbeitskreis von Frau Prof. Schmitz (TU Darmstadt) entwickelte Peptid Ac-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-NH<sub>2</sub> (IL8RP-Loops). Es wurde aus den für die Bindung von IL-8 wichtigen Sequenzen der extrazellulären Domänen 3 und 4 (ECD3 und ECD4) des CXCR1 abgeleitet und zeigt eine Affinität für CXCL8 von  $0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . [127]

Neben diesen Peptidinhibitoren für das Chemokin CXCL8 selbst sind auch verschiedene kleine Moleküle („small molecules“) bekannt, welche die Wirkung von CXCL8 durch Bindung an dessen Rezeptoren inhibieren. Zu nennen sind hier beispielsweise Aminolactame wie FX125L, das sich als Therapeutikum für Asthma bereits in klinischen Studien befindet.[128, 129] Auch Ketopropene wechselwirken mit den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 verhindern dadurch deren Aktivierung und die chemotaktische Aktivität von Neutrophilen und Monozyten. Repertaxin wirkt als nicht-kompetitiver allosterischer Inhibitor für CXCR1 und CXCR2 wodurch diese in einer inaktiven Konformation fixiert werden.[130-132] Ketopropen und Repertaxin sind in **Abbildung 2-6** gezeigt. Weitere kleine Moleküle sind in diesem Zusammenhang Navarixin, ein potenter, oral bioverfügbarer Rezeptorantagonist für CXCR1 und CXCR2 mit ausgezeichneter zellbasierter Aktivität, oder Reparixin, das bei der Vorbeugung der akuten Lungenschädigung (ALI) und der Therapie des akuten Atemnotsyndroms (ARDS) eingesetzt wird. In diesem Zusammenhang gibt es auch einen humanisierten therapeutischen Antikörper. [133-135]



**Abbildung 2-6:** (R)-Ketopropen (links) und Repertaxin (rechts). Kleine Moleküle, die die Wechselwirkung von CXCL8 mit CXCR1 und CXCR2 inhibieren.

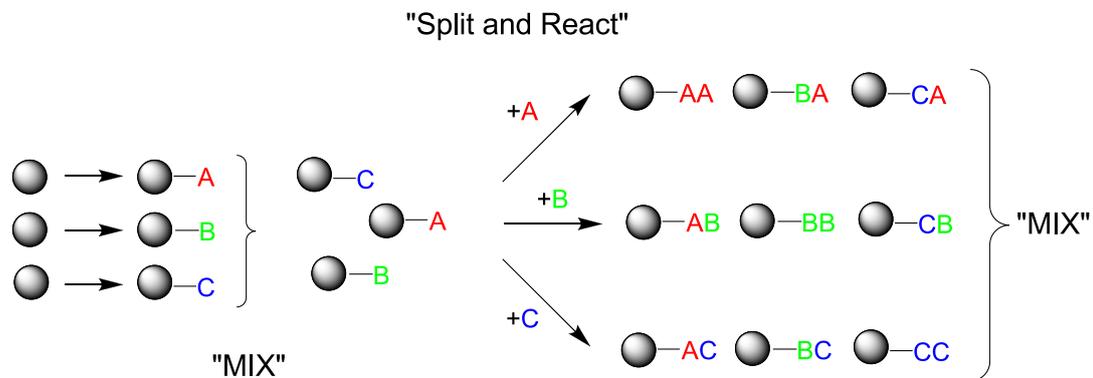
Auch eine Gruppe kleiner Glykoproteine aus dem Zeckenspeichel, die sogenannten Evasine, sind in der Lage an Chemokine zu binden und dadurch Abwehr- und Entzündungsreaktionen zu unterdrücken.[136, 137] Dieser Mechanismus dient der Verlängerung der Aufenthaltszeiten von Zecken auf ihren Wirten. Es wurde gezeigt, dass Evasin-3, aus dem Speichel der braunen Hundezecke, eine hohe Affinität zu CXCL8 hat und bei Mäusen Entzündungen verringert. Durch-NMR-Spektroskopie wurde die Struktur von Evasin-3 und dem CXCL8-Evasin-3-Komplex untersucht. Es wurde festgestellt, dass Evasin-3 die Glykosaminoglykan-Bindungsstelle von IL-8 stört und dadurch die Wechselwirkung von CXCL8 mit seinem Rezeptor CXCR2 hemmt.[136, 138]

---

## 2.2 Peptide und Peptidomimetika

Peptide sind ebenso wie Proteine modular aufgebaute Moleküle. Sie setzen sich üblicherweise aus den zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäurebausteinen zusammen, welche über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Grenze zwischen Peptiden und Proteinen wird gewöhnlich bei einer Anzahl von 50-100 Aminosäurebausteinen gezogen.[139] Peptide als Wirkstoffe bieten einige Vorteile, sowohl gegenüber niedermolekularen Verbindungen („small molecules“), als auch gegenüber Proteinen wie Antikörpern („biologics“). Im Gegensatz zu „small molecules“ besitzen sie häufig eine höhere Selektivität und Spezifität für ihr Target und dadurch auch eine größere Wirksamkeit, da sie größere Oberflächeninteraktionen, wie Protein-Protein-Wechselwirkungen abbilden können.[140] Überdies werden sie nicht zu toxischen Metaboliten abgebaut. Des Weiteren lassen sich spezifische Bindepeptide leichter designen als „small molecules“. Eine Strategie zur Entwicklung von spezifischen Bindepeptiden bzw. Inhibitoren ist das rationale Design. Dabei können mit Hilfe von vorhandenen Informationen über eine Protein-Protein-Interaktion und durch bioinformatische, computergestützte Analysen die relevanten Aminosäuren auf der Oberfläche der interagierenden Proteine identifiziert werden. Diese Informationen können dann genutzt werden um neue Bindepeptide abzuleiten oder bereits vorhandene Binder zu optimieren.[141, 142] Im Gegensatz zu Antikörpern als Wirkstoffen zeichnen Peptide sich aufgrund ihrer geringeren Größe durch eine bessere Gewebsdurchlässigkeit aus. Zudem zeigen sie eine geringere Immunogenität.[143] Außerdem sind Peptide im Vergleich zu Antikörpern vergleichsweise einfach und kostengünstig durch Festphasenpeptidsynthese herzustellen.[139, 144] Aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten der Verknüpfung der 20 natürlichen Aminosäurebausteine, sowie der Option des Einbaus nicht natürlicher Bausteine bieten Peptide eine enorme Vielfalt, und können leicht zur Synthese großer kombinatorischer Wirkstoffbibliotheken herangezogen werden.[144] Dies wird zusätzlich durch die einfache Herstellung mittels Festphasenpeptidsynthese begünstigt, wodurch One-Bead-One-Compound-Bibliotheken bequem zugänglich sind und gezielt nach Liganden für bestimmte, Zielproteine, durchsucht werden können.[145] Eine Methode, die Synthese von Peptid-Bibliotheken mit der Festphasensynthese zu verbinden, bietet die im Jahr 1991 von Furka entwickelte „Mix-and-Split“-Methode.[146] Diese Technik wurde später von Lam et. al. weiterentwickelt, um sogenannte „One-Bead-One-Compound“ (OBOC) Bibliotheken herzustellen, in denen jeder einzelne Harzpartikel jeweils eine einzige Sequenz der synthetisierten Makromoleküle trägt.[147, 148] Zur Synthese von Peptidbibliotheken wird das Syntheseharz dabei in mehrere Reaktionsgefäße aufgeteilt, in denen jeweils eine Aminosäure mit dem Harz zu Reaktion gebracht wird. Nach dem Vereinigen und Mischen aller Harzpartikel und dem Entfernen der N-terminalen Schutzgruppen wird das Harz für die Kupplung der nächsten Aminosäure aufgeteilt. Wenn sich die Anzahl der Aminosäuren in jeder Position nicht unterscheidet entstehen

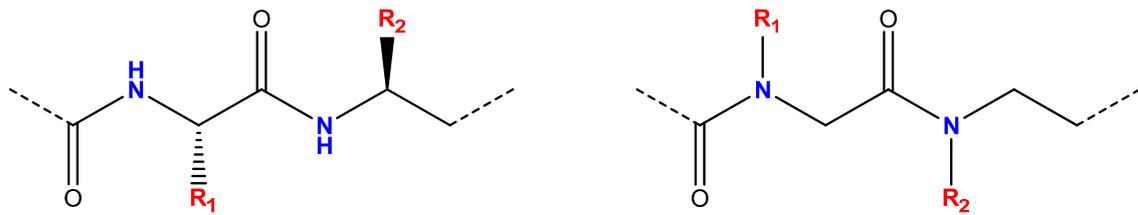
$N = x^i$  mögliche Peptide mit einer Länge von  $i$ , wobei in jeder Position  $x$  verschiedene Aminosäuren eingesetzt werden (siehe **Abbildung 2-7**).



**Abbildung 2-6:** Schematische Darstellung der Mix-and-Split-Synthese. Jeder Reaktionsschritt  $i$  wird mit  $x$  Bausteinen durchgeführt. Anschließend werden die Reaktanden gemischt und wieder gleichmäßig aufgeteilt für den nächsten Reaktionsschritt. Es entstehen  $N = x^i$  unterschiedliche Substanzen mit einer Länge von  $i$ .

Im Vergleich zu „small molecules“ besitzen Peptide als Wirkstoffe auch einige entscheidende Nachteile. Zu nennen ist hier vor allem die kurze Halbwertszeit, welche zum einen bedingt durch die geringe Größe ( $<5$  kDa) auf eine schnelle Ausscheidung über die Nieren und zum anderen auf den Abbau durch proteolytische Enzyme im Blut zurückzuführen ist.[139, 149] Außerdem können Peptide nicht oral verabreicht werden, da sie meist schon im Magen durch die Magensäure denaturiert werden und somit ihre biologische Aktivität verlieren. Dadurch werden sie entweder in ihrer aktiven Form nur unzureichend vom Körper aufgenommen, oder erreichen durch Abbau und Ausscheidung keine Konzentrationen im therapeutischen Bereich und können somit die gewünschte Wirkung nicht entfalten.[150] Um diese Nachteile zu umgehen, wurden Verbindungen entwickelt, deren wesentliche Strukturelemente denen der Peptide nachempfunden sind. Solche Peptidmimetika besitzen idealerweise die gleiche biologische Wirkungen wie Peptide und weisen teilweise sogar verbesserte pharmakologische Eigenschaften, wie z.B. eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen oder eine verbesserte Aufnahme in den Körper, auf.[151, 152] Zu den Peptidmimetika zählt man zahlreiche Verbindungen die sich im Aufbau des Rückgrats von den Peptiden unterscheiden und in den meisten Fällen ähnliche Seitenketten-Funktionalitäten besitzen. [151]

Eine gut untersuchte und wichtige Klasse von Peptidmimetika sind  $\alpha$ -Peptoide. Sie wurden erstmals im Jahre 1992 von Zuckermann *et.al.* als N-substituierte Glycin-Oligomere beschrieben und unterscheiden sich von Peptiden lediglich durch die Position der Seitenkette, die formal vom  $\alpha$ -Kohlenstoffatom an das Stickstoffatom des Polymerrückgrats verschoben ist (siehe **Abbildung 2-7**).[153]



**Abbildung 2-7:** Darstellung der Peptidstruktur(links) und der  $\alpha$ -Peptoidstruktur(rechts).

$\alpha$ -Peptoide können genau wie Peptide Sekundärstrukturen ausbilden zeichnen sich aber dadurch aus, dass sie über einen großen pH- und Temperaturbereich stabil sind. Im Unterschied zu Peptiden besitzen  $\alpha$ -Peptoide ein achirales Polymerrückgrat und dadurch eine erhöhte Flexibilität, sowie eine überlegene zelluläre Permeabilität. Der größte Vorteil der Peptoide ist jedoch die geringe Empfindlichkeit gegenüber Proteasen, die ihnen eine lange Halbwertszeit im Organismus ermöglicht. [153-159] Darüber hinaus zeigen viele Peptoide eine hohe Aktivität in biologischen Systemen, was sie besonders für die pharmakologische Anwendung interessant macht.[154] Die Synthese von Peptoiden kann auf zwei Weisen erfolgen. Entweder durch Einzelkupplung fertiger, mit Schutzgruppen versehener Peptoidmonomere, äquivalent zur Peptidsynthese (Monomermethode) oder durch die Submonomermethode, die auf abwechselnder Acylierung mit einer Halogenessigsäure und Alkylierung durch Substitution des Halogens mit einem primären Amin basiert.[153, 160] Die einfache Synthese an der festen Phase und das große Angebot an kommerziell erhältlichen Aminen erlauben den Einbau unterschiedlichster Seitenketten, wodurch eine große Vielfalt an Peptoiden zugänglich ist. Auch hier bietet sich wiederum die Möglichkeit zur Synthese großer kombinatorischer One-Bead-One-Compound- Wirkstoffbibliotheken.[145, 161, 162]

Ein großer Nachteil von therapeutischen Peptiden und Peptoiden ist die geringe Plasmahalbwertszeit durch renale Exkretion, aufgrund ihrer geringen Größe.[149] Neben der PEGylierung ist eine weitere Strategie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit die Bindung an Serumalbumin. [163, 164] Mit einer Konzentration von ungefähr 50 g/L Blut ist das Humane Serumalbumin (HSA) das am häufigsten auftretende Plasmaprotein. Die Synthese erfolgt in der Leber und aufgrund seiner Größe von 66,5 kDa besitzt es eine Halbwertszeit von ca. 19 Tagen, da es nicht über die Nieren ausgeschieden wird. Die Hauptaufgabe von Albumin im Körper ist unter anderem die Bindung und der Transport von wasserunlöslichen Substanzen, wie z.B. Fettsäuren. Bedingt durch den amphiphilen Charakter kann Albumin jedoch neben Lipiden auch gut polare und geladene Substanzen binden.[165, 166]

---

Mit der *Sudlow site 1* und der *Sudlow site 2* weist HSA zwei Hauptbindestellen für Wirkstoffe auf. [167] Die Innenseite der Tasche der *Sudlow Site 1* weist einen hydrophoben Charakter auf, wohingegen der Eingang der Tasche positive Ladungen in den Seitenketten hat. Dort binden z.B. Wirkstoffe wie Warfarin, Salicylate oder Sulfonamide. Die *Sudlow site 2* wird auch Benzodiazepin-Bindestelle genannt, da dort Diazepam mit hoher Affinität gebunden wird. Außerdem binden dort Tryptophane, Thyroxine und Octanoate. [167] Neben diesen Hauptbindestellen weist HSA zahlreiche weitere Bindestellen auf z.B. neun verschiedenen Bindestellen für Fettsäuren unterschiedlicher Länge.[168, 169] HSA ist als Wirkstoffträger nicht nur wegen seiner langen Halbwertszeit und hohen Verfügbarkeit interessant, sondern auch weil es sich in Tumor- und entzündeten-Geweben ansammelt und somit Wirkstoffe direkt an den Wirkort transportieren kann.[164, 170, 171]

---

### 3 Zielsetzung

---

Das Chemokin CXCL8 spielt als Entzündungsmediator eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen, indem es die chemotaktische Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut hin zum Ort der Entzündung im Gewebe bewirkt. Außerdem kann CXCL8 als Angiogenesefaktor die Neuausbildung von Blutgefäßen fördern, was z.B. im Rahmen der Wundheilung von Bedeutung ist. Sowohl der Prozess der Einwanderung neutrophiler Granulozyten als auch der Gefäßneubildung kann jedoch mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert sein. Bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen kommt es fälschlicherweise zur massiven Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten ins Gewebe, welches dadurch geschädigt werden kann. Die angiogenetische Wirkung von CXCL8 kann dagegen bei bestimmten Krebserkrankungen zum Tumorwachstum und der Metastasierung beitragen. Aufgrund der Beteiligung an diversen Krankheiten ist es von großem Interesse die Wechselwirkung zwischen CXCL8 und seinen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 genauer zu untersuchen. Das genaue Verständnis der Rezeptorbindung ermöglicht die Entwicklung von Verbindungen, welche an CXCL8 binden und somit dessen Wirkung verhindern. In diesen Zusammenhang sind Peptide und Peptidomimetika besonders interessant, da sie direkt aus der Rezeptorsequenz abgeleitet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Bindevverhalten eines aus der *site I* des Rezeptors CXCR1 und eines aus der *site II* des Rezeptors CXCR1 abgeleiteten Bindepeptids an eine vorwiegend als Monomer vorliegende und an eine vorwiegend als Dimer vorliegende Variante des Chemokins CXCL8 mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen untersucht und mit der Bindung an den Wildtyp verglichen werden, da für den Wildtyp die konzentrationsabhängige Ausbildung von Dimeren bekannt ist. Während bekannt ist, dass aus dem N-Terminus (*site I*) von CXCR1 abgeleitete Peptide bevorzugt und mit hoher Affinität an monomere Varianten von CXCL8 binden und gegenüber dimeren Varianten nur eine geringe Affinität aufweisen, ist die Hypothese für die *site II* Bindung, dass monomere und dimere Varianten hier mit gleicher Affinität binden. Die Bindung von CXCL8 an die *site II* des CXCR1 erfolgt primär über den unstrukturierten N-Terminus von CXCL8, der das ELR-Motiv enthält und sowohl im monomeren als auch im dimeren Zustand von CXCL8 freiliegt. Ein experimenteller Beweis für diese Hypothese wurde bisher noch nicht erbracht.

Für einige Chemokinrezeptoren ist bekannt, dass sie am N-Terminus sulfatiert vorliegen können. Es hat sich auch gezeigt, dass viele Chemokine eine entsprechende Sulfotyrosinbindetasche besitzen. In der Regel erhöht sich durch die Rezeptorsulfatierung die Affinität zwischen Chemokin und Rezeptor. Im Lauf dieser Arbeit wurde eine Studie publiziert, die nahelegt, dass auch CXCR1 sulfatiert vorliegt. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass CXCL8 Tyrosinsulfat bindet.[65] Daher war ein

---

weiteres Ziel dieser Arbeit ein vom N-Terminus des CXCR1 abgeleitetes Bindepeptid in sulfatierter Form herzustellen und mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen zu untersuchen, ob das Peptid in sulfatierter Form eine höhere Affinität zu CXCL8 aufweist.

Da in einer vorausgehenden Dissertation[172] im Arbeitskreis für cyclisierte, mit Tetramethylrhodamin (TAMRA) markierte Bindepeptide und -peptide ein ungewöhnliches Bindeverhalten beobachtet worden war, welches auf eine Interaktion des Fluorophors mit der Peptidsequenz hindeutet sollte auch dies im Laufe dieser Arbeit mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen, Proteasestabilitäts-Assays und CD-Spektroskopie genauer untersucht werden.

Da der therapeutische Einsatz von inhibierenden Peptiden nach wie vor durch bestimmte Nachteile, wie z.B. eine geringe Plasmahalbwertszeit durch den raschen Abbau durch Proteasen im Blut oder eine schnelle Ausscheidung über die Nieren aufgrund ihrer geringen Größe, limitiert ist, wurden bestimmte Strategien entwickelt, um diese Nachteile zu umgehen. Der proteolytische Abbau kann zum Beispiel durch Cyclisierung oder Überführung der Peptidsequenz in ein Peptoid aufgehalten werden. Die rasche Ausscheidung über die Nieren kann verzögert werden in dem durch das Anhängen bestimmter Peptidsequenzen oder hydrophober Anker die Bindung an Serumalbumin vermittelt wird. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher Peptoidsequenzen zu finden, welche an humanes Serumalbumin binden, um damit die renale Exkretion zu vermindern und so die Plasmahalbwertszeit therapeutischer Peptide zu verlängern.

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

Im ersten Teil der Arbeit wurde mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen die Bindung von Monomer- und Dimer Varianten des Chemokins CXCL8 an die vom Rezeptor CXCR1 abgeleiteten Bindepeptide CXCR1-p1 (**1**) (*site I*) [126] und IL8RPLoops (**2**) (*site II*) [127] untersucht. Für direkt vom N-Terminus des CXCR1 abgeleitete Peptide wurde in der Literatur bereits eine erhöhte Affinität zu Monomervarianten von CXCL8 beschrieben.[42, 64, 70, 76, 78] Im Rahmen der Arbeit wurde untersucht, ob auch das verkürzte N-terminale Peptid CXCR1-p1 (**1**) diese erhöhte Affinität zu einer Monomervariante von CXCL8 zeigt. Außerdem sollte mit Hilfe des *site II*-Peptids IL8RPLoops (**2**) die Hypothese überprüft werden, dass die *site II*-Bindung unabhängig vom Dimerisierungszustand von CXCL8 erfolgt, da der N-Terminus des Chemokins sowohl im Monomer, als auch im Dimer freiliegt. Außerdem wurde basierend auf einem neuen Bericht über eine mögliche Sulfonyltyrosinbindestelle in CXCL8 der Einfluss der Sulfatierung von Tyrosin im *site I*-Peptid CXCR1-p1 (**1**) auf die Bindung an CXCL8 untersucht

Da im Rahmen der Dissertation von Kevin Brahm[172] für cyclisierte, TAMRA-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops (**2**) ein ungewöhnliches Bindevverhalten beobachtet wurde, wurde hier auch untersucht, welchen Einfluss die Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, auf das Bindevverhalten und die Sekundärstruktur der Peptide, sowie deren Stabilität hat.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse der von mir betreuten Masterthesis von Annika Lill[173] aufgegriffen und verschiedene Peptoid-Sequenzen, welche beim Screening einer One-Bead-One-Compound-Bibliothek (OBOC-Bibliothek) als potentielle Binder für humanes Serumalbumin (HSA) gefunden wurden, mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen auf ihre Bindung an HSA untersucht.

### 4.1 Bindungsstudien mit Rezeptorpeptiden und CXCL8-Varianten

Für die Bindung von CXCL8 an seinen Rezeptor CXCR1 wird ein zweistufiges Modell vorgeschlagen. Dabei kommt es im ersten Schritt zur Wechselwirkung der N-terminalen Schleife von CXCL8 (*site-I*) mit dem N-Terminus (ECD1) des Rezeptors. Im zweiten Schritt kommt es zur Wechselwirkung des ELR-Motivs am N-Terminus von CXCL8 (*site II*) mit den extrazellulären Domänen 3 und 4 (ECD 3 und ECD 4) des Rezeptors, wobei es zur Rezeptoraktivierung kommt.[16, 17, 54, 55]

Die Untersuchung der Interaktion von Peptiden, die aus dem N-Terminus des Rezeptors abgeleitet worden waren, führte zur Aufstellung des heute gängigen Bindungsmodells und dessen späterer Verfeinerung. In Studien mit Monomer- und Dimer-Varianten von CXCL8 zeigte sich, dass diese

---

N-terminalen Rezeptorpeptide stets mit deutlich höherer Affinität an die Monomervarianten binden, als an die Dimervarianten.[42, 64, 70, 76, 78] Von Attwood *et al.* konnte gezeigt werden, dass vor allem die Aminosäuren 9-29 des N-Terminus von CXCR1 für die Bindung an CXCL8 relevant sind.[125] Ein Alanin-Scan dieser Sequenz zeigte weitere Aminosäurereste mit geringer Relevanz für die Bindung an CXCL8 auf, so dass das N-terminale Rezeptorpeptid durch Einführung eines Aminohexansäure-Linkers (Ahx) zu folgender Sequenz verkürzt werden konnte: MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP (CXCR1-p1 (1)). Für dieses Peptid wird in der Literatur ein Wert von  $K_i = 7 \mu\text{M}$  für die Inhibition der Bindung von CXCL8 an die Membran von neutrophilen Granulozyten angegeben.[125, 126]

Für die *site II* Wechselwirkung zwischen CXCL8 und CXCR1 sind die Aminosäuren R199, R203 und D265 der extrazellulären Domänen 3 und 4 von CXCR1 essentiell.[59, 174] Im Arbeitskreis Schmitz konnte von Helmer *et al.* mit Hilfe dieser Informationen und flexiblem *protein-protein docking* ein *site II*-Bindepeptid entwickelt werden, welches die für die Bindung an CXCL8 relevanten Sequenzen der extrazellulären Domänen 3 und 4 des CXCR1 miteinander verbindet.[127] Dazu wurden Ausschnitte der Sequenzen dieser beiden extrazellulären Domänen (A196-I204 (ECD3) und A264-Q271 (ECD4)) ausgewählt, die diese Reste und jeweils eine komplette Helixwindung enthalten und mit einem Aminohexansäure-Linker verknüpft sind. Der Ahx-Linker hatte bereits in den Arbeiten von Attwood *et al.* einen guten Kompromiss zwischen Hydrophobizität, Flexibilität und Länge bewiesen.[126] Das resultierende Peptid mit der Sequenz: AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ (IL8RPLoops (2)) zeigte eine Affinität für CXCL8 von  $K_D = 0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$  und kann die biologische Antwort auf CXCL8 inhibieren.[127]

Für die Rezeptorpeptide CXCR1-p1 (1) (*site I*) und IL8RPLoops (2) (*site II*) wurden bei Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit dem CXCL8 Wildtyp (CXCL8w (3)) im Arbeitskreis Dissoziationskonstanten im mikromolaren bis oberen nanomolaren Bereich gemessen. Dabei wird die Peptidkonzentration konstant gehalten und das Chemokin zutitriert. Da die  $K_D$ -Werte der Peptide etwa in derselben Größenordnung liegen wie die Dimerisierungskonstante von CXCL8, liegen bei der Titration über ca. 2 Größenordnungen oberhalb und unterhalb der Dissoziationskonstante Monomer und Dimer im Gemisch vor. Um das unterschiedliche Bindeverhalten der Rezeptorpeptide an das CXCL8 Monomer bzw. Dimer zu untersuchen ist es daher von Vorteil mit Varianten zu arbeiten, welche über einen weiten Konzentrationsbereich als Monomer bzw. Dimer vorliegen. Neben dem Wildtyp von CXCL8 in seiner 72-Aminosäuren Isoform (CXCL8wt (3))[175] kamen im Rahmen der Arbeit die Mutanten CXCL8 Arg26Cys (4)[70], sowie CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro (5)[71] zum Einsatz. Bei der Mutante CXCL8 Arg26Cys (4) (CXCL8 R26C) handelt es sich um eine Variante von CXCL8 die

---

vorwiegend als Dimer vorkommt, da sich zwischen den Cystein-Resten an Position 26 zweier Monomere eine Disulfidbrücke ausbildet. Die Mutante CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro (5) (CXCL8 VPEP) kommt vorwiegend als Monomer vor, da die Dimerisierung durch Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat verhindert wird. Der Wildtyp sowie die beiden Mutanten wurden durch Expression in *E.coli* hergestellt. Außerdem wurde mit einem kurzen N-Terminalem Peptid von CXCL8 (CXCL8 1-10 (6)) gearbeitet. Die Sequenz von CXCL8 1-10 enthält das ELR-Motiv des Chemokins, welches für die *site II* Wechselwirkung zwischen CXCL8 und seinen Rezeptoren essentiell ist. CXCL8 1-10 (6) wurde durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt, mittels RP-HPLC gereinigt und durch MALDI-MS charakterisiert.

#### 4.1.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der CXCL8-Varianten

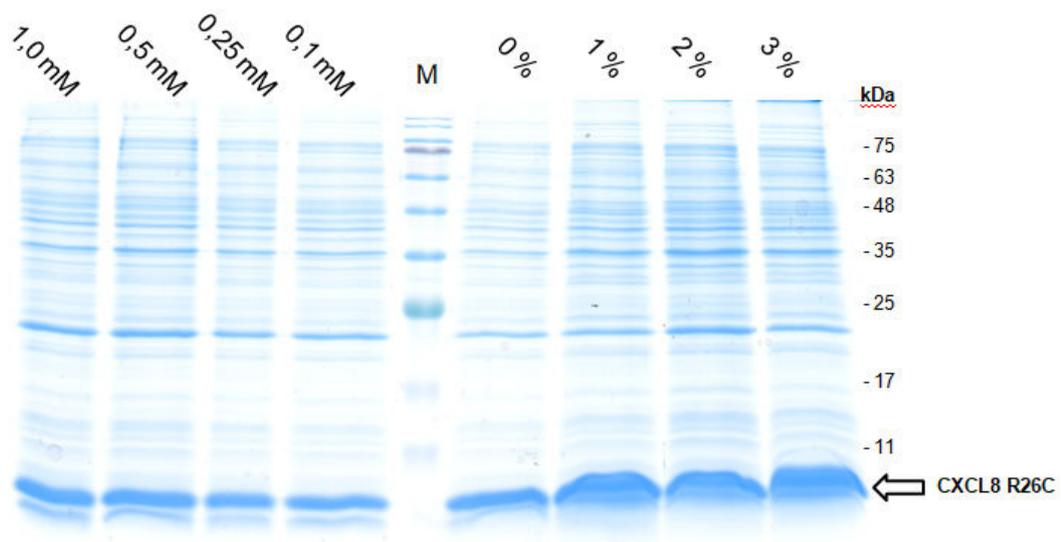
Der Wildtyp (CXCL8wt (3)), sowie die beiden Mutanten von CXCL8 wurden in *E. coli* BL21 DE3 RIL exprimiert, welche zuvor mit dem Vektor pET-22b transformiert wurden, der die jeweilige codonoptimierte Sequenz für die entsprechende CXCL8 Variante enthielt.

Für CXCL8wt (3) erfolgte die Expression, sowie die Reinigung über Kationenaustauschchromatographie nach einem etablierten Standardprotokoll mit dem das Chemokin in guter Ausbeute (siehe **Tabelle 4-1**) und ohne weitere Verunreinigung erhalten wurde (siehe **Abbildungen 9-1** und **Abbildungen 9-2**).

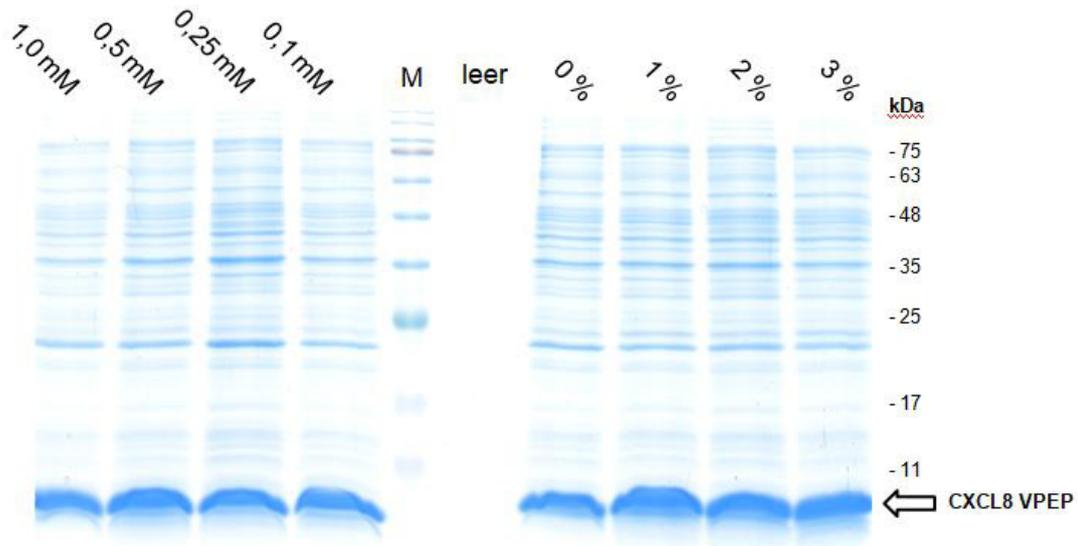
Um für die beiden Mutanten CXCL8 R26C (4) und CXCL8 VPEP (5) die optimalen Expressionsbedingungen zu finden wurde zunächst eine Expressionsoptimierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die beiden Mutanten sehr gut unter denselben Bedingungen (30 °C, 0,1 mM IPTG) wie der Wildtyp exprimiert werden können. Lediglich die Expressionsdauer wurde von drei auf fünf Stunden erhöht. Ein interessanter Befund der Expressionsoptimierung war, dass durch den Zusatz von Ethanol, der in einer Publikation von Chhetri *et al.* als Maßnahme zur Expressionsverbesserung vorgeschlagen wurde,[176] die Expression der Chemokine in *E. coli* BL21 DE3 RIL leicht gesteigert werden konnte. **Abbildung 4-1** zeigt ein Gel der Expressionsoptimierung von CXCL8 R26C (4). Nach rechts variiert die Ethanolkonzentration, nach links die Konzentration an Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Induktion der Expression. Während eine Erhöhung der IPTG-Konzentration keine erkennbare Auswirkung auf die exprimierte Proteinmenge hat, zeigt sich eine Steigerung der Expression des Chemokins durch Zusatz von Ethanol. Da die Proben der Expressionskulturen in Vorbereitung auf die SDS-PAGE mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt wurden, um die Disulfidbrücken im Protein zu reduzieren, ist im Gel die erwartete Bande für das Dimer CXCL8 R26C (4) auf einer Höhe von ca. 8 kDa zu finden. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt auch das Gel der Expressionsoptimierung von CXCL8 VPEP (5) (siehe **Abbildung 4-2**). Durch den Zusatz von

Ethanol ist auch hier eine Steigerung der Proteinexpression zu erkennen. Die Erhöhung der Ethanolkonzentration über 1% zeigte keine weitere Steigerung der Proteinexpression.

Obwohl die Steigerung der Proteinexpression in *E.coli* durch den Zusatz von Ethanol bereits für einige Proteine beschrieben wurde, konnte noch keine abschließende Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.[176, 177] Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass durch Zusatz des amphipathischen Moleküls Ethanol die Membranfluidität der Bakterienzellen verändert wird, wodurch auch weitere Prozesse innerhalb der Zelle beeinflusst werden. Unter anderem wird eine Steigerung der DNA-Synthese und damit einhergehend eine vermehrte Synthese induzierbarer Proteine vermutet. [176, 178-180] Weitere mögliche Erklärungen gehen von einer verbesserten Löslichkeit, oder einer Stabilisierung der rekombinanten Proteine aus, wodurch deren Ausbeute erhöht werden könnte.[181-183]



**Abbildung 4-1:** SDS-PAGE der Expressionsoptimierung von CXCL8 R26C (**4**) (MW≈16 kDa). Rechts von der Bahn mit dem Größenmarker (M) variiert die Ethanolkonzentration, nach links die Konzentration an IPTG. Die Expression wurde bei 30 °C über einen Zeitraum von 5 Stunden durchgeführt. Da die Proben der Expressionskulturen in Vorbereitung auf die SDS-PAGE mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt wurden um die Disulfidbrücken im Protein zu reduzieren, ist im Gel die erwartete Bande für IL-8 R26C (**4**) auf einer Höhe von ca. 8 kDa zu finden.



**Abbildung 4-2:** SDS-PAGE der Expressionsoptimierung CXCL8 VPEP (5) (MW≈8 kDa). Rechts von der Bahn mit dem Größenmarker (M) variiert die Ethanolkonzentration, nach links die Konzentration an IPTG. Die Expression wurde bei 30 °C über einen Zeitraum von 5 Stunden durchgeführt.

Im Rahmen der Expressionsoptimierung konnten als optimale Expressionsbedingungen für die CXCL8-Varianten CXCL8 R26C (4) und CXCL8 VPEP (5) eine Expressionsdauer von 5 Stunden, eine Expressionstemperatur von 30 °C und der Zusatz von 1 % Ethanol zum Expressionsmedium festgestellt werden. Zur Induktion der Expression wurde der Zusatz von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM, der niedrigsten getesteten Konzentration, festgelegt.

Die Reinigung der im Lysatüberstand vorliegenden CXCL8 Varianten CXCL8 R26C (4) und CXCL8 VPEP (5) war mit dem für den Wildtyp entwickelten Standardprotokoll nicht möglich. Für CXCL8 R26C (4) wurde ein pI-Wert von 8,6 und für CXCL8 VPEP (5) ein pI-Wert von 9,4 berechnet.[184] Obwohl also beide Chemokine, wie der Wildtyp, im neutralen pH-Bereich positiv geladen vorliegen sollten, konnte keine Bindung der Proteine durch den Kationentauscher erreicht werden. Auch durch eine Verringerung des Salzgehaltes des Puffers bei der Auftragung des Lysats konnte keine Wechselwirkung der CXCL8 -Varianten mit der stationären Phase des Kationentauschers erreicht werden und die Chemokine befanden sich zusammen mit allen anderen Proteinen im Durchlauf. Im Rahmen der Bachelorthesis von Maximilian Repity konnten die beiden CXCL8 Varianten CXCL8 R26C (4) und CXCL8 VPEP (5) jeweils unter Ausnutzung der GAG-Bindestelle durch Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule und anschließende Größenausschlusschromatographie gereinigt werden.[185] Allerdings war die Proteinausbeute, mit und ohne Ethanolzusatz bei der Expression, nach den zwei aufeinander folgenden Reinigungsschritten für beide

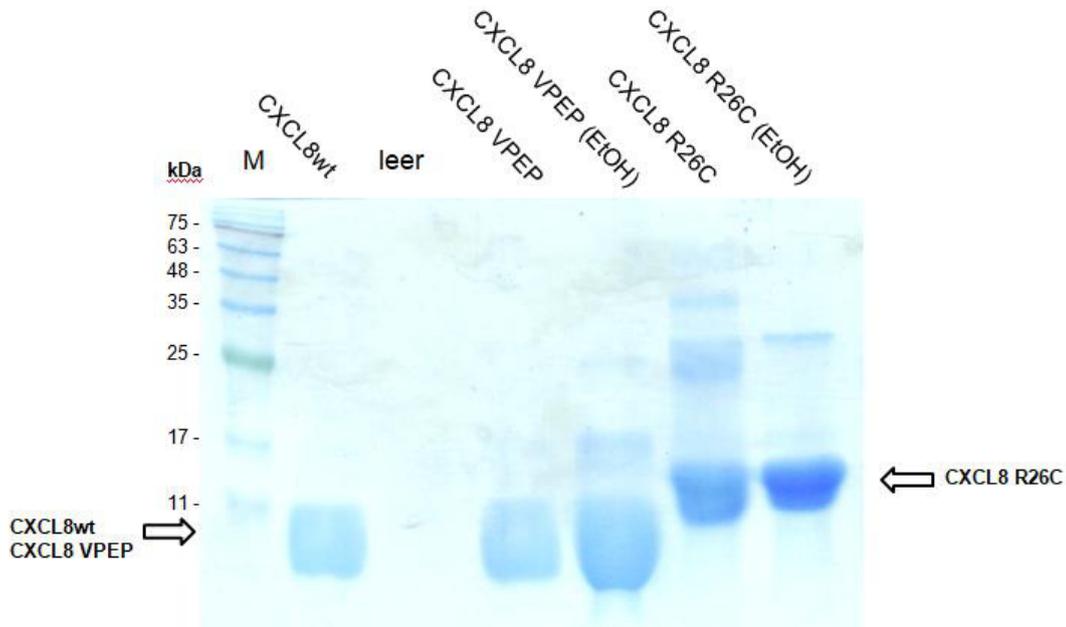
CXCL8 Varianten sehr gering (siehe **Tabelle 4-1**). Eine Ursache für den Ausbeuteverlust ist die Reinigung über die Heparinsäule mittels Affinitätschromatographie. Die Analyse der Eluatfraktionen der Heparinsäule beider CXCL8-Varianten mittels SDS-PAGE zeigte, dass sich größere Mengen des jeweiligen Chemokins im Durchlauf befanden (siehe **Abbildungen 9-5** und **Abbildungen 9-9**). Da die Kapazität der Säule nicht überschritten wurde, lässt das darauf schließen, dass die Wechselwirkung der CXCL8-Varianten mit dem Säulenmaterial Heparin unter den gegebenen Bedingungen nicht optimal war. Das Prinzip der Reinigung von Chemokinen über eine Heparinsäule basiert auf der Bindung von Chemokinen an Glykaminoglykane (GAGs), wie zum Beispiel Heparansulfat. Die Bindung von CXCL8 an Heparin kommt dabei hauptsächlich durch die basischen Aminosäuren in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix zu Stande. [85, 86] Von den Mutationen in beiden CXCL8 Varianten ist dieser Bereich der  $\alpha$ -Helix nicht betroffen. Und sowohl für das Monomer, als auch für das Dimer wird eine gute Wechselwirkung mit Heparin erwartet.[186] Die Aufnahme eines CD-Spektrums der CXCL8-Varianten könnte zeigen, ob sich die Mutationen auf die Struktur von CXCL8 auswirken, insbesondere auf den  $\alpha$ -Helix-Anteil, und dadurch eventuell die für die Bindung an GAGs relevanten Aminosäurereste in der Helix nicht mehr für eine Bindung an Heparin zugänglich sind. Der Ethanolzusatz zur Expression kann als Ursache für die unzureichende Wechselwirkung mit der Heparinsäule ausgeschlossen werden, da auch die Reinigung des Zellysats ohne Ethanolzusatz bei der Expression keine besseren Ergebnisse zeigte. Für zukünftige Arbeiten mit den CXCL8-Varianten sollte die Reinigungsstrategie optimiert werden, damit für Bindungsstudien und Aktivitätsassays mit Zellen größere Mengen der jeweiligen CXCL8-Variante zur Verfügung stehen.

**Tabelle 4-1:** Ausbeuten der CXCL-8 Varianten.

<b>CXCL8-Variante</b>	<b>Ohne Ethanolzusatz</b>	<b>Mit Ethanolzusatz</b>
CXCL8wt (3)	4,8 mg (3,0 mg/L)	-
CXCL8 R26C (4)	0,6 mg (0,38 mg/L)	0,9 mg (0,56 mg/L)
CXCL8 VPEP (5)	0,4 mg (0,25 mg/L)	0,6 mg (0,38 mg/L)

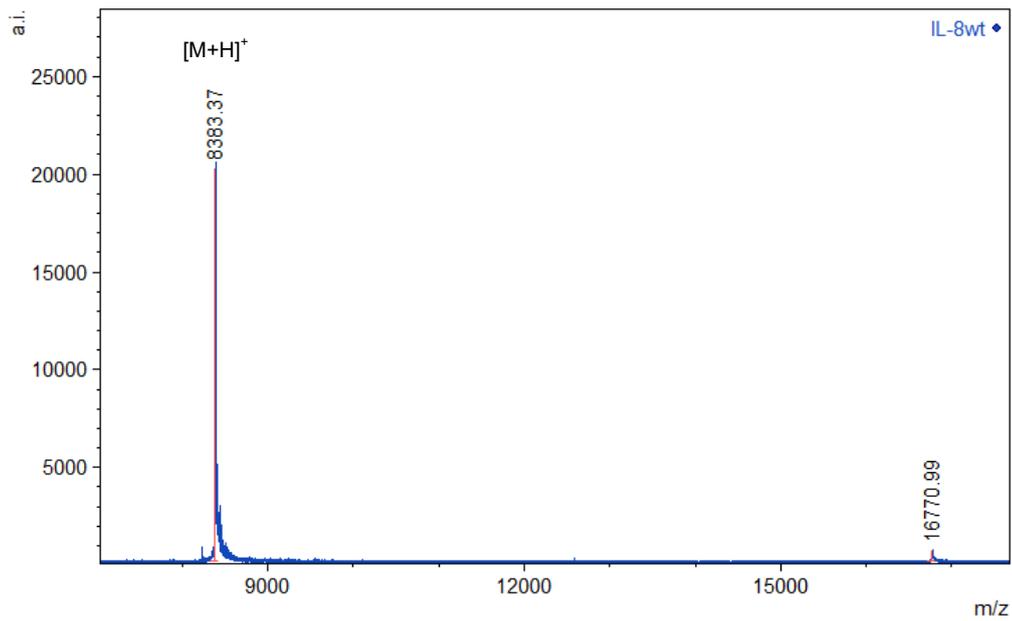
Um zu überprüfen, ob die Variante CXCL8 R26C (4) tatsächlich als Dimer vorliegt, wurde eine SDS-PAGE mit den vollständig gereinigten Chemokinen durchgeführt, bei der die Proben zuvor nicht mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt wurden und somit die Disulfidbrücken im Protein erhalten bleiben. **Abbildung 4-3** zeigt die SDS-PAGE aller verwendeten CXCL8 Varianten unter nicht reduzierenden Bedingungen. Für das Dimer CXCL8 R26C (4) ist eine Bande auf der Höhe von ungefähr 16 kDa zu erkennen, für das Monomer CXCL8 VPEP (5) und den Wildtyp (3) finden sich jeweils Banden auf der Höhe von 8 kDa. Außerdem sind bei den Mutanten noch geringe Mengen von Verunreinigungen

erkennbar, die auch durch den zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie nicht abgetrennt werden konnten.

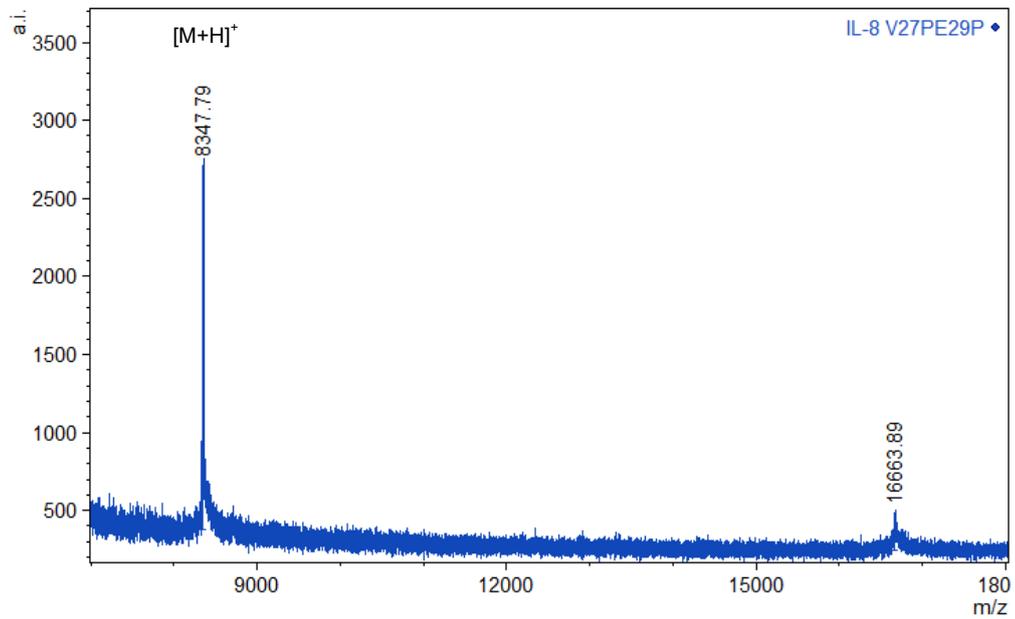


**Abbildung 4-3:** SDS-PAGE der im Rahmen der Arbeit verwendeten CXCL8 Varianten. Die Proben wurden zuvor nicht mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt, so dass die Bande für das Dimer CXCL8 R26C (**4**) auf einer Höhe von etwa 16 kDa, die für das Monomer CXCL8 VPEP (**5**) auf der Höhe von 8kDa zu erkennen ist. Der Wildtyp (**3**) zeigt nur eine Bande bei etwa 8 kDa.

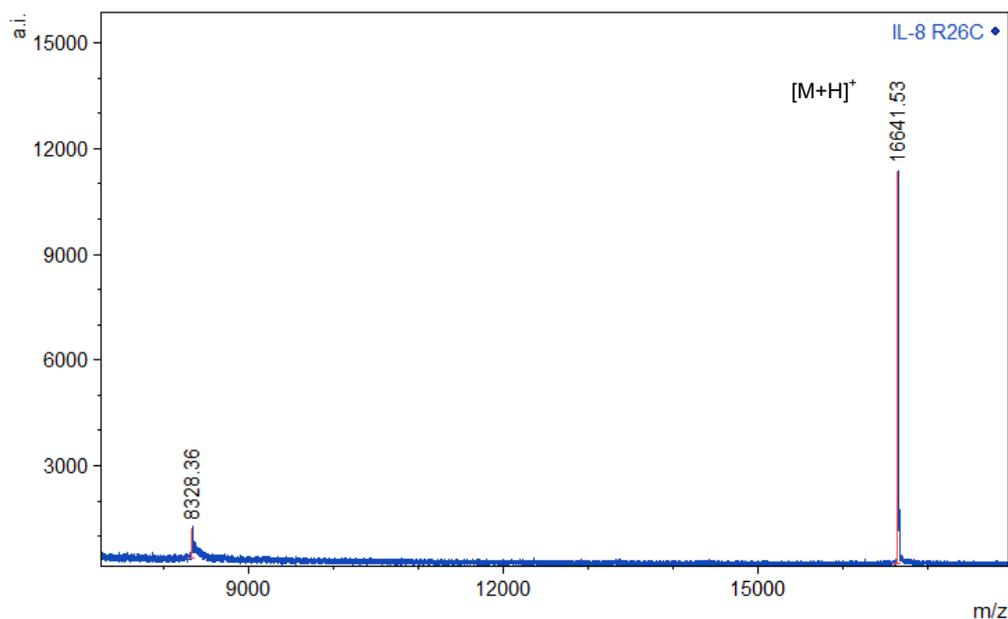
Zur weiteren Charakterisierung der CXCL8-Varianten wurden MALDI-TOF-MS Spektren in der Matrix 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) aufgenommen. Auch dadurch konnte bestätigt werden, dass die Variante CXCL8 R26C (**4**) vorwiegend als Dimer vorliegt. Bei der Monomervariante CXCL8-VPEP (**5**) zeigten sich kleine Mengen des Dimers ähnlich wie beim Wildtyp (**3**). Die MALDI-TOF-MS Spektren der IL-8-Varianten sind in den **Abbildungen 4-4 bis 4-6** gezeigt.



**Abbildung 4-4:** MALDI-TOF-MS-Spektrum von CXCL8wt (**3**) (Matrix: DHAP). Der Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  für das Monomer ist bei der erwarteten Masse von 8383 g/mol zu erkennen. Es liegt zusätzlich ein geringer Anteil der dimeren Form des Chemokins vor.



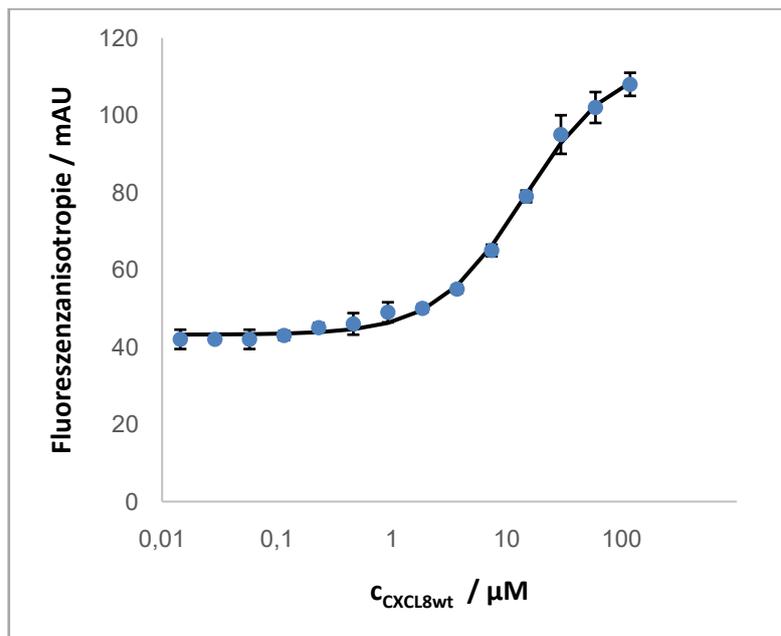
**Abbildung 4-5:** MALDI-TOF-MS-Spektrum von CXCL8 V27P/E29P (**5**) (Matrix: DHAP). Der Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  für das Monomer ist bei der erwarteten Masse von 8347 g/mol zu erkennen. Es liegt zusätzlich ein geringer Anteil der dimeren Form des Chemokins vor.



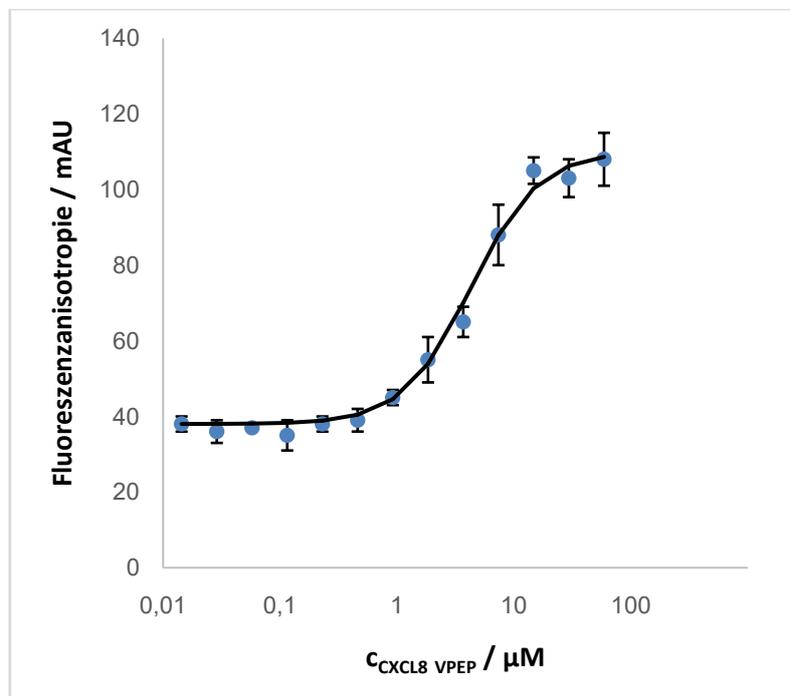
**Abbildung 4-6:** MALDI-TOF-MS-Spektrum von CXCL8 R26C (**4**) (Matrix: DHAP). Der Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  für das Dimer ist bei der erwarteten Masse von 16641 g/mol zu erkennen. Es liegt zusätzlich ein geringer Anteil der monomeren Form des Chemokins vor.

#### 4.1.2 Bindungsstudien mit dem *site I*-Peptid CXCR1-p1 (**1**)

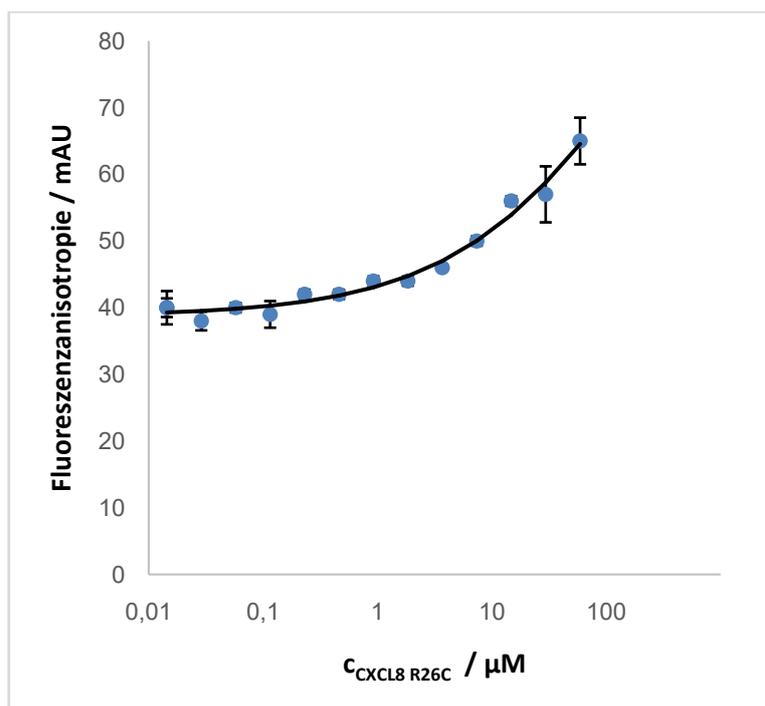
In der Literatur ist beschrieben, dass direkt aus dem N-Terminus des Rezeptors CXCR1 (*site I*) abgeleitete Peptide mit einer deutlich höheren Affinität an monomere Varianten von CXCL8 binden, als an Dimervarianten.[42, 64, 70, 76, 78] Durch die Dimerisierung wird offenbar ein Teil der Bindestelle für den N-Terminus des Rezeptors verdeckt. Für das verkürzte, von Attwood *et al.* beschriebene *site I*-Peptid CXCR1-p1 (**1**) wird ein entsprechendes Bindungsverhalten erwartet. Da im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Fluoreszenzanisotropie-Messung zur Bestimmung des Bindevhaltens der Peptide an CXCL8 eingesetzt wurde, wird eine fluoreszenzmarkierte Variante des Peptids CXCR1-p1 (**1**) benötigt. Das Peptid Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) wurde nach einem Standardprotokoll für die Fmoc-Peptidfestphasensynthese hergestellt und am N-Terminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein markiert (siehe Kapitel 6.3.3). Anschließend wurden Fluoreszenzanisotropie-Messungen von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) mit dem Wildtyp CXCL8wt (**3**), der Monomer-Variante CXCL8 VPEP (**5**) und der Dimer-Variante CXCL8 R26C (**4**) durchgeführt. Die entsprechenden Bindungsisothermen sind in den **Abbildungen 4-7 bis 4-9** gezeigt.



**Abbildung 4-7:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) (20 nM) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 14,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-8:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) (20 nM) an CXCL8 VPEP (**5**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 4,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-9:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) (20 nM) an CXCL8 R26C (**4**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es kann eine Dissoziationskonstante von  $K_D > 120 \mu\text{M}$  angenommen werden, da bei der Bindung keine Sättigung erreicht wird.

Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) bindet mit einer deutlich höheren Affinität an die monomere-Variante CXCL8 VPEP (**5**) als an die dimere-Variante CXCL8 R26C (**4**). Für die Bindung an das Dimer wurde zwar ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen, jedoch wurde im verwendeten Konzentrationsbereich des Chemokins keine Sättigung erreicht und somit kann lediglich eine Dissoziationskonstante im oberen mikromolaren Bereich,  $> 120 \mu\text{M}$ , abgeschätzt werden. Dieser Wert liegt jedoch in etwa in der gleichen Größenordnung wie die mit Hilfe von NMR-Studien bestimmte Dissoziationskonstante für die Bindung eines aus den ersten 24 Aminosäuren des Rezeptors CXCR1 bestehenden Peptids (24mer) an die dimere-Variante CXCL8 R26C (**4**). Hierfür wurde eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 172 \pm 24 \mu\text{M}$  bestimmt.[186] Bei solchen Vergleichen ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Pufferzusammensetzung, insbesondere die Salzkonzentration aber auch der pH-Wert, einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion zwischen Chemokin und Rezeptorpeptid hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit den CXCL8-Varianten in Puffer C bei pH 7,5 durchgeführt. Dieser Puffer enthält neben 40 mM Phosphat auch 35 mM Natriumchlorid (NaCl). Insbesondere der Gehalt an NaCl im Puffer wirkt sich negativ auf die Bindung aus. So wurde in NMR-Studien für die Bindung eines 21 Aminosäuren langen N-terminalem Rezeptorpeptids (21mer) von CXCR1 an die monomere Variante CXCL8 VPEP (**5**) gezeigt, dass sich durch den Zusatz von 150 mM NaCl zum zuvor verwendeten Phosphatpuffer ohne

---

NaCl, in dem eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 43 \pm 10 \mu\text{M}$  bestimmt werden konnte, die Affinität für die monomere-Variante von CXCL8 in etwa um die Hälfte verringert.[186] Das 21mer bildet die gleiche Aminosäuresequenz des N-Terminus von CXCR1 ab wie das *site I*-Peptid CXCR1-p1 (**1**), mit der Ausnahme dass die Aminosäuren in der Mitte der Sequenz (LNFTG) nicht durch einen Ahx-Linker ersetzt wurden. In den hier durchgeführten Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit einer fluoreszenzmarkierten Variante des Peptids Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) in Puffer C konnte eine 10fach geringere Dissoziationskonstante von  $K_D = 4,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$  für die Bindung an die monomere-Variante CXCL8 VPEP (**5**) bestimmt werden als für das 21mer in reinem Phosphatpuffer. Grundsätzlich würde, auf Basis der oben beschriebenen Ergebnisse, jedoch durch den in Puffer C enthaltenen, geringen Anteil an NaCl eine schlechtere Bindung erwartet. Schon Attwood *et al.* konnten jedoch zeigen, dass durch den Austausch der Sequenz LNFTG gegen einen Ahx-Linker die Affinität für CXCL8 erhöht werden kann.[126] Eine weitere Ursache für den Unterschied der gemessenen Dissoziationskonstanten für die Bindung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) und das 21mer an CXCL8 VPEP (**5**) könnte auch in den unterschiedlichen verwendeten Messmethoden liegen. Die hier bestimmte Affinität des verkürzten fluoreszenzmarkierten Peptids Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) liegt im gleichen Bereich, wie diejenige des 29mers, einem längeren N-terminalen Rezeptorpeptid, welches die ersten 29 Aminosäuren des N-Terminus von CXCR1 abbildet und für das in reinem Phosphatpuffer mittels NMR eine Dissoziationskonstante von  $< 5 \mu\text{M}$  für die Bindung an CXCL8 VPEP (**5**) bestimmt wurde. **Tabelle 4-2** fasst die im Rahmen der Arbeit gemessenen Dissoziationskonstanten für die Bindung des *site I*-Peptids Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) an verschiedene Varianten des Chemokins CXCL8, sowie die in der Literatur beschriebenen Dissoziationskonstanten für ähnliche Rezeptorpeptide zusammen.

Für die Bindung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) an die die monomere-Variante CXCL8 VPEP (**5**) wurde eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 4,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$  bestimmt. Diese ist etwa eine Größenordnung geringer als die Dissoziationskonstante für die Bindung von Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) an den Wildtyp CXCL8wt (**3**). In der Literatur ist beschrieben, dass die Bindung von N-terminalen Peptiden des Rezeptors CXCR1 an den Wildtyp von CXCL8 mit einer Dissoziation des Dimers einhergeht.[42, 74, 186] Die höhere Dissoziationskonstante für die Bindung des Peptids an den Wildtyp CXCL8wt (**3**) weist darauf hin, dass der Wildtyp nicht vollständig dissoziiert vorliegt und die gemessene Dissoziationskonstante aus einer Überlagerung der Bindung des Peptids an das Monomer und Dimer des Wildtyps resultiert.

**Tabelle 4-2:** Vergleich der Dissoziationskonstanten für verschiedenen vom N-Terminus des CXCR1 abgeleitete Peptide an monomere und dimere Varianten des Chemokins CXCL8, sowie den Wildtyp. Zusätzlich sind auch die Messmethode und die Pufferbedingungen während der Messung angegeben.  
(FA - Fluoreszenzanisotropie; P<sub>i</sub> – Gesamtkonzentration an Phosphat)

CXCL8-Variante	CXCR1-Abschnitt	Methode	Puffer	K <sub>D</sub> / μM
CXCL8 R26C (4)	24mer	NMR	50 mM P <sub>i</sub> ; pH 7	172 ± 24 [186]
CXCL8 R26C (4)	Fluo-CXCR1-p1 (1a)	FA	40 mM P <sub>i</sub> , 35 mM NaCl; pH 7,5	>120
CXCL8 VPEP (5)	29mer	NMR	50 mM P <sub>i</sub> ; pH 7	<5 [186]
CXCL8 VPEP (5)	21mer	NMR	50 mM P <sub>i</sub> ; pH 7	43 ± 10 [186]
CXCL8 VPEP (5)	21mer	NMR	50 mM P <sub>i</sub> , 150 mM NaCl; pH 7	118 ± 14 [186]
CXCL8 VPEP (5)	Fluo-CXCR1-p1 (1a)	FA	40 mM P <sub>i</sub> , 35 mM NaCl; pH 7,5	4,3 ± 0,2
CXCL8wt (3)	Fluo-CXCR1-p1 (1a)	FA	40 mM P <sub>i</sub> , 35 mM NaCl; pH 7,5	14,1 ± 1,4

Die hier gemessenen Dissoziationskonstante von K<sub>D</sub> = 14,1 ± 1,4 μM für die Bindung des Peptids Fluo-CXCR1-p1 (1a) an den Wildtyp CXCL8wt (3) weicht vom in der Literatur angegebenen Wert der Inhibitionskonstante von K<sub>i</sub> = 7 μM für die Inhibition der Bindung von CXCL8 an die Membran von neutrophilen Granulozyten ab. Dieser Unterschied kann durch die grundlegend unterschiedlichen Messprinzipien hervorgerufen werden. Der K<sub>i</sub>-Wert wird immer dann verwendet, wenn eine Bindungskonstante durch eine Inhibitionskinetik gemessen wird, während der K<sub>D</sub>-Wert erhalten wird, wenn die Bindung direkter gemessen wird wie z.B. hier durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen. K<sub>i</sub>-Werte geben nur dann genau eine Bindungskonstante an, wenn der kinetische Mechanismus korrekt identifiziert ist.

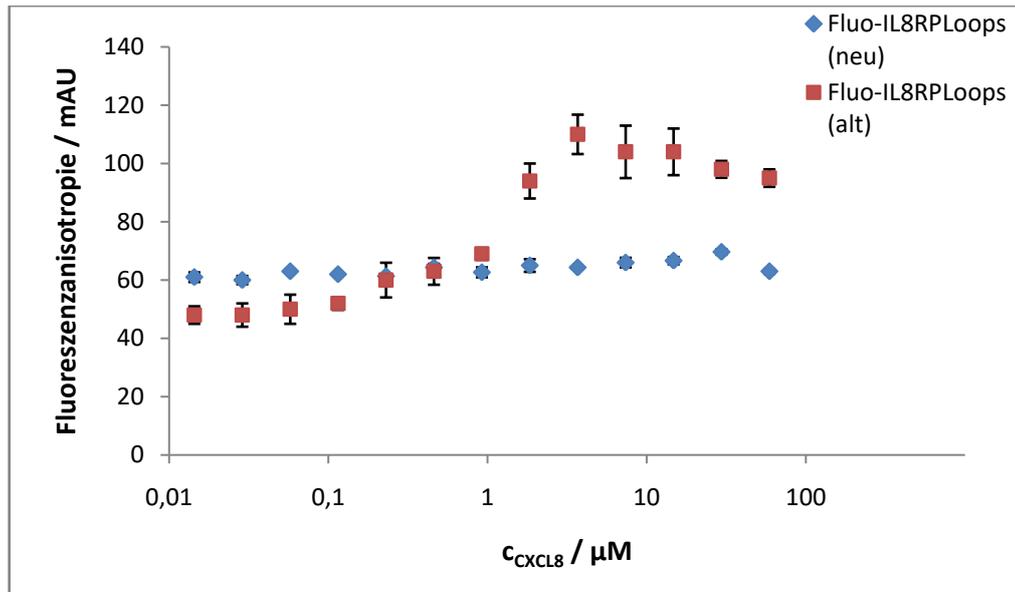
Die mit dem fluoreszenzmarkierten N-terminalen Rezeptorpeptid Fluo-CXCR1-p1 (1a) und den Mutanten CXCL8 R26C (4) und CXCL8 VPEP (5) von CXCL8 durchgeführten Fluoreszenzanisotropie-Messungen bestätigen grundsätzlich die Erwartungen. Es konnte auch für das verkürzte N-terminale Peptid CXCR1-p1 (1) eine erhöhte Affinität zum Monomer von CXCL8 gegenüber dem Dimer gezeigt werden, was auch mit Literaturberichten für andere N-terminale Rezeptorpeptide übereinstimmt.

---

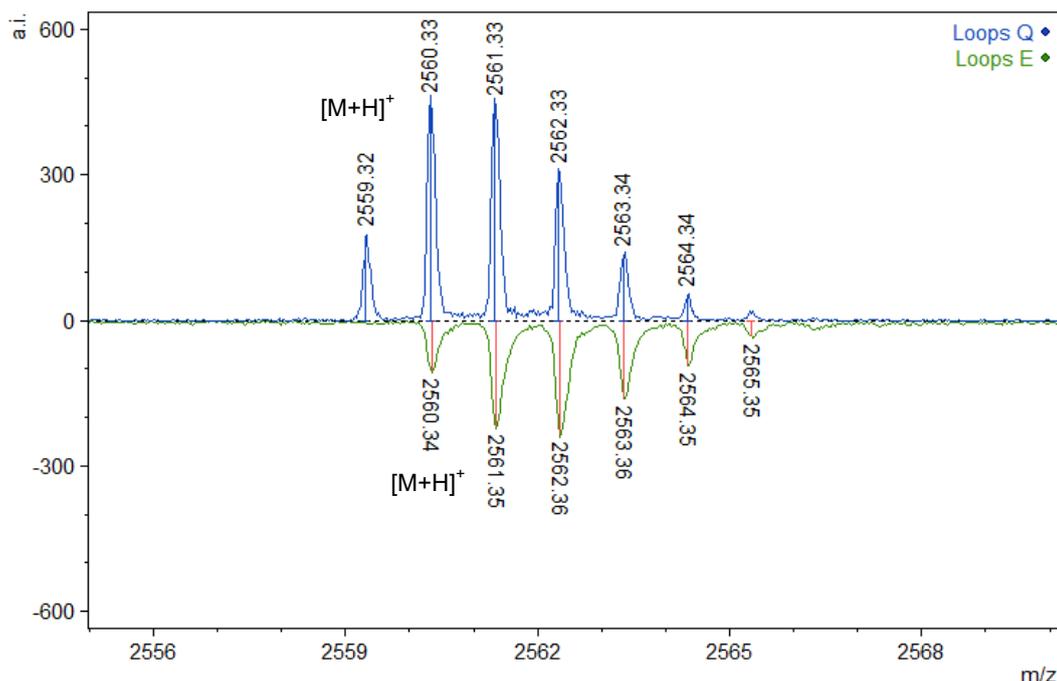
### 4.1.3 Bindungsstudien mit dem *site II*-Peptids IL8RPLoops (2)

Die Bindung an die *site II* Bindestelle des Rezeptors CXCR1 wird durch das N-terminale ELR-Motiv von CXCL8 vermittelt. Da der N-Terminus des Chemokins sowohl im Monomer, als auch im Dimer frei zugänglich ist, wird für die Bindung des *site II*-Peptids IL8RPLoops (2) an monomere- und dimere Varianten von CXCL8 eine ähnliche Affinität erwartet.

Von Helmer *et al.* konnte mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen eine Dissoziationskonstante für die Bindung einer am N-Terminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Variante des *site II*-Peptids Fluo-IL8RPLoops (2a) an den Wildtyp CXCL8wt (3) im oberen nanomolaren Bereich bestimmt werden.[127] Nach erneuter Synthese des fluoreszenzmarkierten Peptids Fluo-IL8RPLoops (2a) im Arbeitskreis konnte jedoch in Fluoreszenzanisotropie-Messungen keine Bindung an CXCL8wt (3) mehr nachgewiesen werden. Messungen, die mit einer alten Probe des Peptids Fluo-IL8RPLoops (2a) aus Dorothea Helmers Arbeit durchgeführt wurden, konnten jedoch die ursprünglichen Ergebnisse bestätigen (siehe **Abbildung 4-10**). Um dem unterschiedlichen Bindeverhalten der alten Probe von Fluo-IL8RPLoops (2a) und dem resynthetisierten Peptid auf den Grund zu gehen wurden in Zusammenarbeit mit Boris Kühl am Institut für funktionelle Grenzflächen des KIT MALDI-TOF-MS-Messungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass zwischen den beiden Peptiden ein Massenunterschied von einem g/mol liegt siehe **Abbildung 4-11**. Da beide Peptide als Amid vom Harz abgespalten wurden, kann die Massendifferenz nicht durch den Unterschied zwischen freiem Carboxylat und Amidgruppe am N-Terminus erklärt werden. Bei genauerer Betrachtung der Sequenz ist es naheliegend, dass statt eines Glutaminrestes (Q) ein Glutamatrest (E) in der Sequenz enthalten ist, wodurch der Massenunterschied von genau einem g/mol erklärt werden kann. Eine Sequenzierung der alten Probe mittels MALDI-TOF-MS/MS konnte leider nicht erreicht werden, da die Fragmentierung wahrscheinlich durch die N-terminale Fluoreszenzmarkierung verhindert wurde. Eine mögliche Erklärung für das Vorliegen eines Glutamatrestes statt eines Glutaminrestes in der Sequenz könnte das Auftreten einer direkten, sequenzunabhängigen Desamidierung von Glutamin sein. [187]

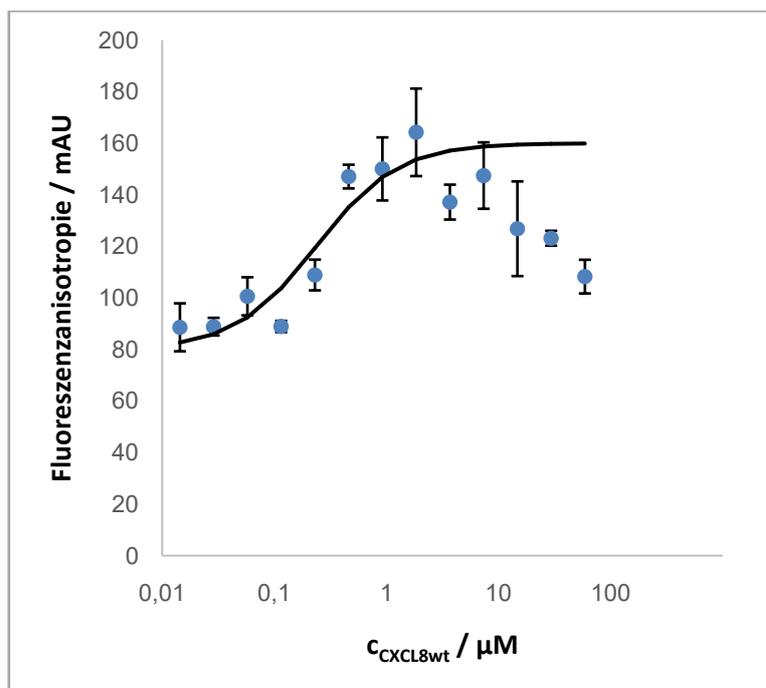


**Abbildung 4-10:** Fluoreszenzanisotropie-Messungen einer alten und einer neuen Probe von Fluo-IL8RPLoops (**2a**) (je 20 nM) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Im Gegensatz zum resynthetisierten Peptid (blau) zeigt die Probe aus Dorothea Helmers Arbeit (rot) des Peptids Fluo-IL8RPLoops (**2a**) eine Bindung an den Wildtyp von CXCL8.



**Abbildung 4-11:** Gegenüberstellung der MALDI-TOF-MS-Spektren einer alten (unten, grün) und einer neuen Probe (oben, blau) von Fluo-IL8RPLoops (**2a**). Der Massenunterschied beträgt genau 1 g/mol. Da beide Peptide als Amid vom Harz abgespalten wurden und damit beide amidierete C-Termini haben, liegt es bei genauerer Betrachtung der Sequenz nahe, dass statt eines Glutaminrestes (Q) ein Glutamatrest (E) in der Sequenz enthalten ist, wodurch der Massenunterschied von genau einem g/mol erklärt werden kann. Für das Peptid Fluo-IL8RPLoopsQ (**7a**) (oben, blau) kann eine monoisotopische Masse von 2558,6 g/mol berechnet werden. Damit wird ein Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  von 2559,6 g/mol erwartet. Für das Peptid Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) (unten, grün) kann eine monoisotopische Masse von 2559,6 g/mol berechnet werden. Damit wird ein Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  von 2560,6 g/mol erwartet. Die erwarteten Massen für die Molekülionenpeaks  $[M+H]^+$  stimmen mit den gemessenen Massen überein.

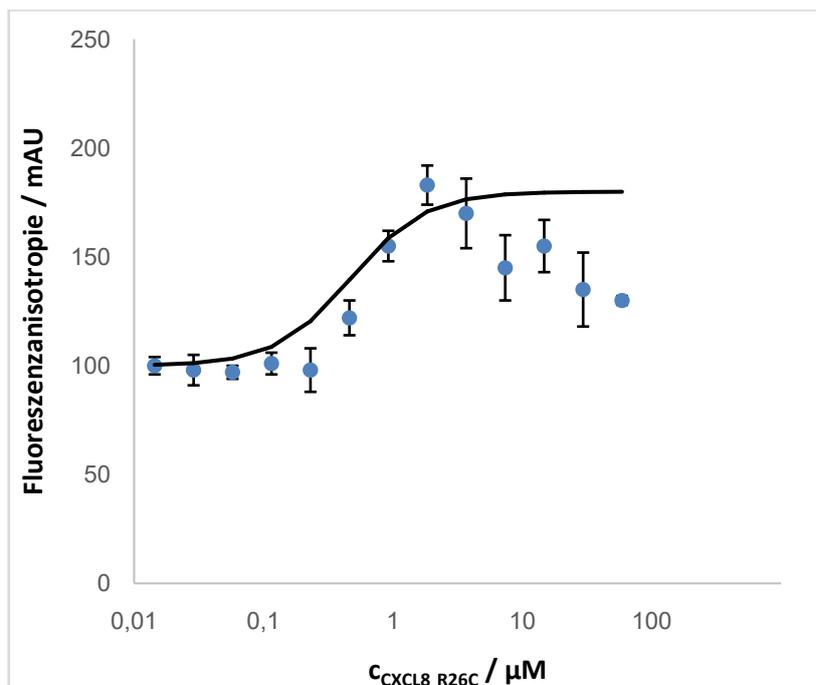
Nach erneuter Synthese des Peptids IL8RPLoops (**2**), diesmal mit der C-terminalen Aminosäure Glutamat (Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**)), konnte mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen wieder eine Bindung an CXCL8wt (**3**) gezeigt werden. Die Bindungsisotherme ist in **Abbildung 4-12** gezeigt. Die Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$  entspricht im Rahmen der Messungenauigkeiten dem Literaturwert von  $K_D = 0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . [127]



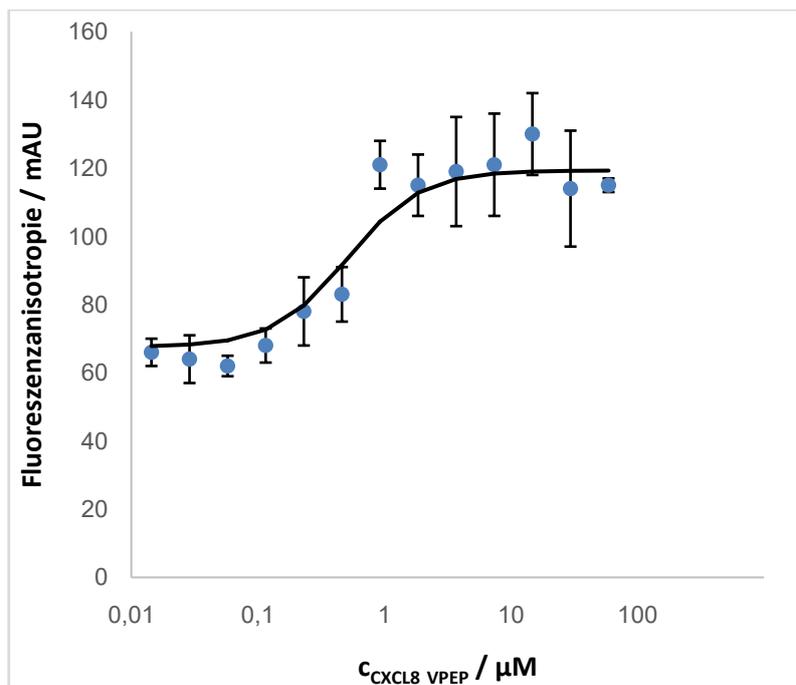
**Abbildung 4-12:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) (20 nM) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ .

Die Bindungsisotherme der Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C weist einen ungewöhnlichen Verlauf auf, da die Fluoreszenzanisotropie-Werte bei hohen Konzentrationen von CXCL8wt (**3**) stark absinken und beinahe wieder den Ausgangswert erreichen. Dieses Verhalten konnte bereits in früheren Messungen von Dorothea Helmer beobachtet werden und wurde als Folge der Dimer-Dissoziation des Wildtyps CXCL8wt (**3**) und der Bindung von Fluo-IL8RPLoops (**2a**) an das Monomer und das Dimer von CXCL8 mit verschiedenen Affinitäten zurückgeführt. Es wurde angenommen, dass Fluo-IL8RPLoops (**2a**) ebenso wie das N-terminale Rezeptorpeptid mit hoher Affinität an das Monomer von CXCL8 bindet und bei steigender CXCL8-Konzentration der Anteil an Dimer zunimmt, zu dem das Peptid wiederum eine niedrige Affinität aufweist. [188] Dies stünde jedoch im Widerspruch zum Bindemechanismus, demzufolge von einer ähnlichen Affinität für die *site II* Bindung monomerer und dimerer Varianten von CXCL8

auszugehen ist, da das N-terminale ELR-Motiv von CXCL8 sowohl im Monomer, als auch im Dimer frei zugänglich ist. Um diese Hypothesen zu überprüfen wurden Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) mit der dimeren Variante CXCL8 R26C (**4**) und der monomeren Variante CXCL8 VPEP (**5**) durchgeführt (siehe **Abbildung 4-13** und **Abbildung 4-14**).



**Abbildung 4-13:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) (20 nM) an CXCL8 R26C (**4**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-14:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) (20 nM) an CXCL8 VPEP (**5**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoide Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ .

Sowohl für die Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) an das Dimer CXCL8 R26C (**4**), als auch an das Monomer CXCL8 VPEP (**5**) können Bindungsisothermen abgeleitet werden, aus denen Dissoziationskonstanten bestimmt werden können, die im Rahmen der Messungenauigkeiten der Dissoziationskonstante für die Bindung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) an den Wildtyp entsprechen. (siehe **Tabelle 4-3**)

**Tabelle 4-3:** Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten für die Bindung von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) an die verschiedenen Varianten von CXCL8. Die von Helmer *et al.* bestimmte Dissoziationskonstante beträgt  $K_D = 0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . [127]

(FA - Fluoreszenzanisotropie;  $P_i$  – Gesamtkonzentration an Phosphat)

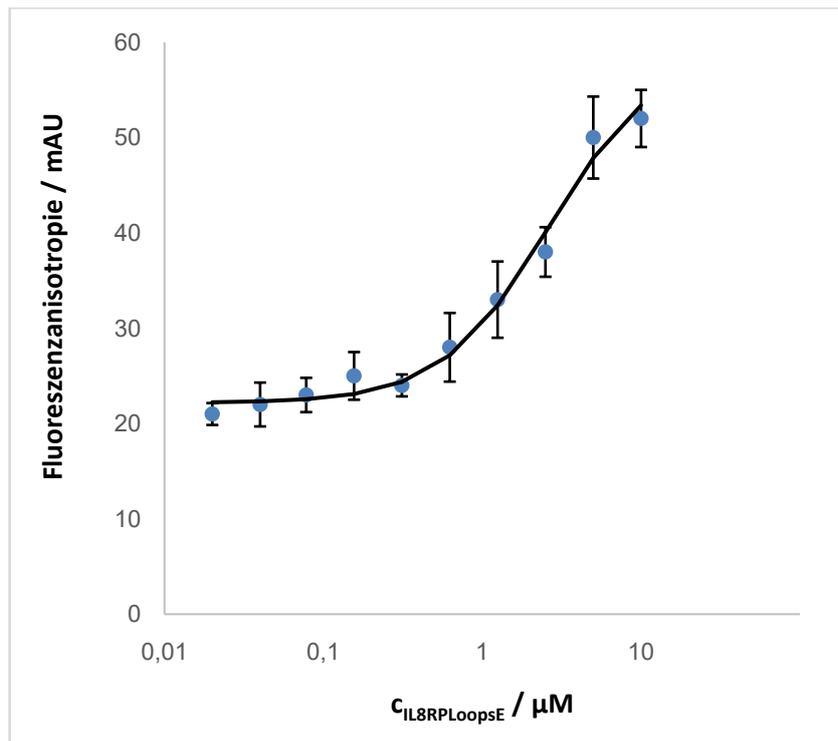
CXCL8-Variante	CXCR1-Abschnitt	Methode	Puffer	$K_D / \mu\text{M}$
CXCL8wt ( <b>3</b> )	Fluo-IL8RPLoopsE ( <b>8a</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$0,3 \pm 1,6$
CXCL8 R26C ( <b>4</b> )	Fluo-IL8RPLoopsE ( <b>8a</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$0,9 \pm 1,4$
CXCL8 VPEP ( <b>5</b> )	Fluo-IL8RPLoopsE ( <b>8a</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$0,5 \pm 0,9$

---

Durch die gemessenen Bindungsisothermen und daraus bestimmten Dissoziationskonstanten kann die Hypothese von Dorothea Helmer, dass der Abfall der Fluoreszenzanisotropie bei hohen Konzentrationen an CXCL8 auf einer geringeren Affinität von Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) für das Dimer beruht nicht bestätigt werden. Dafür konnte gezeigt werden, dass das *site II* Rezeptorpeptid Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) die Monomer-Variante und die Dimer-Variante von CXCL8 mit ähnlicher Affinität bindet, wodurch die Hypothese der freien Zugänglichkeit des N-Terminus von CXCL8 unabhängig vom Dimerisierungszustand gestützt werden kann.

Eine mögliche Erklärung für das Absinken der Fluoreszenzanisotropie-Werte bei hohen Konzentrationen von CXCL8 könnten Quenching Effekte sein, die durch die Bindung des Peptids an CXCL8 auftreten. Mit Hilfe der Dandliker-Korrektur[189] könnten die Bindungsisothermen um diese Effekte bereinigt werden. In den Rohdaten der Fluoreszenzintensität ist jedoch eine starke Streuung enthalten, so dass auch mit der Dandliker-Korrektur keine aussagekräftigen Werte erhalten werden können. In den Rohdaten der Fluoreszenzintensität ist jedoch eine starke Streuung enthalten, so dass auch mit der Dandliker-Korrektur keine aussagekräftigen Werte erhalten werden können. Interessanterweise konnte auch schon in den Fluoreszenzintensitäts-Messungen von Dorothea Helmer eine starke Streuung beobachtet werden. Für zukünftige Studien mit dem *site II* Peptid wäre eine markierungsfreie Methode zur Bindungsbestimmung essenziell. Versuche Bindungsstudien mit dem IL8RP-Loops-Peptid und <sup>15</sup>N-markiertem CXCL8 auf der Basis von NMR-Experimenten durchzuführen scheiterten an der schlechten Löslichkeit des Peptid-Protein-Komplexes, der bei NMR-Studien in verhältnismäßig hoher Konzentration benötigt wird.

Da das ELR-Motiv am N-Terminus des Chemokins CXCL8 maßgeblich an der *site II* Wechselwirkung mit dem Rezeptor CXCR1 beteiligt ist, wurde untersucht ob zwischen dem unmarkierten *site II* Rezeptorpeptid IL8RPLoopsE (**8**) und einem kurzen, fluoreszenzmarkierten N-terminalen Peptid von CXCL8 (Fluo-CXCL8 1-10 (**6a**)), welches das ELR-Motiv enthält, eine Bindung mittels Fluoreszenzanisotropie-Messung nachgewiesen werden kann. Die Bindungsisotherme ist in **Abbildung 4-15** gezeigt. Dass die Dissoziationskonstante für die Bindung dieses aus den ersten 10 Aminosäuren des N-Terminus von CXCL8 abgeleiteten Peptids an das *site II* Peptid IL8RPLoopsE (**8**) mit etwa 7  $\mu$ M deutlich höher liegt als die Dissoziationskonstante für die Bindung zwischen dem *site II* Peptid und dem vollständigen Chemokin CXCL8 lässt vermuten, dass neben dem ELR-Motiv am N-Terminus des Chemokins weitere Bereiche von CXCL8 an der *site II* Rezeptorbindung beteiligt sind.



**Abbildung 4-15:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-CXCL8 1-10 (**6a**) (50 nM) an IL8RPLoopsE (**8**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) gefittet. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 7,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ .

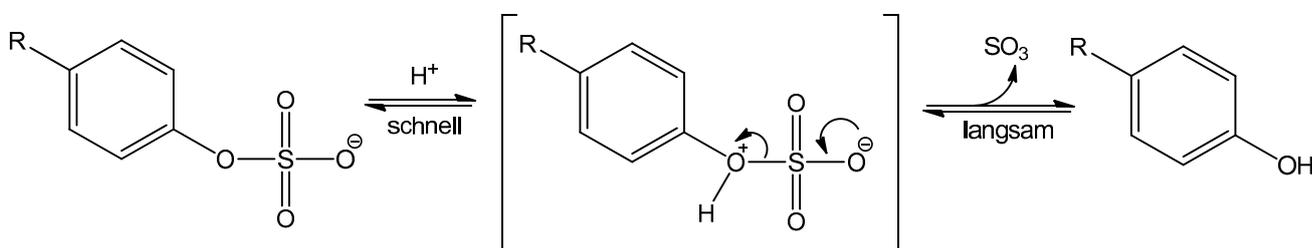
## 4.2 Ein sulfatiertes Bindepeptid für CXCL8

Für einige Chemokinrezeptoren ist bekannt, dass sie am N-Terminus posttranslational durch das Enzym Tyrosylproteinsulfotransferase (TPST) modifiziert werden.[21] Durch diese Tyrosinsulfatierung erhöht sich zum einen die Affinität des Chemokins zum Rezeptor, zum anderen dient diese auch der Beeinflussung der Selektivität des Rezeptors für bestimmte Chemokine.[20] Basierend auf NMR-Studien haben Volkman *et al.* sogar die Existenz einer konservierten Bindetasche zwischen der N-Schleife und dem  $\beta_3$ -Strang für die Sulfotyrosinbindung innerhalb der Chemokinfamilie vorgeschlagen.[65, 190]

Sequenzanalysen mit dem Sulfosite-Algorithmus ergaben für CXCR1 eine 92 %ige Wahrscheinlichkeit, dass der Tyrosinrest an Position 27 des N-Terminus sulfatiert vorliegt.[67] Außerdem konnte in NMR-Titrationsexperimenten eine Bindung von Sulfotyrosin an CXCL8 nachgewiesen werden.[65] Das von Attwood *et al.* [126] beschriebene N-terminale Rezeptorpeptid CXCR1-p1 enthält in seiner Sequenz das im Rezeptor an Position 27 vorkommende Tyrosin. Auf Grundlage der oben genannten Ergebnisse wurde das Peptid CXCR1-p1 in seiner sulfatierten Form (sY-CXCR1-p1 (**9**)) hergestellt und in Fluoreszenzanisotropie-Messungen untersucht, ob das Peptid in sulfatierter Form eine höhere Affinität zu CXCL8 aufweist.

### 4.2.1 Synthese, Reinigung und Charakterisierung von sY-CXCR1-p1 (**9**)

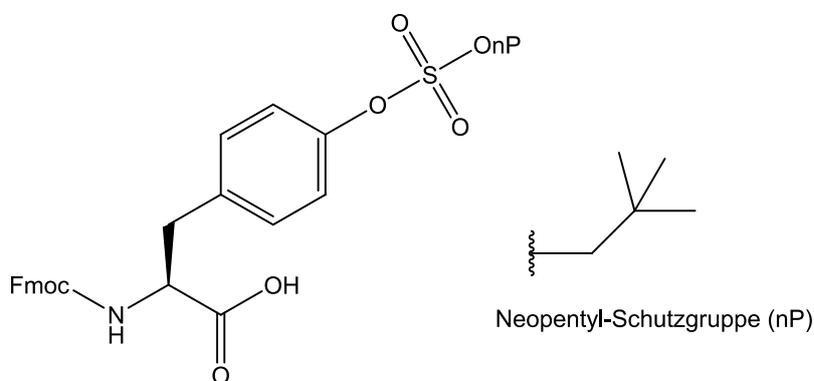
Die Synthese von sulfatierten Peptiden stellt aufgrund der Labilität des Tyrosinsulfatmonoesters, insbesondere gegenüber Säuren, eine Herausforderung dar. Die Hydrolyse des Tyrosinsulfatmonoesters unter sauren Bedingungen ist in **Schema 4-1** dargestellt. Diese Instabilität muss bei allen Synthese-, Reinigungs- und Analyseschritten berücksichtigt werden.



**Schema 4-1:** Hydrolyse eines Tyrosinsulfatmonoesters unter sauren Bedingungen.

Während der Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese herrschen zwar basische Bedingungen, jedoch findet die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren unter stark sauren

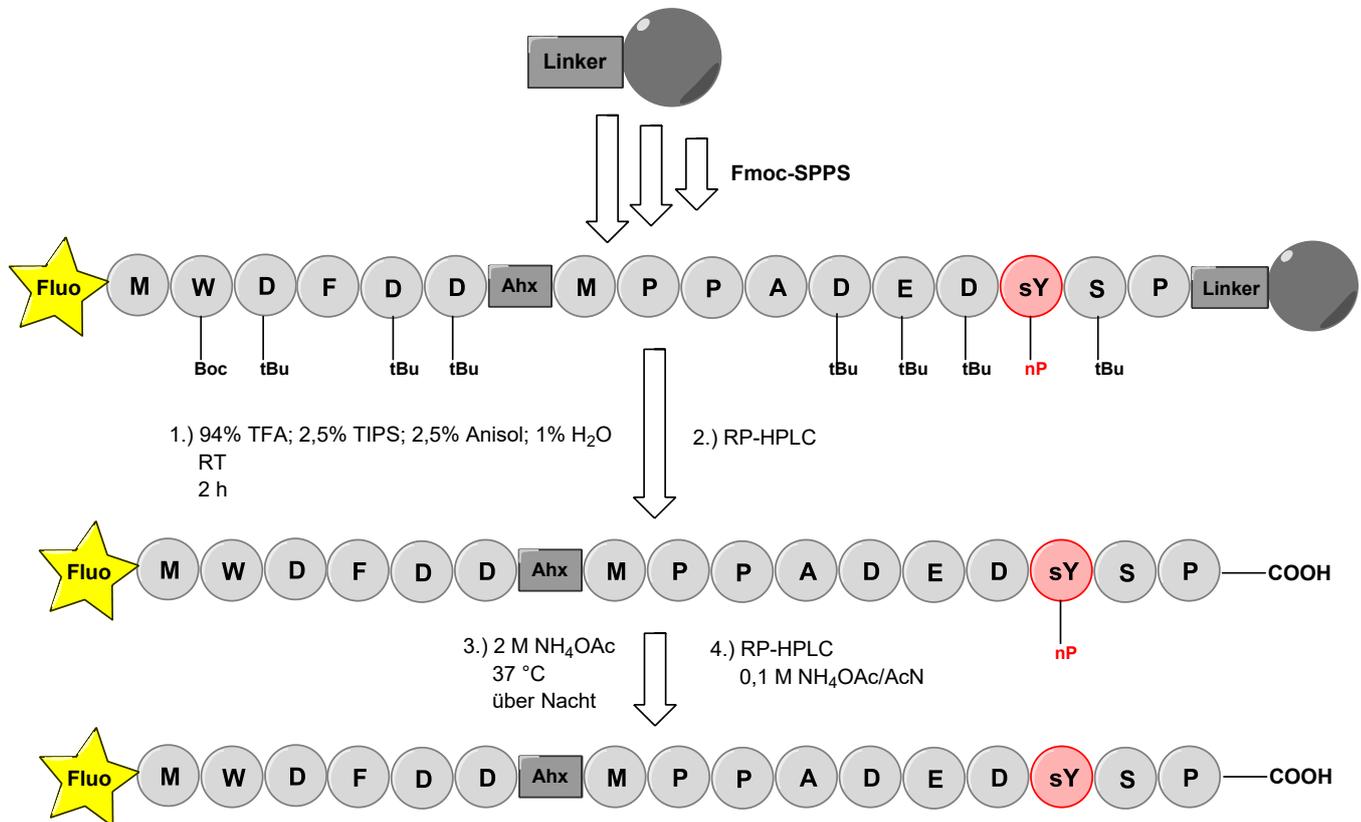
Bedingungen statt, so dass eine geeignete orthogonale Schutzgruppe für den Tyrosinsulfatmonoester gefunden werden muss. Diese Schutzgruppe muss sowohl unter basischen, als auch unter sauren Bedingungen stabil sein. Eine Schutzgruppe die diese Bedingungen erfüllt ist die Neopentyl-Schutzgruppe (siehe **Abbildung 4-16**). Sie ermöglicht die Synthese von sulfatierten Peptiden mit den Standardprotokollen für die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese und ist ausreichend stabil gegenüber Trifluoressigsäure (TFA), sodass eine Hydrolyse des Tyrosinsulfatmonoesters während der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen verhindert wird. Abgespalten wird die Neopentyl-Schutzgruppe mit Hilfe von kleinen, starken Nucleophilen wie Azid- oder Cyanidionen oder unter milderen Bedingungen mit Ammoniumacetat.[19, 191]



**Abbildung 4-16:** Neopentyl-Schutzgruppe für Tyrosinsulfatmonoester (rechts) und neopentyl-geschützter Tyrosinsulfatester-Baustein für die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese (links).

Der in **Abbildung 4-16** gezeigte neopentyl-geschützte Tyrosinsulfatester-Baustein für die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese ist kommerziell erhältlich und auch im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem gekauften Baustein gearbeitet. **Schema 4-2** zeigt die Synthesestrategie für das sulfatierte Peptid sY-CXCR1-p1. Zunächst wird das Peptid nach Standardprotokoll für die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung des neopentyl-geschützter Tyrosinsulfatester-Bausteins auf 2-Chlorotrytylchlorid Harz synthetisiert. Um später Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchführen zu können wird das Peptid am N-Terminus mit einem Fluorophor markiert. Als Fluorophor wurde hier zum einen 5-(6)Carboxyfluorescein (Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**)) und zum anderen 5-(6) Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA-sY-CXCR1-p1 (**9b**)) verwendet. Anschließend erfolgt die simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptides vom Harz unter stark sauren Bedingungen. Der Tyrosinsulfatester bleibt dabei durch die Neopentyl-Schutzgruppe vor Hydrolyse geschützt. Die Einwirkzeit der Abspatlösung wird jedoch gegenüber dem Standardprotokoll von drei auf zwei Stunden verkürzt um einem eventuellen Verlust der Neopentyl-Schutzgruppe und einer damit

verbundenen Hydrolyse des Tyrosinsulfatesters vorzubeugen. Bevor schließlich die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt, wird das Peptid mittels RP-HPLC gereinigt. Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt dann unter milden Bedingungen mit 2 M Ammoniumacetatlösung bei 37 °C.



**Schema 4-2:** Synthesestrategie für das Peptid sY-CXCR1-p1 (9). Als Fluorophor wurde zum einen 5-(6)-Carboxyfluorescein (Fluo-sY-CXCR1-p1 (9a)) und zum anderen 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA-sY-CXCR1-p1 (9b)) verwendet.

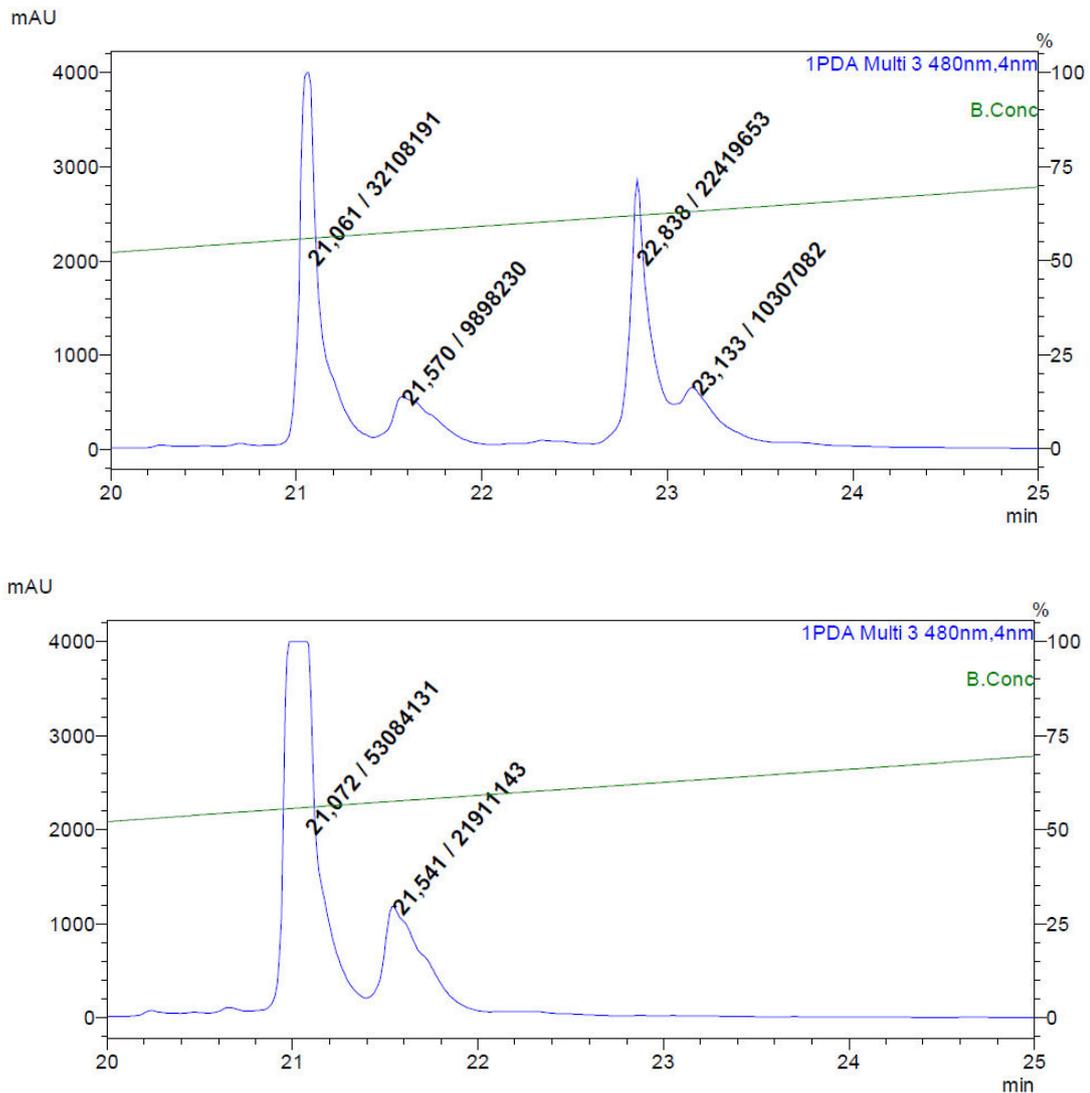
Zunächst wird das Peptid nach Standardprotokoll für die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung des neopentyl-geschützten Tyrosinsulfatester-Bausteins auf 2-Chlorotriethylchlorid Harz synthetisiert. Nach simultaner Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptides vom Harz erfolgt der erste Reinigungsschritt mit RP-HPLC unter Standardbedingungen. Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt schließlich mit 2 M Ammoniumacetatlösung. Es schließt sich ein weiterer Reinigungsschritt mittels RP-HPLC an.

Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe wurde mittels HPLC überprüft. Dabei wird mit einem linearen Gradienten von 0,1 M Ammoniumacetatlösung auf 80 % Acetonitril gearbeitet. **Abbildung 4-17** zeigt die Chromatogramme zu Beginn der Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe und nach 12 Stunden in der Abspaltlösung exemplarisch für das Fluorescein-markierte Peptid (Fluo-sY-CXCR1-p1 (9a)). Die Identität der Peaks wurde massenspektrometrisch bestimmt. Der Peak mit einer Retentionszeit von 22,8 Minuten ist dem neopentyl-geschützten Peptid zuzuordnen, der Peak

---

bei 21,1 Minuten entspricht dem entschützten Peptid und zeigt an, dass bereits nach kurzer Einwirkzeit der 2 M Ammoniumacetatlösung ein Teil des Peptids entschützt vorliegt (siehe **Abbildung 4-17-oben**). Der Peak mit einer Retentionszeit von 22,8 Minuten ist nach 12 stündiger Inkubation vollständig verschwunden, was die vollständige Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe belegt. Die Fläche des Peaks bei 21,1 Minuten hat sich erwartungsgemäß vergrößert (siehe **Abbildung 4-17-unten**). Die Chromatogramme zeigen außerdem, dass eine Verunreinigung des Peptids vorliegt, welche ebenfalls einen Neopentyl-geschützten Tyrosinsulfatester enthält. Da das Peptid im Anschluss an die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erneut mittels RP-HPLC gereinigt wird, kann die Verunreinigung hierbei abgetrennt werden. Im Anschluss an die Reinigung lag das sulfatierte Peptid in einer Mischung aus Acetonitril und Ammoniumacetatlösung vor. Im Rahmen dieser Arbeit kam es beim Gefriertrocknen des sulfatierten Peptids zur Hydrolyse des Tyrosinsulfatester, weshalb im weiteren Verlauf auf das Gefriertrocknen verzichtet wurde.

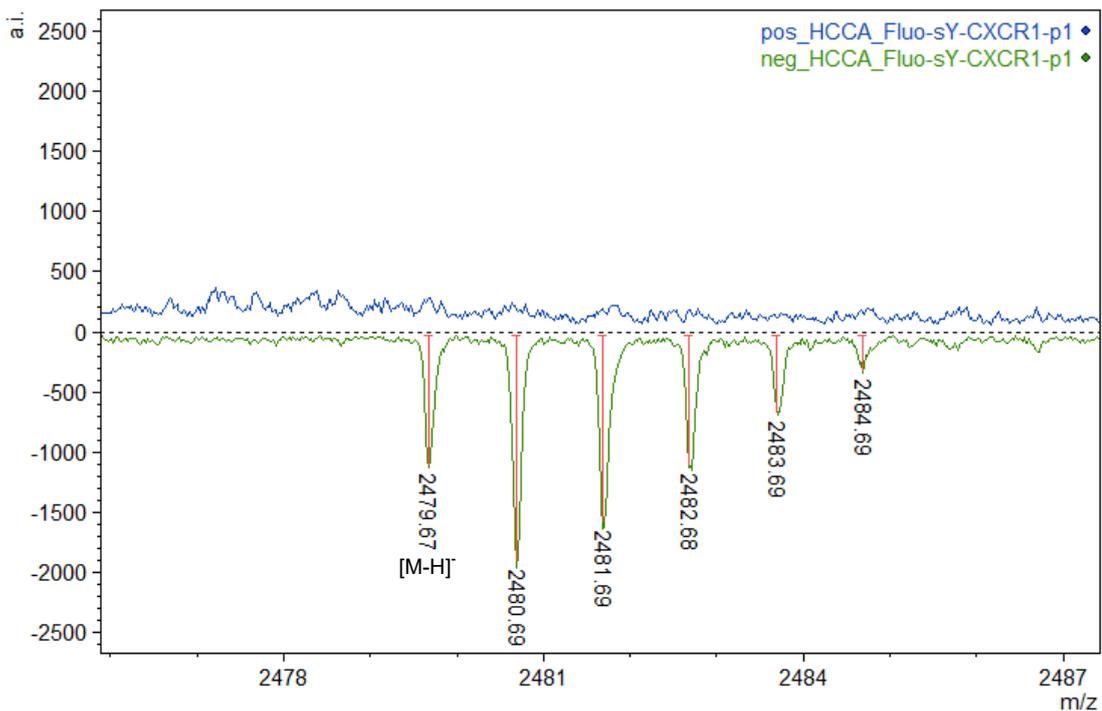
Die Labilität des Tyrosinsulfatmonoesters erschwert den Nachweis des sulfatierten Peptids mittels massenspektrometrischer Methoden. Auch bei der sehr schonenden Elektronenspray Ionisation (ESI) kann es abhängig von den experimentellen Bedingungen zum Verlust der  $\text{SO}_3$ -Gruppe kommen. Aufgrund der höheren Stabilität der deprotonierten Sulfatestergruppe wird bevorzugt der Negativionenmodus zur Bestimmung von sulfatierten Peptiden verwendet. Die Sulfatestergruppe wird im  $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ion stabilisiert.[192] Auch für das Peptid Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) gelang der Nachweis mittels MALDI-MS nur im Negativionenmodus unter Verwendung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) als Matrix (siehe **Abbildung 4-18**). Auch wenn für die Matrix HCCA aufgrund der relativ großen Energieübertragung eine stärkere Fragmentierung und somit ein Verlust der  $\text{SO}_3$ -Gruppe erwartet wurde, konnte das Peptid Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) in HCCA ebenso gut im Negativmodus nachgewiesen werden wie in der laut Literatur besser geeigneten Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB).[192, 193]



**Abbildung 4-17:** RP-HPLC Chromatogramme der Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe für das Peptid Fluo-sY-CXCR1-p1. Die blaue Linie zeigt die Absorption des Peptids bei 480 nm. Der Anteil an Acetonitril (Eluent B) ist in grün dargestellt. Die Zahlen geben die jeweilige Retentionszeit und zugehörige Peakfläche an.

**Oben:** Chromatogramm zu Beginn der Inkubation in 2 M Ammoniumacetatlösung. Der Peak mit einer Retentionszeit von 22,8 Minuten ist dem neopentyl-geschützten Peptid zuzuordnen, der Peak mit einer Retentionszeit von 21,1 Minuten dem entschützten Peptid (Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**)). Die Peaks mit den Retentionszeiten 23,1 und 21,5 Minuten lassen auf eine Verunreinigung schließen, welche ebenfalls einen nP-geschützten Tyrosinsulfatester enthält.

**Unten:** Chromatogramm nach 12 Stunden Inkubation in 2 M Ammoniumacetatlösung. Der Peak mit einer Retentionszeit von 22,8 Minuten ist vollständig verschwunden. Die Fläche des Peaks bei 21,1 Minuten hat sich vergrößert. Es ist davon auszugehen, dass die Neopentyl-Schutzgruppe vollständig abgespalten wurde.



**Abbildung 4-18:** MALDI-TOF-MS-Spektrum von Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) (Matrix: HCCA). Im Positivionenmodus ist der erwartete Molekülionenpeak  $[M+H]^+$  mit der Masse 2581 g/mol nicht zu finden. Im Negativionenmodus dagegen ist der Molekülionenpeak  $[M-H]^-$  mit der Masse 2479 g/mol dagegen gut zu erkennen.

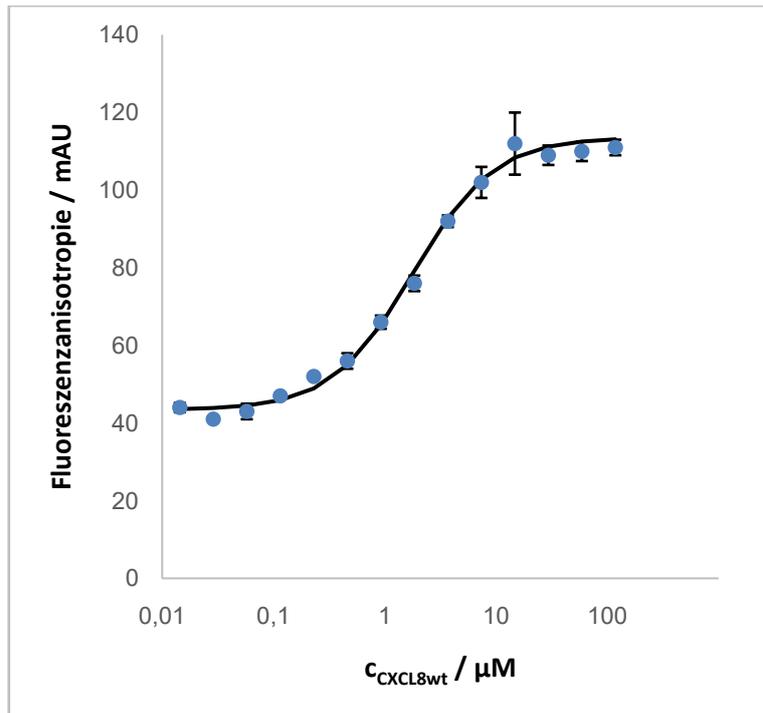
#### 4.2.2 Bindungsstudien von sY-CXCR1-p1(**9**) mit CXCL8wt (**3**)

Um zu überprüfen, ob eine Sulfatierung des Tyrosins in der Sequenz des N-terminalen Rezeptorpeptids CXCR1-p1 (**1**) einen Einfluss auf dessen Affinität zu CXCL8 hat wurden Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit dem Wildtyp von CXCL8 (CXCL8wt (**3**)) und den fluoreszenzmarkierten, sulfatierten Peptiden Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) und TAMRA-sY-CXCR1-p1 (**9b**) durchgeführt. **Abbildung 4-19** zeigt die Bindungsisotherme für die Bindung von Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) an CXCL8wt (**3**). Für die Bindung kann eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$  berechnet werden. Das nicht sulfatierte Peptid Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) bindet im Vergleich dazu mit einer Affinität von  $K_D = 14,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$  an CXCL8wt (**3**). Durch die Sulfatierung kann die Affinität zwischen dem N-terminalen Rezeptorpeptid CXCR1-p1 (**1**) und CXCL8wt (**3**) in etwa um den Faktor 10 erhöht werden (siehe **Abbildung 4-20**). Für die Bindung des reinen Sulfotyrosins an CXCL8 wurde dagegen in NMR-Titrationsexperimenten eine weit höhere Dissoziationskonstante von  $K_D = 35,2 \pm 1,95 \mu\text{M}$  bestimmt.[65] Die Affinität von Sulfotyrosin für CXCL8 wird also durch das Peptid deutlich gesteigert.

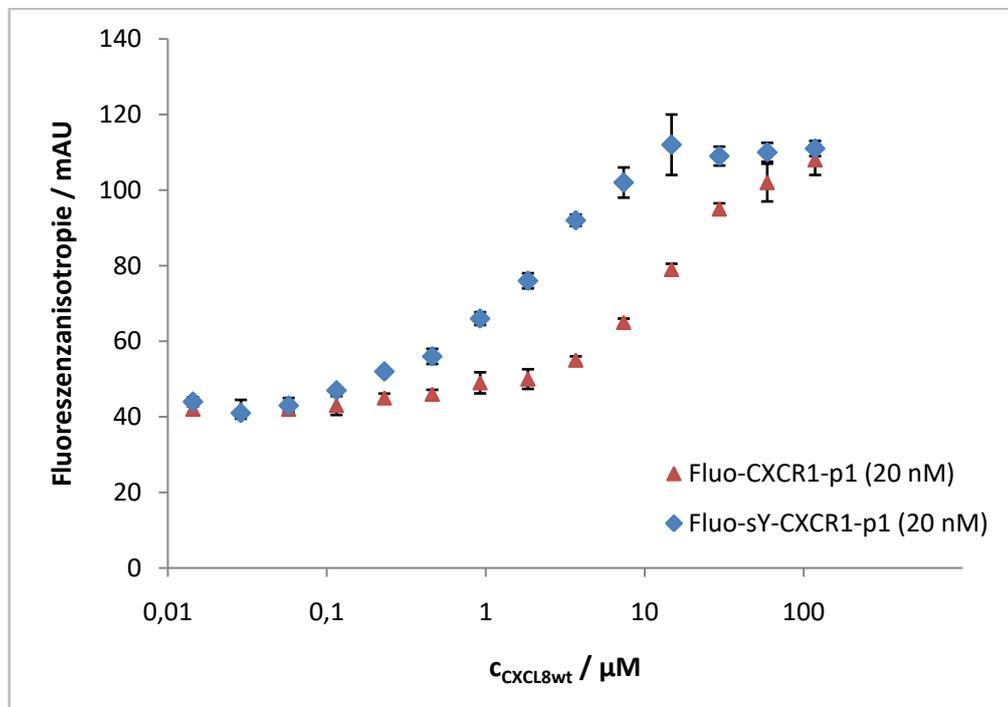
Dieses Ergebnis wird auch durch die Fluoreszenzanisotropie-Messung mit dem TAMRA-markierten sulfatierten Peptid TAMRA-sY-CXCR1-p1 (**9b**) und CXCL8wt (**3**) bestätigt. Für die Bindung wird eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$  berechnet (siehe **Abbildung 4-21**). Beim Vergleich mit dem nicht sulfatierten TAMRA-markierten Peptid wird auch hier eine Erhöhung der Affinität zu IL-8 durch Sulfatierung deutlich (siehe **Abbildung 4-22**). Für die beiden TAMRA-markierten Peptide fällt auch hier wieder die hohe Anisotropie bei niedrigen Proteinkonzentrationen auf, die auf eine geringe Beweglichkeit des Fluorophors im Peptid hinweist. **Tabelle 4-4** zeigt den Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten für die Bindung von sulfatierten und nicht sulfatierten Varianten des N-terminalen Rezeptorpeptids CXCR1-p1 (**1**) an CXCL8wt (**3**).

**Tabelle 4-4:** Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten für die Bindung von sulfatierten und nicht sulfatierten Varianten des N-terminalen Rezeptorpeptids CXCR1-p1 (**1**) an CXCL8wt (**3**). Die für die Bindung von reinem Sulfotyrosin bestimmte Dissoziationskonstante beträgt  $K_D = 35,2 \pm 1,95 \mu\text{M}$  [65]. (FA - Fluoreszenzanisotropie;  $P_i$  – Gesamtkonzentration an Phosphat)

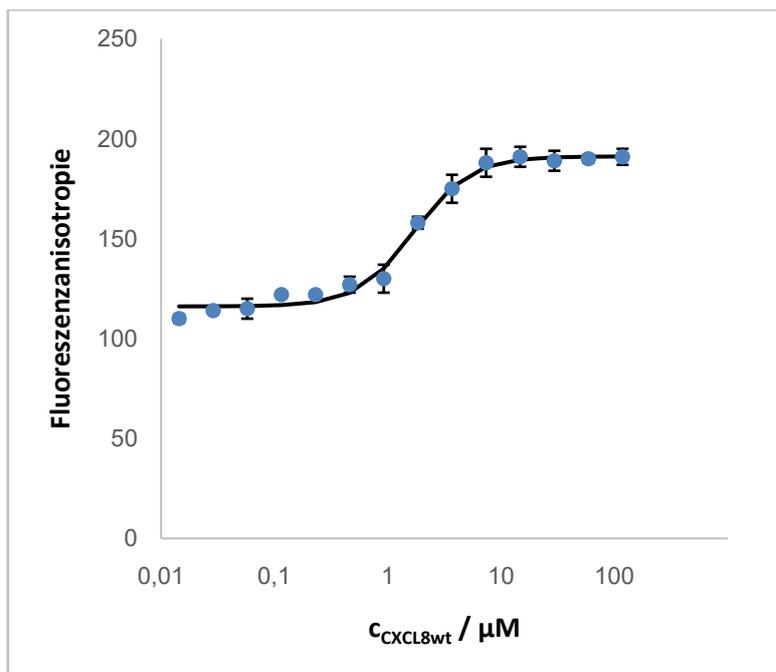
CXCL8-Variante	CXCR1-Abschnitt	Methode	Puffer	$K_D / \mu\text{M}$
CXCL8wt ( <b>3</b> )	Fluo-CXCR1-p1 ( <b>1a</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$14,1 \pm 1,4$
CXCL8wt ( <b>3</b> )	Fluo-sY-CXCR1-p1 ( <b>9a</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$1,8 \pm 0,2$
CXCL8wt ( <b>3</b> )	TAMRA-CXCR1-p1 ( <b>1b</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$28,1 \pm 9,1$
CXCL8wt ( <b>3</b> )	TAMRA-sY-CXCR1-p1 ( <b>9b</b> )	FA	40 mM $P_i$ , 35 mM NaCl; pH 7,5	$1,7 \pm 0,2$



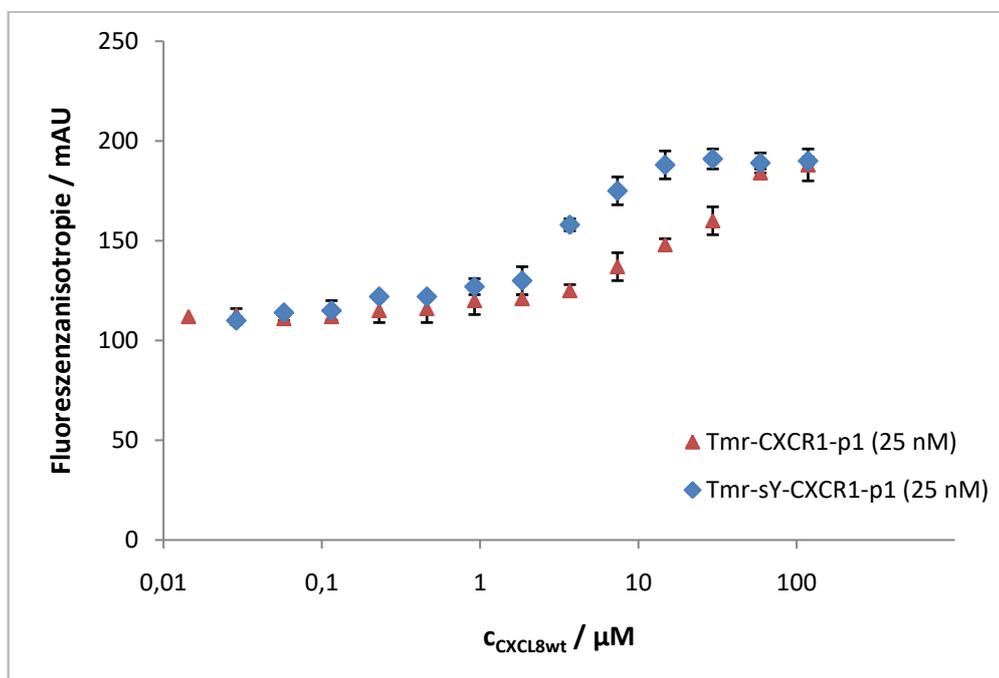
**Abbildung 4-19:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) (20 nM) an CXCL8wt in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) angenähert. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-20:** Vergleich der Bindungsisothermen von Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) (blau;  $K_D = 1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) und Fluo-CXCR1-p1 (**1a**) (rot;  $K_D = 14,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) an CXCL8wt in Puffer C. Das sulfatierte Peptid zeigt eine um den Faktor 10 höhere Affinität zu CXCL8wt als das nicht sulfatierte Peptid.



**Abbildung 4-21:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von TAMRA-sY-CXCR1-p1 (**9b**) an CXCL8wt in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) angenähert. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-22:** Vergleich der Bindungsisothermen von TAMRA(Tmr)-sY-CXCR1-p1 (**9b**) (blau;  $K_D = 1,71 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) und TAMRA(Tmr)-CXCR1-p1 (**1b**) (rot;  $K_D \approx 28,1 \pm 9,1 \mu\text{M}$ ) an CXCL8wt. Das sulfatierte Peptid zeigt eine etwa um den Faktor 24 höhere Affinität zu CXCL8wt als das nicht sulfatierte Peptid.

---

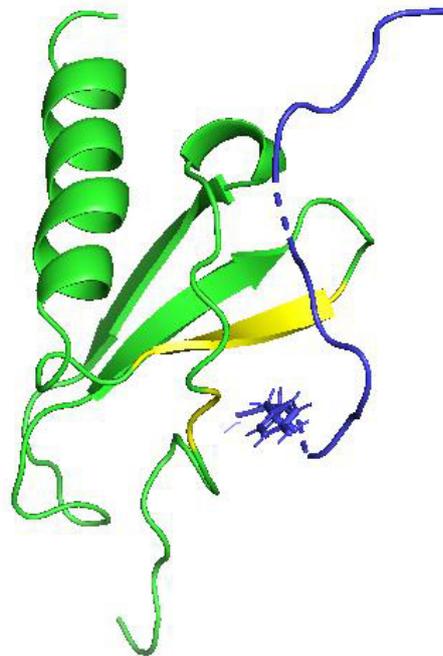
Auch für das Chemokin CXCL8 ist das Vorhandensein der Sulfotyrosin-Bindungstasche zwischen der N-Schleife und dem  $\beta_3$ -Strang wahrscheinlich.[65] **Abbildung 4-23** zeigt die aus NMR-Studien abgeleitete Struktur von CXCL8 mit einem N-terminalen Rezeptorpeptid des CXCR1. Es ist zu erkennen, dass der Tyrosin-Rest in der Nähe der vorgeschlagenen Sulfotyrosin-Bindungstasche liegt. Dies legt auch eine Sulfatierung des N-Terminus des Rezeptors CXCR1 nahe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen gezeigt werden, dass die Affinität des aus dem N-Terminus von CXCR1 abgeleiteten, sulfatierten Peptids Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) für die Bindung an CXCL8 in etwa um den Faktor 10 höher ist, als für das nicht sulfatierte Peptid Fluo-CXCR1-p1 (**1a**). Die gleiche Tendenz zeigt sich auch für das sulfatierte, TAMRA-markierte Peptid (**9b**). Dies bekräftigt die Vermutung, dass CXCR1, wie andere Chemokinrezeptoren, ebenfalls sulfatiert vorliegt. Die Bindung zwischen Chemokin und sulfatiertem Peptid ist stark von den gewählten Pufferbedingungen abhängig. Um eine Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen Bindungsstudien der nicht sulfatierten Peptide zu gewährleisten wurden die Fluoreszenzanisotropie-Messungen auch für das sulfatierte Peptid Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) in Puffer C bei pH 7,5 durchgeführt. Puffer C enthält im Vergleich zum PBS-Puffer einen reduzierten Anteil an Chlorid-Ionen, der Anteil an Phosphat ist jedoch um das Vierfache erhöht. In Studien mit dem CC-Chemokin MCP-1 und sulfatierten Rezeptorpeptiden hat sich gezeigt, dass das im Puffer enthaltene Phosphat mit dem Rezeptor-Sulfopeptid um die Bindung an die Sulfotyrosin-Bindungstasche auf der Chemokinoberfläche konkurriert.[194] Obwohl die Bindungsstudien mit dem sulfatierten Peptid Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) und CXCL8wt (**3**) in einem nicht optimalen Phosphat-Puffersystem durchgeführt wurden, konnte die Affinität den Faktor 10 erhöht werden. Um zu untersuchen, ob durch eine Verringerung der Phosphatkonzentration die Affinität zwischen CXCL8 und dem sulfatierten Rezeptorpeptid noch weiter gesteigert werden kann, könnte zukünftig in einem Phosphat-freien Puffer gearbeitet werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang auch Bindungsstudien in PBS-Puffer, der dem physiologischen Milieu des Extrazellulärraums entspricht. Dieser weist zwar einen geringeren Phosphat-Anteil auf, jedoch ist der Anteil an Natriumchlorid im Vergleich zu Puffer C deutlich erhöht. Es ist bekannt, dass durch Natriumchlorid im Puffer die Bindung von N-terminalen Peptiden des CXCR1 an CXCL8 beeinträchtigt wird.[70] Relevant wäre daher eine Messung in einem Puffer mit der NaCl-Konzentration von Puffer C und der Phosphatkonzentration von PBS.

Vergleicht man die hier gemessene Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen Fluo-sY-CXCR1-p1 (**9a**) und CXCL8 um den Faktor 10 mit den Literaturberichten über andere Chemokine und deren sulfatierte Rezeptorpeptiden, so fällt zunächst auf, dass die meisten Chemokinrezeptoren für die bisher eine Sulfatierung im N-Terminus bekannt ist, mehrere N-terminale Tyrosinreste in ihrer Sequenz enthalten. Die Erhöhung der Affinität zwischen Chemokin und Rezeptorpeptid ist dabei stark davon abhängig, welche Reste sulfatiert vorliegen. Für Sulfopeptide, die vom Chemokinrezeptor CCR3 abgeleitet sind,

---

konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Sulfatierung die Affinität für die Chemokine CCL11, CCL24 und CCL26 um das 7 bis 28-fache erhöht wird, je nachdem, welcher von zwei benachbarten Tyrosinresten sulfatiert ist. Außerdem dient das Sulfatierungsmuster hier auch der Erhöhung der Selektivität für ein bestimmtes Chemokin.[19, 20] Der Rezeptor CXCR4 besitzt in seiner N-terminalen Sequenz drei Tyrosinreste. Mit Hilfe eines N-terminalen Rezeptorpeptids konnte gezeigt werden, dass die Sulfatierung des Tyrosinrestes an Position 21 die Affinität für das Chemokin CXCL12 um den Faktor 3 erhöht. Liegen alle drei Tyrosinreste sulfatiert vor erhöht sich die Affinität um den Faktor 30. Außerdem kann durch die Sulfatierung die dimere Form des Chemokins stabilisiert werden. [33, 35]

Für den Rezeptor CXCR1 konnte die Sulfatierung des einzelnen N-terminalen Tyrosinrestes an Position 27 bisher noch nicht experimentell bestätigt werden. Unklar ist auch, welche Rolle eine Sulfatierung des Rezeptors im biologischen System spielen könnte. CXCR1 bindet neben dem Chemokin IL-8 nur ein weiteres Chemokin, CXCL6, mit hoher Affinität. Interessant wäre eine Untersuchung, ob sich durch eine Sulfatierung auch die Affinität gegenüber CXCL6 erhöht.



**Abbildung 4-23:** Struktur von CXCL-8 (grün) mit N-terminalem CXCR1-Rezeptorpeptid (blau) Der Tyrosinrest des Peptids befindet sich in räumlicher Nähe zur vorgeschlagenen Sulfotyrosin-Bindestelle (gelb) an der N-Schleife und dem  $\beta_3$ -Strang des Chemokins (PDB ID: 1ILP).

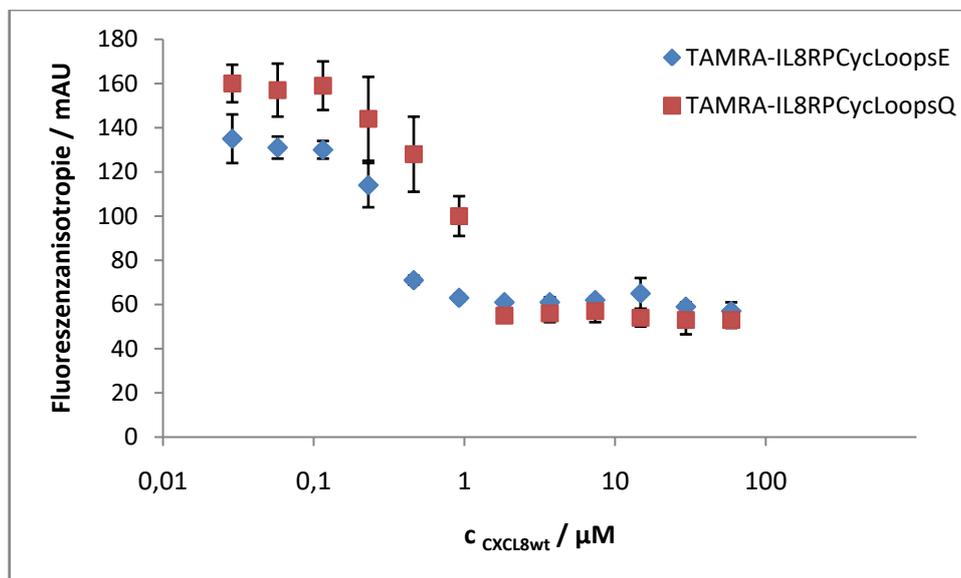
---

### 4.3 Cyclische Bindepeptide für CXCL8

Die Cyclisierung ist ein gebräuchlicher Weg die Stabilität von Peptiden gegenüber einem proteolytischen Abbau zu verbessern.[195-197] Sie führt außerdem zu einer rigideren Struktur der Peptide, wodurch die bindende Konformation des Peptids stabilisiert werden kann und der Entropieverlust bei der Bindung an das Zielprotein verringert wird. Dadurch wird üblicherweise die Bindung an das Zielprotein begünstigt.[198, 199] In MD-Simulationen, durchgeführt von Sven Jäger im AK Hamacher an der TU Darmstadt, zeigte sich, dass es im *site II*-Peptid IL8RPLoopsE (**8**) zu einer Wechselwirkung der Lysinseitenkette an Position 2 mit der Glutamatseitenkette an Position 18 kommt. Dies führt zu einer Annäherung von N- und C-Terminus des Peptids und einer Stabilisierung der Peptidstruktur durch nicht kovalente Cyclisierung. Im Gegensatz dazu fluktuierte der Abstand von N- und C-Terminus im Peptid IL8RPLoopsQ (**7**) aufgrund der fehlenden Wechselwirkung sehr stark.[200, 201] Daher sollten im Rahmen der Dissertation von Kevin Brahm[172] die beiden *site II* Rezeptorpeptide IL8RPLoopsQ (**7**) und IL8RPLoopsE (**8**) kovalent cyclisiert werden. Dadurch wurde die Konformation von IL8RPLoopsQ (**7**) stabilisiert, und es wurde erwartet, dass sich das Bindungsverhalten von IL8RPLoopsQ (**7**) an das von IL8RPLoopsE (**8**) angleicht. Bei der Cyclisierungsstrategie muss der natürliche Abstand von A196, das dem N-Terminus des IL8RPLoops entspricht, und Q271, das dem C-Terminus des IL8RPLoops entspricht, in der Rezeptorsequenz von CXCR1 berücksichtigt werden. Es konnte nicht mit einer direkten „*head-to-tail*“ Cyclisierungsstrategie gearbeitet werden, da hierbei der Abstand zwischen N- und C-Terminus des Peptids zu stark verkürzt würde. Die Cyclisierung der Peptide wurden von Kevin Brahm nach einem Protokoll von Chandra *et al.* [202] durch Einfügen eines zusätzlichen C-terminalen Lysins und eines N-terminalen Succinimids durchgeführt. Da auch für die cyclisierten Peptide IL8RPCycLoopsQ (**10**) und IL8RPCycLoopsE (**11**) zur Bestimmung ihrer Affinität zu CXCL8 Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchgeführt werden sollten und der N-Terminus nicht für die Bindung des Fluorophors zur Verfügung steht, wurde ein zusätzliches Lysin außerhalb der cyclisierten Sequenz eingeführt an dessen Seitenkette der Fluorophor angebracht werden konnte. Als Fluorophor wurde 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) verwendet, da es im Gegensatz zu Fluorescein keine freien Hydroxy-Gruppen enthält, die bei der weiteren Synthese Nebenreaktionen eingehen könnten.

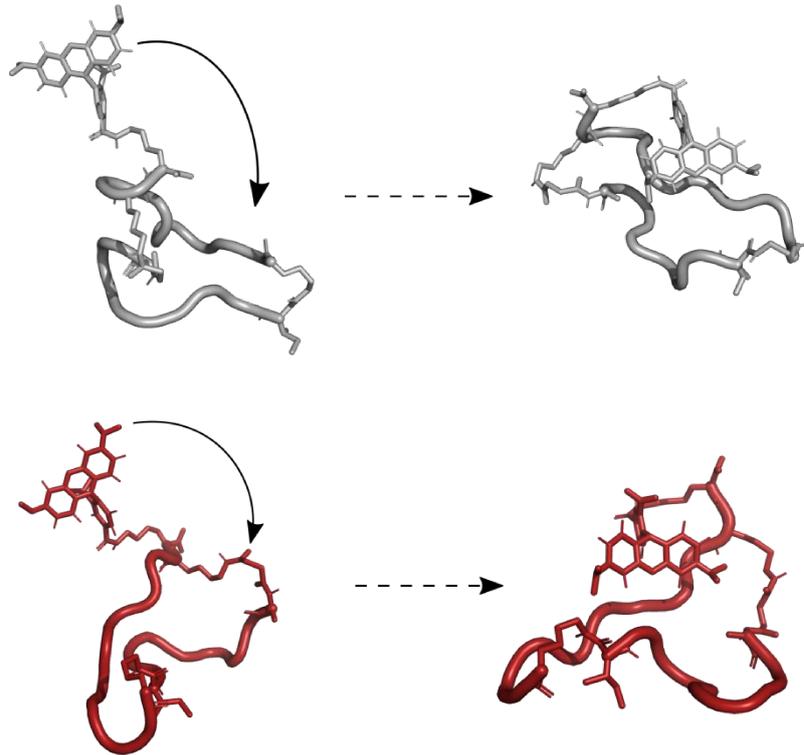
Um die Auswirkung der stabilisierten zyklischen Struktur der Peptide auf die Affinität zu CXCL8 zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Kevin Brahm, für beide Peptide Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchgeführt (siehe **Abbildung 4-24**). Dabei zeigte sich, dass die Dissoziationskonstanten für beiden cyclisierten Peptide TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (**10**) und TAMRA-IL8RPCycLoopsE (**11**) im Rahmen der Messungengenauigkeit etwa gleich sind und auch derjenigen für das lineare mit Fluorescein-markierte Peptid Fluo-IL8RPLoopsE (**8a**) entsprechen. Es

konnte also die Erwartung bestätigt werden, dass das Peptid IL8RPLoopsQ (7), für das in seiner linearen mit Fluorescein-markierten Variante keine Bindung bestimmt werden konnte, durch die Cyclisierung in einer Konformation stabilisiert werden kann, die eine Bindung an CXCL8 begünstigt. Eine Erhöhung der Bindungsaffinität konnte durch die Cyclisierung nicht erreicht werden.



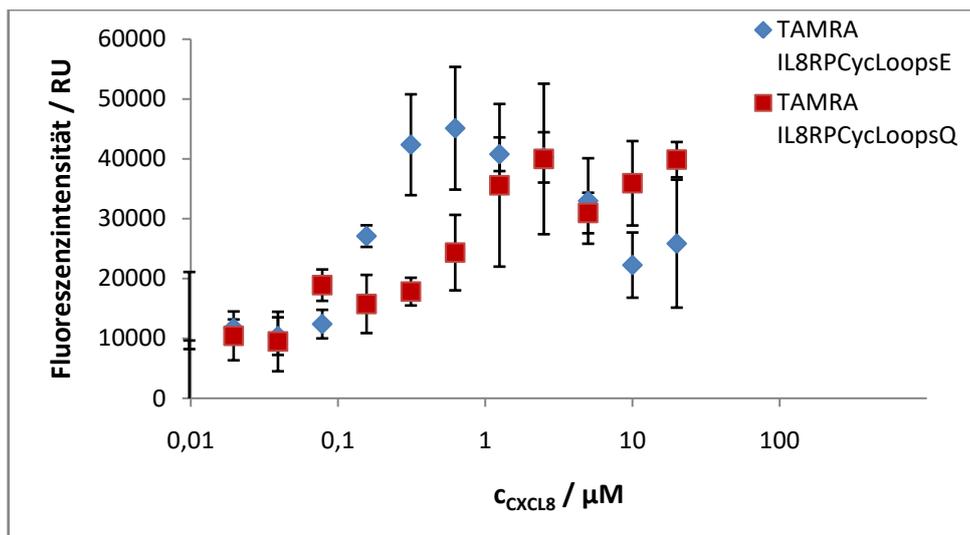
**Abbildung 4-24:** Vergleich der Bindungsisothermen von TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (10) (rot;  $K_D = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) und TAMRA-IL8RPCycLoopsE (11) (blau;  $K_D = 0,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) an CXCL8wt (3) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an.

Auffällig war jedoch, dass die Bindungsisothermen der beiden Peptide invers verlaufen. Anders als erwartet wurden bei niedrigen Konzentrationen an CXCL8 hohe Anisotropiewerte und bei hohen Konzentrationen an CXCL8 niedrige Anisotropiewerte gemessen. Da die Fluoreszenzanisotropie ein Maß für die Beweglichkeit des Fluorophors darstellt, sprechen diese Ergebnisse für eine reduzierte Beweglichkeit des Fluorophors im freien Peptid und eine erhöhte Beweglichkeit des Fluorophors für den Komplex aus cyclisiertem Peptid und dem Chemokin CXCL8. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass der über einen flexiblen Linker mit dem Peptid-Makrozyklus verbundene Fluorophor im ungebundenen Zustand mit dem Peptid interagiert, und durch eine Bindung des Chemokins aus dieser Interaktion verdrängt wird, darauf weisen auch weitere von Sven Jager und Philipp Babel im AK Hamacher an der TU Darmstadt durchgeführte MD-Simulationen hin. Die MD-Simulationen der beiden Sequenzen zeigten, dass die an einer Seitenkette des Makrozyklus verankerten Fluorophore intramolekular mit der Peptidsequenz interagieren und damit im ungebundenen Zustand des jeweiligen Peptids in den Ring falten (siehe **Abbildung 4-25**).



**Abbildung 4-25:** Darstellung der Ergebnisse der MD-Simulationen von TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (**10**) (grau) und TAMRA-IL8RPCycLoopsE (**11**) nach 270 ns und 350 ns Simulationszeit. Der Fluorophor, TAMRA, faltet in die Mitte des Peptid-Makrozyklus. (Mit freundlicher Genehmigung von Philipp Babel.)

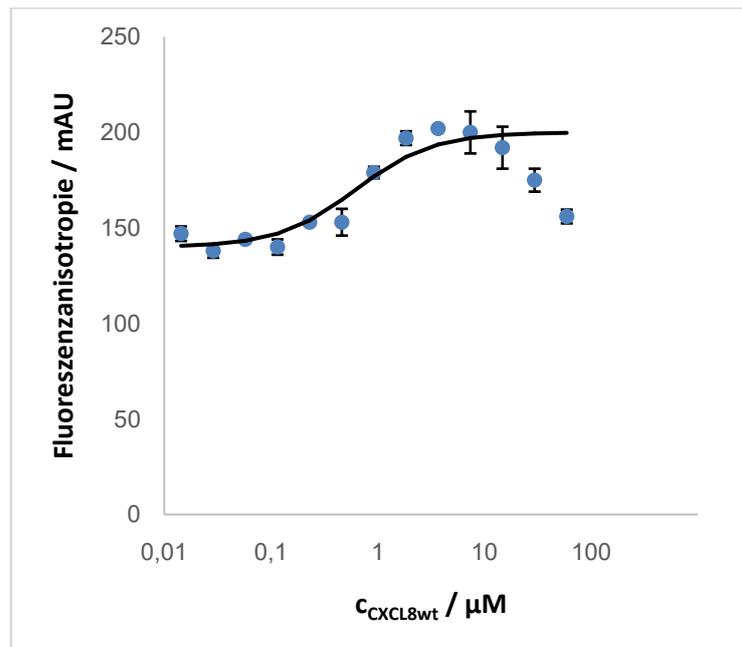
Betrachtet man dagegen die Fluoreszenzintensität, so ist eine Zunahme der Intensität mit steigender Konzentration an CXCL8 zu beobachten (siehe **Abbildung 4-26**). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Verdrängung eines Fluorophors von einem Protein ist bekannt und wird üblicherweise in Biosensorsystemen ausgenutzt. Es wurden bereits TAMRA-basierte Biosensoren entwickelt, welche auf diesem Prinzip basieren. Bei den sogenannten „Quenchbodies“ oder „Q-bodies“ wird der Fluorophor in die variable Region eines Antikörperfragments eingebaut. Nach der Antigenbindung steigt die Fluoreszenzintensität von TAMRA an, da der Fluorophor durch das Antigen verdrängt wird. Dies zeigt sich auch in einer Abnahme der Fluoreszenzanisotropie.[203-205]



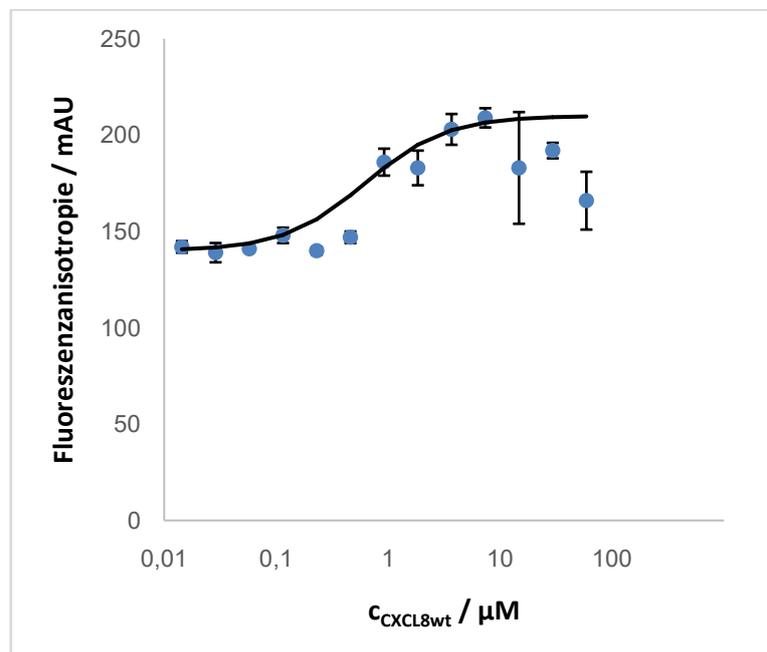
**Abbildung 4-26:** Vergleich der Fluoreszenzintensitäten für die Bindung von TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (**10**) (rot) und TAMRA-IL8RPCycLoopsE (**11**) (blau) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an.

Um das ungewöhnliche Bindevverhalten der cyclischen TAMRA-markierten Peptide genauer zu beleuchten, wurden im Rahmen dieser Arbeit lineare mit TAMRA-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops hergestellt und mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen die Bindung an CXCL8 untersucht. Die erhaltenen Bindungsisothermen für die Peptide TAMRA-IL8RPLoopsE (**8b**) und TAMRA-IL8RPLoopsQ (**7b**) sind in den **Abbildungen 4-27** und **4-28** gezeigt. Die berechneten Dissoziationskonstanten sind nahezu identisch für beide Peptide und liegen im gleichen Bereich wie die der cyclisierten Peptide. Es fällt auf, dass die Bindungsisothermen dieser linearen TAMRA-markierten Peptide wieder den üblichen ansteigenden Verlauf zeigen. Zu beachten ist jedoch, dass auch hier für die ungebundenen Peptide hohe Fluoreszenzanisotropiewerte gemessen wurden, die auf eine Interaktion des Fluorophors mit der Peptidsequenz hindeuten, da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass TAMRA normalerweise eine geringere Fluoreszenzanisotropie aufweist.[206]

Auffällig an den Bindungsisothermen für die linearen, mit TAMRA-markierten Peptide ist wieder der starke Abfall der Fluoreszenzanisotropie bei höheren Konzentrationen an CXCL8, der zuvor schon bei den linearen, mit Carboxyfluorescein-markierten Peptiden beobachtet werden konnte. Zukünftige Untersuchungen der Fluoreszenzlebensdauer oder NMR-Studien könnten zum Verständnis dieses Phänomens beitragen.



**Abbildung 4-27:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von TAMRA-IL8RLoopsE (**8b**) (20 nM) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) angenähert. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$ .



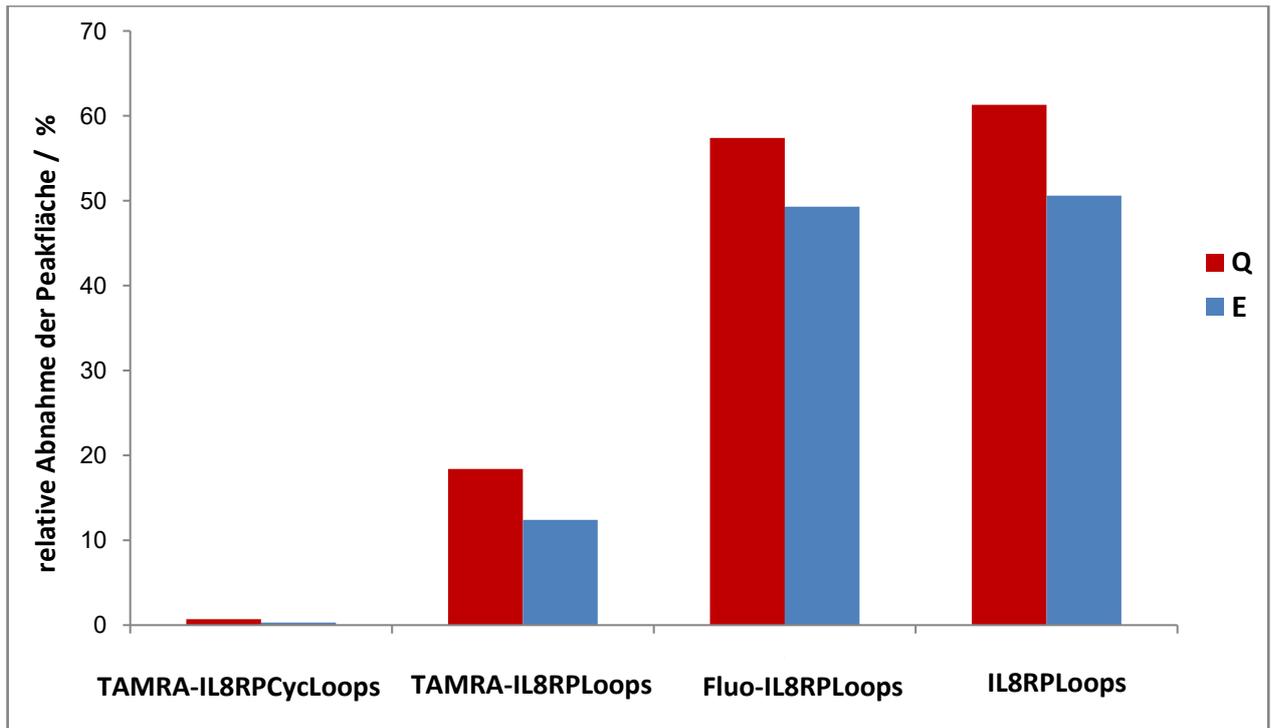
**Abbildung 4-28:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von TAMRA-IL8RLoopsQ (**7b**) (20 nM) an CXCL8wt (**3**) in Puffer C. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) angenähert. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,7 \pm 2,3 \mu\text{M}$ .

---

### 4.3.1 Proteasestabilitäts-Assay

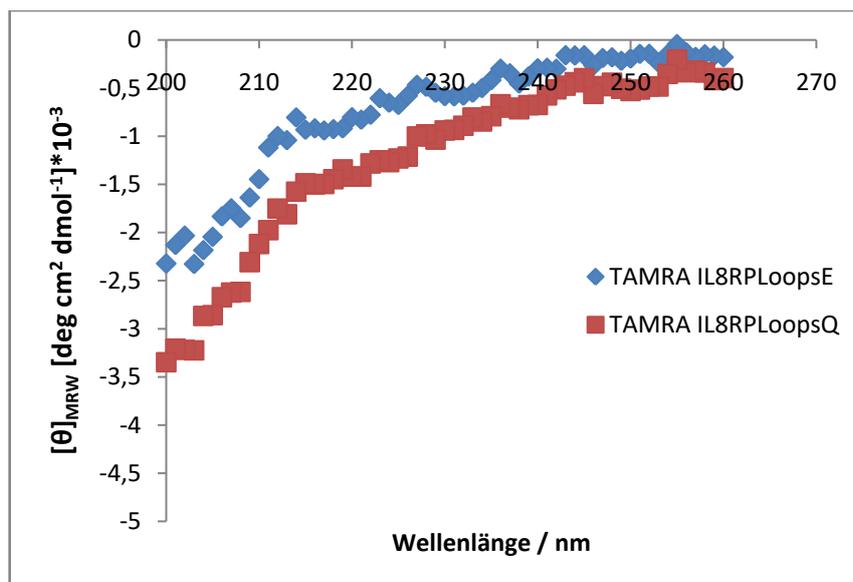
Die Cyclisierung von Peptiden stabilisiert durch die konformationale Einschränkung deren Struktur. Das rigidere Peptidrückgrat und das Fehlen der freien Termini führen darüber hinaus zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau.[195-197] Im Rahmen der Dissertation von Kevin Brahm wurde ein Proteasestabilitäts-Assay entwickelt, mit dem die Stabilität der cyclischen Peptide gegenüber der Protease Trypsin untersucht werden konnte.[172] Trypsin wurde gewählt, da es selektiv hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, die insgesamt viermal in der Sequenz der zu untersuchenden Peptide *site II*-Peptide vorkommen. Da Trypsin eine Endopeptidase ist, kann außerdem ausgeschlossen werden, dass sich das Fehlen der freien Termini der cyclischen Peptide auf die Proteolyse auswirkt, womit die Zugänglichkeit für die Protease zu ihren Schnittstellen lediglich durch die eingeschränkte Konformation beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle verwendeten *site II*-Peptide auf ihre Proteasestabilität hin untersucht. Dabei wurde jeweils eine Probe des jeweiligen Peptids über Nacht bei 37°C in der Trypsinlösung inkludiert. Die jeweilige Kontrolle wurde gleich behandelt, aber ohne Inkubation direkt mittels RP-HPLC analysiert. Die Flächen unter den Peaks bei der jeweiligen Detektionswellenlänge wurden integriert und mit den entsprechenden Kontrollen verglichen. Eine Abnahme der Peakfläche zeigt den Abbau des Peptids durch Trypsin an. Der prozentuale Anteil des Abbaus des jeweiligen Peptids ist in **Abbildung 4-29** gezeigt.

Die cyclischen Peptide haben entsprechend den Erwartungen im Proteasestabilitäts-Assay eine hohe Stabilität gegenüber dem Abbau durch das Enzym Trypsin gezeigt. Interessanterweise konnte hier auch für die linearen mit TAMRA-markierten Peptide eine deutliche Erhöhung der Proteasestabilität im Vergleich zu den mit Fluorescein-markierten linearen Peptiden, welche einen ähnlich starken proteolytischen Abbau erfahren wie die unmarkierten linearen Peptide, gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Interaktion zwischen TAMRA und der Peptidsequenz auch zu einer Stabilisierung der linearen Peptide kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Interaktion von TAMRA mit peptidbasierten Liganden nicht nur, wie bereits bekannt, zu Artefakten führt, sondern auch zur Stabilisierung von Peptiden beitragen kann. Außerdem stützt die geringfügig erhöhte Stabilität der linearen IL8RPLoopsE-Varianten, markiert und unmarkiert, gegenüber den jeweiligen linearen IL8RPLoopsQ-Varianten die These, dass es in der Sequenz von IL8RPLoopsE zu einer Interaktion zwischen der Lysinseitenkette an Position 2 mit der Glutamatseitenkette an Position 18 kommt, wodurch eine Stabilisierung der Peptidstruktur durch nicht kovalente Cyclisierung bewirkt wird.



**Abbildung 4-29:** Abbau der verschiedenen IL8RPLoops-Peptide durch das Enzym Trypsin, gemessen anhand der Peakfläche in der RP-HPLC. Die jeweiligen IL8RPLoopsE-Varianten sind blau dargestellt, die IL8RPLoopsQ-Varianten sind rot dargestellt.

**Abbildung 4-30** zeigt die CD-Spektren der beiden linearen TAMRA-markierten Peptide. Die Spektren zeigen ein Minimum bei 201 nm, das auf ungeordnete Strukturen hinweist. Eine Schulter bei etwa 222 nm, würde auf  $\alpha$ -helikale Strukturen hinweisen. Diese sind hier nicht zu erkennen.



**Abbildung 4-30:** CD-Spektrum der linearen TAMRA-markierten Peptide. Der Verlauf deutet für beide Peptide auf eine ungeordnete Struktur hin.

---

## 4.4 Peptide als Binder für Albumin

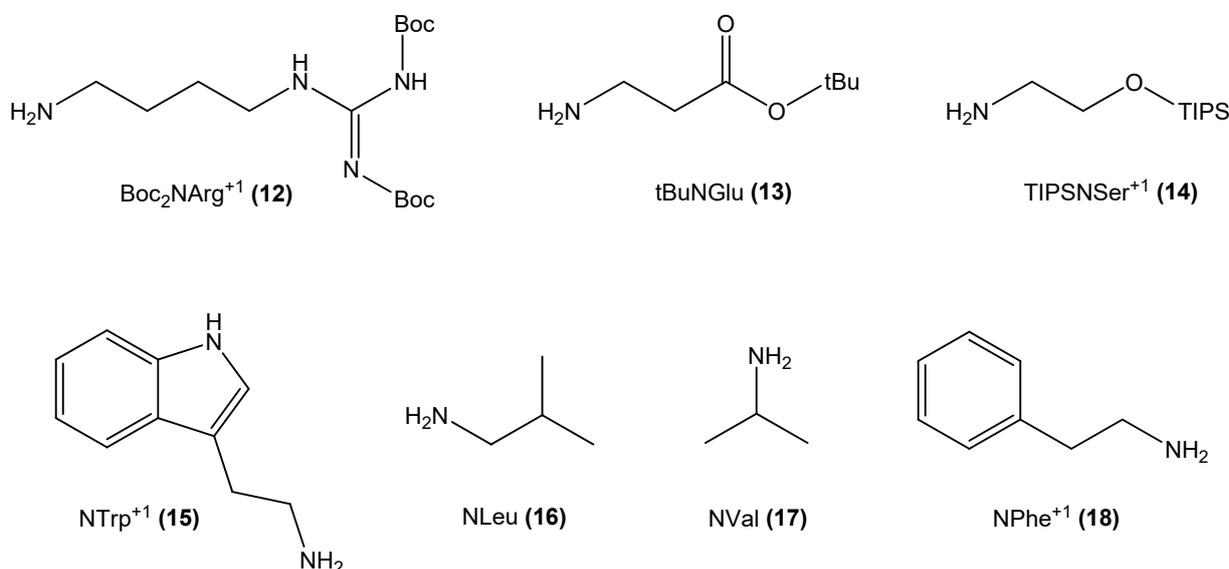
Der therapeutische Einsatz von inhibierenden Peptiden wird in vielen Fällen durch die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften der Peptide verhindert. Dazu gehört zum Einen eine geringe Plasmahalbwertszeit aufgrund des raschen Abbaus der Peptide durch Proteasen im Blut und zum Anderen eine schnelle Ausscheidung der Peptide über die Nieren aufgrund ihrer geringen Größe.[149] Um diese Nachteile zu umgehen und Peptide für den therapeutischen Einsatz nutzbar zu machen wurden verschiedene Strategien entwickelt. Eine Möglichkeit um die proteolytische Stabilität zu erhöhen ist die Modifikation des Peptidrückgrats. Peptide tragen die Seitenkette am Stickstoffatom des Oligoglycinrückgrats und zeichnen sich durch eine sehr gute Stabilität gegenüber Proteasen aus.[160] Die schnelle Ausscheidung über die Niere kann unter anderem durch die Fusion der Sequenz des inhibierenden Peptids an eine Sequenz, welche eine Bindung an Serumalbumin vermittelt, verhindert werden.[164, 207] Im Rahmen der von mir betreuten Masterthesis von Annika Lill wurde eine One-Bead-One-Compound-Bibliothek (OBOC-Bibliothek) basierend auf Peptoid-Hexameren hergestellt und auf potentielle Binder für humanes Serum Albumin (HSA) gescreent.[173]

### 4.4.1 Synthese und Screening der Peptoidbibliothek

Die Auswahl der primären Amin-Bausteine für die Synthese der OBOC-Bibliothek erfolgte dabei basierend auf einem Patent, welches bestimmte an humanes Serumalbumin (HSA) bindende Peptidsequenzen beschreibt, durch deren Fusion mit einer therapeutischen Peptidsequenz eine Erhöhung der Plasmahalbwertszeit erreicht werden konnte.[208] Die für die Synthese der OBOC-Bibliothek ausgewählten, geschützten primären Amin-Bausteine sind in **Abbildung 4-31** dargestellt.

Die Synthese der Peptoidbibliothek erfolgte auf TentaGel MB HMBA-Harz, welches zuvor mit Amino-hexansäure als Spacer zwischen den Harzpartikeln und den Peptoidsequenzen funktionalisiert wurde, um die Zugänglichkeit der Peptoidsequenzen für das Zielprotein beim späteren Screeningprozess zu gewährleisten. TentaGel MB HMBA-Harz hatte sich in Vorarbeiten als sehr gut geeignet für die Synthese und das Screening von OBOC-Bibliotheken erwiesen.[188, 209] Es bietet den Vorteil einer guten Quellbarkeit sowohl in organischen Lösemitteln, als auch im wässrigen Milieu, was eine wichtige Voraussetzung für das Screening der OBOC-Bibliothek auf potentielle Binder für humanes Serumalbumin ist. Zudem vereinfacht die Größe der Partikel ( $d \approx 300 \mu\text{m}$ ) die Handhabung während des Screening-Prozesses, da die Partikel mit dem bloßen Auge zu erkennen sind. Weitere Vorteile des TentaGel MB HMBA-Harz sind ein Minimum an unspezifischen Wechselwirkungen, sowie eine homogene Größenverteilung mit konstanter Beladungskapazität. Der basenlabile

4-Hydroxymethyl-Benzoessäure (HMBA)-Linker ermöglicht zudem das selektive Abspalten der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen, ohne die Peptide gleichzeitig vom Harz abzuspalten.



**Abbildung 4-31:** Primäre Amine, die zur Synthese der OBOC-Bibliothek, mittels der Submonomermethode nach dem „*Mix-and-Split*“ Verfahren, ausgewählt wurden mit den entsprechenden Schutzgruppen. Die Nomenklatur der Amin-Bausteine wurde vom Dreibuchstabencode der äquivalenten Aminosäuren abgeleitet. Die hochgestellte Zahl gibt an, um wie viele CH<sub>2</sub>-Inkremente die Seitenkette des Amin-Bausteins im Vergleich zur Aminosäure verlängert ist.[160]

Die Peptidbibliothek wurden nach der Submonomermethode nach Zuckermann unter der Verwendung des Mix-and-Split-Syntheseverfahrens hergestellt. Ausgehend von den sieben Amin-Bausteinen und der Länge von sechs randomisierten Positionen ergeben sich, für die Bibliothek  $7^6 = 117.649$  mögliche Peptidsequenzen. Die Vollständigkeit der einzelnen Reaktionsschritte bei der Peptidsynthese ist die Voraussetzung dafür, dass tatsächlich OBOC-Bibliotheken erhalten werden und nicht ein Partikel neben einer vollständigen Sequenz mehrere verkürzte Sequenzen trägt. Um die Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen zu überprüfen wurde hier der Chloraniltest durchgeführt.

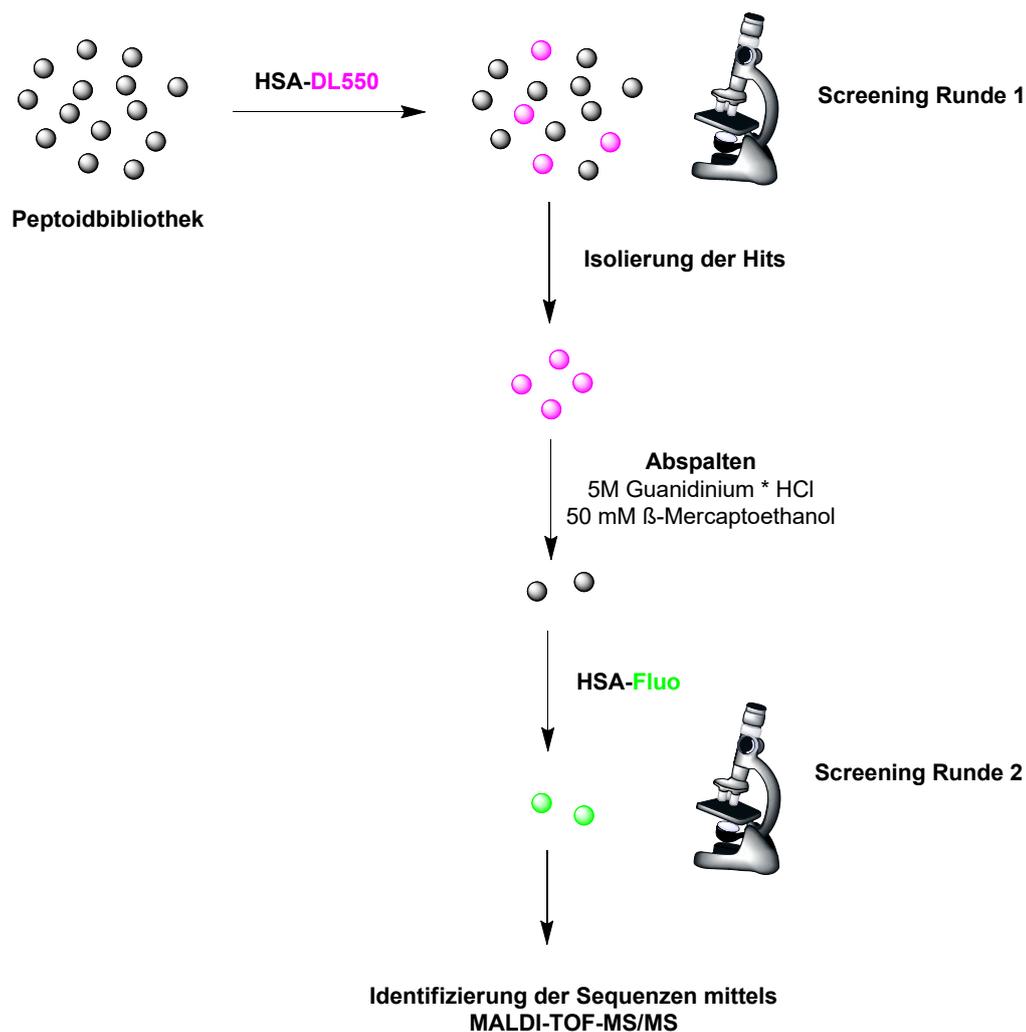
Das Screening der OBOC-Bibliothek erfolgte mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem humanem Serum Albumin (HSA) in einem zweistufigen Prozess. HSA besitzt auf der Oberfläche einen freiliegenden Cysteinrest (Cys 34) über den das Protein spezifisch an dieser Stelle markiert werden kann.[210] Die Markierung erfolgte hier über die freie Thiolgruppe des Albumins mit dem Farbstoff Dylight550<sup>TM</sup>-Maleimid (HSA-DL550) für die erste Screening Runde und mit 5(6)-Fluorescein-Maleimid (HSA-Fluo) für die zweite Screening Runde. Der Farbstoff Dylight550<sup>TM</sup> mit einem Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm und einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 576 nm kann im „Rhodamin“-Kanal des verwendeten Fluoreszenzmikroskops

detektiert werden, wodurch Partikel welche Albumin gebunden haben identifiziert werden können. Außerdem bietet die Verwendung eines langwelligen Fluorophors den Vorteil, dass sowohl die verwendeten TentaGel MB HMBA-Partikel, als auch die Peptide keine nennenswerte Eigenfluoreszenz im „Rhodamin“-Kanal aufweisen.[188, 211] Nach der ersten Screening- Runde mit HSA-DL550 konnten durch Annika Lill 242 fluoreszierende Partikel (Belichtungszeit 10 ms) aus der Peptidbibliothek isoliert werden. Um mit diesen „Hits“ weiter arbeiten zu können musste zunächst das gebundene HSA abgespalten werden. Dazu wurden die fluoreszierenden Partikel bei 30 °C in einer Lösung aus 5 M Guanidinium Hydrochlorid und 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert wodurch das Protein denaturiert werden und sich dadurch von den Peptoiden auf der Partikeloberfläche lösen sollte. Der Prozess des Abspaltens wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops im „Rhodamin“-Kanal kontrolliert. Auch nach einwöchiger Inkubation in der Protein-Abspaltlösung war nur auf 50 Partikeln kein markiertes HSA mehr nachweisbar. Um diese 50 „Hits“ zu bestätigen wurde eine zweite Screening-Runde durchgeführt. Da die Partikel bei einer Belichtungszeit von 10 ms keine Eigenfluoreszenz im FITC-Kanal des Fluoreszenzmikroskops aufwiesen wurde bei der zweiten Screening-Runde HSA-Fluo verwendet, um unspezifische Bindungen aufgrund des verwendeten Farbstoffs in der ersten Runde auszuschließen. Hierbei konnten durch Annika Lill 22 fluoreszierende Partikel (Belichtungszeit 10 ms) als „Hits“ bestätigt werden. Der Screeningprozess ist in **Abbildung 4-32** schematisch dargestellt.

Von allen 22 „Hits“ konnte das Protein problemlos mit Hilfe der Protein-Abspaltlösung entfernt werden. Die Peptoidsequenzen wurden jeweils von den Partikeln abgespalten und mit Hilfe von MALDI-TOF MS/MS-Messungen aufgeklärt. Leider konnten von den 22 „Hits“ nur 6 Sequenzen eindeutig identifiziert werden (siehe **Tabelle 4-5**).[173]

**Tabelle 4-5:** Sequenzen der „Hits“, welche potentielle HSA-Binder darstellen.[173]

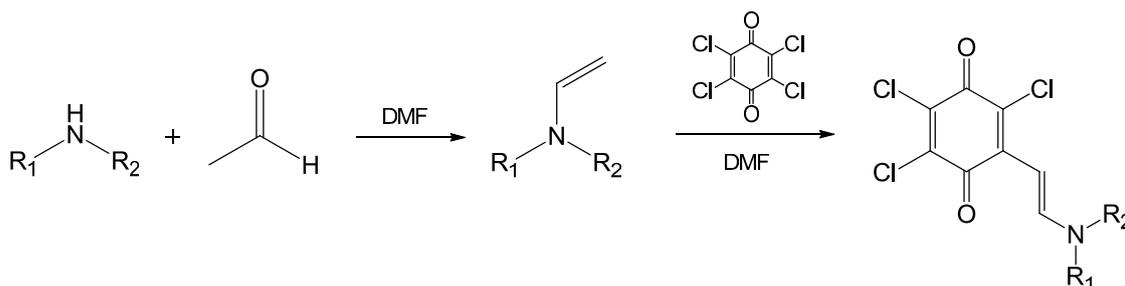
	Sequenz
AL1 (19)	NLeu-NVal-NSer <sup>+1</sup> -NGlu-NLeu-NPhe <sup>+1</sup>
AL3 (20)	NTrp <sup>+1</sup> -NPhe <sup>+1</sup> -NSer <sup>+1</sup> -NArg <sup>+1</sup> -NTrp <sup>+1</sup>
AL7 (21)	NSer <sup>+1</sup> -NArg <sup>+1</sup> -NVal-NGlu-NGlu-NGlu
AL12 (22)	NArg <sup>+1</sup> -NTrp <sup>+1</sup> -NSer <sup>+1</sup> -NSer <sup>+1</sup> -NArg <sup>+1</sup>
AL13 (23)	NLeu-NPhe <sup>+1</sup> -NTrp <sup>+1</sup> -NSer <sup>+1</sup> -NArg <sup>+1</sup>
AL17 (24)	NLeu-NTrp <sup>+1</sup> -NPhe <sup>+1</sup> -NArg <sup>+1</sup> -NGlu



**Abbildung 4-32:** Schematische Übersicht über das zweistufige fluoreszenzbasierte Screening der Peptoidbibliothek nach HSA-Bindern. Nach der ersten Screening-Runde mit HSA-DL550 konnten 242 „Hits“ isoliert werden. Aufgrund von Problemen beim Abspalten des Proteins wurde die zweite Screening-Runde mit HSA-Fluo nur mit den 50 verbleibenden „Hits“ durchgeführt. Dabei wurden 22 „Hits“ bestätigt.

Unter den 6 eindeutig identifizierten Sequenzen finden sich auch Pentamersequenzen, obwohl die Synthese der Peptoidbibliothek auf Hexamere ausgelegt war. Eine Erklärung hierfür ist, dass trotz Überprüfung mittels Chloraniltest nicht jeder Schritt bei der Synthese der Peptoidbibliothek erfolgreich war, wodurch auch kürzere Sequenzen erhalten wurden. Dafür spricht auch, dass bei der Auswertung der MALDI-TOF MS/MS-Ergebnisse eines Partikels teilweise zwei Sequenzen in Frage kamen. Das lässt darauf schließen, dass zwei verschiedene Sequenzen auf ein und demselben Partikel vorhanden waren.

Der Chloraniltest ist ein rein qualitativer Test auf sekundäre Amine, bei dem p-Chloranil (Tetrachloro-1,4-benzochinon) in Anwesenheit von Acetaldehyd und sekundären Aminen zu Derivaten des blauen Farbstoffs Trichloroaminovinyl-1,4-benzochinon umgesetzt wird (siehe **Schema 4-3**). [212, 213]

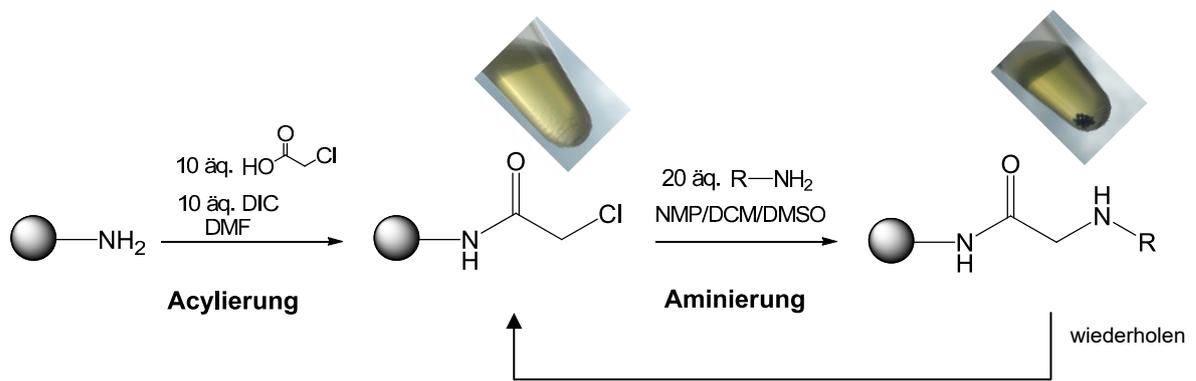


**Schema 4-3:** Chloraniltest zur qualitativen Bestimmung von sekundären Aminen. Sekundäre Amine reagieren mit Acetaldehyd unter Bildung eines Enamins, das mit p-Chloranil zu einem blauen Farbstoff.

Der Chloraniltest bietet im Gegensatz zur quantitativen Bestimmung der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bei der Peptidsynthese eine rein qualitative Aussage über den Erfolg der einzelnen Syntheseschritte bei der Peptidsynthese. Außerdem wird hier nur eine kleine Stichprobe an Partikeln untersucht, so dass keine verlässliche Aussage über den kompletten Reaktionsansatz getroffen werden kann. Ein weiteres Problem ist, dass durch unzureichende Waschschriffe leicht falsch-positive Ergebnisse erhalten werden können. Es ist also nicht auszuschließen, dass einige Kupplungsschritte nicht vollständig verliefen.

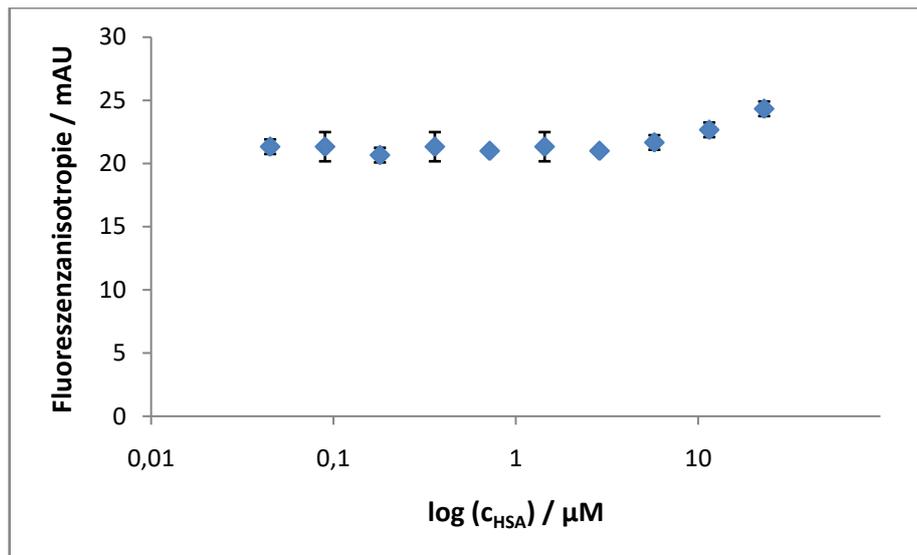
#### 4.4.2 Resynthese der „Hits“ und Bindungsstudien

Die Resynthese der 6 Peptoidsequenzen, welche potentielle Binder für humanes Serum Albumin darstellen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels der Submonomermethode auf Rink-Amid Harz. Auch hier wurde der Erfolg der einzelnen Syntheseschritte mit Hilfe des Chloraniltests überprüft (siehe **Schema 4-4**). Um die Bindung der „Hits“ an humanes Serumalbumin mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen zu untersuchen wurden die Sequenzen im letzten Syntheseschritt am N-Terminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein markiert.



**Schema 4-4:** Peptidsynthese mittels Submonomermethode.[153] Für die Acylierung wird hier mit Chloroessigsäure gearbeitet, da das primäre Amin Tryptamin  $\text{NTrp}^{+1}$  (X) an der Seitenkette ungeschützt eingesetzt wurde.[214] Die einzelnen Syntheseschritte wurden mit Hilfe des Chloraniltests verfolgt. Bei Anwesenheit sekundärer Amine auf der Partikeloberfläche färben sich die Partikel blau, wodurch eine erfolgreiche Aminierung angezeigt wird. Nach der Acylierung sollte die Blaufärbung der Partikel verschwunden sein.

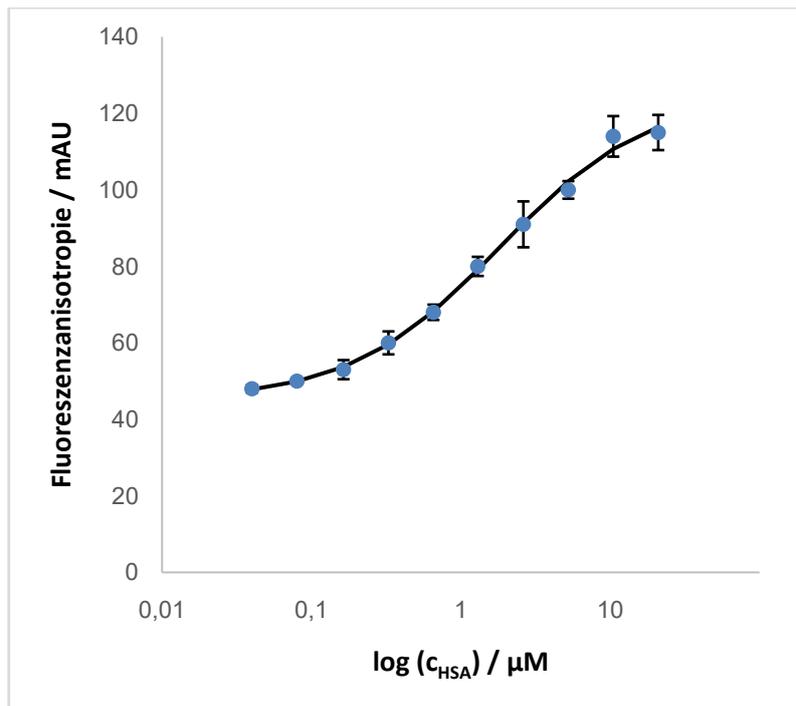
Es ist bekannt, dass Fluorescein an Albumin bindet.[215-217] In der Literatur werden Dissoziationskonstanten im oberen Mikromolaren Bereich angegeben. Wobei Rinderserum Albumin eine deutlich höhere Affinität zu Fluorescein aufweist als humanes Serum Albumin.[217] Um auszuschließen, dass eine mögliche Bindung der Peptide an humanes Serum Albumin auf der Bindung von Fluorescein an HSA beruht, oder ein Anstieg der Anisotropie auf die Viskosität der Proteinlösung zurückzuführen ist, wurden im Vorfeld der Bindungsstudien Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit reinem Fluorescein durchgeführt. Es zeigte sich, dass im HSA-Konzentrationsbereich zwischen  $21 \mu\text{M}$  und  $41 \text{ nM}$  kein nennenswerter Anstieg der Anisotropie zu erkennen ist (siehe **Abbildung 4-33**). Daher wurde bei den Bindungsstudien mit den Fluorescein-markierten „Hits“ in diesem Konzentrationsbereich gearbeitet.



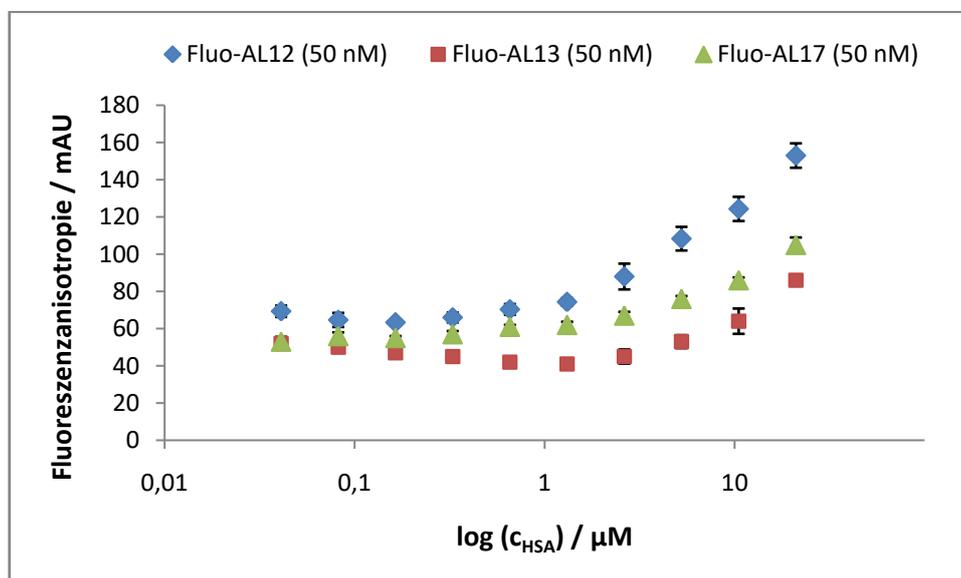
**Abbildung 4-33** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluorescein (20 nM) mit HSA im Konzentrationsbereich von 21  $\mu\text{M}$  und 41 nM in PBS. Es ist kein Anstieg der Anisotropie zu erkennen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung an.

Bei den Fluoreszenzanisotropie-Messungen der potentiell HSA-bindenden Peptide konnte nur für das Peptid Fluo-AL3 (**20a**) im gegebenen Konzentrationsbereich eine stärkere Bindung an HSA nachgewiesen werden. **Abbildung 4-34** zeigt die Bindungsisotherme für die Bindung des Fluorescein-markierten Peptoids AL3 an HSA. Für die Bindung kann eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,87 \pm 0,3 \mu\text{M}$  berechnet werden.

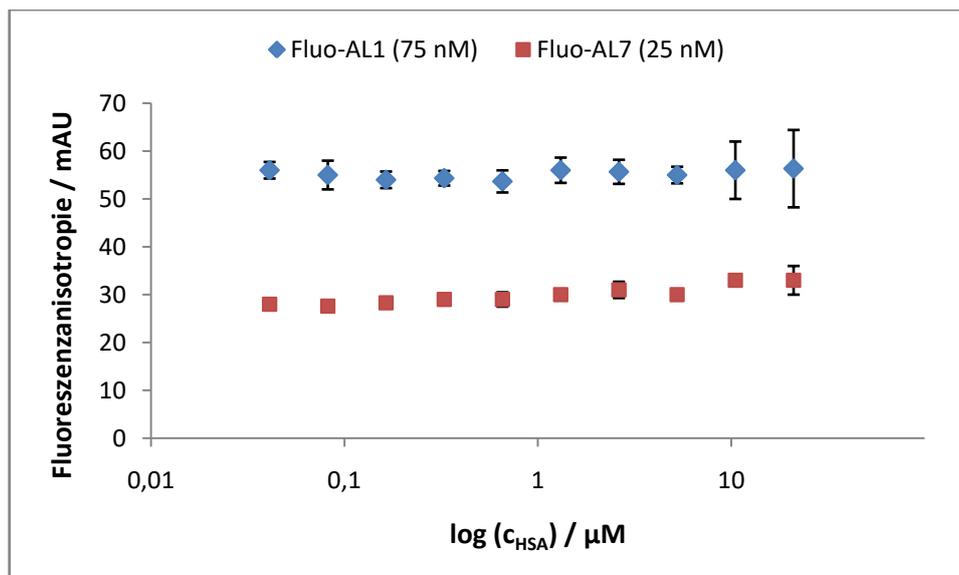
Für drei weitere Peptide konnte zwar ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie bei hohen Konzentrationen beobachtet werden, jedoch wurde im verwendeten Konzentrationsbereich an HSA keine Sättigung erreicht, sodass keine Dissoziationskonstante berechnet werden konnte (siehe **Abbildung 4-35**). Die Kurvenverläufe deuten darauf hin, dass die Sequenzen zwar an HSA binden, jedoch mit einer deutlich geringeren Affinität als Fluo-AL3 (**20a**). Für die Peptide Fluo-AL1 (**19a**) und Fluo-AL7 (**21a**) konnte im verwendeten Konzentrationsbereich kein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie beobachtet werden und somit keine Bindung an HSA festgestellt werden (siehe **Abbildung 4-36**).



**Abbildung 4-34:** Fluoreszenzanisotropie-Messung von Fluo- AL3 (**20a**) (50 nM) an HSA in PBS. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der Software OriginPro8 durch die Hill-Gleichung ( $n = 1$ ) angenähert. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,87 \pm 0,3 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 4-35:** Fluoreszenzanisotropie-Messung der Peptide Fluo-AL12 (**22a**), Fluo-AL13 (**23a**) und Fluo-AL17 (**24a**) an HSA in PBS. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Da im verwendeten Konzentrationsbereich an HSA keine Sättigung erreicht wurde, konnte keine Dissoziationskonstante berechnet werden, sie kann auf  $>20\mu\text{M}$  geschätzt werden.



**Abbildung 4-36:** Fluoreszenzanisotropie-Messung der Peptide Fluo-AL1 (**19a**) und Fluo-AL7 (**21a**) an HSA in PBS. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. Da im verwendeten Konzentrationsbereich an HSA kein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie erkennbar ist, ist nicht von einer Bindung an HSA auszugehen.

Betrachtet man die Sequenzen welche in den Fluoreszenzanisotropie-Messungen eine Bindung an HSA gezeigt haben, so fällt auf, dass diese Sequenzen Tryptamin beinhalten, welches den zur Aminosäure Tryptophan analogen Peptidbaustein darstellt. Da bekannt ist, dass Tryptophan an Albumin bindet ist dieses Ergebnis nicht überraschend.[167, 218-220] Auch andere bereits bekannte Peptidsequenzen die an Albumin binden, beinhalten häufig die Aminosäure Tryptophan, weshalb der Baustein Tryptamin (**15**) auch bei der Synthese der Peptidbibliothek eingesetzt wurde.[208, 221] Da nur von 6 „Hits“ eine eindeutige Sequenz identifiziert werden konnte, und nur für eine dieser Sequenzen die Bestimmung der Dissoziationskonstante möglich war, lässt sich aus den Ergebnissen kein allgemeines Strukturmotiv für eine Bindung an HSA ableiten. Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Tryptophan an Albumin wird im unteren milimolaren Bereich angegeben.[220] Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Fluo-AL3 liegt im unteren mikromolaren Bereich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Bindung an HSA durch weitere Interaktionen des Peptoids mit HSA und nicht allein auf die Bindung der Indolgruppe des Tryptamins an Albumin zurückzuführen ist.

Eine Möglichkeit die synergistischen Effekte durch die Bindung von Fluorescein an Albumin bei den Bindungsstudien mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen zu umgehen wäre, die Verwendung eines anderen Fluorophors. Für TAMRA ist beispielsweise in der Literatur keine Bindung an Albumin beschrieben, so dass dieser Fluorophor eine Alternative darstellt und sich dadurch die Möglichkeit geboten hätte auch die Dissoziationskonstanten der schwächeren Binder für Albumin zu bestimmen.

---

Allerdings stellt auch die Viskosität konzentrierter Proteinlösungen eine grundsätzliche Einschränkung der Methode der Fluoreszenzanisotropie-Messung dar. In Konzentrierten Proteinlösungen steigt die Viskosität wodurch die Beweglichkeit des Fluorophors eingeschränkt wird, was einen Anstieg der Fluoreszenzanisotropie zur Folge hat, der nicht auf eine Bindung an das Protein zurückzuführen ist. Um synergistische Effekte durch die Bindung des Fluorophors an das Zielprotein und Viskositätseffekte zu umgehen, sollte zur weiteren Bestimmung von Bindungsisothermen an HSA eine markierungsfreie Methode in Betracht gezogen werden.

Albumin stellt für das Screening von One-Bead-one-Compound Bibliotheken ein interessantes aber zugleich komplexes Zielprotein dar. Die Aufgabe von Albumin im Körper ist unter anderem die Bindung und der Transport von wasserunlöslichen Substanzen, wie z.B. Fettsäuren. Bedingt durch den amphiphilen Charakter kann Albumin jedoch neben Lipiden auch gut polare und geladene Substanzen binden.[165] Dieses vielseitige Bindungsverhalten von Albumin kann den Screeningprozess erschweren. Beim hier durchgeführten Screening der Peptoidbibliothek zeigte sich, dass das Abspalten des HSA-DL550 von den Partikeln nach der ersten Screening Runde einen kritischen Schritt darstellt. Trotz einwöchiger Einwirkzeit der Protein-Abspaltung konnte das HSA-DL550 nur von einem Fünftel der Partikel abgespalten werden. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass HSA durch die Protein-Abspaltung nicht ausreichend denaturiert wird und die Bindung zwischen den Peptoiden auf den Partikeln und HSA nicht aufgehoben wird. Zum anderen besteht die Option, dass die Peptoidsequenzen an lineare Bindestellen auf Albumin binden, wodurch eine Denaturierung des Proteins keine Auswirkungen auf die Bindung zwischen Peptoid und HSA-DL550 hat. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür könnte sein bei der Abspaltung des Proteins mit einer Enzymlösung zu arbeiten, wodurch das Protein zersetzt wird. Die an die Harzpartikel gebundenen Peptoidsequenzen sollten hierdurch nicht beeinträchtigt werden, da Peptide eine gute Stabilität gegenüber Proteasen aufweisen.[160] Eine weitere Möglichkeit ist, dass es nicht zu einer Wechselwirkung der Partikelgebundenen Peptide und HSA kam, sondern der Farbstoff Dylight550<sup>TM</sup> an die Peptide gebunden hat. Da Dylight550<sup>TM</sup> zur Verbesserung der Löslichkeit vier Sulfonat-Gruppen auf der Oberfläche trägt, wäre eine elektrostatische Wechselwirkung mit überwiegend positiv geladenen Peptoidsequenzen vorstellbar und es könnte versucht werden bei der Abspaltung zusätzlich mit verschiedenen Salzkonzentrationen zu arbeiten. Eine unspezifische Wechselwirkung des HSA-DL550 mit den TentaGel MB HMBA-Harzpartikeln kann ausgeschlossen werden, da dies im Vorfeld des Screenings getestet wurde.[173] Da sich bereits bei der Sequenzierung der „Hits“ gezeigt hat, dass viele Partikel ein Gemisch aus verschiedenen Sequenzen auf der Oberfläche tragen besteht auch die Möglichkeit, dass es durch Aviditätseffekte zu einer Verstärkung der Bindung nach der Denaturierung des Proteins kam, da dadurch wiederum neue Bindestellen für weitere auf dem Partikel vorhandene Sequenzen freigelegt wurden. Dies ist ein durchaus vorstellbares Szenario,

---

welches auch durch das vielseitige Bindeverhalten des Zielproteins HSA gestützt wird. Bedingt durch die Probleme beim Abspalten des fluoreszenzmarkierten Zielproteins gingen beim Screeningprozess viele potentielle Bindepartner für HSA verloren. Dies zeigt, dass der Screeningprozess für zukünftige One-Bead-one-Compound Bibliotheken im Vorfeld noch genauer geplant und verbessert werden muss.

---

## 5 Fazit und Ausblick

---

### 5.1 Bindungsstudien mit Rezeptorpeptiden und CXCL8-Varianten

Für die Bindung des inflammatorischen Chemokins CXCL8 an seinen Rezeptor CXCR1 wird ein zweistufiges Modell vorgeschlagen. Dabei kommt es im ersten Schritt zur Wechselwirkung der N-terminalen Schleife von CXCL8 (*site-I*) mit dem N-Terminus (ECD1) des Rezeptors. Im zweiten Schritt kommt es zur Wechselwirkung des ELR-Motivs am N-Terminus von CXCL8 (*site II*) mit den extrazellulären Domänen 3 und 4 (ECD 3 und ECD 4) des Rezeptors, wobei es zur Rezeptoraktivierung kommt.[16, 17, 54, 55] Im Arbeitskreis von Frau Prof. Schmitz wurde in einer früheren Arbeit von Dorothea Helmer ein Bindepeptid aus dieser *site II*-Bindestelle des Rezeptors CXCR1 für das Interleukin-8 (CXCL8) entwickelt. Das Peptid mit der Sequenz: AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ (IL8RPLoops) zeigte eine Affinität für CXCL8 von  $K_D = 0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$  und kann die biologische Antwort auf CXCL8 inhibieren.[188] Für CXCL8 ist die konzentrationsabhängige Ausbildung von Dimeren bekannt. [46-48] Zahlreiche Studien mit verschiedenen monomeren und dimeren Varianten von CXCL8 sowie dem Wildtyp wurden mit N-terminalen (*site I*) Peptiden des CXCR1 durchgeführt. Dabei konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Affinität der monomeren Varianten von CXCL8 zu den N-terminalen Peptiden deutlich höher ist als die der dimeren Varianten, oder dem Dimer des Wildtyps.[70, 77, 78] Die Hypothese für die *site II* Bindung ist, dass monomere und dimere Varianten von CXCL8 hier mit gleicher Affinität binden. Die Bindung von CXCL8 an die *site II* des CXCR1 erfolgt primär über den unstrukturierten N-Terminus von CXCL8, der das ELR-Motiv enthält und sowohl im monomeren als auch im dimeren Zustand von CXCL8 freiliegt. Ein experimenteller Beweis für diese Hypothese wurde bisher noch nicht erbracht. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Dazu wurde mit der monomeren Variante CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro[71], bei der die Dimerisierung durch Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat verhindert wird, und der kovalent, durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Monomereinheiten, zum Dimer verknüpften Variante CXCL8 Arg26Cys[70] gearbeitet. Die Expression der CXCL8 Varianten in *E.coli* verlief problemlos, wobei ein interessanter Befund war, dass durch den Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol eine leichte Steigerung der Expression erreicht werden konnte. Dies wurde in der Literatur bereits von Chhetri *et al.* beschrieben.[176] Ein kritischer Schritt war die Reinigung der CXCL8 Varianten. Eine Reinigung über Kationenaustauschchromatographie, wie für den Wildtyp von CXCL8 beschrieben, konnte nicht erreicht werden.[175] Die Reinigung konnte schließlich unter Ausnutzung der GAG-Bindestelle der Chemokine durch Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule und anschließender Größenausschluss-chromatographie erreicht werden.[185] Jedoch wurden die CXCL8 Varianten nur in geringer Ausbeute und nicht vollständig gereinigt erhalten, so dass bei der Reinigungsstrategie Optimierungsbedarf besteht. In zukünftigen Arbeiten könnte versucht werden die

---

Wechselwirkung der CXCL8 Varianten mit der Heparinsäule z.B. durch Anpassung des Salzgehaltes bei der Auftragung des Lysats zu optimieren. Eine unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführte SDS-PAGE, sowie MALDI-TOF-MS-Spektren konnten zeigen, dass CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro und CXCL8 Arg26Cys, wie erwartet, als Monomer und Dimer vorliegen, sodass Bindungsstudien auf Basis von Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit dem, aus der *site II*-Bindestelle des CXCR1 abgeleiteten, Bindepeptid für CXCL8, IL8RPLoops, durchgeführt werden konnten. Jedoch konnten die von Helmer *et al.* erhaltenen Ergebnisse für die Bindung des Peptids an den Wildtyp von CXCL8 nicht reproduziert werden.[127, 172, 222] MALDI-TOF-MS-Messungen einer alten Probe zeigten, dass die ursprüngliche Sequenz wahrscheinlich C-terminal die Aminosäure Glutamat statt Glutamin enthalten hat. Für diese Sequenz (IL8RPLoopsE) konnten die ursprünglichen Ergebnisse reproduziert werden. In Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid Fluo-IL8RPLoopsE und der monomeren und der dimeren CXCL8 Variante konnte gezeigt werden, dass IL8RPLoopsE mit ungefähr der gleichen Affinität an die monomere Variante CXCL8 V27P/E29P, wie auch an die dimere Variante CXCL8 R26C bindet. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten lagen im Rahmen der Messungenauigkeiten im gleichen Bereich, wie die für den Wildtyp von Helmer *et al.* bestimmte Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . [188] Dadurch konnte die Hypothese erstmalig bestätigt werden, wonach monomere und dimere Varianten von CXCL8 mit gleicher Affinität an die *site II* Bindestelle von CXCR1 binden. Bindungsversuche mit einem Peptid aus den ersten zehn Aminosäuren des N-Terminus von CXCL8 und dem *site II*-Peptid IL8RPLoops bestätigten, dass der N-Terminus des Chemokins an der Bindung beteiligt ist, legten aber auch nahe, dass noch weitere Aminosäuren von CXCL8 zu dieser Interaktion beitragen, da eine deutlich höhere Dissoziationskonstante gemessen wurde, als für die Bindung zwischen dem *site II*-Peptid IL8RPLoops und dem vollständigen Chemokin. Zur Kontrolle der Experimente wurde ein literaturbekanntes Peptid aus der *site I*-Bindestelle von CXCR1 genutzt.[126] Hierfür konnte die Erwartung bestätigt werden, dass Peptide, welche aus dem N-Terminus des CXCR1 abgeleitet wurden mit höherer Affinität an monomere Varianten von CXCL8 binden als an dimere Varianten. Im Rahmen der Bindungsstudien mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnte für die Bindung des *site II*-Peptids IL8RPLoopsE an CXCL8 ein ungewöhnlicher Verlauf der Bindungsisothermen beobachtet werden. Die Fluoreszenzanisotropie-Werte sinken bei hohen Konzentrationen von CXCL8 stark ab und erreichen beinahe wieder den Ausgangswert. Dieses Verhalten konnte bereits in früheren Messungen von Dorothea Helmer beobachtet werden.[188] Eine mögliche Erklärung für das Absinken der Fluoreszenzanisotropie-Werte bei hohen Konzentrationen von CXCL8 könnten Quenching Effekte sein, die durch die Bindung des Peptids an CXCL8 auftreten. Für zukünftige Studien mit dem *site II* Peptid wäre eine markierungsfreie Methode zur Bindungsbestimmung essenziellem Interesse.

---

## 5.2 Ein sulfatiertes Bindepeptid für CXCL8

Für einige Chemokinrezeptoren ist bekannt, dass sie am N-Terminus posttranslational durch das Enzym Tyrosylproteinsulfotransferase (TPST) modifiziert werden.[21] Durch diese Tyrosinsulfatierung erhöht sich zum einen die Affinität des Chemokins zum Rezeptor, zum anderen dient diese auch der Beeinflussung der Selektivität des Rezeptors für bestimmte Chemokine.[20] Basierend auf NMR-Studien haben Volkman *et al.* sogar die Existenz einer konservierten Bindetasche zwischen der N-Schleife und dem  $\beta_3$ -Strang für die Sulfotyrosinbindung innerhalb der Chemokinfamilie vorgeschlagen.[65, 190] Sequenzanalysen mit dem Sulfosite-Algorithmus ergaben für CXCR1 eine 92 %ige Wahrscheinlichkeit, dass der Tyrosinrest an Position 27 des N-Terminus sulfatiert vorliegt.[67] Außerdem konnte in NMR-Titrationsexperimenten eine Bindung von Sulfotyrosin an CXCL8 nachgewiesen werden.[65] Das von Attwood *et al.*[126] beschriebene N-terminale Rezeptorpeptid CXCR1-p1 enthält in seiner Sequenz das im Rezeptor an Position 27 vorkommende Tyrosin. Auf Grundlage der oben genannten Ergebnisse sollte das Peptid CXCR1-p1 in seiner sulfatierten Form (sY-CXCR1-p1) hergestellt und in Fluoreszenzanisotropie-Messungen untersucht werden, ob das Peptid in sulfatierter Form eine höhere Affinität zu CXCL8 aufweist.

Die Synthese des sulfatierten Peptids konnte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen neopentyl-geschützten Tyrosinsulfatester-Baustein für die Fmoc-basierte Festphasenpeptid-synthese erfolgreich durchgeführt werden. Die Neopentyl-Schutzgruppe ist sowohl unter sauren, als auch unter basischen Bedingungen stabil und verhindert eine Hydrolyse des sehr labilen Tyrosinsulfatesters während der Festphasenpeptidsynthese und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen. Sie kann mit Hilfe von kleinen, starken Nucleophilen wie Azid- oder Cyanidionen oder unter milderer Bedingungen mit Ammoniumacetat abgespalten werden.[19, 191] Im Rahmen der Arbeit gelang die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe mit 2 M Ammoniumacetatlösung über Nacht und das ungeschützte Peptid konnte an der HPLC in einem linearen Gradienten aus 0,1 M Ammoniumacetatlösung und Acetonitril gereinigt werden. Allerdings gestalteten sich das weitere Handling des sulfatierten Peptids, sowie dessen Nachweis mittels Massenspektrometrie als problematisch. Schon durch den Kontakt mit geringen Mengen Säure kommt es zur Hydrolyse des Tyrosinsulfatesters, wenn dieser ungeschützt vorliegt. Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass es beim Gefriertrocknen des in einer Mischung aus Acetonitril und Ammoniumacetatlösung gelösten sulfatierten Peptids zur Hydrolyse kommt, auch wenn dieses Vorgehen in der Literatur für sulfatierte Peptide beschrieben ist. Der massenspektrometrische Nachweis des sulfatierten Peptids konnte nur im Negativionenmodus erreicht werden, was eine Abweichung vom Standardmessverfahren bedeutete. Mittels MALDI-TOF-MS gelang schließlich der Nachweis im Negativionenmodus in der Matrix DHB, sowie in der Matrix HCCA.

Mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnte schließlich gezeigt werden, dass sich durch den Einbau von Sulfotyrosin die Affinität für CXCL8, im Vergleich zum nicht sulfatierten Peptid, um

---

den Faktor 10 erhöht, was die Vermutung, dass CXCR1 ebenfalls sulfatiert vorliegt, bekräftigt. Die Pufferbedingungen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung zwischen sulfatiertem Peptid und Chemokin. Studien konnten zeigen, dass sich Phosphat im Puffer negativ auf die Bindung von sulfatierten Rezeptorpeptiden an Chemokine auswirkt, da dieses mit den Peptiden um die Bindung an die Sulfotyrosin-Bindungstasche auf der Chemokinoberfläche konkurriert.[194] Außerdem ist bekannt, dass Natriumchlorid im Puffer die Bindung von N-terminalen Peptiden des CXCR1 an CXCL8 beeinträchtigt.[70] Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bindungsstudien in Puffer C durchgeführt, der sich im Vergleich zu PBS, der dem physiologischen Milieu des Extrazellulärraums entspricht, zwar durch einen geringen Anteil Natriumchlorid, jedoch einen erhöhten Anteil Phosphat auszeichnet. Interessant wäre es weitere Bindungsstudien mit dem sulfatierten Peptid sY-CXCR1-p1 und CXCL8 in verschiedenen Puffern durchzuführen. Insbesondere könnte eine Messung in einem Puffer mit der NaCl-Konzentration von Puffer C und der Phosphatkonzentration von PBS relevant sein.

Die meisten Chemokinrezeptoren können mehrere Chemokine binden und für einige ist bekannt, dass die Tyrosinsulfatierung des Rezeptors die Beeinflussung der Selektivität des Rezeptors für bestimmte Chemokine dient.[20] CXCR1 bindet neben CXCL8 nur noch das Chemokin CXCL6 mit hoher Affinität.[65] Es wäre interessant zu untersuchen, in wie fern sich die Sulfatierung auf die Affinität zu CXCL6 auswirkt.

### 5.3 Cyclische Bindepeptide für CXCL8

In der dieser Arbeit vorausgehenden Dissertation von Kevin Brahm wurden cyclisierte und mit dem Fluorophor TAMRA-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops hergestellt und in Fluoreszenzanisotropie-Messungen die Bindung an CXCL8 untersucht.[172] Dabei konnte zwar, im Vergleich zum linearen Peptid L8RPLoopsE, keine Erhöhung der Affinität zu CXCL8 festgestellt werden, jedoch konnte durch die Cyclisierung auch für das Peptid IL8RPLoopsQ, für das in seiner linearen Form mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen keine Bindung an CXCL8 nachgewiesen werden konnte, eine Bindung an CXCL8 mit nahezu der selben Affinität wie für das cyclische Peptid L8RPLoopsE Peptid gezeigt werden. Dies zeigt, dass durch die kovalente Cyclisierung das Peptid in seiner bindenden Konformation stabilisiert werden konnte, nachdem MD-Simulationen nahe gelegt hatten, dass es in IL8RPLoopsE zu einer Wechselwirkung der Lysinseitenkette an Position 2 mit der Glutamatseitenkette an Position 18 kommt.[200] Eine Auffälligkeit waren die für die cyclischen Peptide erhaltenen Bindungsisothermen, welche einen inversen Verlauf zeigten. Die hohen Fluoreszenzanisotropiewerte legten nahe, dass der Fluorophor im ungebundenen Peptid stark in seiner Beweglichkeit eingeschränkt ist. Nach Bindung des cyclischen Peptids an das Chemokin CXCL8 wurden geringere Fluoreszenzanisotropiewerte gemessen, was auf eine Erhöhung der Beweglichkeit des

---

Fluorophors hinweist. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens ist, dass der über einen flexiblen Linker mit dem Peptid-Makrozyklus verbundene Fluorophor im ungebundenen Zustand mit dem Peptid interagiert und durch eine Bindung des Chemokins verdrängt wird. Auf diese Fluorophor-Peptid-Interaktion weisen auch MD-Simulationen hin. Um dieses ungewöhnliche Verhalten genauer zu beleuchten, wurden im Rahmen dieser Arbeit lineare mit TAMRA-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops hergestellt und mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen die Bindung an CXCL8 untersucht. Die erhaltenen Bindungsisothermen zeigen den erwarteten, ansteigenden Verlauf, wobei auch hier für das ungebundene Peptid hohe Fluoreszenzanisotropiewerte gemessen wurden, die auf eine Interaktion des Fluorophors mit der Peptidstruktur hindeuten. Für lineare mit Fluorescein-markierte Varianten des *site II*-Peptids IL8RPLoops konnte dieses Verhalten nicht in dieser Ausprägung festgestellt werden. Die cyclischen Peptide haben entsprechend den Erwartungen in einem Proteasestabilitäts-Assay eine hohe Stabilität gegenüber dem Abbau durch das Enzym Trypsin gezeigt. Interessanterweise konnte hier auch für die linearen mit TAMRA-markierten Peptide eine Erhöhung der Proteasestabilität gezeigt werden, nicht jedoch für die mit Fluorescein-markierten. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass es durch die Interaktion zwischen TAMRA und der Peptidsequenz auch zu einer Stabilisierung der linearen Peptide kommt. Durch CD-Spektroskopie konnten keine Sekundärstrukturelemente festgestellt werden, die zu einer Stabilisierung führen könnten. Zukünftig wäre es von Interesse mittels markierungsfreier Methoden Bindungsisothermen für die Peptide zu bestimmen, um den Einfluss des Fluorophors genauer aufzuklären. Insbesondere für das lineare Peptid IL8RPLoopsQ wäre dies interessant.

#### 5.4 Peptide als Binder für Albumin

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Strategien, Peptide für den therapeutischen Einsatz besser nutzbar zu machen, da dieser nach wie vor durch bestimmte Nachteile, wie z.B. eine geringe Plasmahalbwertszeit durch den raschen Abbau durch Proteasen im Blut oder eine schnelle Ausscheidung über die Nieren aufgrund ihrer geringen Größe, limitiert ist.[149] Um den proteolytischen Abbau von Peptiden zu unterbinden, können Peptidsequenzen in Peptide überführt werden. Peptide zeichnen sich durch eine gute Stabilität gegenüber Proteasen aus.[160] Die rasche Ausscheidung über die Nieren kann verzögert werden, in dem durch das Anhängen bestimmter Peptidsequenzen oder hydrophober Anker die Bindung an Serumalbumin vermittelt wird.[164, 207] Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher Peptidsequenzen zu finden, welche an humanes Serumalbumin (HSA) binden können. Dazu wurde im Zuge einer von mir betreuten Masterarbeit eine *One-Bead-One-Compound* (OBOC)-Bibliothek aus Peptidhexameren synthetisiert und mittels fluoreszenzbasiertem Screening auf Binder für humanes Serumalbumin durchmustert.[173]

---

Erste Probleme zeigten sich schon beim Screening-Prozess der Peptoidbibliothek. Zwar konnten in einem ersten Schritt mehr als 200 potentielle HSA-Binder aus den ca. 100 000 möglichen Sequenzen isoliert werden, jedoch konnte das für das fluoreszenzbasierte Screening mit dem Fluorophor Dylight550<sup>TM</sup> markierte HSA bei einem Großteil dieser „Hits“ nicht mehr von den auf den Harzpartikeln gebundenen potentiellen HSA-Bindern abgespalten werden, wodurch eine spätere Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS/MS verhindert wird. Es wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur mit den „Hits“ weiter gearbeitet, bei denen eine Abspaltung von HSA möglich war, so dass viele potentielle „Hits“ verloren gingen. Am Ende wurden 22 „Hits“ einer Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS/MS unterzogen. Dabei konnte nur für 6 „Hits“ eine eindeutige Sequenz identifiziert werden. Obwohl die Synthese der Bibliothek auf Hexamere ausgelegt war, wurden darunter vier Pentamer-Sequenzen eindeutig identifiziert. Dies spricht für unvollständige Syntheseschritte. Dadurch ist es auch möglich, dass auf ein und demselben Harzpartikel mehrere Sequenzen zugleich gebunden waren, wodurch neben Problemen bei der Identifikation der Sequenzen auch Probleme beim Screening, z.B. durch Aviditätseffekte, auftreten können. Zukünftig sollte schon bei der Synthese der OBOC-Bibliothek mit größerer Sorgfalt vorgegangen werden. Damit die einzelnen Syntheseschritte vollständig ablaufen, könnte entweder die Reaktionszeit verlängert werden, oder die einzelnen Syntheseschritte könnten mit frischer Reaktionslösung wiederholt werden. Optimal wäre eine Möglichkeit zur quantitativen Überprüfung des Erfolgs der Syntheseschritte. Bei der Peptidsynthese besteht die Möglichkeit die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe quantitativ durch Absorptionsmessung zu verfolgen. Auch für die Synthese von Peptoiden gibt es die Möglichkeit mit Fmoc-geschützten Bausteinen zu arbeiten.[160] Mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnte für eine Sequenz eine Bindung an HSA im niedrigen mikromolaren Bereich ermittelt werden. Interessant wäre es diese Peptoidsequenz mit einer an CXCL8 bindenden Peptidequenz zu koppeln. Da für HSA bekannt ist, dass es sich in entzündetem Gewebe ansammelt, und CXCL8 als Entzündungsmediator an verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt ist, könnte ein CXCL8-Inhibitor, wie das zuvor beschriebene Peptid IL8RPLoops, so direkt zu seinem Wirkort transportiert werden. [4, 107-110, 127, 164] Dazu wäre es zunächst sehr interessant zu überprüfen, wie sich die Fusion der Peptoidsequenz mit der Sequenz von IL8RPLoops sowohl auf die Bindung an HSA, als auch auf die Bindung an CXCL8 auswirkt.

---

## 6 Material und Methoden

---

### 6.1 Allgemeine Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien und Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: AB SCIEX (Framingham, MA, USA), Acros Organics (Schwerte, DE), Alfa Aesar GmbH (Karlsruhe, DE), AppliChem GmbH (Darmstadt, DE), Biomol (Hamburg, DE), Carbolution (Saarbrücken, DE), , Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE), Corning (Kaiserslautern, DE), Fisher Scientific (Schwerte, DE), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, A), Iris Biochem (Marktredwitz, DE), Macherey & Nagel (Düüeren, DE), Merck Millipore (Darmstadt, DE), Merck Novabiochem (Darmstadt, DE), Orpegen (Heidelberg, DE), PL-Laboratories (Port Moody, CAN), Rapp Polymers (Tübingen, DE), Roche (Grenzach-Whylen, DE), Sarstedt (Nümbrecht, DE), SERVA (Heidelberg, DE), Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE), Tecan (Männedorf, CH), TH Geyer (Renningen, DE), Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG (Braunschweig, DE), VWR International (Darmstadt, DE).

### 6.2 Puffer

**Tabelle 6-1** zeigt die Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer. Zum Ansetzen der Puffer wurde, miliQ-Wasser verwendet.

**Tabelle 6-1:** Häufig verwendete Puffer.

Puffer	
<b>Puffer A</b> , pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM
	NaCl 90 mM
<b>Puffer B</b> , pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM
	NaCl 1,5 M
<b>Puffer C</b> , pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM
	NaCl 35 mM
<b>PBS</b> , pH 7,5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM
	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM
	NaCl 137 mM
	KCl 2,7 mM

### 6.3 Geräte und Software

Zur Durchführung der experimentellen Arbeiten wurden verschiedene Geräte verwendet, welche in **Tabelle 6-2** aufgeführt sind.

**Tabelle 6-2:** Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CD-Spektrometer	J-810 Spektropolarimeter	Jasco, Groß-Umstadt, DE
ESI-MS	Impact II	Bruker, Hanau, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer, HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Gefriertrockner	Alpha 2-4 LD plus	Christ, Osterode am Harz, DE
HPLC	ÄKTAPurifier 10	GE Healthcare, München, DE
HPLC	LC20 AD	Shimadzu, Duisburg, DE
PDA	SPD M20A	Shimadzu, Duisburg, DE
Kühlzentrifuge	Rotina 420 R	Hettich, Kirchlingern, DE
MALDI-TOF-MS	Autoflex speed TOF/TOF	Bruker, Hanau, DE
Mikrotiterplattenleser	Infinite M1000	Tecan, Maennedorf, CH
NMR-Spektrometer	AvanCe 300	Bruker, Hanau, DE
pH-Meter	HI221	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Photometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Reinstwasseranlage	Millipore Milli-Q Biocel	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient	Heidolph, Schwabach, DE
Tischschüttler	Vibramax 100	Heidolph, Schwabach, DE
Tischvakuumpumpe	Laboport	KNF Lab, Freiburg, DE
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR, Darmstadt, DE
Ultraschallsonde	Sonoplus	Bandelin, Berlin, DE

Zur Speicherung und Auswertung von Messdaten wurde verschiedene Software verwendet, die in **Tabelle 6-3** aufgelistet ist.

**Tabelle 6-3:** Verwendete Software.

Software	Art der Daten	Hersteller
Axio Vision	Mikroskop Daten	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
CD Deconvolution	CD-Spektren	Gerald Böhm
i-control 1.11	Fluoreszenzanisotropie-Messungen	Tecan, Maennedorf, CH
Image J	Bildbearbeitung	Wayne Rasband
LabSolutions	HPLC, Shimadzu	Shimadzu, Duisburg, DE
MestReNova 9.1	NMR-Spektren	MestreLab Reasearch
Mmass 5.5.0	MALDI-MS-Spektren	Martin Strohm
OriginPro 8	Fluoreszenzanisotropie-Messungen	OriginLab
Pymol	Peptid- und Proteinstrukturen	Schrödinger, New York, US
Unicorn	HPLC, Äkta	GE Healthcare Life Science, DE

---

## 6.4 Peptid- und Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte manuell nach einem Standardprotokoll für die Fmoc-Festphasenpeptidsynthese[125] auf 2-Chlorotrytylchlorid Harz (PL Polymer Laboratories, Port Moody, CAN) oder TentaGel MB HMBA- Harz (Rapp Polymere, Tübingen, DE). Die Peptidsynthese erfolgte manuell mit der Submonomermethode nach Zuckerman *et al.*[153] auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz (Iris Biochem GmbH, Marktredwitz, DE). Lösemittel für die Synthese wurden von VWR bezogen. Fmoc geschützte Aminosäuren, primäre Amine und Kupplungsreagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Carbolution bezogen. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 6.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Peptid- und Peptidsynthese

#### AAV1: Quellen der Harzpartikel

Die verwendeten Harzpartikel werden zunächst für mindestens 30 min in Dichlormethan (DCM) auf dem Schüttler bei 600 rpm gequollen. Für 100 mg Harz wird mindestens 1 mL DCM verwendet. Im Anschluss daran wird das Harz zweimal mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen und für weitere 10 min auf dem Schüttler bei 600 rpm in DMF gequollen. Anschließend kann das Harz für die Kupplungen eingesetzt werden.

#### AAV2: Waschen des Harzes

Gewaschen wird nach jedem Schritt der Peptid- bzw. Peptidsynthese. Hierfür wird die Flüssigkeit über den Harzpartikeln abgelassen. Anschließend wird fünfmal mit DMF gewaschen (mindestens 1 mL DMF pro 50 mg Harz).

Sollen die Harzpartikel getrocknet werden, wird noch dreimal mit DCM und dreimal mit Methanol gewaschen und die Harzpartikel im Luftstrom der Tischvakuumpumpe vorgetrocknet. Anschließend werden die Harzpartikel über Nacht lyophilisiert.

#### AAV3: Kupplung der ersten Aminosäure an 2-Chlorotrytyl-Chlorid-Harz

1,2 Äquivalente (eq.) der Fmoc-geschützten Aminosäure und 4 eq. Diisopropylethylamin (DIPEA) werden in möglichst wenig DMF gelöst und für 5 Minuten auf dem Schüttler bei 600 rpm voraktiviert. Die voraktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Durch Zugabe von Methanol und 30- minütiger Inkubation werden nicht abreagierte Bindungsstellen am Harz gesättigt.

---

#### **AAV4: Kupplung der ersten Aminosäure an TG-MB-HMBA-Harz**

3 eq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 0,1 eq. 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und 4 eq. Diisopropylcarbodiimid (DIC) werden in möglichst wenig DMF gelöst und für 5 Minuten auf dem Schüttler bei 600 rpm voraktiviert. Die voraktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln in eine Fritte gegeben und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

#### **AAV5: Kupplung von weiteren Aminosäuren**

3 eq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 3 eq. HBTU und 6 eq. DIPEA werden in möglichst wenig DMF gelöst und für 5 Minuten auf dem Schüttler bei 600 rpm voraktiviert. Die voraktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln gegeben und für etwa eine Stunde auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wird die Kupplung wiederholt, im Falle von Arginin wird der Kupplungsschritt zweimal wiederholt. Erfolgt die Inkubation über Nacht, ist eine Wiederholung des Kupplungsschrittes nicht nötig.

#### **AAV6: Fluoreszenzmarkierung der Peptide**

Für die Fluoreszenzmarkierung werden 3 eq. 5-(6)-Carboxyfluorescein bzw. 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin, 3 eq. Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 6 eq. DIC in möglichst wenig DMF gelöst und für 5 Minuten auf dem Schüttler voraktiviert. Die aktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln in die Fritte gegeben und im Dunkeln über Nacht auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert.

#### **AAV7: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe**

Das Harz wird für 5 min in einer 20 %igen Piperidin-Lösung in DMF auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Anschließend werden die Partikel dreimal mit DMF gewaschen und abermals für 10 min in der 20%igen Piperidin-Lösung geschüttelt.

#### **AAV8: Acylierung mit Chloressigsäure**

10 eq. Chloressigsäure werden in DMF gelöst, sodass eine 0,4 M Lösung entsteht. Es werden 10 eq. DIC hinzugefügt, die resultierende Lösung wird zu den Harz-Partikeln gegeben und für eine Stunde auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Dieser Schritt sollte nicht über Nacht ausgeführt werden.

#### **AAV9: Substitution mit primärem Amin (Aminierung)**

20 eq. des primärenamins werden, je nach Löslichkeit, in NMP, DCM oder DMSO gelöst, sodass eine 2 M Lösung erhalten wird, welche anschließend zum Harz gegeben wird. Liegt das primäre Amin als Hydrochlorid vor, werden 10 eq. des Hydrochlorids in einer Mischung aus DMSO und DIPEA (1:1) gelöst, so dass eine 1 M Lösung erhalten wird, welche anschließend zum Harz gegeben wird. Die Aminierung erfolgt bei 600 rpm auf dem Schüttler über Nacht.

---

### **AAV10: Chloranil -Test**

Wenige Harzpartikel werden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es werden 40  $\mu\text{L}$  einer 2 %igen Chloranil-Lösung in DMF, sowie 40  $\mu\text{L}$  einer 2 %igen Acetaldehyd-Lösung in DMF zugegeben und für 5 min inkubiert. Eine Blaufärbung der Partikel zeigt die Anwesenheit freier Aminogruppen an.

### **AAV11: Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen/**

#### **Abspaltung des Peptids/Peptoids von 2-Chlorotriyl-chlorid-Harz bzw. Rink- Amid- Harz**

Die Partikel werden mit einer Lösung aus 94 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA), 2.5 % (v/v) Anisol, 2.5 % (v/v) Triisopropylsilan (TIPS) und 1 % (v/v) Wasser ,versetzt mit 5 % (w/w) Dithiothreitol (DTT) für 3 h auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Die Abspatlösung wird aufgefangen und das verbleibende Harz noch zweimal mit frischer Abspatlösung nachgespült. Danach wird zum Fällen des entsprechenden Peptids/Peptoids gekühlter Diethylether bzw. Methyl-*tert*-butylethers (MTBE) zur Abspatlösung gegeben. Das ausgefallene Peptid/Peptoid wird abzentrifugiert (4 °C, 2500 rpm, 10 Minuten) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wird in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser gelöst und anschließend direkt mittels RP-HPLC gereinigt oder zur Lagerung bei -20 °C lyophilisiert.

#### **AAV12: Abspaltung des Peptids vom TG-MB-HMBA-Harz**

Nachdem die Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11** abgespalten wurden, wird das getrocknete Harz zusammen mit einer 25 %igen Ammoniaklösung in einem Exsikkator platziert. Der Exsikkator wird nun solange evakuiert, bis Ammoniakgas aus der Lösung freigesetzt wird. Dies ist anhand von Bläschenbildung erkennbar. Das Harz wird über Nacht im Ammoniakdampf inkubiert. Anschließend wird das abgespaltene Peptid mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser vom Harz gewaschen und lyophilisiert.

#### **AAV13: Abspaltung der Neopentyl (np)- Schutzgruppe**

Das bereits gereinigte Peptid wird in 2 M Ammoniumacetat-Lösung gelöst und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die resultierende Lösung darf nicht lyophilisiert werden! Der Kontakt mit Säure muss unbedingt vermieden werden!

#### AAV14: Reinigung von Peptiden und Peptoiden über RP-HPLC

Die Lösemittel und Zusätze in HPLC-Qualität für die Reinigung der Peptide und Peptoide wurden von VWR bezogen. Die Zusammensetzung der Eluenten ist in **Tabelle 6-3** zusammengestellt.

**Tabelle 6-4:** Bei der RP-HPLC verwendete Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Eluent A	Acetonitril 5 % miliQ H <sub>2</sub> O 95 % TFA 0,1 %
Eluent B	Acetonitril 95 % miliQ H <sub>2</sub> O 5 % TFA 0,1 %

Lyophilisierte Rohprodukte von Peptiden und Peptoiden werden mit 1 mL Eluent A versetzt und wenn möglich durch Vortexen vollständig gelöst. Substanzen, die nicht vollständig gelöst sind, werden sukzessive mit 50  $\mu$ L Eluent B versetzt und gevortext, bis sie größtenteils gelöst vorliegen. Das Gesamtvolumen der Lösung darf 1,5 mL nicht überschreiten. Nicht gelöste Rückstände werden abzentrifugiert und der Überstand wird mittels einer 2 mL Injektorschleife auf die mit der gleichen Eluentenzusammensetzung äquilibrierte Säule (Supelco Discovery HS C18 250 x 10 mm, 5  $\mu$ M - Sigma Aldrich) aufgetragen. Es wird mit einer Flussrate von 1,5 mL/min gearbeitet. Nach einem Säulenvolumen (CV) mit isokratischem Verlauf werden die Bestandteile des Rohprodukts über 5 Säulenvolumina in einem linearen Gradient bis 80 % Eluent B separiert, eluiert und die entsprechenden Fraktionen manuell in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgt ein Plateau bei 100 % Eluent B, um die Säule vollständig zu spülen. Am Ende der Methode wird die Säule wieder mit einem Säulenvolumen des entsprechenden Eluentengemischs auf die Startbedingungen zurückgesetzt. Peptide bzw. Peptoide werden durch einen Photodiodenarraydetektor (PDA) bei 280nm und 254nm detektiert. Abhängig von der Markierung des Analyten wird zusätzlich die Anregungswellenlänge des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffs detektiert (430 nm – Fluorescein-markierte Peptide und Peptoide, 560 nm – TAMRA-markierte Peptide). Die Fraktionen werden peakweise vereinigt und anschließend lyophilisiert und der Rückstand bei -20 °C aufbewahrt.

#### AAV15: Analytische RP-HPLC

100  $\mu$ L des gelösten Analyten werden entweder mit Hilfe einer Hamilton-Spritze oder des Autosamplers (Shimadzu-20AC HT) auf die äquilibrierte Säule (Supelco Discovery HS C18 100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ M - Sigma Aldrich) aufgetragen und in einem linearen von 0-80% Eluent B über 5 CV, bei einer Flussrate von 0,4 mL/min, analysiert.

## AAV16: Nachweis der Peptide und Peptoide mittels MALDI-TOF MS

Die verwendeten Matrixsubstanzen (siehe **Tabelle 6-4**) wurden von Merck bezogen. Die Lösemittel und Zusätze in UHPLC-MS-Qualität wurden von SERVA bezogen

**Tabelle 6-5:** Verwendete Matrices.

Matrix	Ansetzen der Matrixlösung	Einsatz
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure (HCCA)	Gesättigte Lösung in 1:1 (v/v) AcN:Wasser mit 0,1% TFA	Standardmatrix: Peptide, Peptoide und Proteine (0,7 – 20 kDa)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB)	20 mg/mL 2,5-DHB in 1:1 (v/v) AcN:Wasser mit 0,1% TFA	Breite Einsatzmöglichkeit: Peptide und Proteine Negative Ionen
2,5-Dihydroxyacetophenon (2,5-DHAP)	7,6 mg 2,5-DHAP in 375 $\mu$ L EtOH + 125 $\mu$ L 18 mg/mL Diammoniumhydrogencitrat in Wasser	Proteine (8 – 100 kDa)

Die Probenvorbereitung und Auftragung richtet sich nach der jeweils verwendeten Matrix.

### HCCA („Dried Droplet Methode“)

Die gesättigte HCCA- Matrixlösung wird für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Peptid- bzw. Peptoidprobe wird, wenn möglich, in 50:50 (v/v) AcN:Wasser mit 0,1 % TFA gelöst. Anschließend wird ein Teil der Probe mit einem Teil der Matrixlösung vermischt und je 0,5  $\mu$ L auf die MALDI-Target Platte (MTP 384 *ground steel*, Bruker) aufgetragen. Dabei sollte die Platte möglichst nicht mit der Pipettenspitze berührt werden und zur besseren Kristallisation ein sauberer Tropfen auf die Platte gesetzt werden. Die Proben werden bei Raumtemperatur für 30 Minuten an der Luft trocknen gelassen.

### DHB („Dried Droplet Methode“)

Um die Matrixsubstanz vollständig zu lösen wird die 20 mg/mL Matrixlösung für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Peptidprobe wird, wenn möglich, in 50:50 (v/v) AcN:Wasser mit 0,1 % TFA gelöst. Anschließend wird ein Teil der Probe mit einem Teil der Matrixlösung vermischt und je 0,5  $\mu$ L auf die MALDI-Target Platte (MTP 384 *ground steel*, Bruker) aufgetragen. Dabei sollte die Platte möglichst nicht mit der Pipettenspitze berührt werden und zur besseren Kristallisation ein sauberer Tropfen auf die Platte gesetzt werden. Die Proben werden bei Raumtemperatur für 30 Minuten an der Luft trocknen gelassen.

### DHAP („Kratzmethode“):

Die Probe wird möglichst in Wasser mit 0,1 % TFA gelöst. Anschließend werden 2  $\mu\text{L}$  der Probenlösung und 2  $\mu\text{L}$  der wie in Tabelle angesetzte Matrixlösung vermischt und solange auf und ab pipettiert, bis die Kristallisation beginnt. Je 0,5  $\mu\text{L}$  der Suspension werden auf die MALDI-Target Platte (MTP 384 *ground steel*, Bruker) aufgetragen. Die Proben werden bei Raumtemperatur für 30 Minuten an der Luft trocknen gelassen.

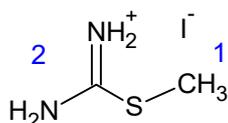
## 6.4.2 Synthese geschützter primärer Amine für die Peptidsynthese

Einige der für die Peptidsynthese benötigten, geschützten primären Amine wurden anhand der jeweils angegebenen Literaturvorschrift selbst hergestellt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten der Firma Merck (TLC Silica F254) mit UV-Indikator verfolgt. Die Überprüfung des Syntheseerfolgst und der Reinheit erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Analysen bei 300 MHz in der NMR- Abteilung des Fachbereichs Chemie der TU Darmstadt. Die deuterierten Lösemittel für die NMR- Spektroskopie wurden von der NMR- Abteilung der TU Darmstadt bezogen.

### Synthese von Di-Boc-guanidin-1,4-diaminbutan ( $\text{Boc}_2\text{-Narg}^{+1}$ ) (**12**)

Di-Boc-guanidin-1,4-diaminbutan ( $\text{Boc}_2\text{-Narg}^{+1}$ ) wird in einer dreistufigen Synthese nach Hickey *et al.* hergestellt.[223]

#### Stufe 1: Synthese von 2-Methylisothiuroniumiodid (**12b**)

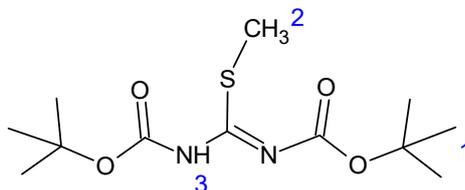


Eine Mischung von 5,0 g (65 mmol, 1 eq.) Thioharnstoff, 4,1 ml (65 mmol, 1 eq.) Methyljodid und 50 mL Methanol wird für 90 Minuten auf 65 °C erhitzt. Anschließend wird die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt, der ausgefallene Feststoff mit der Saugflasche abfiltriert und zweimal mit je weils 15 mL kaltem Diethylether gewaschen. Als Produkt (**12b**) werden 12,78 g (59 mmol, 90 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

$R_F = 0,73$  (Aceton)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz, 300 K): δ/ppm = 2.55 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>(1)), 8.89 (bs, 4 H, NH<sub>2</sub>(2)).

### Stufe 2: Synthese von Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-S-methylisothioharnstoff (12a)

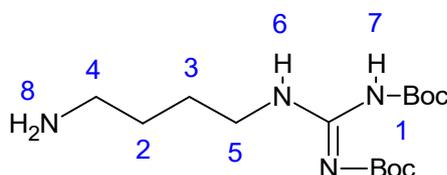


6,0 g (27,5 mmol, 1 eq.) 2-Methylisothiuroniumiodid (**12b**) werden in 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und zu einer Lösung aus 12 g (55 mmol, 2 eq.) BocO<sub>2</sub> in 300 mL DCM getropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren des Trockenmittels am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Als Rohprodukt erhält man einen weißen, öligen Feststoff, welcher zur Reinigung für 1 Stunde in 200 mL dest. H<sub>2</sub>O/EtOH (9:1 (v/v)) suspendiert, anschließend abfiltriert und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen wird. Insgesamt werden 7,8 g (27 mmol, 97 %) eines weißen, pulverigen Feststoffs (**12a**) erhalten.

R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:1, v/v) = 0,9

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 300 K): δ/ppm = 1.52 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>(1)), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>(2)), 11.61 (bs, 1H, NH(3)).

### Stufe 3: Synthese von Di-Boc-guanidin-1,4-diaminbutan (Boc<sub>2</sub>-Narg<sup>+1</sup>) (12)



Zu einer Lösung aus 5,0 g (57 mmol, 2.6 eq.) 1,4-Diaminbutan in 30 mL DCM wird eine Lösung aus 6,0 g (20.5 mmol, 1 eq.) **12a** und 50 mL DCM getropft. Das Reaktionsgemisch wird für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zweimal mit dest. H<sub>2</sub>O und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung, gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Es werden 6,7 g

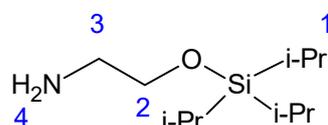
---

(20 mmol, 96%) einer farblosen, öligen Flüssigkeit (**12**) erhalten, die über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert.

$R_f$  (Methanol) = 0,22

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, 300 K):  $\delta/\text{ppm}$  = 1.36 (s, 2 H,  $\text{NH}_2(8)$ ), 1.42 (s, 18 H,  $\text{CH}_3(1)$ ), 1.52-1.58 (m, 4 H,  $\text{CH}_2(2,3)$ ), 2.66 (t, 2 H,  $\text{CH}_2(4)$ ), 3.35 (m, 2 H,  $\text{CH}_2(5)$ ), 8.26 (bs, 1 H,  $\text{NH}(6)$ ), 11.39 (bs, 1 H,  $\text{NH}(7)$ ).

### Synthese von 2-((Triisopropylsilyl)oxy)ethanamin (TIPS-Nser<sup>+1</sup>) (**14**)



Zu einer Lösung aus 2,0 g (33.3 mmol, 1eq) Monoethanolamin in 30 mL DCM wird eine Mischung aus 6,4 g (33.3 mmol, 1Äq) Triisopropylsilylchlorid in 30 mL DCM getropft. Während der Zugabe wird das Reaktionsgemisch im Eisbad gekühlt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 30 mL gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt. Es wird zweimal mit je 25 mL DCM ausgeschüttelt und anschließend werden die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 100 mL, gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Es werden 6,5 g (91%) einer farblosen, öligen Flüssigkeit (**14**) erhalten. [224]

$R_f$  (Cyclohexan/Essigsäureethylester, 1:2, v/v) = 0,19

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, 300 K):  $\delta/\text{ppm}$  = 1.03-1,07 (m, 18 H,  $\text{CH}_3(1)$ ); 2.79 (t, 2 H,  $\text{CH}_2(3)$ ); 3.63 (bs, 2 H,  $\text{NH}_2(4)$ ); 3.70 (t, 2 H,  $\text{CH}_2(2)$ ).

---

### 6.4.3 Peptide und Peptoide

Im Folgenden werden alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptide und Peptoide aufgeführt.

#### CXCR1-p1 (1)

Sequenz: NH<sub>2</sub>-MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-COOH

Die Sequenz wurde von Attwood *et al.* [126] als CXCL8 bindendes Peptid beschrieben. Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlorotriylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach AAV3. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach AAV2 gewaschen, und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach AAV2, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach AAV5 wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptids vom Harz nach AAV11. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 39 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2044,2 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

#### Fluo-CXCR1-p1 (1a)

Sequenz: Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-COOH

Um die Bindung von CXCR1-p1 (1) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlorotriylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach AAV3. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden

---

durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kuppelung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt schließlich die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)-Carboxyfluorescein nach **AAV6**. Danach werden gemäß **AAV11** die Seitenkettenschutzgruppen, sowie das Peptid vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 34 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2401,5 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **TAMRA-CXCR1-p1 (1b)**

Sequenz: TAMRA-MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-COOH

Um die Bindung von CXCR1-p1 (**1**) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid mit 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlortritylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kuppelung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen, und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kuppelung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt schließlich die Fluoreszenzmarkierung mit 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin nach **AAV6**. Danach werden gemäß **AAV11** die Seitenkettenschutzgruppen, sowie das Peptid vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 34 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2455,6 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

---

## CXCL8 1-10 (6)

Sequenz: NH<sub>2</sub>-SAKELRCQCI-COOH

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlortritylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Ser(tBu)-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen, und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptids vom Harz nach **AAV11**. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 34 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA) m/z = 1151,1 [M+H]<sup>+</sup> (entspricht berechneter Masse)

## Fluo-CXCL8 1-10 (6a)

Sequenz: Fluo-SAKELRCQCI-COOH

Um die Bindung von CXCL8 1-10 (6) an IL8RPLoopsE (8) mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlortritylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Ser(tBu)-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen, und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt schließlich die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)-Carboxyfluorescein nach **AAV6**. Danach werden gemäß **AAV11** die Seitenkettenschutzgruppen, sowie das Peptid vom Harz

---

abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 38 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1507,7 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **IL-8-RP-Loops Q (7)**

Sequenz:  $\text{NH}_2\text{-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-CONH}_2$

Die Sequenz wurde von Helmer *et al.* [127] als CXCL8 bindendes Peptid beschrieben. Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Gln(Trt)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen, und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kuopplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11**. Gemäß **AAV12** wird das Peptid vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 10-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 30 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2202,2 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **Fluo-IL-8-RP-Loops Q (7a)**

Sequenz:  $\text{Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-CONH}_2$

Um die Bindung von IL8RPLoopsQ (7) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kuopplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Gln(Trt)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**,

---

bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)-Carboxyfluorescein nach **AAV6**, bevor die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11** durchgeführt wird. Danach wird das Peptid gemäß **AAV12** vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 34 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2561,1 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **TAMRA-IL-8-RP-Loops Q (7b)**

Sequenz: TAMRA-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-CONH<sub>2</sub>

Um die Bindung IL8RPLoopsQ (7) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kopplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Gln(Trt)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin nach **AAV6**, bevor die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11** durchgeführt wird. Danach wird das Peptid gemäß **AAV12** vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 36 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2615,4 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

---

## IL-8-RP-Loops E (8)

Sequenz: NH<sub>2</sub>-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTE- CONH<sub>2</sub>

Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheseyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11**. Gemäß **AAV12** wird das Peptid vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 10-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 29 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA) m/z = 2203,1 [M+H]<sup>+</sup> (entspricht berechneter Masse)

## Fluo-IL-8-RP-Loops E (8a)

Sequenz: Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTE- CONH<sub>2</sub>

Um die Bindung von IL8RPLoopsE (8) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheseyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)Carboxyfluorescein nach **AAV6**, bevor die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11** durchgeführt wird. Danach wird das Peptid gemäß **AAV12** vom Harz abgespalten. Die

---

Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 36 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2562,4 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **TAMRA-IL-8-RP-Loops E (8b)**

Sequenz: TAMRA-AKWRMVLRl-Ahx-ADTLMRTE- CONH<sub>2</sub>

Um die Bindung IL8RPLoopsE (**8**) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf TentaGel MB HMBA-Harz mit einer Kapazität von 0,24 mmol/g. Dabei werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH nach **AAV4**. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die Fluoreszenzmarkierung mit 5(6)Carboxytetramethylrhodamin nach **AAV6**, bevor die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach **AAV11** durchgeführt wird. Danach wird das Peptid gemäß **AAV12** vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 20-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 35 Minuten.

MALDI-TOF (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 2616,3 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### **sY-CXCR1-p1 (9)**

Sequenz: NH<sub>2</sub>-MWDFDD-Ahx-MPPADEDsYSP-COOH

Die Sequenz wurde von Attwood *et al.* [126] als CXCL8 bindendes Peptid beschrieben. Hier erfolgt die Synthese in sulfatierter Form mit Hilfe der orthogonalen Neopentyl (nP)-Schutzgruppe am Sulfotyrosin-Baustein. Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlorotriptylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH,

---

Fmoc-L-Tyr(SO<sub>3</sub>nP)-OH (Merck Milipore), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt die simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptids vom Harz nach **AAV11**, wobei die Neopentyl-Schutzgruppe am sulfatierten Tyrosin verbleibt. Die Reinigung des neopentyl-geschützten Peptids erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 30 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2193,3 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt nach **AAV13**. Der Verlauf der Abspaltung wird mittels analytischer RP-HPLC nach **AAV15** kontrolliert, wobei anstelle von Eluent A eine 0,1 M Ammoniumacetatlösung verwendet wird und zu Eluent B kein TFA zugesetzt wird. Nach vollständiger Abspaltung der nP-Schutzgruppe erfolgt ein erneuter Reinigungsschritt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV) mit den oben beschriebenen Eluenten. Die Retentionszeit liegt bei 28 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Negativmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2122,3 [M-H]^-$  (entspricht berechneter Masse)

### **Fluo-sY-CXCR1-p1 (9a)**

Sequenz: Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPADED<sub>s</sub>YSP-COOH

Um die Bindung von sY-CXCR1-p1 (**9**) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlorotriylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(SO<sub>3</sub>nP)-OH (Merck Milipore), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden

---

durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der Syntheszyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt schließlich die Fluoreszenzmarkierung mit 5-(6)Carboxyfluorescein nach **AAV6**. Danach werden gemäß **AAV11** die Seitenkettenschutzgruppen, sowie das Peptid vom Harz abgespalten, wobei die Neopentyl-Schutzgruppe am sulfatierten Tyrosin verbleibt. Die Reinigung des neopentyl-geschützten Peptids erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 34 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2551,6 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt nach **AAV13**. Der Verlauf der Abspaltung wird mittels analytischer RP-HPLC nach **AAV15** kontrolliert, wobei anstelle von Eluent A eine 0,1 M Ammoniumacetatlösung verwendet wird und zu Eluent B kein TFA zugesetzt wird. Nach vollständiger Abspaltung der nP-Schutzgruppe erfolgt ein erneuter Reinigungsschritt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV) mit den oben beschriebenen Eluenten. Die Retentionszeit liegt bei 31 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Negativmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2481,5 [M-H]^-$  (entspricht berechneter Masse)

### **TAMRA-sY-CXCR1-p1 (9b)**

Sequenz: TAMRA-MWDFDD-Ahx-MPPADEDsYSP-COOH

Um die Bindung von sY-CXCR1-p1 (**9**) an CXCL8 mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung nachzuweisen, wird das Peptid am N-Terminus mit 5-(6)- Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Die Synthese des Peptids erfolgt auf 2-Chlorotriylchlorid Harz mit einer Kapazität von 1,5 mmol/g, wobei das Harz nur zu einem Viertel der Kapazität beladen wird. Es werden die folgenden Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen verwendet: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(SO<sub>3</sub>nP)-OH (Merck Milipore), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Zunächst wird das Harz nach **AAV1** gequollen. Anschließend erfolgt die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-L-Pro-OH nach **AAV3**. Die verbleibenden freien Bindungsstellen am Harz werden durch Methanol abgesättigt. Das Harz wird nach **AAV2** gewaschen und anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV7** abgespalten. Es folgt erneut der Waschschrift nach **AAV2**, bevor sich der

---

Synthesesyklus mit Kupplung der nächsten Aminosäure nach **AAV5** wiederholt. Ist die Sequenz vollständig synthetisiert, erfolgt schließlich die Fluoreszenzmarkierung mit 5(6)Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin nach **AAV6**. Danach werden gemäß **AAV11** die Seitenkettenschutzgruppen, sowie das Peptid vom Harz abgespalten, wobei die neopentyl-Schutzgruppe am sulfatierten Tyrosin verbleibt. Die Reinigung des neopentyl-geschützten Peptids erfolgt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV). Die Retentionszeit liegt bei 35 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2605,8 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

Die Abspaltung der Neopentyl-Schutzgruppe erfolgt nach **AAV13**. Der Verlauf der Abspaltung wird mittels analytischer RP-HPLC nach **AAV15** kontrolliert, wobei anstelle von Eluent A eine 0,1 M Ammoniumacetatlösung verwendet wird und zu Eluent B kein TFA zugesetzt wird. Nach vollständiger Abspaltung der nP-Schutzgruppe erfolgt ein erneuter Reinigungsschritt mittels RP-HPLC nach **AAV14** (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 6 CV) mit den oben beschriebenen Eluenten. Die Retentionszeit liegt bei 33 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Negativmodus, Matrix: 2,5-DHB)  $m/z = 2535,7 [M-H]^-$  (entspricht berechneter Masse)

### **TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (10) und TAMRA-IL8RPCycLoopsE (11)**

Sequenz:  $\overbrace{\text{AKWRMVLRI-Ahx\_ADTLMRTQKK}}^{\text{ScC}}(\text{TAMRA})-\text{CONH}_2$  (10)

Sequenz:  $\overbrace{\text{AKWRMVLRI-Ahx\_ADTLMRTEKK}}^{\text{ScC}}(\text{TAMRA})-\text{CONH}_2$  (11)

Die cyclischen Peptide wurden im Rahmen der Dissertation von Kevin Brahm[172] synthetisiert.

---

## Fluo-HSA-Peptoid AL1 (19a)

Sequenz: Fluo-NLeu-NVal-NSer<sup>+1</sup>-NGlu-NLeu-NPhe<sup>+1</sup>-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill <sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen NLeu (16), NVal (17), TIPSNSer<sup>+1</sup> (14), *t*BuNGlu (13), NPhe<sup>+1</sup> (18) auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz mit einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde. Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 30 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1092,6 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

## Fluo-HSA-Peptoid AL3 (20a)

Sequenz: Fluo-NTrp<sup>+1</sup>-NPhe<sup>+1</sup>-NSer<sup>+1</sup>-NArg<sup>+1</sup>-NTrp<sup>+1</sup>-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill <sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen NTrp<sup>+1</sup> (15), NPhe<sup>+1</sup> (18), TIPSNSer<sup>+1</sup> (14), Boc<sub>2</sub>NArg<sup>+1</sup> (12) auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde.

---

Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 26 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1208,5 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### Fluo-HSA-Peptoid AL7 (21a)

Sequenz: Fluo-NSer<sup>+1</sup>-NArg<sup>+1</sup>-NVal-NGlu-NGlu-NGlu-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill <sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen TIPSNSer<sup>+1</sup> (14), Boc<sub>2</sub>NArg<sup>+1</sup> (12), NVal (17), *t*BuNGlu (13) auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde. Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 25 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1133,1 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### Fluo-HSA-Peptoid AL12 (22a)

Sequenz: Fluo-Arg<sup>+1</sup>-NTrp<sup>+1</sup>-NSer<sup>+1</sup>-NSer<sup>+1</sup>-NArg<sup>+1</sup>-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill <sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

---

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen Boc<sub>2</sub>NArg<sup>+1</sup> (12), NTrp<sup>+1</sup> (15), TIPSNSer<sup>+1</sup> (14 auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde. Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 21 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA) m/z = 1217,3 [M+H]<sup>+</sup> (entspricht berechneter Masse)

### Fluo-HSA-Peptoid AL13 (23a)

Sequenz: Fluo-NLeu-NPhe<sup>+1</sup>-NTrp<sup>+1</sup>-NSer<sup>+1</sup>-NArg<sup>+1</sup>-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill<sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen NLeu (16), NPhe<sup>+1</sup> (18), NTrp<sup>+1</sup> (15), TIPSNSer<sup>+1</sup> (14), Boc<sub>2</sub>NArg<sup>+1</sup> (12) auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde. Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 25 Minuten.

---

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1121,0 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

### Fluo-HSA-Peptoid AL17 (24a)

Sequenz: Fluo-NLeu-NTrp<sup>+1</sup>-NPhe<sup>+1</sup>-NArg<sup>+1</sup>-NGlu-CONH<sub>2</sub>

Die Sequenz wurde im Rahmen der im Arbeitskreis angefertigten Masterthesis von Annika Lill<sup>[173]</sup> als potentielles HSA-bindendes Peptoid aus einer *one-bead-one-compound*-Bibliothek isoliert.

Die Resynthese erfolgt aus den Aminen NLeu (16), NTrp<sup>+1</sup> (15), NPhe<sup>+1</sup> (18), Boc<sub>2</sub>NArg<sup>+1</sup> (12) auf Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz einer Kapazität von 0,59 mmol/g. Zunächst wird das Harz nach AAV1 gequollen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV7 und der Waschschrift nach AAV2. Die freie Aminogruppe am Harz wird anschließend nach AAV8 mit Chloressigsäure acyliert. Nach einem erneuten Waschschrift (AAV2) erfolgt die Substitution des Chlors durch das primäre Amin Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>) (AA9). Der Erfolg der Aminierung wird nach AAV10 mit Hilfe des Chloraniltests überprüft. Der Zyklus aus Waschen (AAV2), Acylierung (AAV8) und Aminierung (AAV9) wird nun solange wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde. Nach Kupplung des letzten Amins (AAV9) und einem weiteren Waschschrift (AAV2) wird die Peptoidsequenz nach AAV6 mit 5-(6)Carboxyfluorescein markiert, gewaschen und nach AAV11 werden simultan die vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Peptoid vom Harz abgespalten.

Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC nach AAV14 (linearer Gradient von 0-80 % Eluent B über 5 CV). Die Retentionszeit liegt bei 27 Minuten.

MALDI-TOF-MS (Positivmodus, Matrix: HCCA)  $m/z = 1149,0 [M+H]^+$  (entspricht berechneter Masse)

---

## 6.5 Proteinbiochemische Methoden

### 6.5.1 Proteinexpression

Zur Expression der Chemokine CXCL8wt (3)[175], CXCL8 Arg26Cys (4)[70] (Dimervariante), sowie CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro (5)[71] (Monomervariante) wird der Stamm *E. coli* BL21 DE3 RIL verwendet, welcher zuvor mit dem Vektor pET-22b transformiert wurde, der die jeweilige codonoptimierte Sequenz für die entsprechende CXCL8 Variante enthält

#### Allgemeine Expressionsvorschrift

Je 20 mL steriles LB-Medium mit 60 µg/ml Ampicillin Endkonzentration werden in vier 50 mL-Röhrchen mit dem jeweiligen Expressionsstamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Diese Übernachtskulturen werden jeweils in einen 2L-Kolben mit 500 mL sterilem LB-Medium mit 60 µg/ml Ampicillin Endkonzentration überführt und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 bis 1,0 erreicht ist. Dann wird die Expression mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Für die Expression der Mutanten IL-8 R26C (4) und IL-8 VPEP (5) kann optional Ethanol zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zugesetzt werden.[176] Es wird für 3 h bzw. 5 h bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Vor und nach der Expression werden jeweils 400 µL Probe für die SDS-PAGE entnommen. Die Expressionsansätze werden bei 4 °C und 4500 g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet kann bei Bedarf bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### Lyse

Das Zellpellet wird in 10 mL Lysepuffer (1 mM EDTA, 0,2 mg/mL Lysozym, 0,1 mg/mL DNase, ¼ Proteaseinhibitor-Tablette (cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) in Puffer A, pH 7,5) resuspendiert und unter gelegentlichem invertieren für 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 µL Triton X-100 erfolgt die Zelllyse durch drei Ultraschallbehandlungen für jeweils 30 Sekunden bei einer Amplitude von 30 %. Anschließend werden 100 µL einer 0,1 mg/mL DNase-Lösung hinzugefügt und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein Hitzeschritt für 10 min bei 70 °C im Wasserbad. Dann wird das Lysat bei 4 °C und 4500 g für 30 min zentrifugiert. Von Überstand und Pellet werden Proben für die SDS-PAGE entnommen. Das Pellet wird anschließend verworfen.

---

## 6.5.2 Proteinreinigung

### Reinigung von CXCL8wt (3) über einen Kationentauscher

Der Überstand nach der Lyse wird über eine HiTrap SPFF 5 mL-Säule an der ÄKTApurifier gereinigt. Dabei wird die Säule mit Puffer A äquilibriert, bevor die Probe auf die Säule aufgetragen wird. Nach einem Spüllauf über 6 CV zum Entfernen ungebundener Proteine werden die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 90 bis 583,5 mM über 40 CV eluiert. Detektion der proteinenthaltenden Fraktionen erfolgt durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Diese Fraktionen werden vereinigt, mittels Zentrifugalfilter (Vivaspin 20, Sartorius, Ausschlussgrenze 3000 Da) eingeeengt und anschließend in Puffer C umgepuffert.

### Reinigung von CXCL8 Arg26Cys (4) und CXCL8 Val27Pro/Glu29Pro (5) über Heparin-Affinitätschromatografie und anschließende Größenausschluss-chromatografie

Der Überstand nach der Lyse wird über eine HiPrep Heparin FF-Affinitätssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) an der ÄKTApurifier gereinigt. Dabei wird die Säule mit 20 mM TRIS und 167 mM NaCl (pH 8,0) äquilibriert, bevor die Probe auf die Säule aufgetragen wird. Nach einem Spüllauf über 6 Säulenvolumen (column volume, CV) zum Entfernen ungebundener Proteine werden die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 167 mM bis 1 M über 12 CV eluiert. Die Detektion der proteinenthaltenden Fraktionen erfolgt durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Diese Fraktionen werden vereinigt und mittels Zentrifugalfilter (Vivaspin 20, Sartorius, Ausschlussgrenze 3000 Da) eingeeengt. Im Anschluss erfolgt ein weiterer Reinigungsschritt über eine HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare, München, Deutschland) werden Proteine nach der Größe getrennt. Die Säule wird mit 2 CV Puffer C äquilibriert. Nach Auftragen der Probe wird die Säule mit 2 CV Puffer C gespült. Es werden 10 mL-Fraktionen gesammelt. Die Detektion der proteinenthaltenden Fraktionen erfolgt durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Die Fraktionen, die das gewünscht Protein enthalten, werden vereinigt und mittels Zentrifugal filter (Vivaspin 20, Sartorius, Ausschlussgrenze 3000 Da) eingeeengt.

## 6.5.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von CXCL8 wird über eine Standardreihe bei 280 nm in Puffer C bestimmt, die im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit erstellt wurde.[225] Die Formel der Kalibrationsreihe lautet:

$$A = 0,122 * c \left[ \frac{mg}{mL} \right] + 0,079 \quad (1)$$

## 6.5.4 SDS-PAGE

In **Tabelle 6-6** sind alle für die SDS-PAGE verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 6-6:** Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE. Alle Puffer werden mit dest. Wasser angesetzt. Die pH-Einstellung erfolgt mit HCl oder NaOH.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Tris Puffer; pH 8,8	TRIS 1,5 M
Tris Puffer; pH 6,8	TRIS 0,5 M
SDS-Lösung	Natriumdodecylsulfat (SDS) 20 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 % (w/v)
18 %-iges Trenngel	dest. Wasser 1,3 mL 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8) 2,5 mL 30 %-ige Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1) 6 mL 10 %-ige SDS-Lösung 100 µL 10 %-ige APS-Lösung 100 µL TEMED 4 µL
5 %-iges Sammelgel	dest. Wasser 2,3 mL 0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8) 1 mL 30 %-ige Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1) 670 µL 10 %-ige SDS-Lösung 40 µL 10 %-ige APS-Lösung 40 µL TEMED 2,5 µL
2x Lämmli-Puffer	SDS 4 % (w/v) Glycerol 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 % (v/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Tris-Puffer (pH 6,8) 0,16 M
5x Lämmli-Puffer	SDS 10 % (w/v) Glycerol 50 % (v/v) β-Mercaptoethanol 25 % (v/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Tris-Puffer (pH 6,8) 0,31 M
Laufpuffer (pH 7,5)	TRIS 25 mM Glycin 193 mM SDS 0,35 mM
Kolloidale Coomassie-Lösung	Phosphorsäure (85 %) 10 % (v/v) Ammoniumsulfat 10 % (w/v) Coomassie BB G250 0,12 % (w/v) Methanol 20 % (v/v)

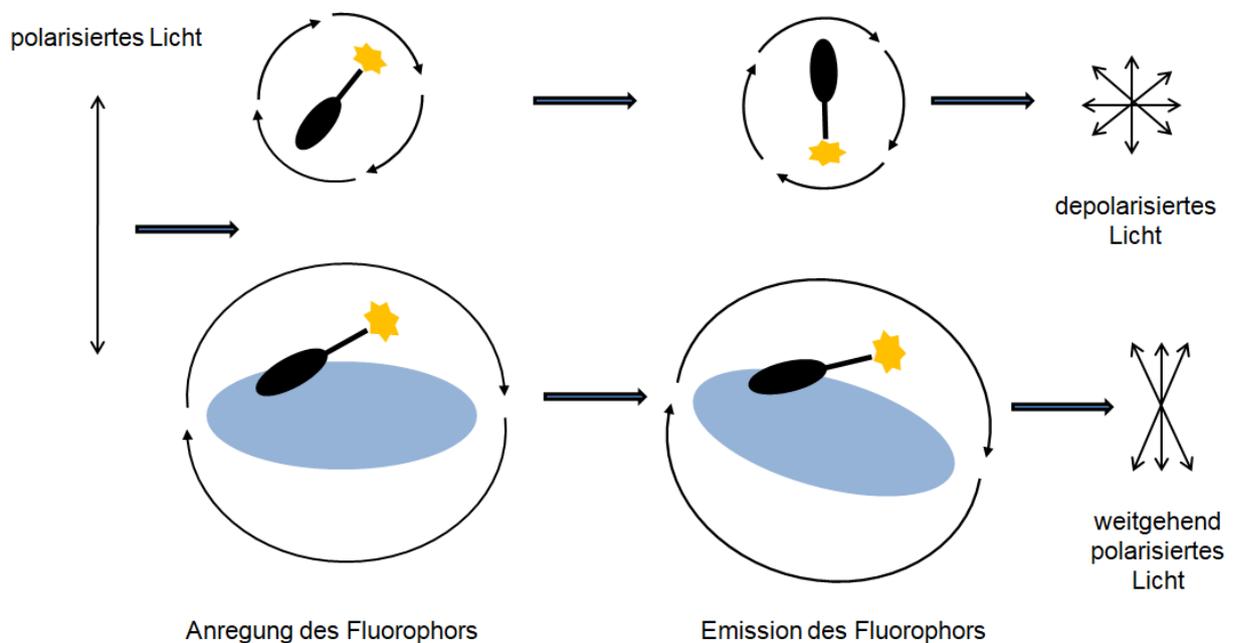
Zur Analyse der Proteinproben wird eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dafür werden ein weitmaschiges Sammelgel, mit einem pH-Wert von 6,8, und ein engmaschiges Trenngel, mit einem pH-Wert von 8,8, verwendet. Zunächst

---

werden jeweils eine Glas- und eine Keramikplatte mit einem 1 mm-Spacer in die Vertikalgießapparatur eingespannt und mit Wasser auf Dichtigkeit überprüft. Dann wird das 18 %-ige Trenngel angesetzt und zwischen die Platten gegossen. Damit sich eine gerade Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel ausbildet und der Luftsauerstoff die Polymerisation nicht behindern kann, wird das noch unpolymersierte Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist (nach ca. 30 min), wird das Isopropanol entfernt, das 5 %-ige Sammelgel angesetzt und über das Trenngel gegossen. In das noch unpolymersierte Sammelgel wird der Taschenformer eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels (nach ca. 20 min) kann das Gel direkt in eine Vertikalgelelektrophoresekammer eingesetzt werden oder bis zur Verwendung bei 4 °C, eingeschlagen in ein mit Wasser getränktes Tuch und in Folie verpackt, gelagert werden. Nach Einbau der Gele in die Vertikalgelelektrophoresekammer werden die oberen und das untere Elektrophoresereservoir mit Laufpuffer befüllt und die Taschenformer entfernt. Die Expressionsproben werden für 5 min bei 194 xg zentrifugiert und 350  $\mu\text{L}$  des Überstandes entfernt. Die pelletierten Zellen werden im verbleibenden Medium und 50  $\mu\text{L}$  2x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Lysisproben werden mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  2x Lämmli-Puffer vermischt. Die Proben der Reinigungsfractionen werden mit jeweils 10  $\mu\text{L}$  5x Lämmli-Puffer vermischt. Anschließend werden alle Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt. Von den denaturierten Proben werden je 15  $\mu\text{L}$  in eine Tasche der Acrylamidgele gefüllt. Als Größenstandard werden 3  $\mu\text{L}$  des BLUEplus prestained Protein Ladder (10-180 kDa) (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese wird zunächst bei 100 V durchgeführt. Nachdem die Proteine in das Trenngel eingelaufen sind, wird die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die blaue Lauffront unten aus dem Gel austritt. Das Gel wird anschließend aus der Apparatur entnommen und über Nacht mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung eingefärbt. Das Entfärben des Gels erfolgt über ca. 2 Tage in destilliertem Wasser mit mehrfachem Wasserwechsel über die Zeit.

## 6.6 Bindungsstudien mittels Fluoreszenzpolarisation

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation kann die Bindung zweier Interaktionspartner in Lösung konzentrationsabhängig verfolgt, sowie deren Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt werden. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass Fluorophore, welche mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, ebenfalls linear polarisiertes Licht aussenden (Fluoreszenzpolarisation). Bei freier Beweglichkeit der Fluorophore in Lösung ist das emittierte Licht jedoch, aufgrund der Rotation der Moleküle depolarisiert. Wird der fluoreszenzmarkierte Ligand durch die Bindung an einen größeren Bindungspartner in seiner Beweglichkeit verlangsamt, bleibt ein Teil der Polarisation erhalten, was als Messsignal genutzt wird. Dieses Prinzip ist in **Abbildung 6-1** schematisch dargestellt.



**Abbildung 6-1:** Schematische Darstellung des Grundprinzips der Fluoreszenzpolarisation, in Anlehnung an [226].

Die Fluoreszenzpolarisation ist also von der Beweglichkeit des Fluorophors abhängig. Je schneller dieser in Lösung rotieren kann, desto kleiner die Polarisation, die nach Anregung mit polarisiertem Licht gemessen wird. Bei der Bindung an ein großes Protein verringert sich die Beweglichkeit eines kleinen fluoreszenzmarkierten Liganden. Die gemessene Polarisation wird größer. Auf diese Weise lässt sich anhand der Fluoreszenzpolarisation die Bindung eines Liganden an sein Zielprotein verfolgen und in einem Titrationsexperiment die Dissoziationskonstante  $K_D$  als Maß für die Affinität bestimmen. Der Reader misst die Fluoreszenzintensität ( $I$ ) in der Polarisationsebene senkrecht und horizontal zur Polarisationsebene des Anregungslichts. Anisotropie und Polarisation berechnen sich wie folgt:

---

Anisotropie  $A$ :

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2)$$

Polarisation  $P$ :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (3)$$

Umrechnung:

$$A = \frac{2P}{3 - P} \quad (4)$$

Die gemessene Anisotropie  $A$  ist das gewichtete Mittel der Anisotropie  $A_i$  der unterschiedlichen fluoreszenzten Spezies  $i$ , die zu einem Prozentsatz von  $f_i$  in der Lösung vorliegen:

$$A = \sum_{i=1}^n f_i A_i \quad (5)$$

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  eines Bindungsgleichgewichts aus Zielprotein  $R$  und Ligand  $L$  ist definiert als:

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (6)$$

Wird viel mehr Protein als Peptid zugegeben, gilt im Gleichgewicht näherungsweise:

$$[R] \approx [R_0] \quad (7)$$

d.h. die Proteinkonzentration im Gleichgewicht entspricht in etwa der Anfangskonzentration  $[R]_0$

Die Konzentration des Peptids im Gleichgewicht  $[L]$  ergibt sich aus der Anfangskonzentration  $[L]_0$  wie folgt:

$$[L] = [L_0] - [RL] \quad (8)$$

Einsetzen in Formel (6) ergibt:

$$K_d = \frac{([L]_0 - [RL])[R]}{[RL]} \quad (9)$$

und

$$\frac{[RL]}{[L]_0} = \frac{[R]}{K_d + [R]} = B \quad (10)$$

---

Dabei ist B der Anteil der gebundenen Spezies relativ zur Menge des eingesetzten Ligands (Peptids). B kann über die Anisotropie bestimmt werden, denn die gemessene Anisotropie entspricht dem gewichteten Mittel aus freiem Fluorophor und gebundenem Fluorophor, wobei die Summe der Anteile von freiem und gebundenem Fluorophors 100% ist:

$$A = A_{frei} (1 - B) + A_{gebunden} B \quad (11)$$

Bei einer Titrationsmessung zur Bestimmung von  $K_D$  über die Fluoreszenzanisotropie wird eine kleine Menge des markierten Ligands (Peptid) vorgelegt und eine Reihe verschiedener Konzentrationen des unmarkierten größeren Moleküls (Zielprotein) zugegeben. Idealerweise sollten diese Konzentrationen zwei Größenordnungen um den vermuteten  $K_D$  herum verteilt sein. Die Anisotropie des freien Fluorophors  $A_{frei}$  ermittelt man durch Messung des Fluorophors ohne Proteinzusatz. Die Anisotropie des gebundenen Fluorophors  $A_{gebunden}$  kann aus der Bindungsisotherme bestimmt werden, wenn diese die Sättigung erreicht. In diesem Fall kann B für jede Proteinkonzentration berechnet und ebenfalls in einem Diagramm aufgetragen werden, aus dem  $K_D$  für B=50% abgelesen werden kann.

### **Ansatz im *low-volume* Maßstab in einer 384well-Mikrotiterplatte**

In 13 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen werden je 31,5  $\mu$ L Puffer vorgelegt, ein zusätzliches 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen wird mit 31,5  $\mu$ L einer der Proteinstammlösung im entsprechenden Puffer befüllt. Anschließend werden in das erste der 13 mit Puffer befüllten Mikrozentrifugenröhrchen 31,5  $\mu$ L der Proteinstammlösung gegeben und gemischt. Dann werden aus diesem Gefäß 31,5  $\mu$ L in das zweite überführt, wieder gemischt, 31,5  $\mu$ L entnommen und in das dritte überführt etc. So wird eine 1:2-Verdünnungsreihe mit 14 Konzentrationen erstellt. Aus Gefäß 14 werden 31,5  $\mu$ L verworfen. Dann werden je 3,5  $\mu$ L einer Lösung des fluoreszenzmarkierten Peptids in Gefäß 1 bis 14 zugegeben. Gefäß 15 enthält nur Puffer und dient als Hintergrundkontrolle. Zur Bestimmung der Polarisation des freien Peptids werden in Gefäß 16 zusätzlich 31,5  $\mu$ L Puffer ebenfalls mit Peptid versetzt. Aus jedem Gefäß werden dreimal je 10  $\mu$ L in eine schwarze *low-volume* 384-well Mikrotiterplatte mit transparentem Boden ( Corning, NY, USA) überführt. Die Platte wird für eine Minute bei 2000 g zentrifugiert und die Fluoreszenzintensität, sowie die Polarisation und Anisotropie am Tecan Infinite M1000-Reader bestimmt. Fluoresceinmarkierte Peptide werden mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionwellenlänge von 535 nm, TAMRA-markierte Peptide mit einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionwellenlänge von 579 nm, vermessen. Der Gerätefaktor G wurde bestimmt und beträgt 1,173.

---

## 6.7 Proteasestabilitäts-Assay

20  $\mu\text{L}$  einer 25  $\mu\text{M}$  Peptid-Lösung in Puffer C werden mit 20  $\mu\text{L}$  einer 1.25  $\mu\text{U}$  Trypsin-Lösung in Puffer C über Nacht bei 37 °C und 400 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden 20  $\mu\text{L}$  Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben, um das Enzym auszufällen. Das Reaktionsgemisch wird für drei Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Als Referenz dient eine Lösung gleicher Zusammensetzung, bei der alle Komponenten, einschließlich TFA, zusammenpipettiert und anschließend sofort zentrifugiert werden. Die Überstände werden mit einer Hamilton-Spritze aufgenommen und durch RP18-HPLC (linearer Gradient 0-100% Eluent B über 6 CV) analysiert. Die Flächen unter den Signalen werden integriert und mit den entsprechenden Referenzen verglichen. Eine Abnahme der Peakfläche zeigt semi-quantitativ den Abbau des Peptids durch die Protease an.

## 6.8 CD Spektroskopie

Für die Messung werden je 150  $\mu\text{L}$  einer 200  $\mu\text{M}$  Lösung des Peptids oder Proteins verwendet. Die CD-Spektren werden bei Raumtemperatur am J-810 Spectropolarimeter von Jasco (AG Heckel; Goethe Universität Frankfurt) aufgenommen. Hierbei wird der Bereich von 260 bis 190 nm zehnmal gescannt. Es wird in 0,5 nm Intervallen und mit einer Scanrate von 10 nm/min gemessen. Zur Auswertung der CD-Spektren wurde die Software CD-Deconvolution verwendet.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

Ac	Acetat
AcN	Acetonitril
Ahx	Aminohexansäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Arg	Arginin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cystein
CD	Circulardichroismus
ca.	circa
ClTrtCl	2-Chlorotriethylchlorid-Linker
CV	<i>Column Volume</i> , Säulenvolumen
CXCL8	Interleukin-8, IL-8
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat (Glu)
ECD	<i>Extracellular domain</i> , Extrazelluläre Domäne
ELR	Aminosäuremotiv (Glutamat, Leucin, Arginin)
eq.	Äquivalent
EtOH	Ethanol
ESI	Electrospray Ionization
FA	Fluoreszenzanisotropie
Fluo	5(6)-Carboxyfluorescein
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GAG	Glykosaminoglykan
Glu	Glutamat
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure
HMBA	4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure

---

HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HSA	humanes Serumalbumin
IL-8	Interleukin-8, CXCL8
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Lys	Lysin
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation</i>
mAU	<i>Milli Absorbance Unit</i>
MeOH	Methanol
mg	Miligram
$\mu$ M	mikromolar
min	Minute
mL	Mililiter
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MTP	Mikrotiterplatte
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammoniumion
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernmagnetresonanz-Spektroskopie
nP	Neopentyl
OBOC	<i>one-bead-one- compound</i>
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDA	<i>Photo Diode Array</i>
pH	pH-Wert
pI	Isoelektrische Punkt
P <sub>i</sub>	Phosphat
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase ( <i>Reversed Phase</i> )
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

---

---

SDS	Natriumlaurylsulfat
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
sY	Sulfotyrosin
TAMRA	5(6)-Tetramethylrhodamin
tBu	<i>tert</i> -Butylester
TEMED	Tetrametyhlethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Tentagel
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	<i>time of flight</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
V	Valin
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

---

## 8 Literaturverzeichnis

---

1. Kumar, V. and A. Sharma, *Neutrophils: Cinderella of innate immune system*. International immunopharmacology, 2010. **10**(11): p. 1325-1334.
2. Kobayashi, S.D., et al., *Neutrophils in the innate immune response*. Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis-English Edition-, 2005. **53**(6): p. 505.
3. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-568.
4. Epstein, F.H. and A.D. Luster, *Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(7): p. 436-445.
5. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annual review of immunology, 2000. **18**(1): p. 217-242.
6. Griffith, J.W., C.L. Sokol, and A.D. Luster, *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. Annu rev immunol, 2014. **32**(1): p. 659-702.
7. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-127.
8. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu. Rev. Immunol., 2007. **25**: p. 787-820.
9. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(34): p. 23128-23134.
10. Luster, A.D. and M.E. Rothenberg, *Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation*. Journal of leukocyte biology, 1997. **62**(5): p. 620-633.
11. Johnson, Z., A. Proudfoot, and T. Handel, *Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention*. Cytokine & growth factor reviews, 2005. **16**(6): p. 625-636.
12. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(2): p. 106-115.
13. Bachelierie, F., et al., *New nomenclature for atypical chemokine receptors*. Nature immunology, 2014. **15**(3): p. 207-208.
14. Olson, T.S. and K. Ley, *Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2002. **283**(1): p. R7-R28.
15. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacological reviews, 2000. **52**(1): p. 145-176.
16. Rajagopalan, L. and K. Rajarathnam, *Structural basis of chemokine receptor function—a model for binding affinity and ligand selectivity*. Bioscience reports, 2006. **26**(5): p. 325-339.
17. Rajagopalan, L. and K. Rajarathnam, *Ligand selectivity and affinity of chemokine receptor CXCR1: role of N-terminal domain*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30000-30008.
18. Thiele, S. and M. Marie Rosenkilde, *Interaction of chemokines with their receptors—from initial chemokine binding to receptor activating steps*. Current medicinal chemistry, 2014. **21**(31): p. 3594-3614.
19. Simpson, L.S., et al., *Regulation of chemokine recognition by site-specific tyrosine sulfation of receptor peptides*. Chemistry & biology, 2009. **16**(2): p. 153-161.
20. Zhu, J.Z., et al., *Tyrosine sulfation influences the chemokine binding selectivity of peptides derived from chemokine receptor CCR3*. Biochemistry, 2011. **50**(9): p. 1524-1534.
21. Ludeman, J.P. and M.J. Stone, *The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition*. British journal of pharmacology, 2014. **171**(5): p. 1167-1179.
22. Mishiro, E., et al., *Differential enzymatic characteristics and tissue-specific expression of human TPST-1 and TPST-2*. Journal of biochemistry, 2006. **140**(5): p. 731-737.

23. Danan, L.M., et al., *Mass spectrometric kinetic analysis of human tyrosylprotein sulfotransferase-1 and-2*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(10): p. 1459-1466.
24. Danan, L.M., et al., *Catalytic mechanism of Golgi-resident human tyrosylprotein sulfotransferase-2: a mass spectrometry approach*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(9): p. 1633-1642.
25. Jen, C.H., K.L. Moore, and J.A. Leary, *Pattern and temporal sequence of sulfation of CCR5 N-terminal peptides by tyrosylprotein sulfotransferase-2: an assessment of the effects of N-terminal residues*. Biochemistry, 2009. **48**(23): p. 5332-5338.
26. Farzan, M., et al., *The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 $\alpha$  association and HIV-1 entry*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(33): p. 29484-29489.
27. Farzan, M., et al., *Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry*. Cell, 1999. **96**(5): p. 667-676.
28. Choe, H., et al., *Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and Plasmodium vivax Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC)*. Molecular microbiology, 2005. **55**(5): p. 1413-1422.
29. Preobrazhensky, A.A., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(9): p. 5295-5303.
30. Tan, J.H., et al., *Tyrosine sulfation of chemokine receptor CCR2 enhances interactions with both monomeric and dimeric forms of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(14): p. 10024-10034.
31. Jen, C.H. and J.A. Leary, *A competitive binding study of chemokine, sulfated receptor, and glycosaminoglycan interactions by nano-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2010. **407**(1): p. 134-140.
32. Duma, L., et al., *Recognition of RANTES by extracellular parts of the CCR5 receptor*. Journal of molecular biology, 2007. **365**(4): p. 1063-1075.
33. Seibert, C., et al., *Sequential tyrosine sulfation of CXCR4 by tyrosylprotein sulfotransferases*. Biochemistry, 2008. **47**(43): p. 11251-11262.
34. Veldkamp, C.T., et al., *Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12*. Science signaling, 2008. **1**(37): p. ra4-ra4.
35. Veldkamp, C.T., et al., *Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12)*. Journal of molecular biology, 2006. **359**(5): p. 1400-1409.
36. Manda, A., et al., *Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology*. Central European Journal of Immunology, 2014. **39**(1): p. 116-121.
37. Baggiolini, M., A. Walz, and S. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. The Journal of clinical investigation, 1989. **84**(4): p. 1045-1049.
38. Baggiolini, M., P. Loetscher, and B. Moser, *Interleukin-8 and the chemokine family*. International journal of immunopharmacology, 1995. **17**(2): p. 103-108.
39. Harada, A., et al., *Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation*. Journal of leukocyte biology, 1994. **56**(5): p. 559-564.
40. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clinical cancer research, 2008. **14**(21): p. 6735-6741.
41. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS letters, 1992. **307**(1): p. 97-101.
42. Fernando, H., et al., *Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(35): p. 36175-36178.
43. Lowman, H.B., et al., *Monomeric variants of IL-8: Effects of side chain substitutions and solution conditions upon dimer formation*. Protein Science, 1997. **6**(3): p. 598-608.
44. Burrows, S.D., et al., *Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations*. Biochemistry, 1994. **33**(43): p. 12741-12745.

45. Das, S.T., et al., *Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment*. PloS one, 2010. **5**(7): p. e11754.
46. Clore, G.M., et al., *Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution*. Biochemistry, 1990. **29**(7): p. 1689-1696.
47. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *Three-dimensional structures of  $\alpha$  and  $\beta$  chemokines*. The FASEB journal, 1995. **9**(1): p. 57-62.
48. Baldwin, E.T., et al., *Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(2): p. 502-506.
49. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-1280.
50. Murphy, P.M. and H.L. Tiffany, *Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1280-1283.
51. Lee, J., et al., *Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(23): p. 16283-16287.
52. Wolf, M., et al., *Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2*. European journal of immunology, 1998. **28**(1): p. 164-170.
53. Chuntharapai, A., et al., *Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes*. The Journal of Immunology, 1994. **153**(12): p. 5682-5688.
54. Skelton, N.J., et al., *Structure of a CXC chemokine-receptor fragment in complex with interleukin-8*. Structure, 1999. **7**(2): p. 157-168.
55. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of chemokines*. Journal of leukocyte biology, 1995. **57**(5): p. 703-711.
56. Joseph, P.R.B., et al., *Probing the Role of CXC Motif in Chemokine CXCL8 for High Affinity Binding and Activation of CXCR1 and CXCR2 Receptors\*[S]*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(38): p. 29262-29269.
57. Joseph, P.R.B., et al., *Dynamic conformational switching in the chemokine ligand is essential for G-protein-coupled receptor activation*. Biochemical Journal, 2013. **456**(2): p. 241-251.
58. Hebert, C.A., R. Vitangcol, and J.B. Baker, *Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(28): p. 18989-18994.
59. Leong, S.R., R.C. Kabakoff, and C.A. Hebert, *Complete mutagenesis of the extracellular domain of interleukin-8 (IL-8) type A receptor identifies charged residues mediating IL-8 binding and signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(30): p. 19343-19348.
60. LaRosa, G.J., et al., *Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(35): p. 25402-25406.
61. Clubb, R.T., et al., *Mapping the binding surface of interleukin-8 complexed with an N-terminal fragment of the type 1 human interleukin-8 receptor*. FEBS letters, 1994. **338**(1): p. 93-97.
62. Clark-Lewis, I., et al., *Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(23): p. 16075-16081.
63. Park, S.H., et al., *Interactions of interleukin-8 with the human chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers by NMR spectroscopy*. Journal of molecular biology, 2011. **414**(2): p. 194-203.
64. Barter, E.F. and M.J. Stone, *Synergistic interactions between chemokine receptor elements in recognition of interleukin-8 by soluble receptor mimics*. Biochemistry, 2012. **51**(6): p. 1322-1331.
65. Moussouras, N.A., et al., *Differences in sulfotyrosine binding amongst CXCR1 and CXCR2 chemokine ligands*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(9): p. 1894.
66. Liu, J., et al., *Tyrosine sulfation is prevalent in human chemokine receptors important in lung disease*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2008. **38**(6): p. 738-743.
67. Chang, W.C., et al., *Incorporating support vector machine for identifying protein tyrosine sulfation sites*. Journal of computational chemistry, 2009. **30**(15): p. 2526-2537.

- 
68. Horcher, M., et al., *IL-8 derivatives with a reduced potential to form homodimers are fully active in vitro and in vivo*. Cytokine, 1998. **10**(1): p. 1-12.
  69. Williams, M.A., et al., *Interleukin 8 dimerization as a mechanism for regulation of neutrophil adherence-dependent oxidant production*. Shock, 2005. **23**(4): p. 371-376.
  70. Joseph, P.R.B. and K. Rajarathnam, *Solution NMR characterization of WT CXCL 8 monomer and dimer binding to CXCR 1 N-terminal domain*. Protein Science, 2015. **24**(1): p. 81-92.
  71. Joseph, P.R.B., et al., *Proline substitution of dimer interface  $\beta$ -strand residues as a strategy for the design of functional monomeric proteins*. Biophysical journal, 2013. **105**(6): p. 1491-1501.
  72. Rajarathnam, K., I. Clark-Lewis, and B.D. Sykes, *<sup>1</sup>H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8*. Biochemistry, 1995. **34**(40): p. 12983-12990.
  73. Rajarathnam, K., et al., *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8*. Science, 1994. **264**(5155): p. 90-92.
  74. Rajarathnam, K., et al., *Probing receptor binding activity of interleukin-8 dimer using a disulfide trap*. Biochemistry, 2006. **45**(25): p. 7882-7888.
  75. Rajarathnam, K., et al., *Characterization of quaternary structure of interleukin-8 and functional implications*, in *Methods in enzymology*. 1997, Elsevier. p. 89-105.
  76. Fernando, H., G.T. Nagle, and K. Rajarathnam, *Thermodynamic characterization of interleukin-8 monomer binding to CXCR1 receptor N-terminal domain*. The FEBS journal, 2007. **274**(1): p. 241-251.
  77. Fernando, H., et al., *Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36175-8.
  78. Ravindran, A., P.R.B. Joseph, and K. Rajarathnam, *Structural basis for differential binding of the interleukin-8 monomer and dimer to the CXCR1 N-domain: role of coupled interactions and dynamics*. Biochemistry, 2009. **48**(37): p. 8795-8805.
  79. Witt, D.P. and A.D. Lander, *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. Current Biology, 1994. **4**(5): p. 394-400.
  80. Rot, A., *Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism*. European journal of immunology, 1993. **23**(1): p. 303-306.
  81. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-13578.
  82. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2002. **100**(12): p. 3853-3860.
  83. Hamel, D.J., A.E. Proudfoot, and T.M. Handel, *Interactions of chemokines with glycosaminoglycans*. Methods in enzymology, 2009. **461**: p. 71-102.
  84. Lander, A.D. and S.B. Selleck, *The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas*. The Journal of cell biology, 2000. **148**(2): p. 227-232.
  85. Kuschert, G.S., et al., *Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8*. Biochemistry, 1998. **37**(32): p. 11193-11201.
  86. Middleton, J., et al., *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell, 1997. **91**(3): p. 385-395.
  87. Cardin, A.D. and H. Weintraub, *Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions*. Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc., 1989. **9**(1): p. 21-32.
  88. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty, *Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(3): p. 1229-1234.
  89. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(4): p. 1885-1890.

- 
90. Massena, S., et al., *A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010. **116**(11): p. 1924-1931.
  91. Wagner, L., et al.,  *$\beta$ chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans*. *Nature*, 1998. **391**(6670): p. 908-911.
  92. Zigmond, S.H., *Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors*. *The Journal of cell biology*, 1977. **75**(2): p. 606-616.
  93. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. *Pharmacological reviews*, 2000. **52**(3): p. 349-374.
  94. Rajarathnam, K., et al., *How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways*. *Cellular signalling*, 2019. **54**: p. 69-80.
  95. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 859-873.
  96. Konstantopoulos, K. and L.V. McIntire, *Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion*. *The Journal of clinical investigation*, 1996. **98**(12): p. 2661-2665.
  97. von Andrian, U.H., et al., *Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(17): p. 7538-7542.
  98. Ley, K., *Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S*. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**: p. 678-689.
  99. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nature reviews immunology*, 2013. **13**(3): p. 159-175.
  100. Ramachandran, V., et al., *Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(37): p. 13519-13524.
  101. Sundd, P., M.K. Pospieszalska, and K. Ley, *Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings*. *Molecular immunology*, 2013. **55**(1): p. 59-69.
  102. Yago, T., et al., *Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear*. *The Journal of cell biology*, 2004. **166**(6): p. 913-923.
  103. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. *Trends in immunology*, 2011. **32**(10): p. 452-460.
  104. Proebstl, D., et al., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*, 2012. **209**(6): p. 1219-1234.
  105. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and instruct them with pattern-recognition and motility programs*. *Nature immunology*, 2013. **14**(1): p. 41-51.
  106. Wang, S., et al., *Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(6): p. 1519-1532.
  107. Nickoloff, B., et al., *Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis*. *The American journal of pathology*, 1991. **138**(1): p. 129.
  108. Duan, H., et al., *Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis*. *Journal of Dermatological Science*, 2001. **26**(2): p. 119-124.
  109. Seitz, M., et al., *Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis*. *The Journal of clinical investigation*, 1991. **87**(2): p. 463-469.
  110. Deleuran, B., et al., *Localisation of interleukin 8 in the synovial membrane, cartilagepannus junction and chondrocytes in rheumatoid arthritis*. *Scandinavian journal of rheumatology*, 1994. **23**(1): p. 2-7.
  111. Haringman, J.J., et al., *Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis*. *Annals of the rheumatic diseases*, 2003. **62**(8): p. 715-721.
  112. Apostolopoulos, J., P. Davenport, and P.G. Tipping, *Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1996. **16**(8): p. 1007-1012.

113. Rus, H., R. Vlaicu, and F. Niculescu, *Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall*. *Atherosclerosis*, 1996. **127**(2): p. 263-271.
114. Jorens, P.G., et al., *Interleukin 8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS*. *Cytokine*, 1992. **4**(6): p. 592-597.
115. Wiedermann, F.J., et al., *Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and  $\alpha$ -chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS*. *Chest*, 2004. **125**(1): p. 212-219.
116. Allen, T.C. and A. Kurdowska, *Interleukin 8 and acute lung injury*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2014. **138**(2): p. 266-269.
117. Kaiser, R., et al., *Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19*. *Jci Insight*, 2021. **6**(18).
118. Schadendorf, D., et al., *IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor*. *The Journal of Immunology*, 1993. **151**(5): p. 2667-2675.
119. Brew, R., et al., *Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro*. *Cytokine*, 2000. **12**(1): p. 78-85.
120. Miller, E.J., et al., *A synthetic peptide which specifically inhibits heat-treated interleukin-8 binding and chemotaxis for neutrophils*. *Agents and actions*, 1993. **40**(3): p. 200-208.
121. Hayashi, S., et al., *Synthetic hexa-and heptapeptides that inhibit IL-8 from binding to and activating human blood neutrophils*. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(2): p. 814-824.
122. Hayashi, S., et al., *A synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of melanoma cell lines*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **99**(11): p. 2581-2587.
123. Hayashi, S., et al., *Antileukinate, a hexapeptide inhibitor of CXC-chemokine receptor, suppresses bleomycin-induced acute lung injury in mice*. *Lung*, 2002. **180**(6): p. 339-348.
124. Houimel, M. and L. Mazzucchelli, *Identification of biologically active peptides that inhibit binding of human CXCL8 to its receptors from a random phage-epitope library*. *Journal of leukocyte biology*, 2009. **85**(4): p. 728-738.
125. Attwood, M.R., et al., *Identification and characterisation of an inhibitor of interleukin-8: a receptor based approach*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 1996. **6**(15): p. 1869-1874.
126. Attwood, M.R., et al., *Peptide based inhibitors of interleukin-8: structural simplification and enhanced potency*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 1997. **7**(4): p. 429-432.
127. Helmer, D., et al., *Rational design of a peptide capture agent for CXCL8 based on a model of the CXCL8: CXCR1 complex*. *RSC Adv.*, 2015. **5**(33): p. 25657-25668.
128. Fox, D.J., et al., *Highly potent, orally available anti-inflammatory broad-spectrum chemokine inhibitors*. *Journal of medicinal chemistry*, 2009. **52**(11): p. 3591-3595.
129. Grainger, D., et al. *FX125L, a novel small molecule chemokine inhibitor, attenuates neutrophil accumulation in a model of allergic asthma and exhibits a superior efficacy profile to dexamethasone or monteleukast*. in *Allergy*. 2009. WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148 ....
130. Bertini, R., et al., *Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(32): p. 11791-11796.
131. Bertini, R., et al., *Repertaxin is a new potent and selective small organic inhibitor of interleukin-8 (CXCL8) with a unique mode of action*. *Minerva Biotecnologica*, 2004. **16**(1): p. 3.
132. Bizzarri, C., et al., *ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets*. *Pharmacology & therapeutics*, 2006. **112**(1): p. 139-149.
133. Bao, Z., et al., *Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury*. *International immunopharmacology*, 2010. **10**(2): p. 259-263.
134. Dwyer, M.P., et al., *Discovery of 2-hydroxy-N, N-dimethyl-3-{2-[[*(R)*]-1-(5-methylfuran-2-yl)propyl] amino]-3, 4-dioxocyclobut-1-enylamino} benzamide (SCH 527123): a potent, orally*

- bioavailable CXCR2/CXCR1 receptor antagonist. *Journal of medicinal chemistry*, 2006. **49**(26): p. 7603-7606.
135. Zarbock, A., M. Allegretti, and K. Ley, *Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice*. *British journal of pharmacology*, 2008. **155**(3): p. 357-364.
136. Bhusal, R.P., et al., *Evasins: tick salivary proteins that inhibit mammalian chemokines*. *Trends in biochemical sciences*, 2020. **45**(2): p. 108-122.
137. Hajnicka, V., et al., *Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts*. *Parasite immunology*, 2001. **23**(9): p. 483-489.
138. Škrlec, K., et al., *Evasin-displaying lactic acid bacteria bind different chemokines and neutralize CXCL 8 production in Caco-2 cells*. *Microbial biotechnology*, 2017. **10**(6): p. 1732-1743.
139. Sato, A.K., et al., *Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development*. *Current opinion in biotechnology*, 2006. **17**(6): p. 638-642.
140. Smith, M.C. and J.E. Gestwicki, *Features of protein–protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity*. *Expert reviews in molecular medicine*, 2012. **14**.
141. Geppert, T., et al., *Context-based identification of protein-protein interfaces and “hot-spot” residues*. *Chemistry & biology*, 2011. **18**(3): p. 344-353.
142. Cukuroglu, E., et al., *Hot spots in protein–protein interfaces: Towards drug discovery*. *Progress in biophysics and molecular biology*, 2014. **116**(2-3): p. 165-173.
143. Waldmann, H., *Human monoclonal antibodies: the residual challenge of antibody immunogenicity*. *Human Monoclonal Antibodies*, 2014: p. 1-8.
144. Lien, S. and H.B. Lowman, *Therapeutic peptides*. *Trends in biotechnology*, 2003. **21**(12): p. 556-562.
145. Lam, K.S., M. Lebl, and V. Krchnák, *The “one-bead-one-compound” combinatorial library method*. *Chemical reviews*, 1997. **97**(2): p. 411-448.
146. Furka, A., et al., *General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures*. *International journal of peptide and protein research*, 1991. **37**(6): p. 487-493.
147. Thakkar, A., et al., *High-throughput sequencing of peptoids and peptide–peptoid hybrids by partial Edman degradation and mass spectrometry*. *Journal of combinatorial chemistry*, 2009. **11**(2): p. 294-302.
148. Lam, K.S., et al., *A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity*. *Nature*, 1991. **354**(6348): p. 82-84.
149. Diao, L. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics and pharmacokinetic–pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides*. *Clinical pharmacokinetics*, 2013. **52**(10): p. 855-868.
150. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. *Drug discovery today*, 2010. **15**(1): p. 40-56.
151. Vagner, J., H. Qu, and V.J. Hruby, *Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery*. *Current opinion in chemical biology*, 2008. **12**(3): p. 292-296.
152. Grauer, A. and B. Koenig, *Peptidomimetics—A versatile route to biologically active compounds*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009. **2009**(30): p. 5099-5111.
153. Zuckermann, R.N., et al., *Efficient method for the preparation of peptoids [oligo (N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 1992. **114**(26): p. 10646-10647.
154. Culf, A.S. and R.J. Ouellette, *Solid-phase synthesis of N-substituted glycine oligomers (alpha-peptoids) and derivatives*. *Molecules*, 2010. **15**(8): p. 5282-335.
155. Miller, S.M., et al., *Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers*. *Drug Development Research*, 1995. **35**(1): p. 20-32.
156. Simon, R.J., et al., *Peptoids: a modular approach to drug discovery*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(20): p. 9367-9371.
157. Moehle, K. and H.J. Hofmann, *Peptides and peptoids—A quantum chemical structure comparison*. *Biopolymers*, 1996. **38**(6): p. 781-790.
158. Butterfoss, G.L., et al., *A preliminary survey of the peptoid folding landscape*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(46): p. 16798-16807.

159. Miller, S.M., et al., *Proteolytic studies of homologous peptide and N-substituted glycine peptoid oligomers*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 1994. **4**(22): p. 2657-2662.
160. Culf, A.S. and R.J. Ouellette, *Solid-phase synthesis of N-substituted glycine oligomers ( $\alpha$ -peptoids) and derivatives*. Molecules, 2010. **15**(8): p. 5282-5335.
161. Taylor, E.W., J.A. Gibbons, and R.A. Braeckman, *Intestinal absorption screening of mixtures from combinatorial libraries in the Caco-2 model*. Pharmaceutical research, 1997. **14**(5): p. 572-577.
162. Figliozzi, G.M., et al., [25] *Synthesis of N-substituted glycine peptoid libraries*, in *Methods in enzymology*. 1996, Elsevier. p. 437-447.
163. Jevševar, S., M. Kunstelj, and V.G. Porekar, *PEGylation of therapeutic proteins*. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 2010. **5**(1): p. 113-128.
164. Kratz, F., *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. Journal of controlled release, 2008. **132**(3): p. 171-183.
165. McMENAMY, R.H., *Albumin binding sites*, in *Albumin: Structure, Function and Uses*. 1977, Elsevier. p. 143-158.
166. Peters Jr, T., *Serum albumin*. Advances in protein chemistry, 1985. **37**: p. 161-245.
167. Sudlow, G., D. Birkett, and D. Wade, *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*. Molecular pharmacology, 1975. **11**(6): p. 824-832.
168. Nilvebrant, J., et al., *Engineering bispecificity into a single albumin-binding domain*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25791.
169. Nilvebrant, J., et al., *Development and characterization of small bispecific albumin-binding domains with high affinity for ErbB3*. Cellular and molecular life sciences, 2013. **70**(20): p. 3973-3985.
170. Elsadek, B. and F. Kratz, *Impact of albumin on drug delivery—New applications on the horizon*. Journal of Controlled Release, 2012. **157**(1): p. 4-28.
171. Kratz, F., *A clinical update of using albumin as a drug vehicle—A commentary*. Journal of controlled release, 2014. **190**: p. 331-336.
172. Brahm, K., *Untersuchung von Peptidomimetika als Inhibitoren für das Chemokin CXCL8*. 2020, TU Darmstadt.
173. Lill, A., *"One-Bead-One-Compound" Bibliotheken zur Isolierung von Albumin-bindenden Peptoiden*. 2020, TU Darmstadt.
174. Hebert, C., et al., *Partial functional mapping of the human interleukin-8 type A receptor. Identification of a major ligand binding domain*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(25): p. 18549-18553.
175. Wiese, D. and K. Schmitz, *Expression of recombinant human interleukin-8 and its purification using a single buffer system*. Journal of immunological methods, 2011. **364**(1-2): p. 77-82.
176. Chhetri, G., P. Kalita, and T. Tripathi, *An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in Escherichia coli*. MethodsX, 2015. **2**: p. 385-391.
177. Yu, Z., et al., *High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in E. coli BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching*. Bioresource Technology, 2016. **214**: p. 303-310.
178. Ingram, L.O.N. and T.M. Buttke, *Effects of alcohols on micro-organisms*. Advances in microbial physiology, 1985. **25**: p. 253-300.
179. Dombek, K.M. and L. Ingram, *Effects of ethanol on the Escherichia coli plasma membrane*. Journal of bacteriology, 1984. **157**(1): p. 233-239.
180. Basu, T. and R. Poddar, *Effect of ethanol on Escherichia coli cells. Enhancement of DNA synthesis due to ethanol treatment*. Folia microbiologica, 1994. **39**(1): p. 3-6.
181. Thomas, J.G. and F. Baneyx, *Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing heat-shock proteins (\*)*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(19): p. 11141-11147.
182. Kusano, K., et al., *Protein synthesis inhibitors and ethanol selectively enhance heterologous expression of P450s and related proteins in Escherichia coli*. Archives of biochemistry and biophysics, 1999. **367**(1): p. 129-136.

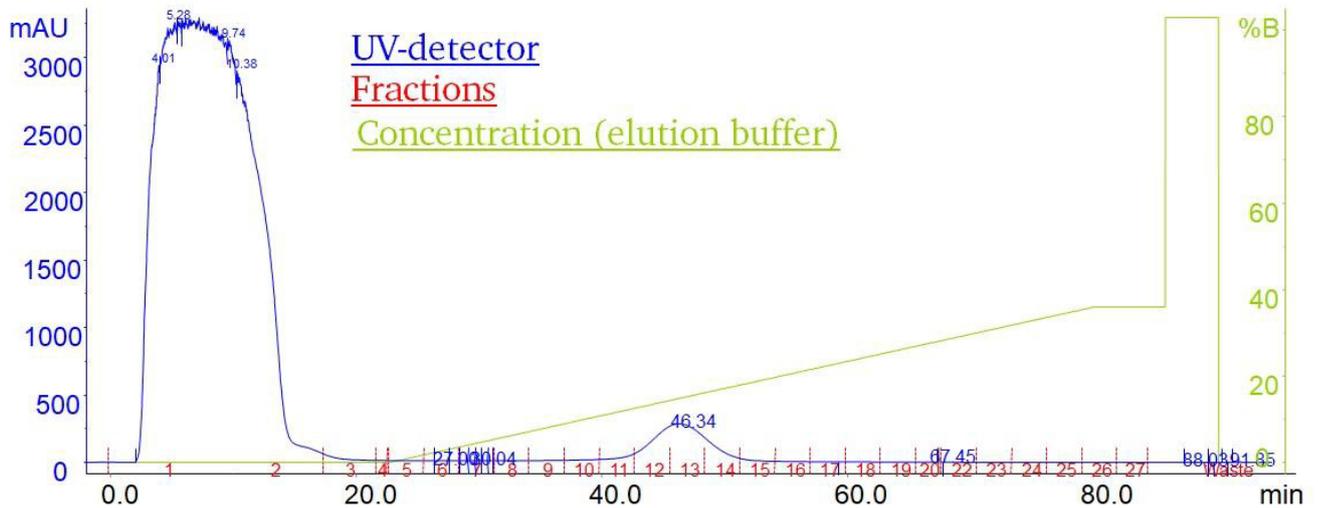
- 
183. Blackwell, J.R. and R. Horgan, *A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form*. FEBS letters, 1991. **295**(1-3): p. 10-12.
  184. <https://www.genscript.com/tools/peptide-molecular-weight-calculator>. 13.08.2022.
  185. Repity, M., *Bindungsstudien mit Monomer- und Dimervarianten von Interleukin-8 an Rezeptorpeptiden*. 2019, TU Darmstadt.
  186. Joseph, P.R.B., et al., *Solution NMR characterization of chemokine CXCL8/IL-8 monomer and dimer binding to glycosaminoglycans: structural plasticity mediates differential binding interactions*. Biochemical Journal, 2015. **472**(1): p. 121-133.
  187. Grassi, L. and C. Cabrele, *Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions*. Amino Acids, 2019. **51**(10): p. 1409-1431.
  188. Helmer, D., *Synthesis and Test of Peptides and Peptoids for the Inhibition of Cytokines*. 2015, TU Darmstadt.
  189. Dandliker, W.B., et al., [1] *Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization*, in *Methods in enzymology*. 1981, Elsevier. p. 3-28.
  190. Ziarek, J.J., et al., *Sulfonyltyrosine recognition as marker for druggable sites in the extracellular space*. International journal of molecular sciences, 2011. **12**(6): p. 3740-3756.
  191. Simpson, L.S. and T.S. Widlanski, *A comprehensive approach to the synthesis of sulfate esters*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(5): p. 1605-1610.
  192. Seibert, C. and T.P. Sakmar, *Toward a framework for sulfoproteomics: synthesis and characterization of sulfonyltyrosine-containing peptides*. Peptide Science, 2008. **90**(3): p. 459-477.
  193. Drake, S.K. and G.L. Hortin, *Improved detection of intact tyrosine sulfate-containing peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in linear negative ion mode*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010. **42**(1): p. 174-179.
  194. Ludeman, J.P., et al., *Phosphate modulates receptor sulfonyltyrosine recognition by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2015. **13**(7): p. 2162-2169.
  195. Monroc, S., et al., *De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria*. Peptides, 2006. **27**(11): p. 2567-2574.
  196. Millward, S.W., et al., *Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity*. ACS chemical biology, 2007. **2**(9): p. 625-634.
  197. Klubthawee, N. and P. Khajornpipat, *Antimicrobial activity, stability, cytotoxicity and mechanism of action determination of antimicrobial peptide against Bacillus cereus improved by cyclization*. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย ปทุมธานี, 2022. **3**(1): p. 29-43.
  198. Cardote, T.A. and A. Ciulli, *Cyclic and macrocyclic peptides as chemical tools to recognise protein surfaces and probe protein-protein interactions*. ChemMedChem, 2016. **11**(8): p. 787-794.
  199. White, C.J. and A.K. Yudin, *Contemporary strategies for peptide macrocyclization*. Nature chemistry, 2011. **3**(7): p. 509-524.
  200. Jager, S., *Development of Computer-aided Concepts for the Optimization of Single-Molecules and their Integration for High-Throughput Screenings*. 2019, TU Darmstadt.
  201. Helmer, D., et al., *Correction: Rational design of a peptide capture agent for CXCL8 based on a model of the CXCL8: CXCR1 complex*. RSC advances, 2018. **8**(30): p. 16800-16801.
  202. Chandra, K., et al., *A tandem in situ peptide cyclization through trifluoroacetic acid cleavage*. Angewandte Chemie, 2014. **126**(36): p. 9604-9609.
  203. Abe, R., et al., *"Quenchbodies": quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(43): p. 17386-17394.
  204. Jeong, H.-J., et al., *Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **40**(1): p. 17-23.
  205. Ohashi, H., et al., *Insight into the working mechanism of quenchbody: Transition of the dye around antibody variable region that fluoresces upon antigen binding*. Bioconjugate chemistry, 2016. **27**(10): p. 2248-2253.

- 
206. Brahm, K., et al., *Macrocyclization enhances affinity of chemokine-binding peptoids*. *Biopolymers*, 2019. **110**(4): p. e23244.
207. Wunder, A., et al., *Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(3): p. 1-54.
208. Hilde Adi Pierrette Revets, C.B., Stephanie Staelens, Peter Verheesen, *Peptides capable of binding to serum proteins and compounds, constructs and polypeptides comprising the same*, in <https://patents.google.com/patent/US8217140?q=ca2721202A1>. 2012.
209. Wiegand, P., *Methodenentwicklung für die Isolierung und Charakterisierung von Proteinbindern aus "One-Bead-One-Compound" Bibliotheken*. 2017, TU Darmstadt.
210. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. *Protein engineering*, 1999. **12**(6): p. 439-446.
211. Helmer, D., et al., *Two-channel image analysis method for the screening of OBOC libraries*. *Analytical Methods*, 2016. **8**(20): p. 4142-4152.
212. Christensen, T., *Qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil*. *Acta Chem. Scand. B*, 1979. **33**: p. 763-766.
213. Gaggini, F., et al., *Colorimetric tools for solid-phase organic synthesis*. *Journal of combinatorial chemistry*, 2004. **6**(5): p. 805-810.
214. Burkoth, T.S., et al., *Incorporation of unprotected heterocyclic side chains into peptoid oligomers via solid-phase submonomer synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(29): p. 8841-8845.
215. Andersson, L.O., A. Rehnström, and D.L. Eaker, *Studies on "nonspecific" binding: The nature of the binding of fluorescein to bovine serum albumin*. *European Journal of Biochemistry*, 1971. **20**(3): p. 371-380.
216. Barbero, N., et al., *A study of the interaction between fluorescein sodium salt and bovine serum albumin by steady-state fluorescence*. *Dyes and pigments*, 2009. **80**(3): p. 307-313.
217. Penniston, J.T., *Fluorescence polarization measurement of binding of fluorescein to albumin*. *Experimental eye research*, 1982. **34**(3): p. 435-443.
218. McMenemy, R.H. and J. Oncley, *The specific binding of L-tryptophan to serum albumin*. 1958.
219. Yamamoto, T., et al., *Changes in the albumin binding of tryptophan during postoperative recovery: a possible link with central fatigue?* *Brain research bulletin*, 1997. **43**(1): p. 43-46.
220. Pardridge, W., *Tryptophan transport through the blood-brain barrier: in vivo measurement of free and albumin-bound amino acid*. *Life Sciences*, 1979. **25**(17): p. 1519-1528.
221. Dennis, M.S., et al., *Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(38): p. 35035-35043.
222. Wack, J.S., *Synthese & Charakterisierung von Peptiden als Liganden für Proteine aus dem Blut*. 2015, TU Darmstadt.
223. Hickey, S.M., et al., *An optimised synthesis of 2-[2, 3-Bis (tert-butoxycarbonyl) guanidino] ethylamine*. *Synlett*, 2012. **23**(12): p. 1779-1782.
224. Kirshenbaum, K., et al., *Sequence-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(8): p. 4303-4308.
225. Rink, I., *Untersuchungsmethoden für die chemokininduzierte Migration von Leukozyten*. 2016, TU Darmstadt.
226. Moerke, N.J., *Fluorescence polarization (FP) assays for monitoring peptide-protein or nucleic acid-protein binding*. *Current protocols in chemical biology*, 2009. **1**(1): p. 1-15.

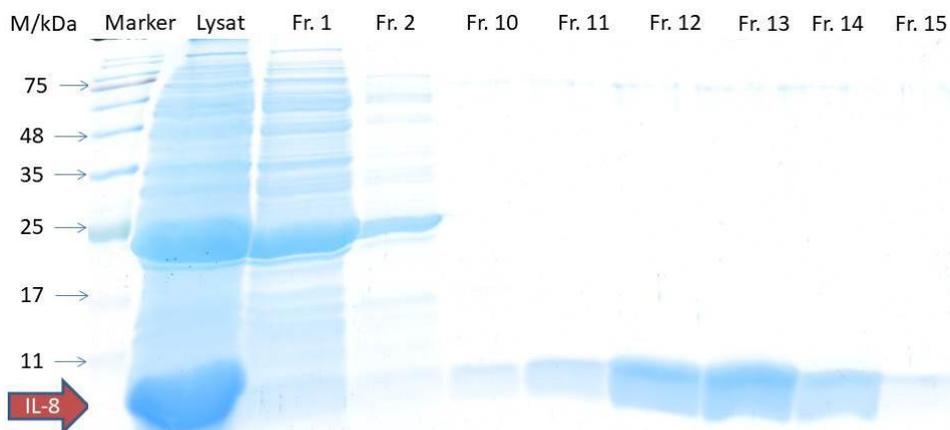
## 9 Anhang

### 9.1 Expression und Reinigung der CXCL8-Varianten

#### CXCL8wt (3)

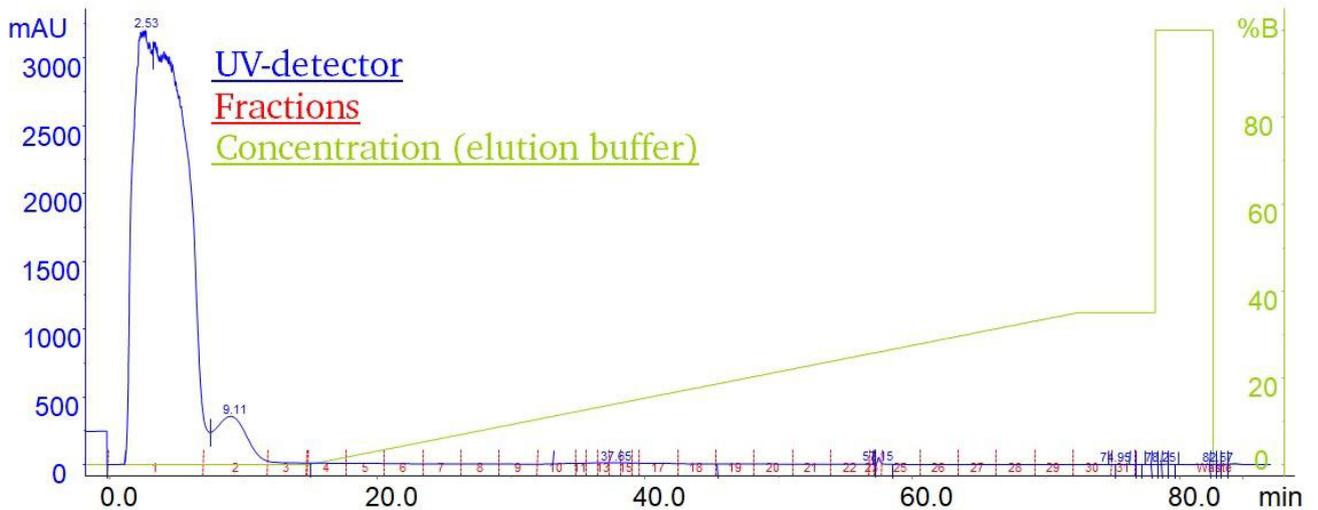


**Abbildung 9-1:** Exemplarisches Chromatogramm der Reinigung von CXCL8wt (3) durch Kationenaustauschchromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und mit steigender Konzentration an Puffer B (grün) wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

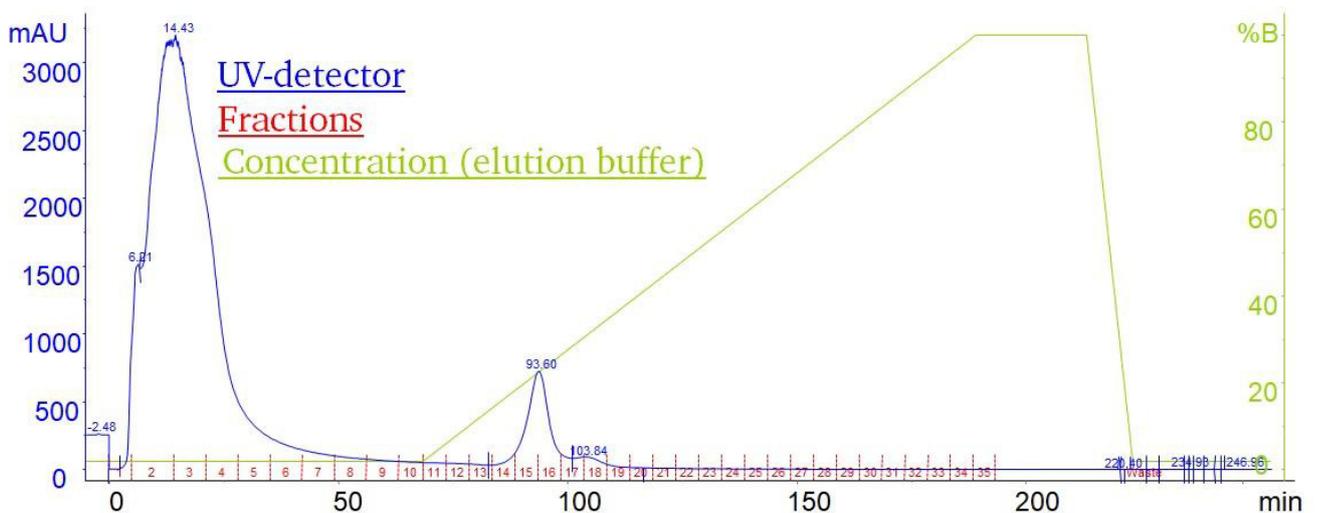


**Abbildung 9-2:** Exemplarische SDS-PAGE des durch Kationenaustauschchromatographie gereinigten Zelllysats bei der Expression von CXCL8wt (3). Die Fraktionen 10-15 enthalten das Chemokin CXCL8wt (3) (MW≈8 kDa) ohne weitere Verunreinigungen. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

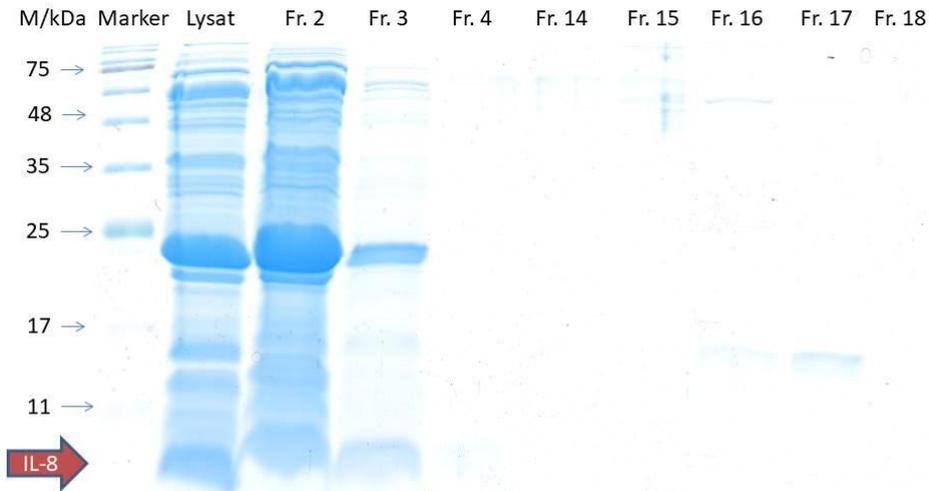
## CXCL8 V27P/E29P (5)



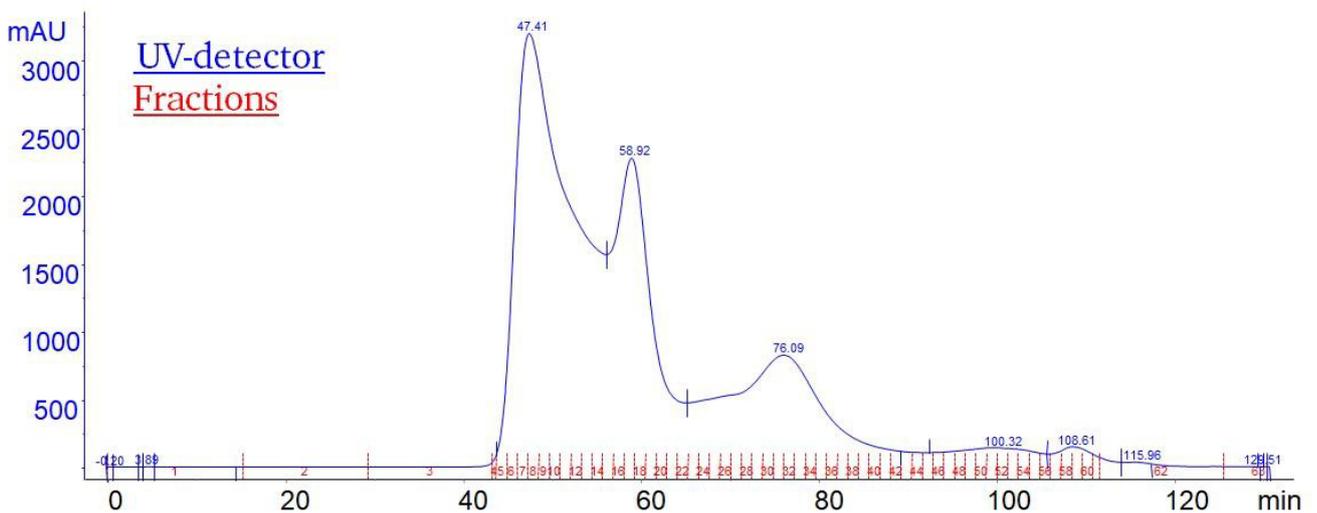
**Abbildung 9-3:** Chromatogramm des Versuchs der Reinigung von CXCL8 V27P/E29P (5) durch Kationenaustauschchromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und mit steigender Konzentration an Puffer B (grün) wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Es kann kein nennenswerter Anstieg der Absorption erkannt werden. Die Reinigung war nicht erfolgreich. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]



**Abbildung 9-4:** Chromatogramm der Reinigung von CXCL8 V27P/E29P (5) durch Heparin-Affinitätschromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und mit steigender Konzentration an Puffer B (grün) wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

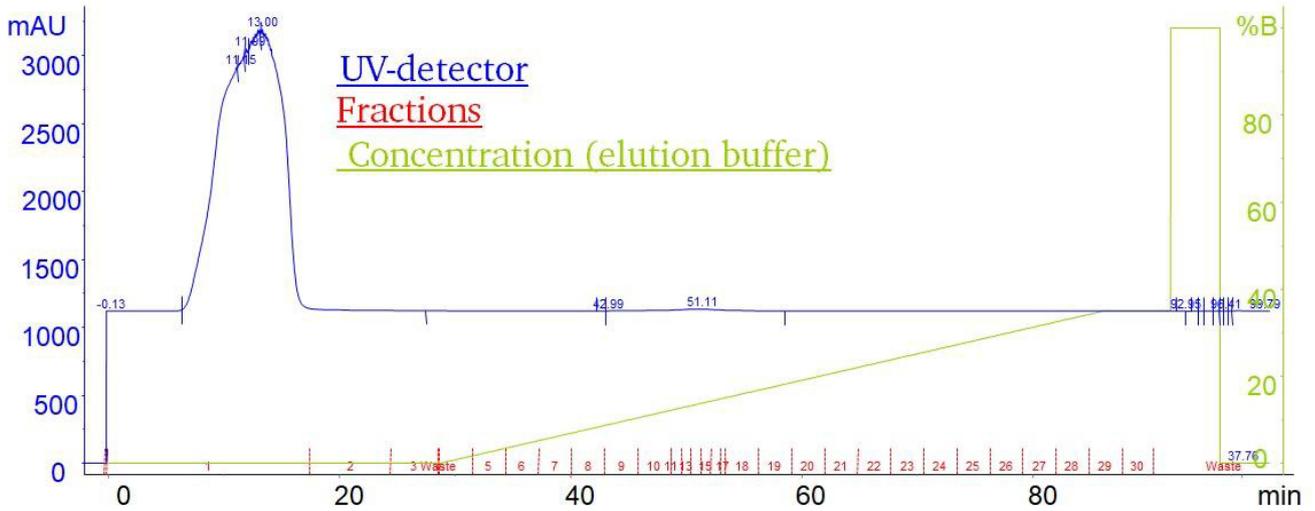


**Abbildung 9-5:** SDS-PAGE des durch Heparin-Affinitätschromatographie gereinigten Zelllysats bei der Expression von CXCL8 V27P/E29P (**5**). Die Fraktionen 14-16 enthalten das Chemokin CXCL8 V27P/E29P (**5**) (MW≈8 kDa) stark verdünnt und mit Verunreinigungen. Größere Mengen des Chemokins CXCL8 V27P/E29P (**5**) sind in den Fraktionen 2 und 3 des Durchlaufs enthalten. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

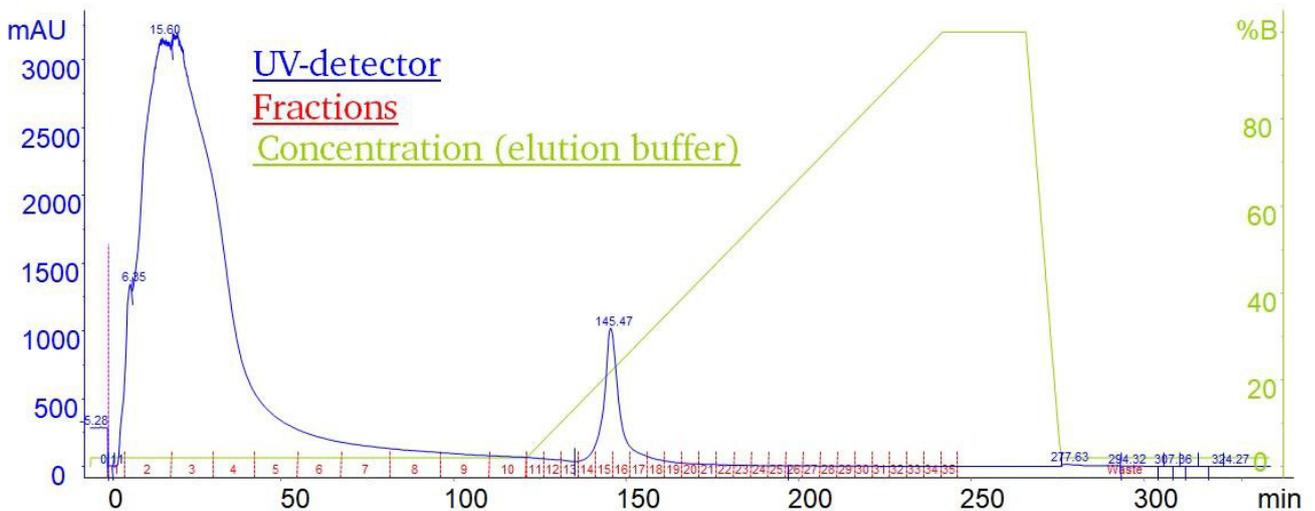


**Abbildung 9-6:** Chromatogramm der isokratischen Reinigung von CXCL8 V27P/E29P (**5**) durch Größenausschlusschromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und es wurden automatisch Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Das Chemokin CXCL8 V27P/E29P (**5**) ist in den Fraktionen 16-20 enthalten. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

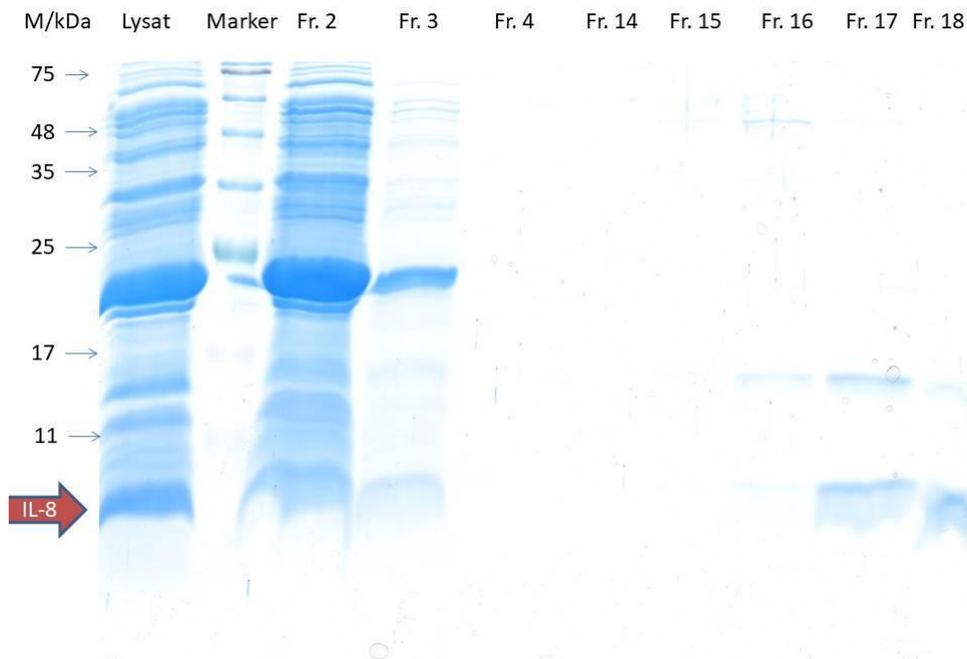
## CXCL8 R26C (4)



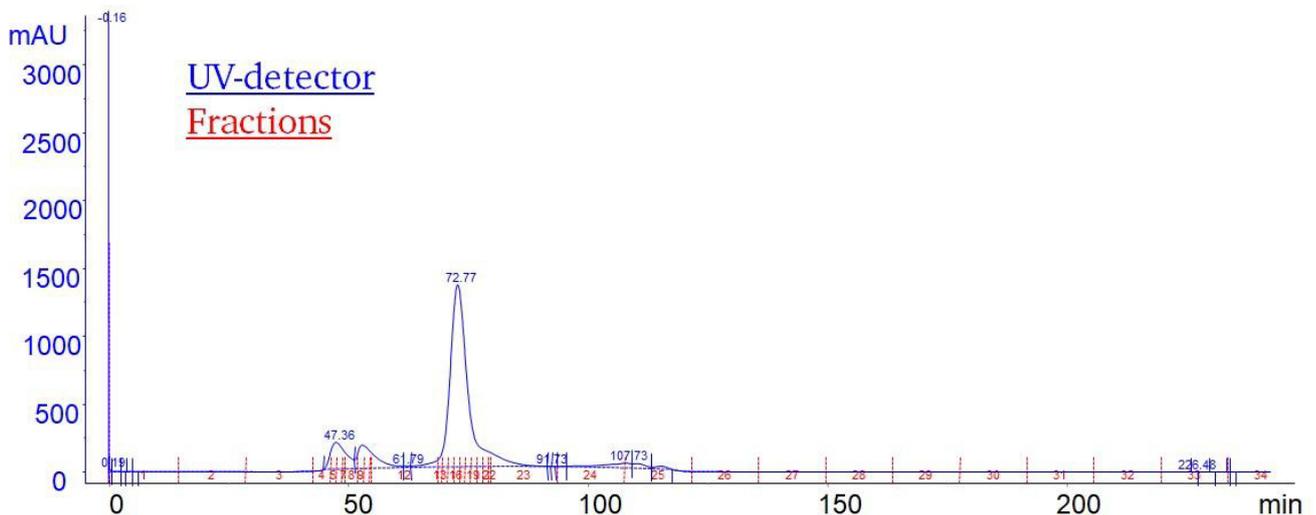
**Abbildung 9-7:** Chromatogramm des Versuchs der Reinigung von CXCL8 R26C (4) durch Kationenaustauschchromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und mit steigender Konzentration an Puffer B (grün) wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Es kann kein nennenswerter Anstieg der Absorption erkannt werden. Die Reinigung war nicht erfolgreich. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]



**Abbildung 9-8:** Chromatogramm der Reinigung von CXCL8 R26C (4) durch Heparin-Affinitätschromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und mit steigender Konzentration an Puffer B (grün) wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]



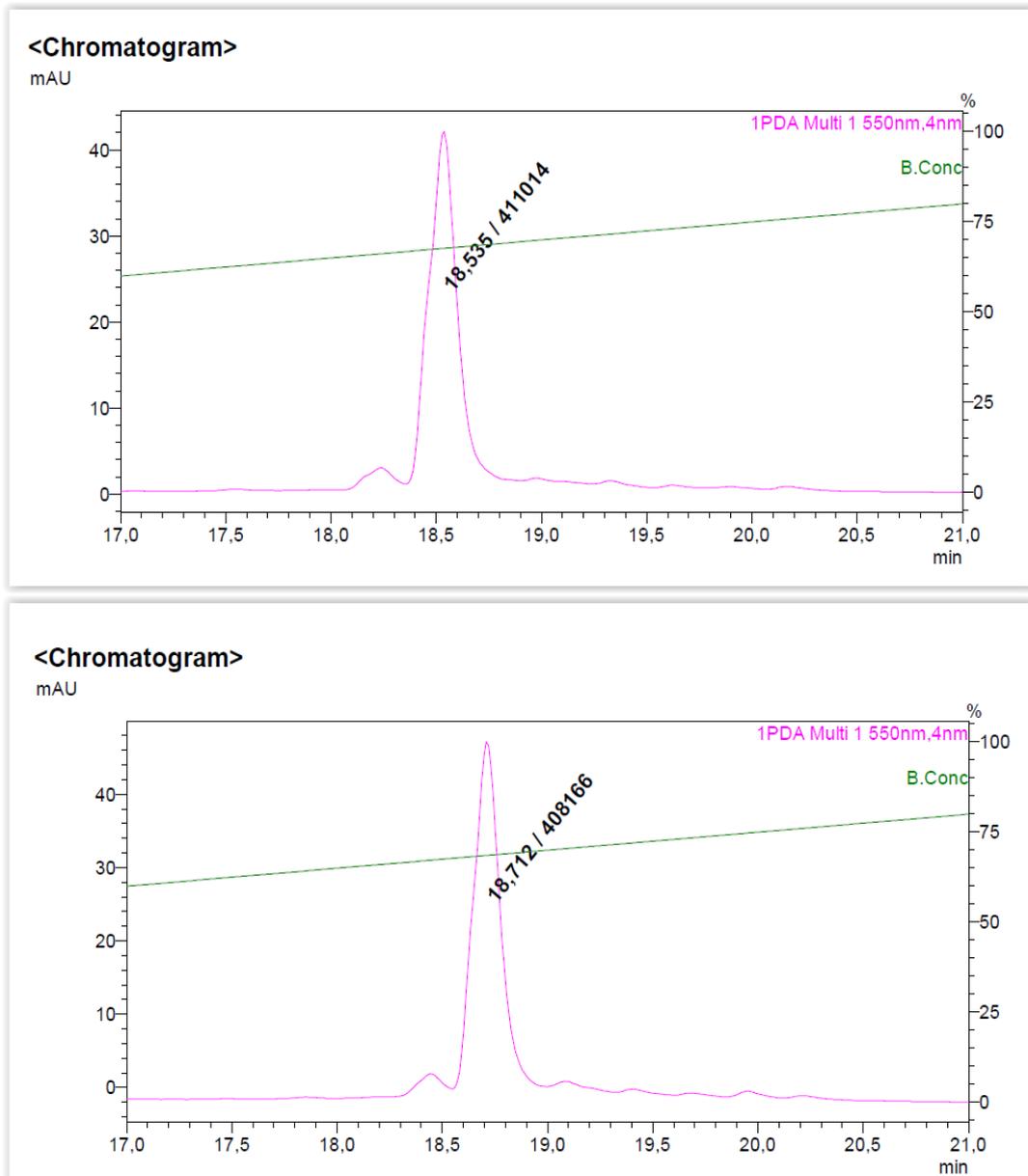
**Abbildung 9-9:** Exemplarische SDS-PAGE des durch Heparin-Affinitätschromatographie gereinigten Zelllysats bei der Expression von CXCL8 R26C (**4**). Die Fraktionen 16-18 enthalten das Chemokin CXCL8 R26C (**4**) (MW≈16 kDa) mit Verunreinigungen. Größere Mengen des Chemokins CXCL8 R26C (**4**) sind in den Fraktionen 2 und 3 des Durchlaufs enthalten. Da die Proben der in Vorbereitung auf die SDS-PAGE mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt wurden um die Disulfidbrücken im Protein zu reduzieren, ist im Gel die erwartete Bande für IL-8 R26C (**4**) auf einer Höhe von ca. 8 kDa zu finden. Größere Mengen des Chemokins CXCL8 R26C (**4**) sind in den Fraktionen 2 und 3 des Durchlaufs enthalten. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]



**Abbildung 9-10:** Chromatogramm der isokratischen Reinigung von CXCL8 R26C (**4**) durch Größenausschlusschromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und es wurden automatisiert Fraktionen (rot) des Eluats gesammelt. Das Chemokin CXCL8 R26C (**4**) ist in den Fraktionen 13-22 enthalten. Mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Repity.[185]

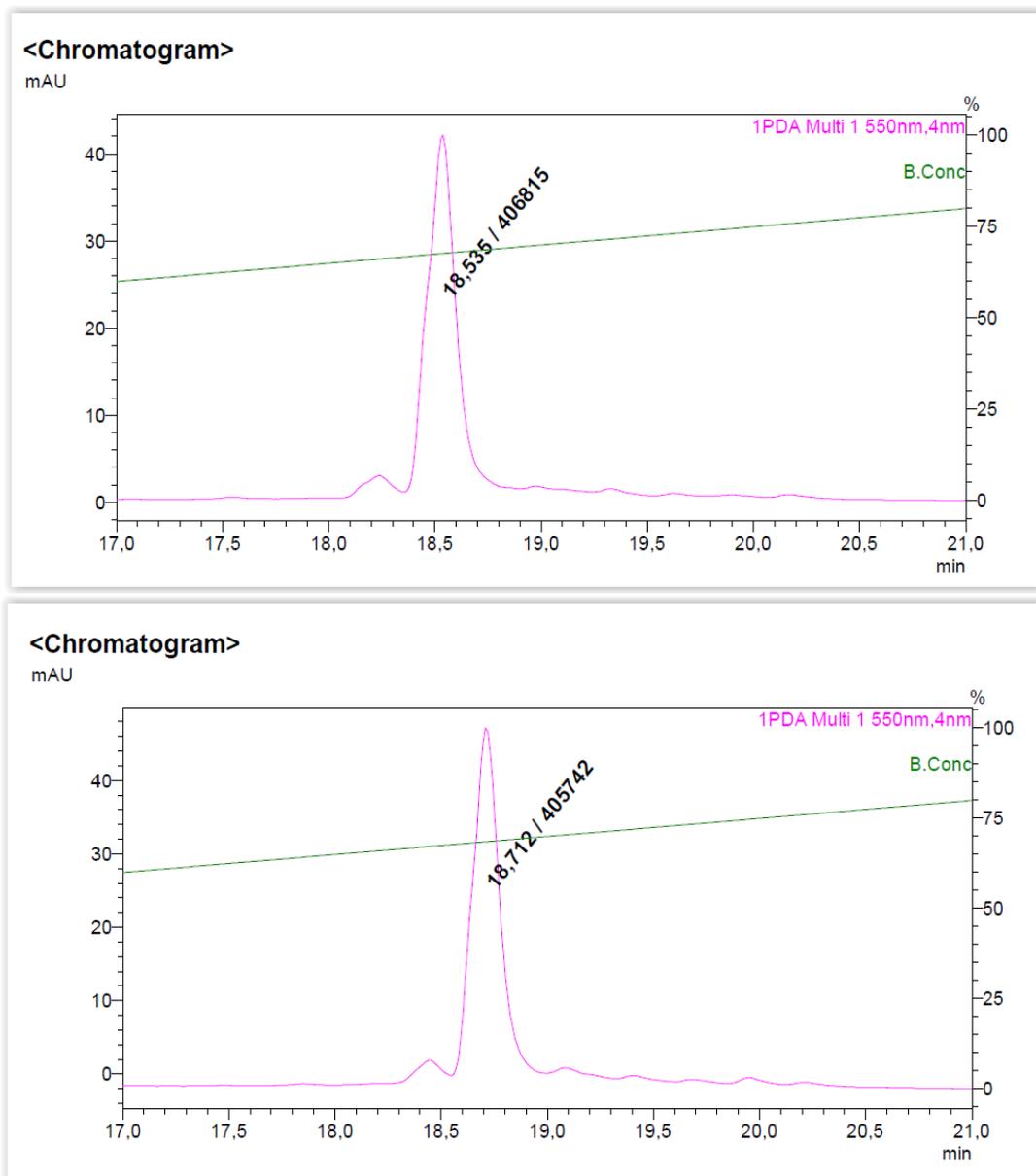
## 9.2 Proteasestabilitäts-Assay

### TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (10)



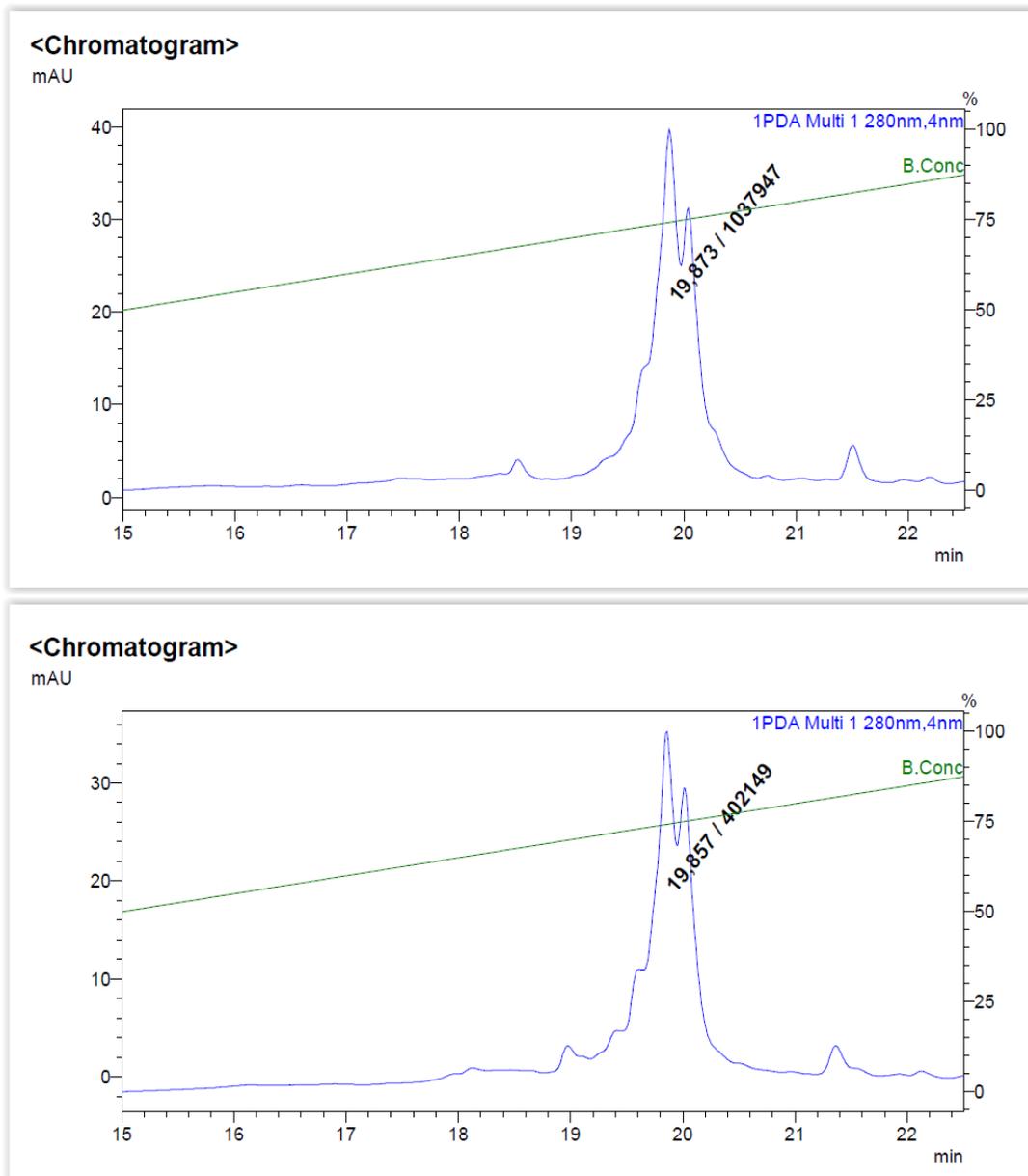
**Abbildung 9-11:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (10) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RPCycLoopsQ (10) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 550 nm (pinke Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (dunkelgrüne Linie).

## TAMRA-IL8RPCycLoopsE (11)



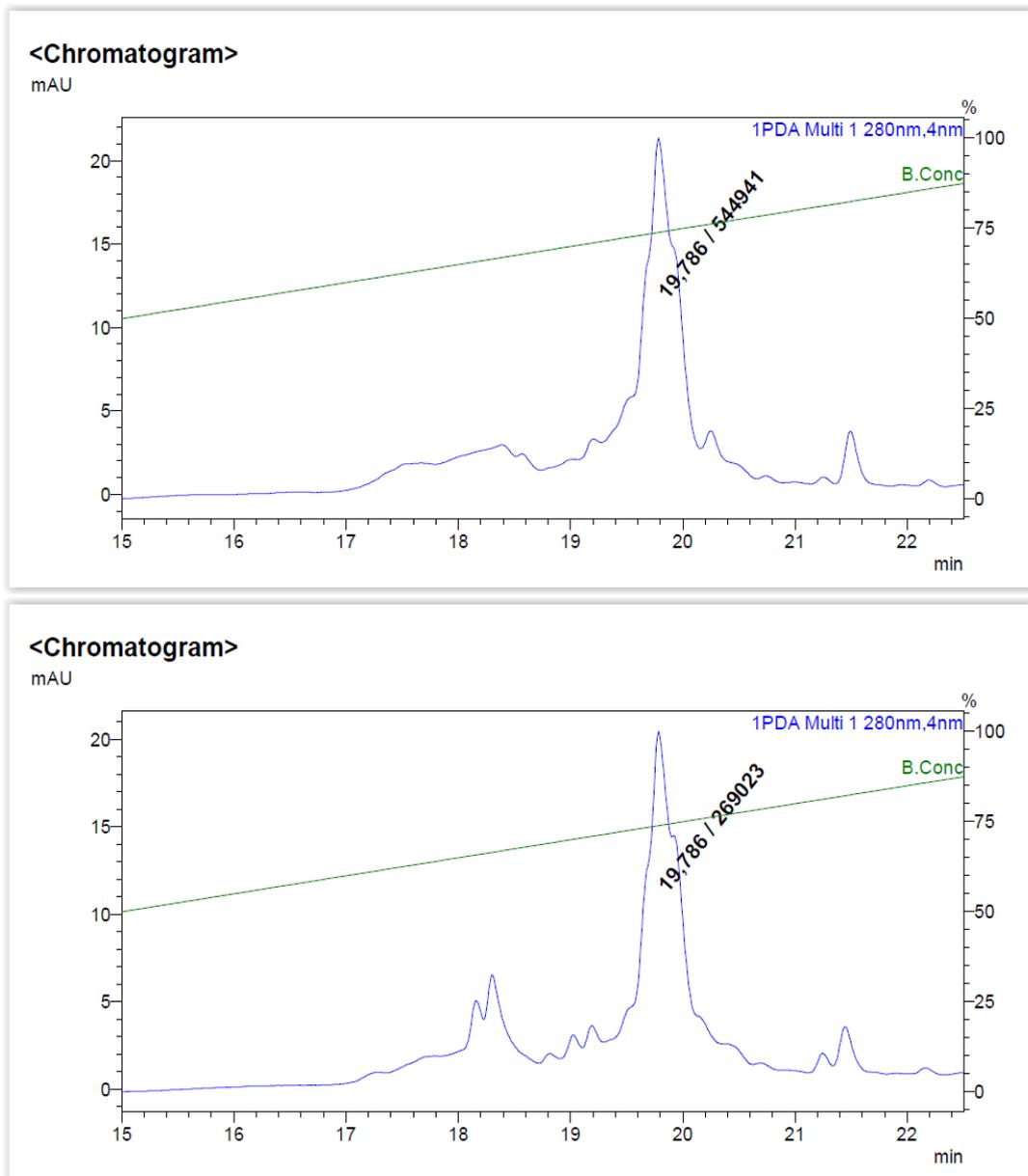
**Abbildung 9-12:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RPCycLoopsE (11) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RPCycLoopsE (11) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 550 nm (pinke Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (dunkelgrüne Linie).

## IL8RP-LoopsQ (7)



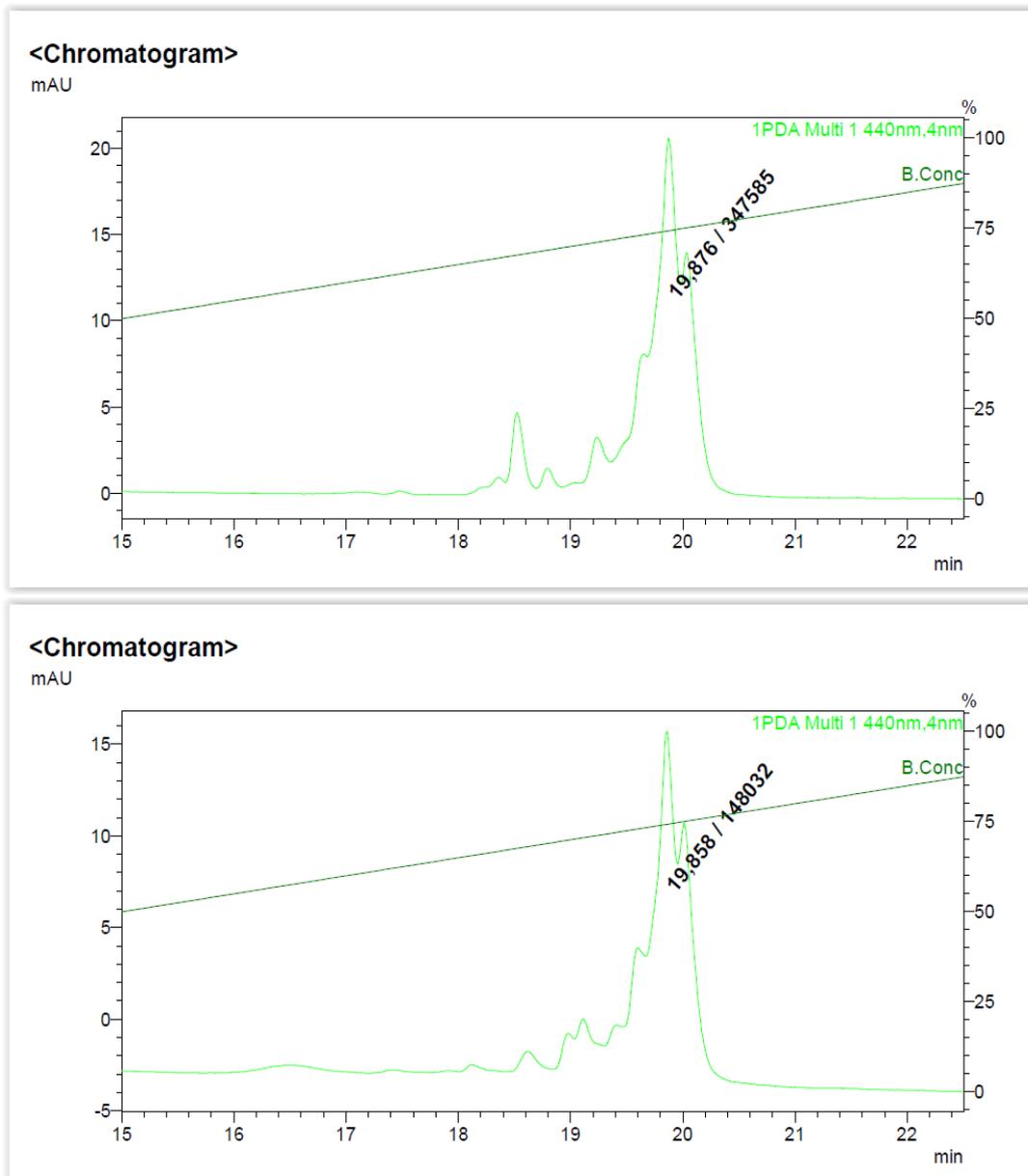
**Abbildung 9-13:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem IL8RP-LoopsQ (7) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem IL8RP-LoopsQ (7) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 280 nm (blaue Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie).

## IL8RP-Loops E(8)



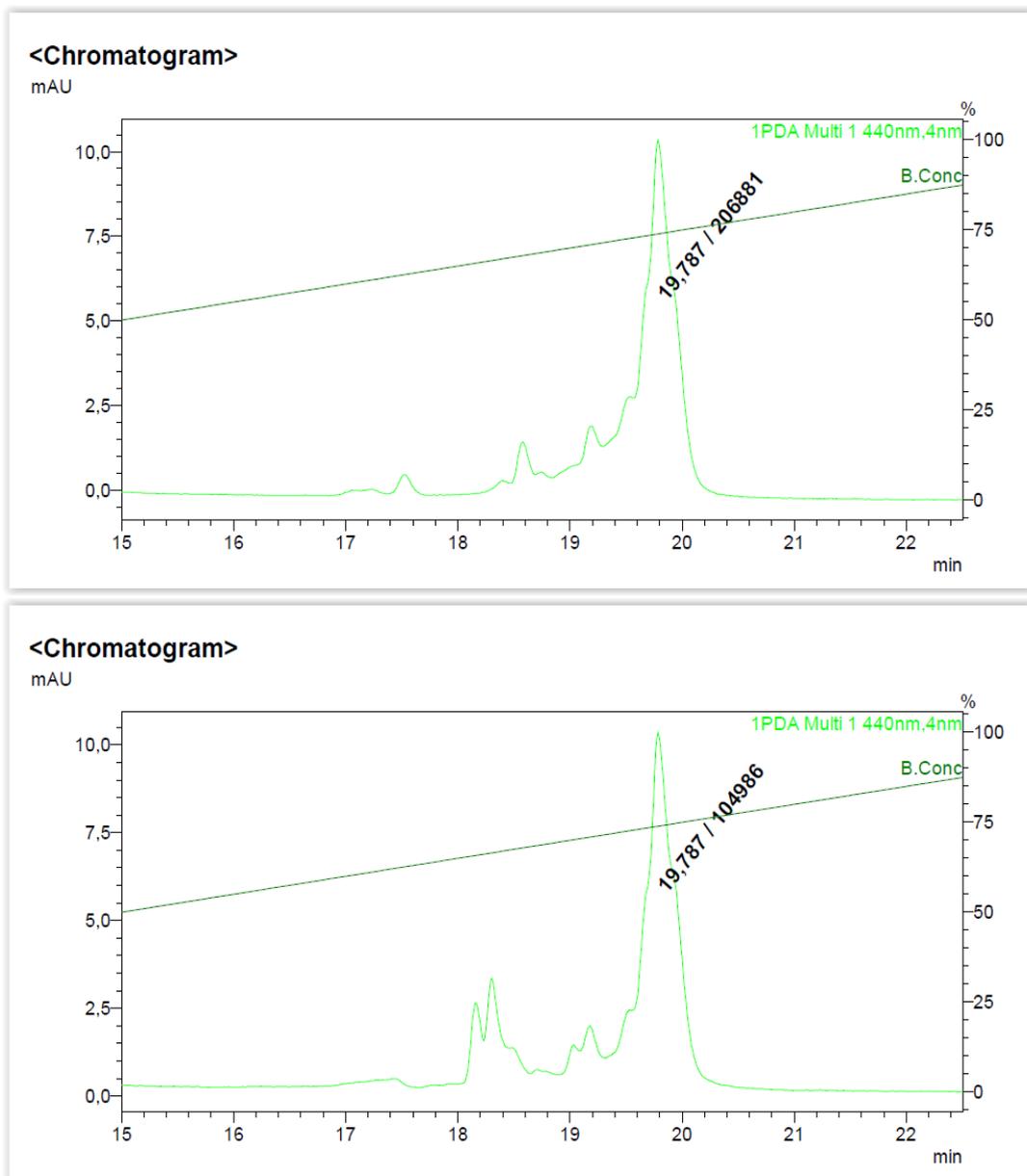
**Abbildung 9-14:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem IL8RP-LoopsE (8) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem IL8RP-LoopsE (8) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 280 nm (blaue Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie).

## Fluo-IL8RP-LoopsQ (7a)



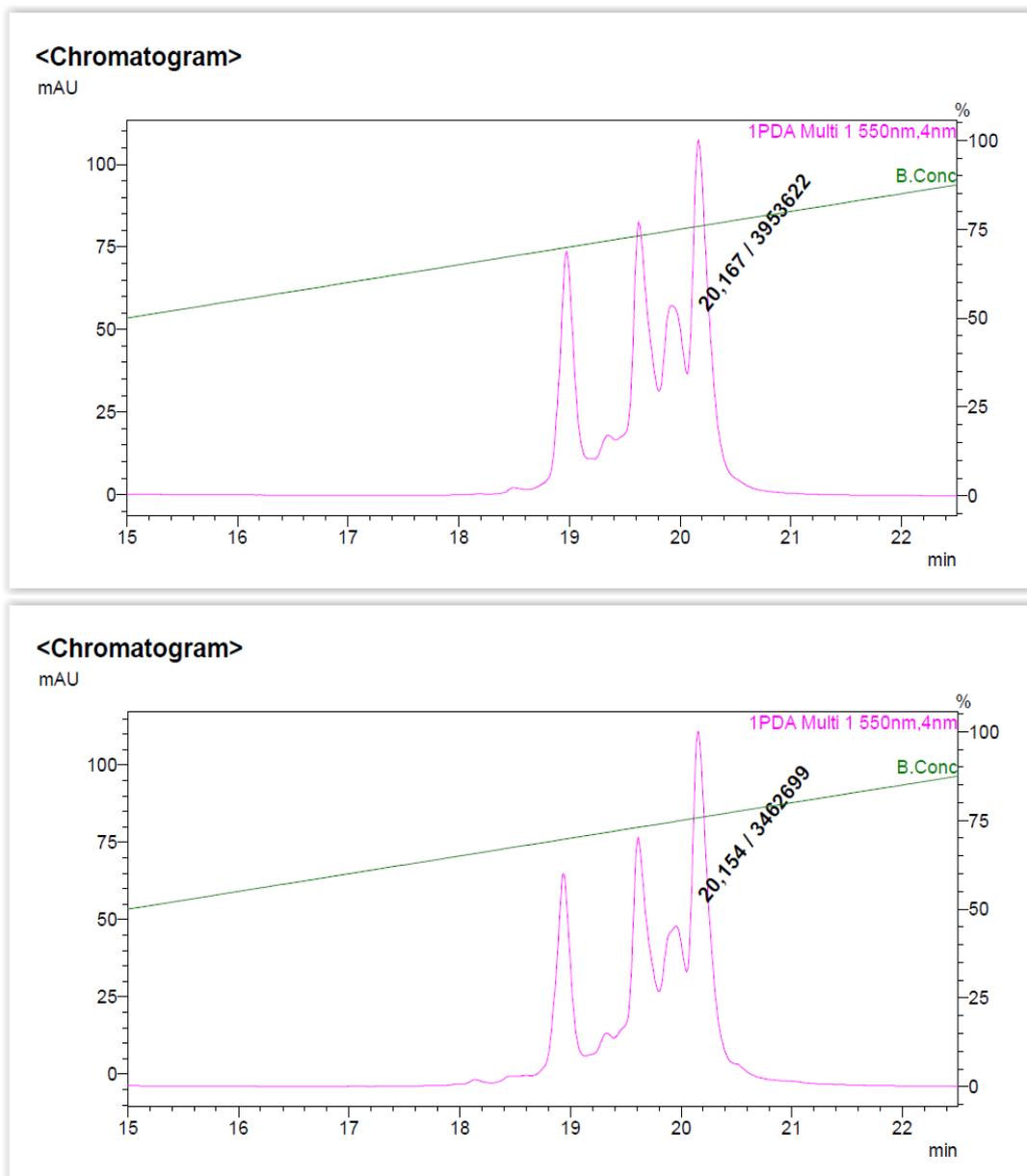
**Abbildung 9-15:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsQ (7a) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsQ(7a) Proteolyse durch mit Trypsin. Detektionswellenlänge 440 nm (hellgrüne Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (dunkelgrüne Linie).

## Fluo-IL8RPLoopsE (8a)



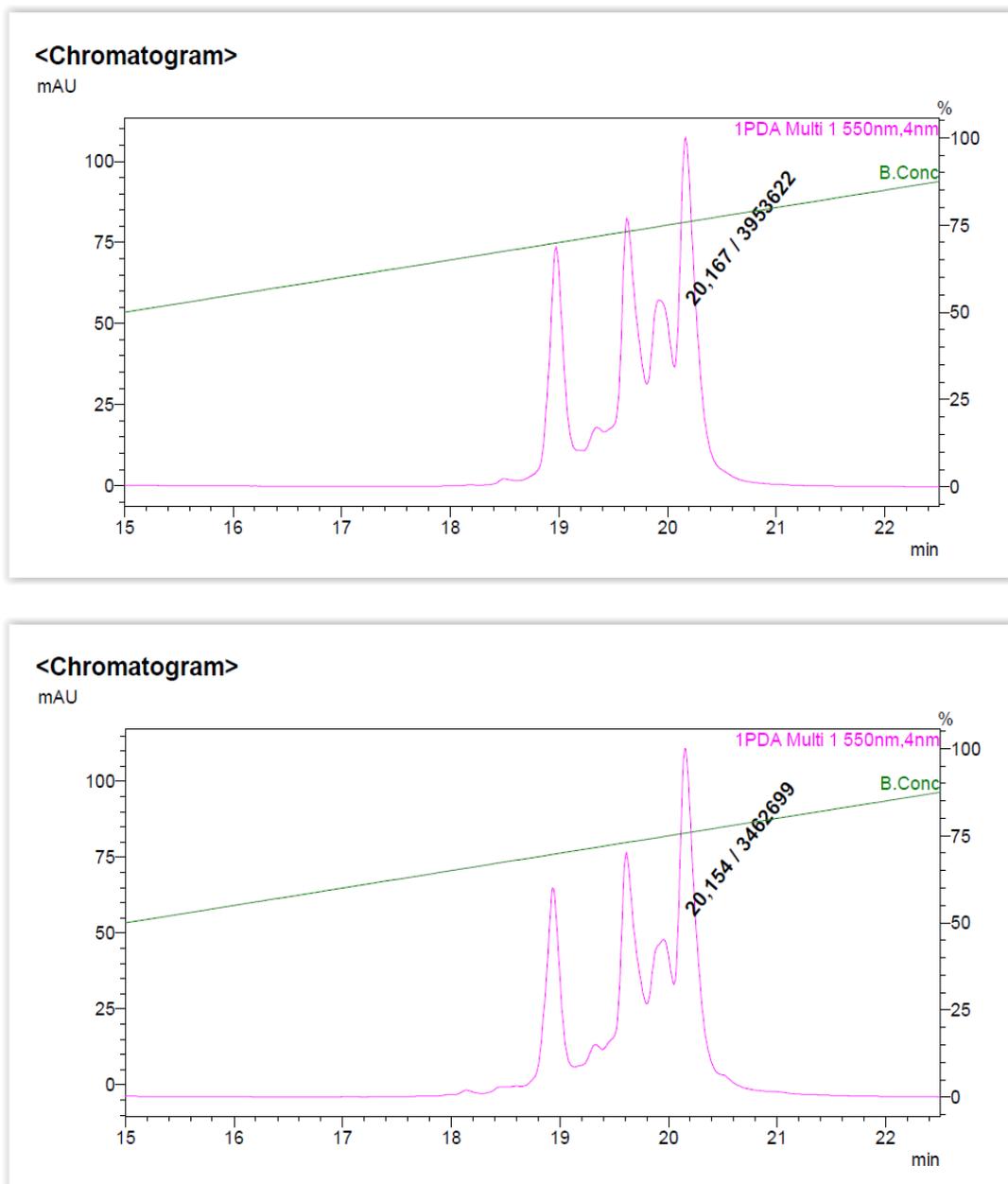
**Abbildung 9-16:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsE (8a) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsE(8a) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 440 nm (hellgrüne Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (dunkelgrüne Linie).

## TAMRA-IL8RPLoopsQ (7b)

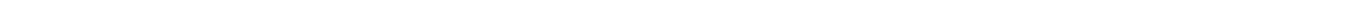


**Abbildung 9-17: oben:** Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem TAMRA-IL8RP-LoopsQ (**7b**) vor Proteolyse durch Trypsin. **unten:** Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RP-LoopsQ (**7b**) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 550 nm (pinke Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie).

## TAMRA-IL8RPLoopsE (8b)



**Abbildung 9-17:** oben: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem TAMRA-IL8RPLoopsE (**8b**) vor Proteolyse durch Trypsin. unten: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von TAMRA-IL8RPLoopsE (**8b**) nach Proteolyse durch Trypsin. Detektionswellenlänge 550 nm (pinke Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie).



---

## Kurzlebenslauf Julia Susanne Wack

---

### Persönliche Daten

Julia Susanne Wack  
geboren in Darmstadt  
wohnhaft in Pfungstadt

---

### Berufliche Erfahrung

Seit 06/2020  
Regulatory Affairs Manager bei KFT Chemieservice GmbH einer Tochtergesellschaft der Infracore Höchst-Gruppe

- Teamleitung der Spezialgebiete Biozidrecht und Kosmetikrecht
- Verkehrsfähigkeitsprüfung von Biozid- und Kosmetikprodukten
- Kundenberatung und Schulungen

---

### Wissenschaftliche Mitarbeit

09/2015 – 05/2020  
Promotion in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Katja Schmitz an der TU Darmstadt

- Thema: „Peptide und Peptoide als Bindepartner für Chemokine“

---

### Studium und Schule

10/2011 – 09/2015  
Masterstudium der Chemie an der TU Darmstadt

- Studienschwerpunkt: Biochemie
- Masterarbeit: „Synthese & Charakterisierung von Peptiden als Liganden für Proteine aus dem Blut“ bei Frau Prof. Dr. Katja Schmitz

10/2006 – 09/2011  
Bachelorstudium der Chemie an der TU Darmstadt

- Bachelorarbeit: „Untersuchungen zur radikalischen Copolymerisation von photo-aktiven „Spiro“-Monomeren mit Methylmethacrylat als Comonomer“ bei Herrn Prof. Dr. Markus Biesalski

07/1997 – 06/2006  
Gymnasium und Abitur an der Friedrich-Ebert Schule in Pfungstadt

---

### Teilnahme am Qualifikationsprogramm für Nachwuchswissenschaftler der TU Darmstadt (Ingenium)

- „Scientific Writing in English“
  - „Agiles Projektmanagement“
  - „Projektmanagement - eine Industrieperspektive“
  - „Teams erfolgreich leiten“
-

---

## Publikationen

- J. S. Wack, K. Brahm, P. Babel, J. A. R. Dalton, K. Schmitz, „Effect of Macrocyclization and TAMRA-Labeling on Chemokine Binding Peptides“, *Journal of Peptide Science* **2023**, e3486.
- S. Eckes, J. Braun, J. S. Wack, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz, „Rose bengal crosslinking to stabilize collagen sheets and generate modulated collagen laminates“, *International journal of molecular sciences* **2020**, 21(19), 7408.
- K. Brahm, J. S. Wack, S. Eckes, V. Engemann, K. Schmitz, „Macrocyclization enhances affinity of chemokine-binding peptoids“, *Biopolymers* **2019**, 110 (4).
- P. Wiegand, L. Lupu, N. Hüttmann, J. Wack, S. Rawer, M. Przybylski, K. Schmitz, „Epitope Identification and Affinity Determination of an Inhibiting Human Antibody to Interleukin IL8 (CXCL8) by SPR-Biosensor–Mass Spectrometry Combination“, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2019**, 31.1, 109-116.
- D. Helmer, K. Brahm, C. Helmer, J. S. Wack, G. Brenner-Weiss, K. Schmitz, „Two-channel image analysis method for the screening of OBOC libraries“, *RSC Analytical Methods* **2016**, 8, 4142-4152.
- Patent: K. Schmitz, C. Weber, J. Hönes, B. E. Rapp, J. S. Wack, „Kompetitiver Test eines Enzymsubstrats mit interner Kompensation der Enzymaktivität“, EP3538664B1, **2016**.

---

## Posterbeiträge

- J. S. Wack, K. Brahm, P. Wiegand, K. Schmitz, “Method development for the isolation and characterization of peptoids from one-bead-one-compound libraries for the inhibition of Interleukin-8“, 14. Deutsches Peptidsymposium, Köln **2019**. (inklusive Kurzvortrag)
  - J. S. Wack, P. Babel, V. Engemann, S. Eckes, K. Brahm, D. Helmer, K. Schmitz, “Receptor-derived linear and cyclic peptides as chemokine inhibitors“, 14. Deutsches Peptidsymposium, Köln **2019**.
-

- 
- J. S. Wack, K. Brahm, P. Wiegand, K. Schmitz, “Method development for the isolation and characterization of peptoids from one-bead-one-compound libraries for the inhibition of Interleukin-8“, GDCh-Wissenschaftsforum Chemie, Berlin **2017**.
  - K. Brahm, J. S. Wack, D. Helmer, K. Schmitz, „Translation of high affinity binding peptides to peptomer sequences and combinatorial peptoid libraries in chemokine inhibitor screenings“, 9th Peptoid Summit, Berkeley **2015**.
  - K. Brahm, J. S. Wack, K. Schmitz, “Selection of protein ligands from large libraries with functionalized magnetic beads“, Bioorthogonal Chemistry, Berlin **2014**.
  - K. Brahm, J. S. Wack, K. Schmitz, “Selection of protein ligands from large libraries with functionalized magnetic beads“, Chemical Biology, Heidelberg **2014**.
-

