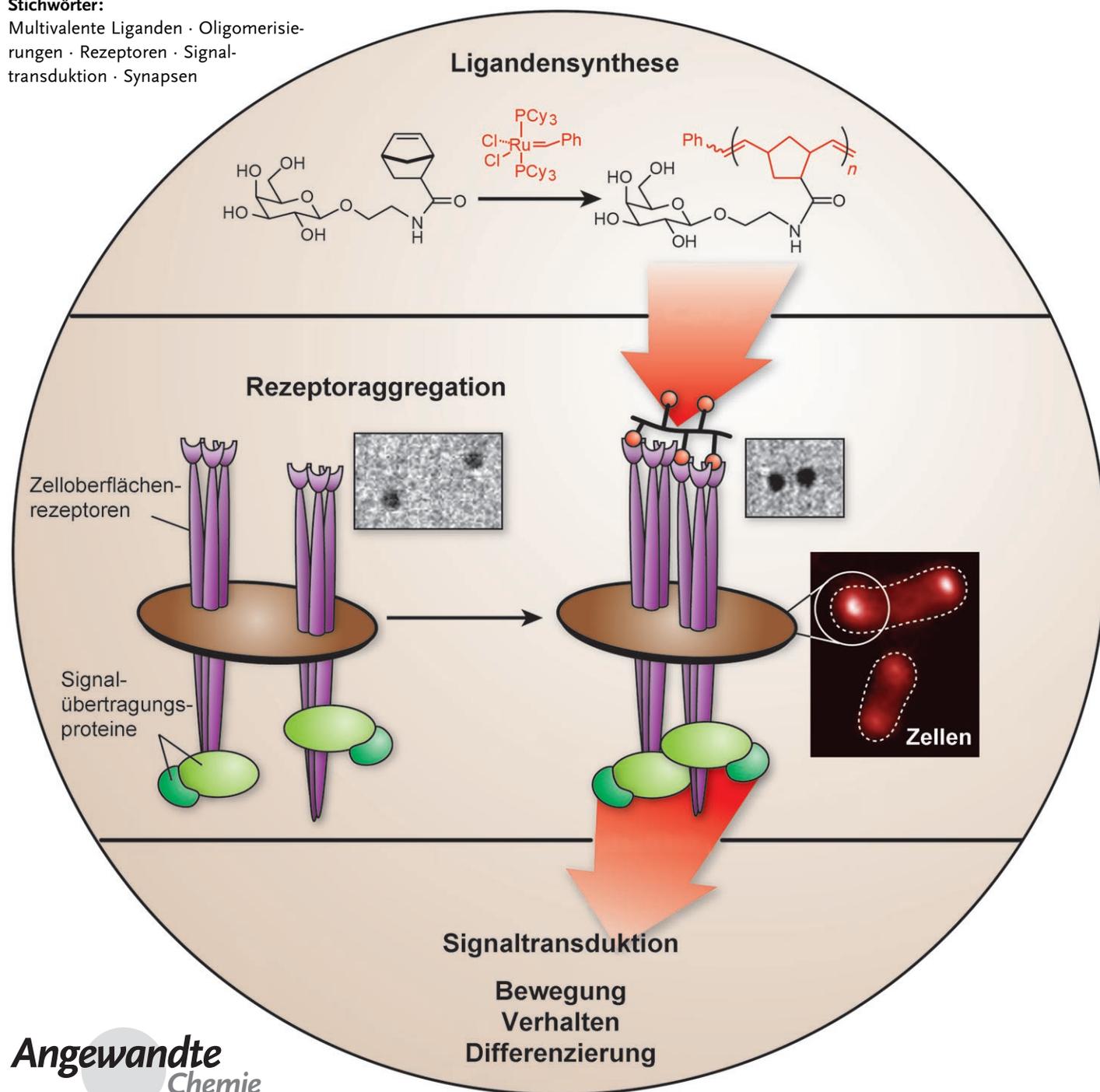


Synthetische multivalente Liganden als Sonden für die Signaltransduktion

Laura L. Kiessling,* Jason E. Gestwicki und Laura E. Strong

Stichwörter:

Multivalente Liganden · Oligomerisierungen · Rezeptoren · Signaltransduktion · Synapsen



Zelloberflächenrezeptoren nehmen Informationen aus der extrazellulären Umgebung auf und stimmen die intrazellulären Reaktionen darauf ab. Viele dieser Rezeptoren agieren nicht einzeln, sondern als Teil von dimeren oder oligomeren Komplexen. Die funktionelle Kopplung mehrerer Rezeptoren verleiht den Signaltransduktionswegen möglicherweise die Empfindlichkeit, die für die Regulation zellulärer Reaktionen erforderlich ist. Außerdem können Multi-rezeptor-Signalkomplexe ansonsten überlappende Signalkaskaden räumlich trennen. Die Mechanismen, das Ausmaß und die Konsequenzen der Colokalisation und die Kommunikation zwischen den Rezeptoren sind noch unklar, doch synthetische Verbindungen können dabei helfen, die Rolle der Rezeptorassoziationen bei der Signaltransduktion zu ermitteln. Solche multivalenten Liganden können Bindestellen verschiedener Größe, Form, Valenz, Orientierung und räumlicher Anordnung enthalten. Der Schwerpunkt dieses Aufsatzes liegt auf dem Einsatz synthetischer multivalenter Liganden, um die Rezeptorfunktion zu charakterisieren.

Aus dem Inhalt

1. Einführung – die Funktion von Rezeptoren	2409
2. Direkte und indirekte Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren	2409
3. Multivalente Liganden als Sonden für Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkungen	2413
4. Aufklärung von Rezeptorfunktionen mithilfe multivalenter Liganden	2417
5. Zusammenfassung und Ausblick	2425

1. Einführung – die Funktion von Rezeptoren

Um in der Konkurrenz um günstige chemische und physikalische Bedingungen zu bestehen, müssen alle Organismen von Bakterien über Würmer bis hin zum Menschen schnell und genau Veränderungen ihrer Umgebung wahrnehmen. Auch die komplexe Steuerung von Entwicklungsschemata oder Immunantworten beruht auf der Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Den Rezeptoren an der Zelloberfläche fällt die Aufgabe zu, die extrazellulären Bedingungen zu verfolgen. Diese Proteine koordinieren den intrazellulären Apparat, indem sie von außen eintreffende Informationen sammeln, ordnen und übersetzen. Um das Überleben zu sichern, müssen die Reaktionen auf diese Reize empfindlich und genau sein; synergistische und konkurrierende Signale müssen verstärkt und integriert werden. Für diese Aufgaben haben die Zellen elegante Abläufe entwickelt, die empfindliche und steuerbare rezeptorvermittelte Antworten auslösen.

Bei einem wichtigen Mechanismus für eine effiziente Signalauslösung werden die Funktionen mehrerer Zelloberflächenrezeptoren gekoppelt;^[1–9] diese Rezeptoren reagieren meist nicht als individuelle Komponenten sondern konzentriert. Dabei verfestigt sich die Auffassung, dass die Rezeptoren innerhalb eines Multirezeptor-Komplexes miteinander kommunizieren.^[7] Doch trotz zahlreicher Hinweise konnte der Mechanismus dieser Kommunikation noch nicht aufgeklärt werden.

Durch chemische Synthese sind vielfältige Verbindungen zugänglich, mit deren Hilfe die Rolle der Rezeptorzusammenlagerung in der Signalweiterleitung untersucht werden kann. Hierzu eignen sich besonders multivalente Liganden, mit denen es gelingt, Aspekte der Rezeptorwechselwirkung offenzulegen, die mit herkömmlichen Methoden nicht leicht aufzuklären sind. Da sich der Schwerpunkt zunehmend von

der funktionellen Untersuchung einzelner Proteine hin zur Analyse von Multirezeptor-Signalkomplexen verschiebt, sollten diese multivalenten Liganden für mechanistische Studien zusätzlich an Bedeutung gewinnen. Darüber hinaus könnten sie neue Möglichkeiten eröffnen, die Rezeptorsysteme zu beeinflussen, Reaktionswege zu analysieren und letztlich sogar Krankheiten zu heilen. Der vorliegende Aufsatz befasst sich mit synthetischen multivalenten Liganden als Sonden für das Zusammenwirken von Rezeptoren.

2. Direkte und indirekte Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren

2.1. Signalkomplexe

Rezeptoren leiten Informationen über extrazelluläre Signale an das Zellinnere weiter. Weil verschiedene Rezeptoren oft in gemeinsamen cytoplasmatischen Komponenten zusammenlaufen, muss die Informationsübertragung eingeschränkt werden, um einen unerwünschten Austausch zwischen unabhängigen Signalwegen zu verhindern.^[7,10–12] Um zu

[*] Prof. L. L. Kiessling, Dr. J. E. Gestwicki,^[†] Dr. L. E. Strong^[‡]
Departments of Chemistry and Biochemistry
University of Wisconsin – Madison
1101 University Ave., Madison, WI 53706 (USA)
Fax: (+1) 608-265-0764
E-mail: kiessling@chem.wisc.edu

[†] aktuelle Adresse:
University of Michigan
210 Washtenaw Avenue, Ann Arbor, MI 48109 (USA)

[‡] aktuelle Adresse:
Quintessence Biosciences
University Research Park
505 S. Rosa Rd., Madison, WI 53719 (USA)

verstehen, wie die Signale weitergeleitet werden, muss man aufklären, wie Zellen mithilfe eines Satzes gemeinsamer Komponenten unterschiedlich auf verschiedene Reize reagieren.^[7]

Die subzelluläre Platzierung von Rezeptoren in Signalkomplexe ist ein möglicher Mechanismus, mit dem eine Zelle eine räumliche und zeitliche Regulierung sicherstellen kann.^[13–19] Multiprotein-Signalkomplexe sind die wichtigsten Signaleinheiten in neuronalen Synapsen,^[20,21] Immunsynapsen,^[13,22,23] fokalen Adhäsionskomplexen^[24] und bakteriellen Chemorezeptorfeldern (Abbildung 1).^[25,26] Diese Komplexe bestehen aus Rezeptoren, Signalproteinen, Adapterproteinen und Cytoskelett-Komponenten.^[27–29] In Eukaryotenzellen

sind viele Signalkomplexe in Detergens-unlösliche Lipidmikrodomänen eingebettet, in deren einzigartiger physikalischer Umgebung die Signalkomponenten zusammengehalten werden.^[30–35] In vielen Fällen ist nicht bekannt, ob die Zelle Mikrodomänen oder andere Mechanismen nutzt, um die Signalkomponenten anzuordnen.

Die Bildung von Signalkomplexen ist nicht auf spezielle Rezeptorklassen beschränkt. Ergebnisse aus Experimenten mit kovalenter Vernetzung sowie Mikroskopie- und Röntgenkristallographie-Analysen zeigen, dass sich Zelloberflächenrezeptoren aus vielen Strukturklassen zu Multirezeptorkomplexen zusammenlagern; dazu gehören einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit sieben Helix-Abschnitten,^[36–38] Methylacceptor-Chemotaxisproteine (MCPs),^[39] Ionenkanäle,^[40] Rezeptorprotein-Tyrosinkinasen (RPTKs)^[41,42] und mehrkettige Immunerkennungszeporen (multichain immune recognition receptors, MIRRs).^[22,33,35,43–45] Die Größe dieser Komplexe variiert: Manche bestehen aus zwei Rezeptoren, andere enthalten Tausende. Einige Rezeptoren^[46–48] wie der Ryanodin-Rezeptor^[40] und MCPs^[39] sind so hoch konzentriert, dass sie Zellregionen dominieren. Leider ist nur wenig bekannt über die Strukturen dieser Komplexe, wo sie innerhalb der Zelle lokalisiert sind und wie dies das Signal beeinflusst. Auf Detailwissen könnten aber neue Strategien aufbauen, um die Rezeptorfunktion und damit die Antworten der Zelle präzise zu steuern. Auch wenn die Auswirkungen von Rezeptorlokalisierung und -organisation noch erforscht werden müssen, lassen die bisherigen Befunde einige allgemeine Grundlagen der Kommunikation zwischen Rezeptoren erkennen.

Rezeptoren können Informationen im direkten Kontakt oder über vermittelnde Proteine austauschen. Direkte Rezeptorkontakte finden meist zwischen spezifischen Proteinregionen statt.^[49] Beispielsweise könnten Dimerisierung oder Oligomerisierung von GPCRs durch helixvermittelte Wechselwirkungen erleichtert werden (Abbildung 2).^[38,50,51] Hinweise auf die Bedeutung dieser Wechselwirkungen für die Funktion stammen aus Experimenten, in denen unterbrechende Mutationen an den vermuteten Kontaktstellen oder zusätzliche isolierte Transmembranhelices in GPCRs eingefügt wurden.^[37,52,53] Die Auswirkungen auf die Rezeptoroligomerisierung sind noch nicht genau bekannt, es steht jedoch fest, dass diese Veränderungen die Signalweitergabe modulieren; wahrscheinlich werden Kontakte zwischen den Re-

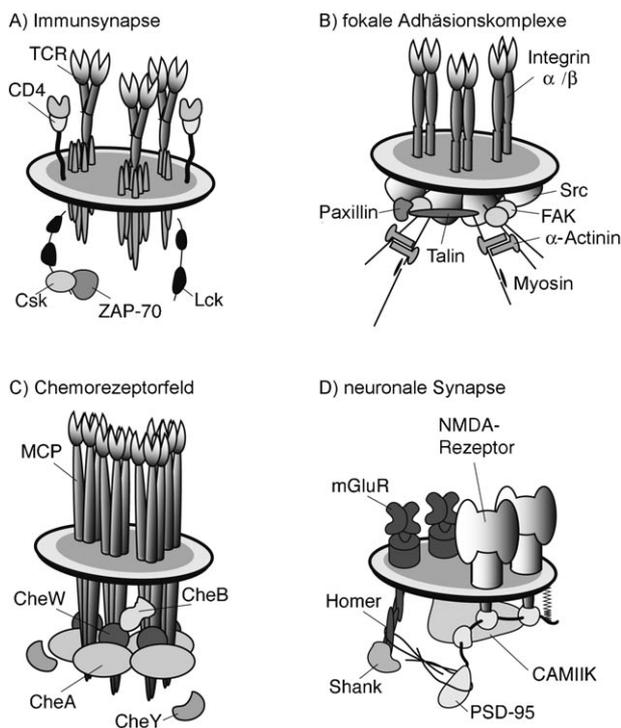


Abbildung 1. Beispiele für Komplexe, die an der Signaltransduktion beteiligt sind: A) eukaryotische Immunerkennung; B) eukaryotische Zelladhäsion; C) prokaryotische Chemotaxis und d) neuronale Signalweiterleitung. Diese schematischen Darstellungen verdeutlichen die Komplexität biologischer Multiprotein-Signalkomplexe.



Laura L. Kiessling erhielt ihren BSc am Massachusetts Institute of Technology und promovierte in Chemie an der Yale University unter Anleitung von Stuart Schreiber. Nach einem Postdoktorandenaufenthalt am California Institute of Technology in Peter Dervans Gruppe begann sie 1991 mit eigenen Studien an der University of Wisconsin-Madison. Dort ist sie nun Professorin der Institute für Chemie and Biochemie. Über ihre langjährigen Forschungen zur organischen Synthese für Untersuchungen an Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen hinaus, be-

fasst sie sich mit multivalenter Bindung, Erkennung von Biomolekülen und Signalübertragung.



Jason E. Gestwicki erhielt 1997 den BSc in Chemie an der State University of New York, Fredonia. Im Jahre 2002 promovierte er unter der Anleitung von Prof. Laura L. Kiessling in Biochemie an der University of Wisconsin-Madison. Daraufhin forschte er als Helen-Hay-Whitney-Postdoktorand an der Stanford University bei Prof. Gerald R. Crabtree über die Synthese potenter difunktionaler Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Er verstärkte die University of Michigan Medical School im Jahre 2005 als

Assistant Professor für Pathologie und als Research Assistant Professor am Life Sciences Institute.

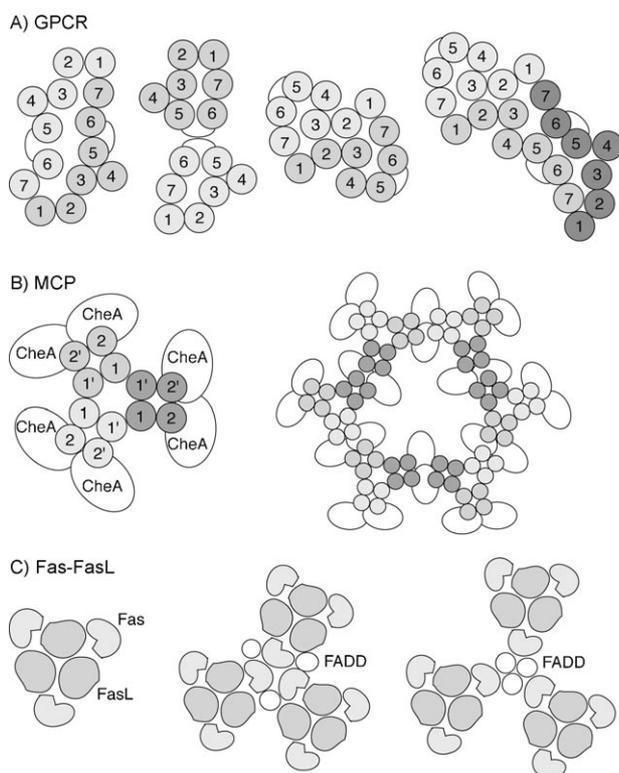


Abbildung 2. Vorschläge für den Aufbau einiger Multirezeptor-Komplexe. A) Modelle von drei Siebenhelix-GPCR-Dimeren und einem Trimer, auf der Grundlage von Mutagenese-Ergebnissen und der Struktur von Bakteriorhodopsin. Jeder nummerierte Kreis steht für eine spezifische Transmembranhelix. Viele 1-7-, 5-6- und 2-3-Dimere und -Multimere wurden postuliert. B) Bakterielle Chemorezeptoren (Methylacceptor-Chemotaxisproteine, MCPs) sind dimer. Sie können sich in ein Trimer von Dimeren zusammenlagern, das dann mit signalweiterleitenden Proteinen wie der Kinase CheA wechselwirken kann. Jeder MCP durchspannt die Membran zweimal (1 und 2); Coiled-coil-Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen (1 und 1') vermitteln die Dimerisierung. Gezeigt ist ein Gittermodell der Organisation von sechs dieser Trimere von MCP-Dimeren und 24 Kopien von CheA. C) Die Fas-FasL-Wechselwirkung wurde anhand der Protein-Berührungsflächen modelliert, die mit Mutagenese- und Vernetzungsuntersuchungen gefunden wurden. Der Rezeptor Fas und sein Ligand FasL sind Trimer. Der entsprechende trimere Komplex bildet ein Gerüst, das durch das Adapterprotein FADD stabilisiert wird. Es sind zwei Modelle aufgezeigt, eines mit Fas-zentrierter, das andere mit FADD-zentrierter Symmetrie. Siehe Text für Details und Literaturverweise.



Laura E. Strong ist stellvertretende Leiterin der Produktentwicklung bei Quintessence Biosciences, Inc. Sie erhielt den BSc in Chemie von der University of Richmond und promovierte in organischer Chemie in der Gruppe von Prof. Laura L. Kiessling an der University of Wisconsin-Madison (Stipendium der National Institutes of Health). Dort war sie an der Entwicklung der ringöffnenden Metathesepolymerisation zur Synthese biologisch aktiver multivalenter Liganden beteiligt. Sie ist Coautorin von zwölf Publikationen und drei Patentanmeldungen.

zeptoren aufgebrochen. Wie zuvor erwähnt, kann der Informationsaustausch zwischen Rezeptoren auch über vermittelnde Proteine laufen. Diese Gerüstproteine können Multirezeptorkomplexe organisieren, indem sie als Matrix für die Proteinassoziation wirken. Beispiele für dergestalt lokalisierte Rezeptoren sind MCPs und Tumornekrosefaktor-(TNF)-Rezeptoren (Abbildung 2b–c).^[54–56]

Die Bindung von Liganden kann Signale unmittelbar weiterleiten, indem sie Proteinkomplexe stabilisiert oder destabilisiert.^[57–59] So deuten Daten aus verschiedenen Experimenten darauf hin, dass eine enge Bindung an ein einzelnes MCP ein Signal von umliegenden MCPs auslösen kann.^[46, 60–64] In ähnlicher Weise wird die Kreuzphosphorylierung einiger Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch ligandeninduzierte Kontakte erleichtert.^[65] Neben homodimeren (oder -oligomeren) Wechselwirkungen wurden auch Kontakte zwischen strukturell nicht verwandten Rezeptoren nachgewiesen.^[66] Die neuronalen Dopamin- und GABA-Rezeptoren, ein Ionenkanal und ein GPCR, tauschen Informationen im direkten Kontakt aus.^[67]

Liganden können weiterhin einen Informationsfluss und eine Zusammenlagerung zwischen den Rezeptoren auslösen, indem sie das Einfangen vermittelnder Proteine an den Zielrezeptoren erleichtern. In diesen vermittelnden Proteinen – Adapter oder Gerüstproteine genannt^[68–73] – wirken spezialisierte Domänen als Informationsleiter; Beispiele sind die SH2-, SH3- und PDZ-Domänen. Diese Domänen sind an vielen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt, die Informationen weitergeben und Rezeptoren lokalisieren. Die einfachsten Adapter verknüpfen einen Rezeptor mit einem anderen. Darüber hinaus enthalten viele dieser Proteine mehrere Domänen, die die Kommunikation zwischen einem Rezeptor und unterschiedlichsten membranassoziierten und löslichen Signalproteinen erleichtern.

2.2. Einflüsse auf die Kommunikation zwischen Rezeptoren

Vor der Untersuchung und Beeinflussung der Funktion eines Multirezeptor-Signalkomplexes müssen zunächst seine Eigenschaften beschrieben werden. Da zahlreiche Rezeptoren und modulare Adapter potenziell vorhanden sind, kann sich diese Aufgabe schwierig gestalten. Die Eigenschaften der Immunsynapse illustrieren einige Aspekte, die für die Aufklärung der Funktion von Signalkomplexen wichtig sind.

T-Lymphocyten sind entscheidend als Vermittler einer effizienten Immunantwort gegen eindringende Pathogene. Der Beitrag der T-Zellen zur Immunantwort wird über weite Strecken durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) bestimmt. Wie viele andere wichtige Zelloberflächenrezeptoren können auch TCRs zu einem Multirezeptorkomplex zusammengelagert werden. Wenn eine T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APC; z.B. einer dendritischen oder einer B-Zelle) in Berührung kommt, reorganisiert sich das Cytoskelett und die TCRs wandern in die Kontaktzone. Diese Kontaktzone wird als „Immunsynapse“ bezeichnet (Abbildung 1a).

Die Eigenschaften der Immunsynapsen variieren. Ihre Struktur wird geprägt durch die beteiligte APC, durch die Art

und den Aktivierungsstatus der T-Zelle, die Dauer des T-Zell-APC-Kontaktes und die lokale physiologische Umgebung, in der sie gebildet werden.^[74] Leistungsfähige neue Bildgebungsverfahren haben Immunsynapsen in vitro und in vivo sichtbar gemacht; so ließen sich dynamische Veränderungen der Proteinlokalisierung und -organisation nachweisen. Auf molekularer Ebene ist die Rolle der Proteinorganisation innerhalb der Synapse noch nicht geklärt. Es ist nicht bekannt, ob die Organisation der Rezeptoren auf der T-Zelle die Signalerzeugung beeinflusst.

Die TCR^[75] und Corezeptoren wie CD4^[76,77] befinden sich an der Kontaktfläche zwischen den Zellen. Einige Corezeptoren (z.B. CD4) verstärken das TCR-Signal, andere schwächen es ab. Durch Balance und Orientierung der Corezeptoren kann so der Grad der T-Zell-Aktivierung justiert werden. Erreicht wird dies durch Änderungen des Phosphorylierungszustandes intrazellulärer Proteindomänen und Rezeptoren; die Immunsynapse enthält auch Kinasen wie Lck und ZAP-70, die die Phosphorylierung von ligandenträgenden Rezeptoren und anderen Proteinen katalysieren.^[77,78] Eine Phosphorylierung kann die folgende Einbindung oder die enzymatische Aktivität verschiedener Komponenten des Signalkomplexes fördern oder hemmen.

Den Ergebnissen von Mikroskopie-Experimenten und Untersuchungen der Signaltransduktion zufolge kann die Synapse hoch organisiert sein.^[76] Das Cytoskelett spielt bei der Organisation einiger Proteine an der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle. Dies bestätigen Befunde, denen zufolge Bestandteile des Cytoskeletts wichtig für die Signaltransduktion der TCR sind.^[13,79,80] Innerhalb der Immunsynapse sind die Proteine ausgesprochen beweglich. Wenn beispielsweise eine T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle in Kontakt tritt, bewegt sich der negative Regulator CD45 zur Peripherie der Synapse.^[76,81–83] Im Gegenzug wird der TCR ins Synapseninnere verlagert. Diese Änderungen der Rezeptorpositionen deuten darauf hin, dass die Organisation der Synapse die Signalübertragung beeinflusst: Die komplizierten, aufeinander abgestimmten Bewegungen^[76] sollten die Übertragung und Verstärkung des Aktivierungssignals beeinflussen. Die Position des TCR relativ zu den positiven und negativen Regulatoren scheint die Signalintensität vorzugeben.

Viele Parameter beeinflussen das Ausgangssignal, und es ist schwierig, ihre Beiträge zum T-Zell-Signal zu trennen. Aufgrund von Beobachtungen^[20] wurde unter anderem der Zahl der aktivierten Rezeptoren, ihrer Identität und ihrem stöchiometrischen Verhältnis diesbezüglich Bedeutung zugeschrieben (Abbildung 3).^[4,84,85] Die stöchiometrische Zusammensetzung eines Signalkomplexes (d.h. die Zahl aktivierender im Verhältnis zur Zahl abschwächender Rezeptoren) kann die Signalstärke beeinflussen, die erforderlich ist, um einen Schwellenwert zu überschreiten. Neben der Identität der Rezeptoren und der stöchiometrischen Zusammensetzung des Komplexes kann das Signal auch durch die Umgebung und subzelluläre Kompartimentierung der Rezeptoren bestimmt werden. Es bleibt schwierig, die relativen Beiträge aller genannten Variablen zum letztlich übermittelten Signal zu quantifizieren. Um ein solch komplexes Signalsystem zu analysieren, benötigt man viele biologische und chemische

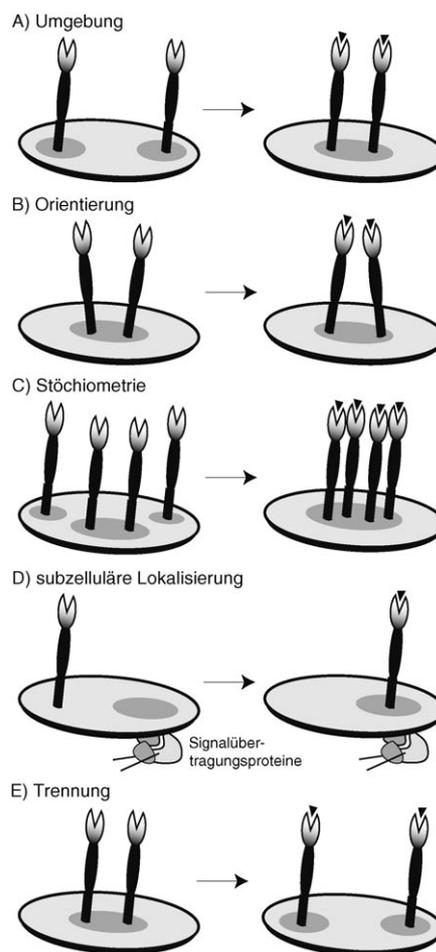


Abbildung 3. Mögliche Mechanismen zur Regulierung der Kommunikation zwischen Rezeptoren. A) Der Abstand kann den Informations-transfer zwischen Rezeptoren oder anderen Proteinen modulieren. B) Die relative Orientierung der beiden Rezeptoren bestimmt die Anordnung der aktiven Zentren von Enzymen und steuert, wie schnell die zur Signalerzeugung erforderlichen kovalenten Modifikationen ablaufen. C) Die Zahl der Rezeptoren in einem Komplex kann die Signalintensität beeinflussen. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes zwischen Rezeptoren mit zunehmender Zahl in einem Komplex. D) Die subzelluläre Lokalisierung eines Rezeptors kontrolliert seinen Zugang zu intrazellulären Signalproteinen. Positionsänderungen können den Informationsfluss durch einen Rezeptor oder ein Rezeptoraggregat steuern. E) Wenn Corezeptoren als negative Regulatoren wirken, kann die Bindung von Liganden einen Rezeptor aktivieren, indem sie die Abspaltung dieser Corezeptoren herbeiführt. Dieser Mechanismus ist mit der Aktivierung durch Annäherung verwandt, obwohl unterschiedliche molekulare Wechselwirkungen zugrundeliegen.

Methoden. Multivalente Liganden sind ein wichtiger Bestandteil dieses Instrumentariums.

2.3. Aufgaben bei der Untersuchung von Rezeptorfunktionen

In der Vergangenheit wurden zelluläre Funktionen beschrieben, indem man Struktur und Aktivität der einzelnen Proteine einer Reaktionskette detailliert untersuchte. Die

Signaltransduktion allerdings umfasst die koordinierte Wirkung vieler verschiedener Proteine. Um zelluläre Funktionen zu verstehen, muss man daher die Wechselwirkungen in heterogenen Proteingruppen entschlüsseln. Durch Fortschritte in der Genomforschung, bei der Züchtung transgener Tiere und in der chemischen Biologie können die Komponenten einer Reaktionsfolge nun identifiziert werden. Es ist aber nach wie vor nicht leicht, die funktionellen und strukturellen Beziehungen zwischen diesen Komponenten aufzuklären.^[86–88] Nachdem Beweise für eine physikalische Assoziation vorliegen, müssen nun die Reihenfolge und Kinetik dieser Wechselwirkungen untersucht werden. Dazu werden Strategien benötigt, die Licht auf komplexe zelluläre Zusammenhänge werfen.

In Bezug auf Multirezeptorkomplexe gilt es, molekulare und supramolekulare Zusammenhänge zu enthüllen. Methoden wie Immunpräzipitation, konfokale Mikroskopie und resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) haben hierbei die Untersuchung der subzellulären Proteinverteilung beeinflusst.^[89,90] Durch fluoreszierende Proteine und fortschrittliche Bildgebungsverfahren ist es möglich, Proteine in lebenden Zellen in Echtzeit zu beobachten.^[91–93] Solche Ansätze gewähren wohl Einblicke in die Vorgänge in Multiproteinkomplexen, doch die molekularen Details der Rezeptorwechselwirkungen bleiben oft unklar. Hier zeigt sich ein altes Problem: Die Details, die ein Experiment zeigt, sind durch die geringe Auflösung der Untersuchungsmethoden begrenzt. So liegt die Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie bei etwa 200 nm, aber mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie könnte die Bewegung eines Rezeptors von einer Seite der Zelle zur anderen nachweisbar sein; Informationen über die Orientierung zweier benachbarter Rezeptoren sind dagegen schwieriger zu gewinnen.

Untersuchungen im Subnanometerbereich erfordern Methoden mit ausgezeichneter Auflösung. Mithilfe von FRET sind Rezeptorkomplexe in diesem Bereich zwar analysierbar, doch müssen dazu meist Zell-Linien hergestellt werden, die fluoreszierende Proteine exprimieren. Für die Elektronenmikroskopie sind keine transfizierten Zell-Linien erforderlich. Da die Auflösungsgrenze hier bei etwa 0.1 nm liegt, kann man 1000-mal kleinere Details erkennen als bei Untersuchungen im Lichtmikroskop. In jüngster Zeit konnten mit neuen Einzelpartikelmethoden molekulare Details einiger Signalkomplexe aufgeklärt werden.^[45,92–94] Diese experimentellen Weiterentwicklungen stecken den Rahmen ab, innerhalb dessen Reagentien zu entwickeln sind, um die Funktion von Multirezeptorkomplexen zu untersuchen.

Neue Methoden für die Untersuchung der Signaltransduktion entstammen der organischen Synthesechemie und der chemischen Biologie. Mithilfe synthetischer Verbindungen kann die Bedeutung molekularer Wechselwirkungen aufgeklärt werden. Zusammen mit neuen Bildgebungsverfahren können diese Liganden die Rolle von Proteinkomplexen erhellen. Im Mittelpunkt dieses Aufsatzes stehen daher synthetische multivalente Liganden für die Analyse von Signalkomplexen.^[9,84]

3. Multivalente Liganden als Sonden für Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkungen

3.1. Strukturen und Funktionen multivalenter Liganden

Multivalente Liganden tragen mehrere Kopien eines Erkennungselementes (recognition element, RE) an einem zentralen Gerüst.^[84,95–98] Diese Erkennungselemente können Kohlenhydrate, Peptide, Proteine oder niedermolekulare Verbindungen sein – also jede Gruppe, die an einen Rezeptor bindet. Das Gerüst bestimmt die Struktur des multivalenten Liganden, und es legt fest, wie einfach er variiert werden kann. Dies ist wichtig, weil die Architektur eines multivalenten Liganden – seine Form, die Orientierung der REs, die Flexibilität, Größe und Valenz – die biologische Aktivität und den Wirkungsmechanismus verändern kann.^[99–101] In Systemen, die durch Rezeptoraggregation aktiviert werden, sollten beispielsweise Liganden mit vielen, nahe beieinander liegenden REs am wirksamsten sein. Liganden mit derart definierten Eigenschaften und maßgeschneiderten biologischen Aktivitäten lassen sich durch chemische Synthesen erhalten.

Dem Entwurf multivalenter Liganden zur Aktivierung zellulärer Signalgebung liegt ein wichtiges Konzept zugrunde: Viele Zelloberflächenrezeptoren sind modular. Manche Rezeptoren enthalten intrazelluläre katalytische Domänen, die von den extrazellulären Bindedomänen abgesetzt sind; die RE-bindenden und die signalerzeugenden Regionen der Rezeptoren sind somit strukturell verschieden und räumlich getrennt. Eine multivalente Bindung an der Zelloberfläche kann daher distale intrazelluläre (cytoplasmatische) Komponenten zusammenführen und ihre Wechselwirkungen beeinflussen. Diese Situation unterscheidet sich von der eines typischen Katalysators für organische Reaktionen, bei dem die Bildung des Katalysator-Substrat-Komplexes in einer chemischen Transformation resultiert. Substratbindung und katalytische Aktivität sind hier also unweigerlich verknüpft. Weil Bindung und katalytische Aktivität bei den meisten Zelloberflächenrezeptoren räumlich getrennt sind, können multivalente Liganden die Lokalisierung intrazellulärer katalytischer Domänen manipulieren. Die Ligandenbindung kann den Rezeptor und damit die Umgebung der katalytischen Domänen verändern und so den Zugang des Substrats zum aktivem Zentrum erleichtern oder blockieren. Auf diese Art können multivalente Liganden zelluläre Antworten beeinflussen.

Wegen ihrer abweichenden Funktionsweise kann die Nomenklatur für multivalente Verbindungen zu Verwirrung führen.^[102] Biologisch aktive monovalente Verbindungen werden oft als Agonisten oder Antagonisten klassifiziert: der eine aktiviert eine Antwort, der andere inhibiert sie. Mit dieser Bezeichnung wird zugleich oft ein Mechanismus impliziert – von Agonisten nimmt man an, dass sie eine Konformationsänderung hervorrufen, die derjenigen durch den natürlichen Liganden vergleichbar ist; Antagonisten sollten dagegen eine inaktive Konformation induzieren. Diese mechanistischen Voraussetzungen komplizieren die Anwendung der Nomenklatur auf multivalente Liganden. Ein einzelnes RE kann ein Agonist, ein partieller Agonist oder ein Antagonist sein. Anders als beim einzelnen RE wird die Fähigkeit

eines multivalenten Liganden, eine biologische Antwort zu aktivieren oder zu inhibieren, nicht nur durch das RE selbst, sondern auch durch das Gerüst beeinflusst, an das es gebunden ist. Eine multivalente Anordnung eines REs, das monovalent als Antagonist wirkt, kann zur Rezeptoraggregation führen, und der multivalente Ligand könnte als *Agonist* wirken.^[103] Ähnlich kann auch ein multivalenter Ligand aus REs, die an einer anderen Stelle als der physiologische Ligand binden, eine Aktivierung mancher Systeme allein dadurch auslösen, dass er die Abstände zwischen den Rezeptoren verringert.^[104,105] Umgekehrt erwartet man, dass agonistische REs in einem multivalenten Liganden aufgrund ihrer Orientierung als *Antagonisten* wirken können, wenn sie die Rezeptoren in einer für die Signalauslösung unproduktiven Anordnung fixieren.^[106,107] Auch eine ligandeninduzierte Aussonderung von Schlüsselproteinen der Signalauslösung kann antagonistischen- oder agonistenähnliche Effekte hervorrufen.^[108,109] Statt multivalente Liganden als Agonisten oder Antagonisten zu bezeichnen, sprechen wir daher lieber von multivalenten *Effektoren* oder *Inhibitoren*.^[84] Inhibitoren blockieren die Rezeptorfunktion und Effektoren aktivieren zelluläre Prozesse. Diese Terminologie setzt weder eine besondere Aktivität eines individuellen Erkennungselements voraus noch eine spezifische Art der Bindung; die Wirkung ergibt sich aus der RE-Identität und der Architektur des multivalenten Liganden.

3.2. Architekturen multivalenter Liganden

Eine Reihe natürlicher, synthetischer und halbsynthetischer Gerüste wurde zum Test von Rezeptorfunktionen genutzt (Beispiele sind in Abbildung 4 zusammengestellt). Die Gerüste variieren in Größe, Form und physikalischen Eigenschaften. Da verschiedene Gerüststrukturen die REs unterschiedlich präsentieren (siehe Abschnitt 3.1), können auch sie einen großen Einfluss auf die Aktivität ausüben. Ein globuläres Grundgerüst wie ein Protein oder ein Dendrimer ist kaum in der Lage, große Distanzen zu überbrücken, wie es die Proteinaggregation verlangt, ein solcher Ligand kann jedoch effizient mehrere Bindungsstellen an einem oligomeren Rezeptor besetzen. So spielt die Architektur eines Liganden eine wichtige Rolle, wenn verschiedenartige makromolekulare Rezeptorkomplexe gebildet werden sollen.^[84,100,110]

Vor dem Entwurf synthetischer multivalenter Liganden ist es hilfreich, die komplexen Strukturen natürlicher multivalenter Liganden zu betrachten. Natürliche Liganden zeigen eine enorme Vielfalt von Architekturen. So besteht sTALL aus der TNF-Familie aus 60 Monomereinheiten, die nicht-kovalent zu einem symmetrischen, „virusähnlichen“ Komplex zusammengelagert sind.^[94,111,112] Vermutlich ist die komplexe Architektur von sTALL erforderlich, um mehrere Kopien seines Zelloberflächenrezeptors in einem aktiven Signalkomplex zu versammeln. Andere natürliche Liganden wie Lipopolysaccharide, Mucine und Glycosaminoglycane ent-

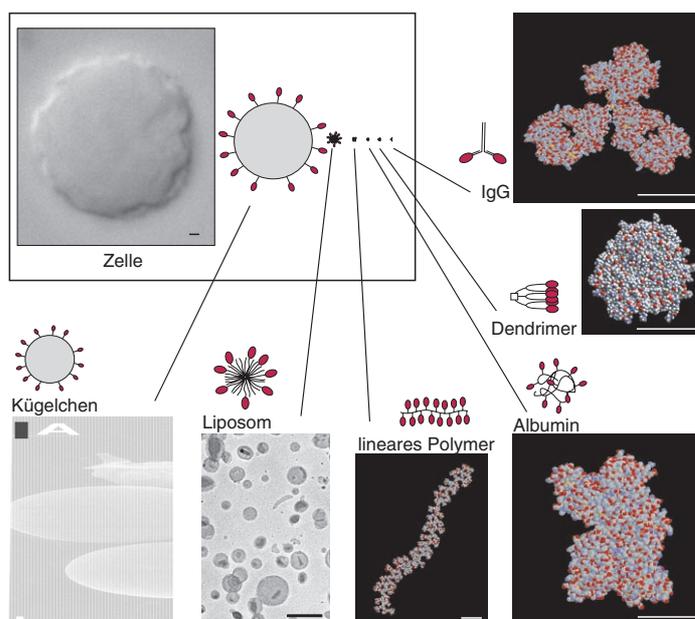


Abbildung 4. Skalierte Abbildung der Gerüststrukturen für multivalente Liganden. Der Kasten zeigt einen Größenvergleich dieser Liganden mit einem Säugerlymphocyt. Maßstäbe: Zelle und Kügelchen 1 μm ; Liposomen und Polymer 0.5 μm ; Antikörper, Dendrimer und Albumin 0.05 μm . Die Immunglobulin-Struktur beruht auf PDB 11GT, und als Albumin ist humanes Serumalbumin aus PDB 1BM0 abgebildet. Das Bild der Kügelchen wird mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [262] wiedergegeben. A. Menon hat die Liposomen zur Verfügung gestellt, die Zelle entstammt einer Jurkat-Zellenkultur;^[263] das Dendrimermodell wurde im Caltech Molecular and Process Simulation Center erstellt, und das ROMP-Polymer wurde von C. W. Cairo entwickelt (unveröffentlichte Ergebnisse).

halten eine heterogene Anordnung potenzieller Rezeptorbindestellen sogar in einem Molekül.^[113,114] Ein oberflächlicher Vergleich von sTALL und einem typischen Glycosaminoglycan zeigt wenige Ähnlichkeiten bei Größe, Form oder RE-Dichte. Doch trotz ihrer deutlich unterschiedlichen Strukturen sind sTALL und die Glycosaminoglycane an der Aggregation von Zelloberflächenrezeptoren beteiligt. Welche Unterschiede in der Gerüststruktur beeinflussen aber dann die Signalauslösung? In vielen Fällen ist es schwierig zu bestimmen, welche Ligandeneigenschaften die Aktivität modulieren. Natürliche Polysaccharide variieren in Länge, Verzweigungsgrad und Monosaccharidzusammensetzung. So kann es sehr mühsam sein, die spezifischen Eigenschaften zu ermitteln, die über die Aktivität eines physiologischen multivalenten Liganden entscheiden.

Durch chemische Synthese sind multivalente Liganden mit verschiedenartigen Architekturen erhältlich, mit deren Hilfe diejenigen Eigenschaften im Einzelnen identifiziert werden können, die zur Aktivität physiologischer Liganden führen. Anders als bei natürlichen Liganden ist die Valenz eines synthetischen Liganden systematisch variierbar, indem man die Länge (oder Größe) des Gerüsts einstellt. Alternativ kann man den Effekt der Valenz auf die Aktivität anhand von Polymeren definierter Länge bestimmen. Bei Dendrimeren lässt sich dieser Effekt untersuchen, indem man die Generationenzahl variiert. Aus dem Einfluss dieser Veränderungen auf die biologische Antwort kann man auf die Funktionsweise

natürlicher Rezeptor-Ligand-Komplexe schließen. In den folgenden Abschnitten werden wir Synthese und Anwendungen einiger Klassen multivalenter Liganden ansprechen. Abschließend werden wir diskutieren, wie synthetische multivalente Liganden zur Aufklärung der Mechanismen von Schlüsselrezeptoren beigetragen haben und wie diese Ergebnisse genutzt werden konnten.

3.3. Die Synthese multivalenter Liganden

Die flexibelste Synthesemethode für multivalente Liganden geht von einem vollständigen synthetischen oder natürlichen Gerüst aus, an das die REs gebunden werden. Diese Gerüste stammen aus vielen Strukturklassen: Proteine, Dendrimere, Polymere und Festphasen wurden eingesetzt.^[115] Verwendet man ein passend funktionalisiertes Gerüst (und RE), so können viele Kopien des REs angehängt werden. Dieser einfache Weg führt zu Liganden der gewünschten Valenz und RE-Dichte, weil der Molenbruch des funktionalisierten REs in der Konjugationsreaktion leicht eingestellt werden kann.^[115] Eine Alternative dazu bietet ein Ansatz, mit dem typischerweise multivalente Liganden mit Polymergerüst erhalten werden: In einem einzigen Polymerisations-schritt entsteht aus RE-tragenden Monomeren ein multivalenter Ligand.

Bei der Synthese der hier vorgestellten multivalenten Liganden wurden die REs zumeist an ein bereits vorhandenes Gerüst geknüpft. Diese Methode ist bei begrenzter Erfahrung in organischer Synthese anzuraten. Unsere Beispiele leiten durch die Auswahl des Gerüsts, die angegebenen Literaturstellen liefern Informationen zum effizientesten Syntheseweg.

3.3.1. Niedermolekulare Liganden

Als „niedermolekulare Liganden“ bezeichnen wir Verbindungen, die weniger als zehn REs präsentieren und typischerweise leichter als 1000 Da sind. Die Synthese solcher Verbindungen kann schwierig sein, inzwischen stehen jedoch einige allgemeine Strategien zur Verfügung.^[116–119] Obwohl Verfahren für die direkte Dimerisierung einzelner REs bekannt sind,^[119] werden niedermolekulare multivalente Liganden meist durch Konjugation von REs an eine zentrale Gerüststruktur hergestellt. Ein Vorteil solcher Liganden besteht in der festgelegten Orientierung der REs an einem starren Gerüst. Außerdem sind durch kombinatorische Synthese niedermolekulare Liganden zugänglich,^[120,121] in denen Form, Flexibilität und andere Struktureigenschaften variierbar sind. Zwar ist es möglich, die Eigenschaften niedermolekularer Liganden genau maßzuschneidern, doch meist greift man auf Dimere zurück. Diese Verbindungen lassen sich leicht synthetisieren, sie können jedoch nur mit zwei Zelloberflächenrezeptoren wechselwirken. Daher ist ihr Nutzen für die Untersuchung größerer Rezeptoraggregate bei der Signalauslösung begrenzt.

3.3.2. Proteinkonjugate

Halbsynthetische multivalente Liganden erhält man oft durch den Einbau von REs in gut charakterisierte Trägerproteine wie Streptavidin, Rinderserumalbumin (BSA) und Schlüssellochschnellen-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH).^[122,123] Größe und Form des Gerüsts variieren: Das Tetramer Streptavidin hat eine rechteckige Struktur von etwa 6 nm × 10 nm, während humanes Serumalbumin globulär ist (Durchmesser ca. 10 nm). Ein Nachteil von Proteinkonjugaten und anderen halbsynthetischen multivalenten Verbindungen liegt darin, dass sie verglichen mit rein chemischen Gerüststrukturen relativ heterogen sind. Proteinkonjugationsreaktionen hängen normalerweise von Vorhandensein und Zugänglichkeit bestimmter endogener Aminosäureseitenketten ab. Die Epitop-Orientierung ist daher nur begrenzt steuerbar. Diese Einschränkung konnte vor kurzem teilweise durch die Einführung von funktionellen Gruppen in virale Hüllproteine überwunden werden. Viren mit solchen modifizierten Proteinen organisieren die Funktionalitäten in definierten Mustern.^[124–126] Da diese vielversprechende Strategie gerade erst am Anfang steht, ist ihre Tragweite noch nicht abzusehen.

3.3.3. Festphasen

Rezeptorbindung, -aktivierung und Endocytose wurden mithilfe von funktionalisierten Kügelchen und Oberflächen untersucht.^[127–130] Die Kügelchen können aus derivatisiertem Polystyrol, Latex, aus Polysacchariden oder anderen unlöslichen Materialien bestehen. Zum Verankern bindender Epitope an den Kügelchen dienen gewöhnlich geradlinige und allgemein anwendbare Reaktionen, die allerdings selten chemo- oder regioselektiv sind. Unterschiedliche kleine und große, synthetische und natürliche REs wurden angekuppelt. Die Anzahl der potenziellen Bindestellen an der Oberfläche hängt von der Zusammensetzung der Kügelchen ab. Obwohl Kügelchen oft verwendet werden, sind Orientierung und Zugänglichkeit der Bindestellen noch nicht charakterisiert worden. Meist nimmt man eine zufällige Verteilung der Bindestellen auf den Kügelchen (und vielleicht auch der REs) an. Auch die Größe der Kügelchen beeinflusst die Aktivität, und in der Praxis schwankt der Durchmesser der Teilchen sehr stark: Sepharose-Kügelchen, die für die Gelchromatographie verwendet werden, haben Durchmesser zwischen 30 und 300 µm; Latex-Kügelchen sind mit 0,2 bis 2 µm viel kleiner. Die Zahl der Rezeptoren, die ein funktionalisiertes Kügelchen besetzen können, hängt von einigen Faktoren ab: von der Zahl der zugänglichen REs, der RE-Dichte und der Größe der Kügelchen. Da die Kügelchengröße als einzige Variable gut beherrschbar ist, sind auch Kügelchen, ähnlich wie Proteingerüste, mit dem Nachteil einer mangelhaften Kontrolle behaftet.

3.3.4. Liposomen

Liposomen sind typische nichtkovalente Aggregate, die mehrere REs präsentieren können. Durch die Wechselwirkung der Lipide untereinander entsteht eine zweidimensio-

nale Molekülanordnung,^[131–133] daher kann man die Zusammensetzung der Liposomen steuern, indem man das Verhältnis RE-tragender und nichtmodifizierter Lipide ändert. Die Größe von Liposomen kann in einem weiten Bereich variiert werden. Erzeugt man Liposomen durch Behandlung mit BioBeads, so erhält man Partikel mit Durchmessern zwischen 0.05 und 0.5 μm .^[134] Große Liposomen mit 5–200 μm Durchmesser („giant vesicles“) sind ebenfalls zugänglich.^[135] Ihre Größenverteilung ist nahezu homogen, doch ist die Anordnung der REs in den einzelnen Liposomen nur schwer zu steuern. Eine fluktuierende Präsentation der REs innerhalb eines Liposoms kann von Vorteil sein, wenn man ein hoch aktives System herstellen will. Orientierung und Dichte der REs ändern sich, weil die Lipidkomponenten einer Diffusion in zwei Dimensionen unterliegen; dadurch kann sich die aktivste Anordnung herausbilden. Dieses dynamische Verhalten erschwert allerdings mechanistische Untersuchungen. Ein weiterer möglicher Nachteil von Liposomen ergibt sich daraus, dass einzelne Bestandteile auf biologische Membranen übergehen. Daher kann der Einsatz von Liposomen für mechanistische Untersuchungen mit Organismen oder bereits mit Zellen zu einem Problem werden.

3.3.5. Dendrimere

Dendrimere dienen oft als Gerüste für multivalente Liganden.^[96,136–141] Diese Liganden sind meist weitgehend homogen,^[96] sodass sich ihre Eigenschaften gut mit ihrer biologischen Aktivität in Beziehung setzen lassen. Kügelchen und Trägerprotein-Konjugate bilden oft heterogene Populationen, da nicht bekannt ist, an welchen Stellen die Anbindung des REs erfolgt. Dagegen ist der Aufbau eines Dendrimerliganden durch das Grundgerüst und die Synthesemethode festgelegt. So haben PAMAM-Dendrimere der 0. Generation einen Durchmesser von 1.5 nm und sind vierwertig.^[142] Jede weitere Generation vergrößert den Durchmesser um 0.7–1.6 nm und verdoppelt die maximale Valenz. Mit der Größe des Dendrimers nimmt also auch die RE-Dichte zu. In solch hoch funktionalisierten Dendrimeren ist oft ein Teil der REs für Proteine nicht zugänglich.

3.3.6. Polymere

Die moderne Polymerchemie eröffnet neue Synthesewege für maßgeschneiderte, biologisch aktive polymere (oder oligomere) Liganden. Multivalente Polymerliganden bestehen normalerweise aus einem Rückgrat, das zahlreiche Kopien eines RE trägt. Liganden dieses Typs können auf verschiedene Weise hergestellt werden. Polymere aus RE-tragenden Monomeren werden meist in einem Reaktionsschritt durch radikalische oder ionische Polymerisation sowie durch ringöffnende Metathesepolymerisation gebildet.^[101,143–149] Alternativ können die REs an ein bestehendes Polymergerüst angehängt werden.^[101,147] Die Polymerisationsreaktionen sind gegenüber biologisch aktiven Funktionalitäten unterschiedlich empfindlich, sodass die einzubauenden Epitope bestimmen, welche Synthesestrategie am effizientesten ist.

Einige Polymerisationsmethoden liefern biologisch aktive Liganden definierter Valenz.^[84] Lebende Polymerisationen, bei denen die Geschwindigkeit des Kettenabbruchs niedrig ist, sind gut geeignet, um multivalente Liganden gezielt zu erhalten. Polymerisationen mit schnellem Kettenstart und langsamem Kettenwachstum erzeugen Polymere mit enger Kettenlängenverteilung.^[150] Solche Polymerisationen können eingesetzt werden, wenn multivalente Liganden unterschiedlicher Größen gewünscht sind. Lineare Polymere mit Molekulargewichten um 3000, die mit ringöffnender Metathesepolymerisation (ROMP) erhalten werden, können Abstände von 100 nm überbrücken.^[151] Polymere mit Dendrimer-Seitengruppen erreichen Größen zwischen 10 und 100 nm.^[152] Zusätzlich sind durch lebende Polymerisation auch Blockpolymere zugänglich, die unterschiedliche REs (oder unterschiedliche Funktionalitäten) in den einzelnen Blöcken tragen.^[153]

Durch ROMP synthetisierte Polymere werden zunehmend als biologisch aktive multivalente Liganden eingesetzt.^[101,149,154–158] ROMP mit Rutheniumcarben-Katalysatoren eignet sich für die Synthese von Verbindungen unterschiedlicher Valenz.^[150,159–161] Diese Liganden wurden als Inhibitoren von Saccharid-Protein-Wechselwirkungen,^[151,162–164] zur Bekämpfung Vancomycin-resistenter Bakterien^[156] und als Effektoren biologischer Reaktionen eingesetzt.^[46,165] Mithilfe dieser Polymerisationsmethode sind RE-Präsentation und -Dichte steuerbar,^[166,167] sodass Aktivitätsunterschiede zwischen einzelnen Verbindungen spezifischen Aspekten der Ligandenstruktur zugeordnet werden können.

3.3.7. Kombinatorische Synthese multivalenter Liganden

Kombinatorische Methoden bieten einen weiteren Zugang zu multivalenten Liganden. Die kombinatorische und diversitätsorientierte Synthese monovalenter Verbindungen hat die Suche nach niedermolekularen Liganden erleichtert, die optimal an einen Zielrezeptor binden.^[168–173] Bibliotheken von multivalenten Liganden sollten analog Elemente verschiedener Aktivität enthalten.^[119–121,166,167,174]

Die technischen Hürden bei der Synthese von Bibliotheken multivalenter Liganden sind andere als bei der Synthese niedermolekularer Liganden. So können multivalente Liganden mit unterschiedlichen REs auch verschiedene physikalische Eigenschaften haben und unterschiedliche Reinigungsmethoden erfordern. Kombinatorische Ansätze zur Synthese multivalenter Liganden stehen noch am Anfang, und bislang wurden nur wenige Strategien für verschiedenartige multivalente Liganden beschrieben.^[119–121,153,166,167,174]

3.4. Bindungsmechanismen multivalenter Liganden

Multivalente Liganden können auf verschiedene Arten an Rezeptoren binden, die für monovalente Verbindungen unmöglich sind (Abbildung 5).^[100,115,175] Beispielsweise kann ein Ligand mit mehreren Kopien einer RE gleichzeitig mehrere Bindungsstellen eines einzelnen oligomeren Rezeptors besetzen (Beispiele für solche Rezeptoren sind Immunglobuline und einige Lektine). Der notwendige Beitrag für die Trans-

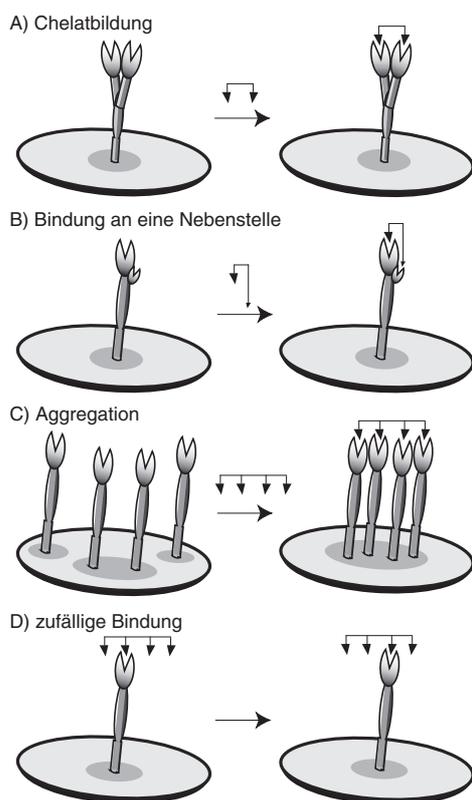


Abbildung 5. Mechanismen der Rezeptorbindung, die nur multivalenten Liganden möglich sind.

lationsentropie wird beim ersten Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand aufgebracht; weitere bindende Wechselwirkungen bilden sich ohne zusätzlichen Entropieaufwand.^[176] Hervorragende Beispiele dieser Chelatbindung wurden in einigen vor kurzem veröffentlichten Untersuchungen geschildert, die sich mit der Entwicklung pentavalenter Toxine befassen.^[177–179] Ähnlich wirken Nebenbindungsstellen, die manche Rezeptoren zusätzlich zur primären Wechselwirkungsposition enthalten. Anders als monovalente Liganden, die nur Nebenstellen in Nachbarschaft der primären Bindetasche besetzen, können multivalente Liganden auch Bindungsenergie aus dem Kontakt mit weiter entfernten, sekundären Stellen gewinnen.^[180] Ein RE oder ein Element des Gerüsts kann mit diesen Positionen in Kontakt treten. Wenn der multivalente Ligand mehr als eine Bindestelle einnimmt – gleich, ob es eine primäre oder eine sekundäre Bindestelle innerhalb eines oligomeren Rezeptors ist – wird er typischerweise mit hoher funktioneller Affinität binden.^[181] Ein multivalenter Ligand kann auch über sterische Stabilisierung wirken: Die große Raumerfüllung des multivalenten Liganden kann ausschließen, dass ein gebundener Rezeptor mit einem Virus oder einer Zelle in seiner Nähe in Kontakt tritt.^[182] Dieser Aspekt der Aktivität multivalenter Liganden ist besonders wichtig für die Hemmung bindender Wechselwirkungen an zellulären oder viralen Oberflächen. All diese Bindungsformen kommen nur bei multivalenten Liganden vor, und zahlreiche Anwendungen dieser Reagentien als Hemmstoffe der Wechselwirkungen von Makromolekülen sind bekannt.

Multivalente Liganden müssen nicht zwangsläufig einen Prozess hemmen, sie können auch als *Aktivatoren* der Signalweiterleitung wirken. Multivalente Liganden binden stark an Rezeptorkomplexe an der Zelloberfläche; dieser Prozess wird durch die Diffusion der Rezeptoren innerhalb der Lipiddoppelschicht erleichtert. Indem multivalente Liganden signalauslösende Rezeptoren aggregieren (Abbildung 5c), können sie Signalkaskaden aktivieren. Dieser Mechanismus, der ausschließlich multivalenten Liganden vorbehalten ist, steht in den folgenden Abschnitten im Mittelpunkt.

Wir haben die drei wichtigsten Aspekte dargestellt, die entscheidend für die Anwendung multivalenter Liganden als Sonden für die Signaltransduktion sind: 1) Die Signalkaskaden werden durch Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkungen vermittelt, und die Zusammenlagerung der Rezeptoren ist ein kritischer Erfolgsfaktor (Abbildung 3). 2) Multivalente Liganden können auf verschiedene Weise an die Zielrezeptoren binden (Abbildung 5). 3) Die Struktur eines multivalenten Liganden bestimmt, welcher Bindungsmodus bevorzugt ist (Abbildung 4). Daher kann ein Ligand so optimiert werden, dass er den gewünschten biologischen Effekt hervorruft.^[84] In den folgenden Abschnitten werden wir einige Beispiele anführen, die den Nutzen multivalenter Liganden für mechanistische Studien belegen.

4. Aufklärung von Rezeptorfunktionen mithilfe multivalenter Liganden

Die Bindung eines multivalenten Liganden an eine Zelloberfläche kann zur Bildung eines Multiproteinkomplexes führen. Die Valenz des Liganden, die Orientierung seiner REs und die Stabilität der Wechselwirkung bestimmen die Eigenschaften dieses Komplexes: stöchiometrische Zusammensetzung, Größe, Lebensdauer und Orientierung der Rezeptoren. Ein multivalenter Ligand kann daher einen erheblichen Einfluss auf das Ausgangssignal einer Kaskade nehmen. Die folgenden Beispiele beschreiben, wie die Signaltransduktion mithilfe von spezifischen multivalenten Liganden analysiert wurde.

4.1. Die Umgebung des Rezeptors

Durch die Bindung multivalenter Liganden können in der Membran Rezeptoraggregate erzeugt werden.^[84] Hier diskutieren wir einige Beispiele, bei denen die aggregierende Wirkung multivalenter Liganden genutzt wurde, um Informationen über die Rezeptorfunktion zu gewinnen.

4.1.1. Integrine

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die die Zelladhäsion vermitteln; sie spielen auch eine zentrale Rolle im fokalen Adhäsionssignalkomplex.^[24,183–185] Integrine sind wichtig für vielzellige Organismen; so kann die gezielte Deletion von Integrin-Untereinheiten die Gewebeformung stark beeinträchtigen.^[186] Bedenkt man diese grundlegende physiologische Funktion, dann überrascht es nicht, dass Integrin-

vermittelte Adhäsion und Signalauslösung sorgfältig reguliert werden.

Integrine verfügen über die Fähigkeit, zwischen niedrig und hoch affinen Bindungszuständen umzuschalten.^[187] Diese beiden Zustände ermöglichen nach gegenwärtiger Vorstellung die schnelle und reversible Anpassung der Zelladhäsion. Der Wechsel geht wahrscheinlich mit einer Veränderung der Konformation und/oder der Umgebung der Integrine einher.^[188] Integrine sollten mindestens zwei Konformationen einnehmen: einen gefalteten inaktiven Zustand und einen gestreckten aktiven Zustand.^[187] Außerdem kann die Rezeptorumgebung Änderungen durchlaufen, die entweder durch Wechselwirkung mit einem Liganden (ein „outside-in“-Wechsel) oder durch zelluläre Aktivierung (ein „inside-out“-Wechsel) induziert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass Umgebung und Konformation die Signalauslösung und die Adhäsionsstärke beeinflussen. Dennoch könnten spezifischere Wirkstoffe entwickelt werden, wenn es gelingt, die relativen Beiträge der Mechanismen gegeneinander abzugrenzen. Der Einfluss der Rezeptorumgebung im fokalen Adhäsionskomplex zeigt sich in Experimenten mit synthetischen multivalenten Liganden.

Eine Gruppe synthetischer Liganden, die zur Untersuchung der Integrin-Aggregation diente, sind die chemischen Dimerisierungsagentien (chemical inducers of dimerization, CIDs). Diese niedermolekularen divalenten Liganden sind zellgängig und vermitteln die Zusammenlagerung von zwei Rezeptoren.^[4,116,189–191] Die CIDs zeichnen sich dadurch aus, dass sie Rezeptoren oligomerisieren können, die mit einem spezifischen ligandenbindenden Protein fusioniert sind (Abbildung 6). Anfangs setzte diese Strategie auf Fusionen mit

dem Protein FKBP, das an den Immunsuppressor FK506 bindet.^[189] Der niedermolekulare Wirkstoff FK506 kann in das Dimer FK1012 umgewandelt werden, das FKBP dimerisiert. FKBP-Fusionen können durch Transfektion oder auf anderem Wege in Zellen eingebracht werden, um die Auswirkungen der FK1012-vermittelten Dimerisierung auf die Funktion des Fusionsproteins zu untersuchen. Wenn mehrere Kopien von FKBP an das Zielprotein fusioniert sind, führt die Anlagerung des Liganden zu Aggregaten höherer Ordnung.^[192] Solche Strategien sind auf Heterodimerisierungs- und Dimerisierungsagentien ausgedehnt worden, die endogene Proteine meiden (z. B. FKBP) und eigens konstruierte Fusionsproteine spezifisch binden.^[192–194]

Umgebung und Konformation von Integrinen tragen zur Änderung der Bindungsaffinität bei. Der Beitrag des Konformationswechsels wurde durch eine CID-Strategie vom Einfluss der Umgebung abgegrenzt.^[195] Dazu wurde ein Gen, das zwei Kopien von FKBP in Tandemkonfiguration codiert, mit dem Protein α IIB fusioniert, das Teil des Integrinkomplexes α IIB- β 3 ist. Die Zugabe des Dimerisierungsagens AP1510 verstärkt die Bildung von Integrin-Aggregaten in Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren. Wäre die Umgebung alleine entscheidend für das Umschalten zwischen niedriger und hoher Affinität, so würde man erwarten, dass AP1510 einen natürlichen Bindungspartner völlig ersetzt. Als Maß für den Wechsel in die hoch affine Konformation diente die Bindung eines Antikörpers (PAC1), der für diese Integrinform spezifisch ist. Die Zugabe des FKBP-Dimerisierungsagens AP1510 führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der PAC1-Bindung. Um den Beitrag der Rezeptorkonformation zu untersuchen, setzten die Autoren das monovalente

Antikörperfragment LIBS ein, das Integrine bindet und aktiviert. Die Zunahme der Bindung in Gegenwart von AP1510 war mäßig, der Effekt der LIBS-Behandlung dagegen erheblich stärker. Diese Untersuchungen mit CIDs zeigen, dass die Umgebung des Rezeptors zwar einen Beitrag leistet, andere Faktoren wie das Vorliegen der hoch affinen Konformation aber signifikant zur Integrin-vermittelten Zelladhäsion beitragen.

Integrine sind nicht nur an der Adhäsion, sondern auch an der intrazellulären Signalgebung beteiligt. Durch die Signale der Integrine werden verschiedene Kaskaden aktiviert, und wie bei den meisten anderen komplexen Signalsystemen versucht man auch hier, die Beiträge der einzelnen Wege zu entwirren. Im Fall der Integrinsignale sind die beiden Kinasen Syk und FAK an der Weiterleitung der Signale über verschiedene Wege beteiligt. Die Bildung von Integrinaggregaten begünstigt möglicherweise die Weitergabe der Information über einen der beiden Wege (Syk oder FAK). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Rolle der Rezeptorumgebung bei der Signalweitergabe durch Syk und FAK mit dem dimeren Liganden AP1510 untersucht. Behandelte

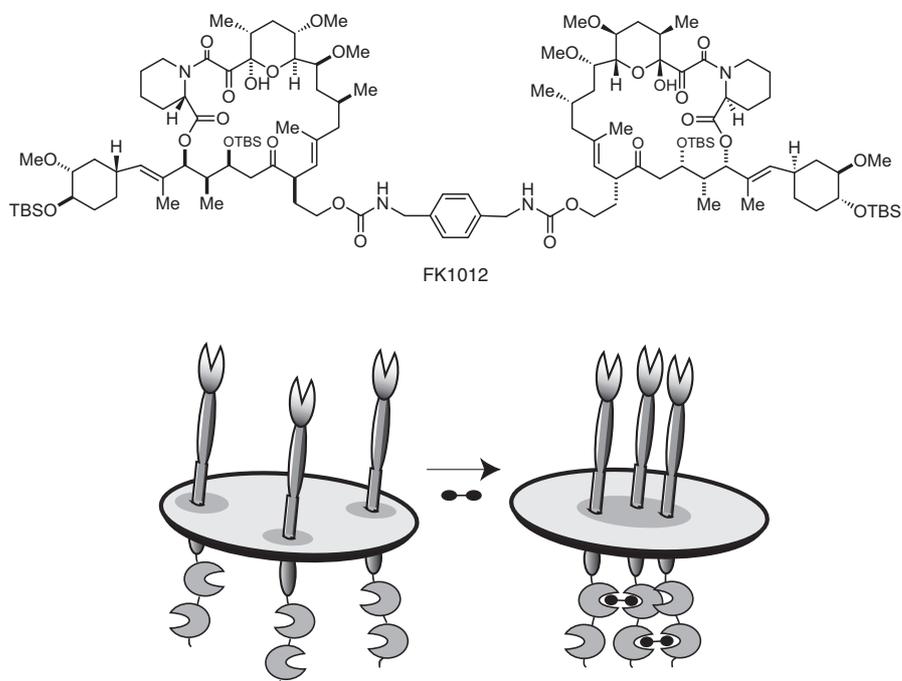


Abbildung 6. Intrazellulär vermittelte Veränderung der Rezeptorumgebung durch einen CID. Ein mit einem Bindeprotein fusionierter Rezeptor wird in der Zielzelle exprimiert. Die Zugabe eines niedermolekularen Dimerisierungsagens (wie FK1012) induziert die Rezeptoraggregation. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

man die Zellen nur mit AP1510, um Aggregate des Integrins α IIb- β 3 zu bilden, so nahm die Tyrosinphosphorylierung durch Syk zu. Um FAK zu aktivieren sind dagegen sowohl die hoch affine Besetzung des Rezeptors (Behandlung mit LIBS) als auch die Oligomerisierung (Behandlung mit AP1510) erforderlich. Dies zeigt das komplexe Wechselspiel zwischen Signalgebung, Adhäsion und Reaktion der Zelle, das durch Veränderungen der Umgebung, der Besetzung der Integrine oder durch beides beeinflusst werden kann. Die CID-Strategie ist beim Entwirren der verschiedenen Beiträge sehr hilfreich. Ein kleiner Nachteil dieses Ansatzes liegt aber darin, dass die Zellen genetisch verändert werden müssen, um das Fusionsprotein zu exprimieren.

An multivalenten Oberflächen lässt sich die Integrinfunktion direkt untersuchen. Integrine können die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixkomponenten ebenso erleichtern wie die Adhäsion an andere Zellen.^[185,196] Die extrazelluläre Matrix beeinflusst daher als natürliche Präsentationsfläche ebenfalls die Integrinaktivität.^[197] Bei einem Zelladhäsionsexperiment wurden die Oberflächen in Vertiefungen auf Mikrotiterplatten mit Fibrinogen oder Fibrin modifiziert^[198] und mit lymphoblastoiden B-Zellen in Berührung gebracht (Abbildung 7A). Das multivalente Fibrin unterstützt die Adhäsion der Zellen, wohingegen immobilisiertes monovalentes Fibrinogen nichtaktivierte Zellen nicht einfiel.

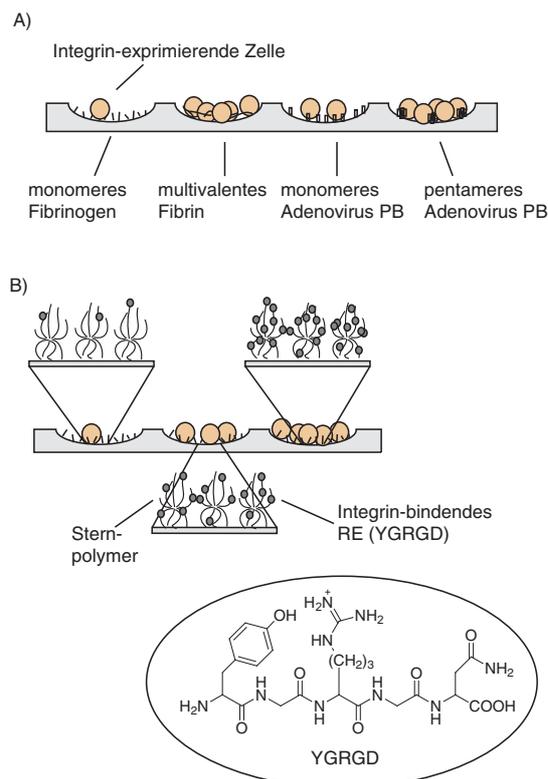


Abbildung 7. Die Dichte der präsentierten REs beeinflusst die Zelladhäsion an Integrinliganden tragende Oberflächen. A) Mit multivalenten Liganden beschichtete Oberflächen haben eine größere funktionelle Affinität für B-Zellen. B) Sternpolymere mit unterschiedlich vielen Kopien des Pentapeptids YGRGD (eines Integrin-bindenden REs). Die relative Wirksamkeit der einzelnen Oberflächen entspricht der Zahl gebundener Zellen.

In einer ähnlichen Versuchsreihe diente das Adenovirus-PB, ein spezifischer Ligand für das Integrin $\alpha_v\beta_3$, als Monomer oder als Pentamer zur Beschichtung der Mikrotiterplatten-Vertiefungen (Abbildung 7B). Wie beim Fibrin adhärten die B-Zellen selektiv in den Vertiefungen mit dem multivalenten Liganden. Um die Mechanismen aufzuklären, die zu der unterschiedlichen Bindung führen, wurde die Zahl der möglichen Integrin-Bindestellen in den Vertiefungen mit einem Radioimmunassay bestimmt: Es waren 800 Positionen mm^{-2} beim monomeren Liganden und 125 Positionen mm^{-2} beim pentameren Liganden. Obwohl sie nur ein Sechstel der Bindestellen aufwies, war die Oberfläche mit dem pentameren Integrin-Liganden adhäsiver. Somit ist die räumliche Anordnung und nicht die Gesamtzahl der Bindestellen für die Integrin-vermittelte Adhäsion entscheidend.

Gestützt werden diese Ergebnisse durch Daten, denen zufolge die lokale RE-Dichte wichtig für die Adhäsionsstärke der Integrine ist.^[127] Maheshwari et al. griffen auf Sternpolymere mit unterschiedlicher Anzahl von Kopien des minimalen Integrin-Liganden YGRGD zurück, um den Einfluss der Bindestellendichte auf die Integrin-vermittelte Zellmigration und die Adhäsion $\alpha_v\beta_3$ -tragender Zellen zu untersuchen. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet an die RGD-Sequenzen, und Oberflächen mit mehr YGRGD-Motiven waren effizienter in der Zell-Zell-Wechselwirkung (Abbildung 7B). Bei gleicher RE-Zahl vermitteln Oberflächen mit dichter gepackten REs effizienter die Zellmigration und -adhäsion. Demnach verstärkt die Aggregation bei Integrienen die Adhäsion, wahrscheinlich sowohl durch eine höhere funktionelle Affinität für die Liganden als auch durch eine Aktivierung der Signalkaskaden.

Diese Experimente mit synthetischen multivalenten Oberflächen haben die Bedeutung der Rezeptorumgebung für die Integrinfunktion verdeutlicht. Sie liefern auch Informationen über die effizientesten Klassen natürlicher Integrinliganden. Zwar lässt sich mit diesen multivalenten Oberflächen die Integrinfunktion in lebenden Organismen nicht untersuchen, doch können Experimente mit löslichen multivalenten Liganden die physiologischen Folgen der Integrin-Aggregation erhellen.

4.1.2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bilden eine der größten Familien von Zelloberflächenrezeptoren bei Säugern. Sie sind an vielen wichtigen physiologischen Vorgängen beteiligt. Ihre Bedeutung lässt sich daran ermesen, dass über 50% aller kommerziellen Therapeutika über GPCRs wirken.^[199] Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass die Homo- und Heterodimerisierung von GPCRs zur Regulierung der Signalgebung über diese Rezeptoren beiträgt.^[117,200] Um diesen Vorgang steuern zu können, muss daher geklärt werden, welchen Beitrag die GPCR-Oligomerisierung leistet. Experimente mit synthetischen multivalenten Liganden sollen zeigen, ob ein Ligand an diesem Prozess beteiligt ist.

Die Dimerisierung von Rezeptoren wurde mit niedermolekularen divalenten Liganden untersucht.^[103,117,186,201–207] Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der Chemotaxis bei neutrophilen Granulocytten durch das Dimer eines GPCR-

Liganden.^[208] Die Zellen werden von Nebenprodukten der bakteriellen Proteinsynthese, etwa *N*-Formylmethionin-haltigen Peptidfragmenten, zu bakteriellen Infektionsherden gelockt. *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLF) ist wohl der am besten untersuchte Chemoeffektor für Neutrophile; erkannt wird es vom Formylpeptidrezeptor (FPR), einem GPCR. Daher wurden Dimere mit zwei fMLF-Einheiten verwendet, um die Bedeutung der Rezeptorumgebung bei der Regulierung des FPR-Signals zu untersuchen.

In Mono-, Di- und Triethylenglycol-verknüpften Dimeren sind die fMLF-Einheiten über einen Linker am C-Terminus des Peptids verbunden. Das Monoethylenglycol-Dimer sollte den FPR nicht dimerisieren können; jede Verstärkung der chemotaktischen Aktivität im Vergleich zu fMLF wäre daher auf eine höhere Affinität zurückzuführen. Dagegen vermuten die Autoren, dass das Triethylenglycol-verknüpfte Dimer die Rezeptordimerisierung erleichtert, obwohl nicht bekannt ist, wie lang ein Linker für die gleichzeitige Besetzung zweier FPRs sein muss. Die Autoren stellten weitere divalente Liganden mit längeren Linkern her, um den FPR zu dimerisieren.

Die FPR-Funktion wurde anhand von zwei Parametern überprüft: der Chemotaxis und der Superoxid-Produktion.^[208] In vivo werden Neutrophile durch Chemotaxis zu der Stelle gelockt, an der das Pathogen eindringt, um dieses anschließend durch Freisetzung von Superoxid abzutöten. Die beiden Vorgänge müssen räumlich und zeitlich streng kontrolliert ablaufen, um den Schaden an gesundem Gewebe zu minimieren. Insbesondere muss die Wanderung zum Ort der Infektion der Bildung von Superoxid vorausgehen, sonst würden die Neutrophilen die toxischen Sauerstoffspezies vorzeitig freisetzen. Beide Reaktionen können durch die Bindung von Liganden an FPR verstärkt werden. Es ist daher wichtig zu verstehen, welche Faktoren an der Auslösung dieser verschiedenen Zellfunktionen beteiligt sind.

Die synthetischen Dimere wurden zu Zellen gegeben, die FPR exprimieren, und Chemotaxis und Superoxidbildung wurden verfolgt. Das Triethylenglycol-verknüpfte Dimer war die chemotaktisch aktivste Verbindung, während das Monoethylenglycol-Dimer die stärkste Superoxidbildung auslöste. Obwohl die FPR-Dimerisierung nicht direkt getestet wurde, kann man aus den Ergebnissen ableiten, dass die Rezeptordimerisierung die chemotaktische Reaktion beeinflussen kann. Die größere Aktivität des Monoethylenglycol-Dimers bei der Superoxidbildung wird der höheren Affinität für die FPRs zugeschrieben. Die spezifischen Reaktionsmechanismen der divalenten Wirkstoffe wurden nicht im Detail studiert, doch diese ersten Ergebnisse lassen erwarten, dass synthetische multivalente Liganden hilfreich sein können, um die Rolle der Rezeptoraggregation bei der GPCR-Signalgebung im Allgemeinen und der chemotaktischen Signalgebung in Neutrophilen im Besonderen aufzuklären.

Die Heterooligomerisierung von Rezeptoren kann ein Mittel sein, um Informationen verschiedener Signalwege zu einer kohärenten zellulären Antwort zu integrieren. Die Folgen der GPCR-Heterodimerbildung wurden mithilfe heterodimerer Liganden untersucht.^[103] Mit dieser Strategie wurden die Effekte der Bildung eines gemischten Aggregats aus einem GPCR, der auf Enkephalin reagiert, und einem

Neurotensin-spezifischen Rezeptor charakterisiert. Die beiden physiologischen Liganden sind wichtige regulatorische Neuropeptide, die das GPCR-Signals synergistisch aktivieren.^[209] Ziel dieser Untersuchungen war es, zu bestimmen, ob die Aggregation zu einem heterooligomeren GPCR-Komplex das Signal direkt potenziert.

Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, wurden mit Neurotensin, einer Mischung aus Neurotensin und Enkephalin oder einem difunktionellen Neurotensin-Enkephalin-Konjugat behandelt.^[209] Die Konzentration von cyclischem GMP (cGMP) im Cytosol wurde für eine Reihe von Ligandenkonzentrationen gemessen. Separate Zugabe beider Hormone resultierte lediglich in einem leichten Anstieg der cGMP-Produktion, dagegen erwies sich das kovalente Heterodimer als ein wirksamer Induktor. Vermutlich ist also die erzwungene Nähe der beiden Rezeptoren maßgeblich für den Anstieg der cGMP-Produktion. Wie im vorherigen Beispiel fehlen allerdings auch hier direkte Beweise für die Heterodimerisierung.

Weitere Liganden mit höherer Valenz oder anderen Strukturen könnten dabei helfen, die Auswirkungen der Rezeptorumgebung auf das GPCR-vermittelte Signal zu klären. Besonders interessant wird es sein, die Signalauslösung zusammen mit dem Einfluss von Liganden auf die GPCR-Aggregation zu untersuchen. Da viele Wirkstoffe an GPCRs angreifen, könnten diese Experimente die Entwicklung neuer Therapeutika erleichtern.^[210]

4.1.3. T-Zell-Rezeptoren

T-Lymphocyten vermitteln die Immunität bei Säugern.^[15,22,78,211] Sie erkennen fremde Antigene über T-Zell-Rezeptoren (TCRs). Die Bindung an T-Zell-Rezeptoren aktiviert die Zellen, die daraufhin Tumorzellen, Pathogene und virusinfizierte Zellen abtöten können. Bereits in Abschnitt 1 wurde beschrieben, wie an der Berührungsfläche zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle eine Immunsynapse entsteht. Die hoch organisierte Immunsynapse enthält die TCRs, andere Corezeptoren und Bestandteile der Signalkaskade.^[76]

Änderungen in der Organisation der TCRs und anderer Komponenten des Signalkomplexes beeinflussen die T-Zell-Aktivierung; die Beiträge einzelner Faktoren zur Signalgebung sind jedoch noch nicht geklärt. Trotz umfangreicher Untersuchungen zu TCR-Organisation und Signalgebung verbleiben einige Fragen zu molekularen Details der TCR-Funktion. So ist umstritten, ob die TCR-Dimerisierung einen ausreichenden Reiz für die T-Zell-Aktivierung liefert oder ob eine TCR-Oligomerisierung erforderlich ist. Unklar ist auch die Bedeutung der einfachen Besetzung einzelner TCRs mit monovalenten Liganden.^[212] Wenn einzelne oder kleine Gruppen von TCRs das Signal auslösen könnten, wäre die Bildung der Synapse unerklärlich. Multivalente Liganden werden mit Sicherheit bei der Untersuchung dieser grundlegenden Fragen im Vordergrund stehen.

Eine Untersuchungsmethode für die TCR-Funktion beruht auf multivalenten Proteinkonjugaten, bei deren Bildung man die hohe Affinität zwischen Biotin und dem tetravalenten Protein Streptavidin nutzt.^[213] Die vier identi-

schen Bindestellen von Streptavidin binden Biotin mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-15} M; daher kann man biotinylierte Erkennungselemente gut an einem Streptavidin-Gerüst verankern. So sind multivalente Komplexe zugänglich, die ein, zwei, drei oder vier Erkennungselemente pro Gerüsteinheit tragen (Abbildung 8). Davis, McConnell und

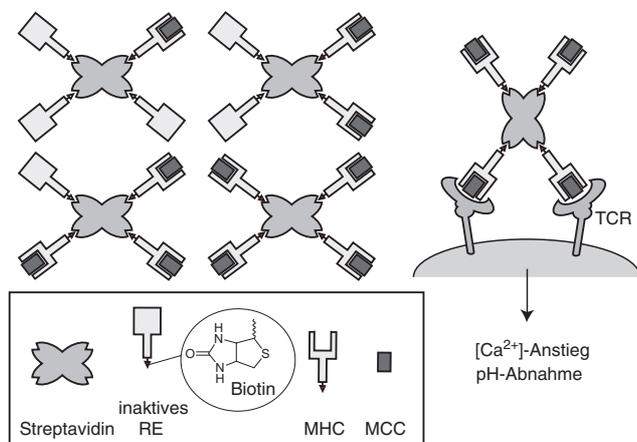


Abbildung 8. Streptavidin-MHC-MCC-Komplexe (schematisch). Links: Komplexe mit einem, zwei, drei oder vier biotinylierten MHC-MCC-Resten. Rechts: ein Modell der Aktivierung von TCRs durch Bindung des Liganden höchster Valenz.

Mitarbeiter verwendeten Streptavidin als Grundgerüst für die Präsentation peptidbeladener Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC-Komplexe).^[213] Weil peptidbeladene MHCs als Liganden für TCRs wirken, können Streptavidingerüste mit biotinylierten MHC-Komplexen (theoretisch) bis zu vier TCRs binden.

Um diese multivalenten Konjugate zu erzeugen, wurde ein Peptid, das von Motten-Cytochrom c (MCC) abgeleitet wurde, zu dem MHC gegeben. Der MCC-MHC-Komplex wurde mit einer Biotineinheit versehen und mit Streptavidin gemischt; dabei sollte ein tetravalenter Komplex entstehen, der an TCR binden kann (Abbildung 8). Der Anteil des aktiven MHC-Komplexes bei der Assoziationsreaktion wurde variiert, um die Bildung von mono-, di-, tri- oder tetrameren Strukturen zu begünstigen. Biotinyliertes MHC ohne MCC, das TCR nicht bindet, wurde zugegeben, um die verbliebenen Bindestellen am Streptavidin abzusättigen. Der Komplex mit vier unbeladenen MHCs, die kein fremdes Antigen trugen, diente als Kontrolle.

Um die Auswirkungen der Rezeptorassoziate auf die T-Zell-Aktivierung zu testen, wurden die Abnahme des extrazellulären pH-Werts und der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen. In beiden Fällen war das Tetramer der einzige Ligand, der die Aktivität spürbar erhöhte. Obwohl kinetische Effekte bei der Bindung nicht ausgeschlossen werden können, geht man davon aus, dass eine Änderung der TCR-Umgebung die T-Zell-Aktivierung beeinflusst. Chemisch definierte multivalente Peptidliganden lieferten ähnliche Ergebnisse, doch ein dimerer Ligand war bereits ausreichend, um ein TCR-Signal auszulösen.^[214,215] Die Gesamtheit dieser Daten spricht dafür, dass die Valenz

eine wichtige Eigenschaft natürlicher TCR-Liganden ist und dass die Rezeptorumgebung TCR-vermittelte Signale verstärken kann.

Neben der TCR-Vernetzung tragen auch andere Faktoren zu Aktivierung und Signalmodulierung bei. Viele Corezeptoren verstärken oder schwächen das Aktivierungssignal. Bei Streptavidingerüsten erweist es sich als problematisch, mehrere REs einzubauen, die gleichzeitig TCRs und Corezeptoren binden können. Daher wurde auf funktionalisierte Gerüsteinheiten zurückgegriffen, die unterschiedliche REs präsentieren.

Zahlreiche Kügelchen und Oberflächen wurden als multivalente Präsentationsflächen verwendet, um die Auslösung der T-Zell-Signale zu erforschen.^[9,129,216–218] In einer Untersuchung befasste man sich mit dem Mechanismus, nach dem die T-Zell-Reaktionen durch den Corezeptor CD28 verstärkt werden.^[87] Die Bindung von Liganden an den TCR ist hinreichend und notwendig für die Aktivierung der T-Zellen; eine gleichzeitige Stimulation des CD28-Corezeptors ergibt jedoch eine stärkere Zellantwort. Um zu bestimmen, wie dieses stärkere Signal zustandekommt, wurde eine antigenpräsentierende Zelle mit TCR und CD28 an der Oberfläche größengetreu mit Kügelchen simuliert.

Anhand von modifizierten Latexkügelchen wurde das Verhalten bei gleichzeitiger Bindung mehrerer Rezeptoren untersucht. Damit TCR und CD28 auf den Kügelchen aggregieren können, wurden Antikörper gegen TCR und gegen den Corezeptor CD28 angehängt. Die Kügelchen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Zellproliferation zu induzieren, die auch im Verlauf der Lymphocyten-Aktivierung ausgelöst wird. Wenn die T-Zell-Aktivierung die gleichzeitige Beteiligung beider Rezeptoren, TCR und CD28, erforderlich macht, sollten nur solche Kügelchen die Zellen aktivieren, die beide REs präsentieren. Kügelchen, die nur das TCR-aggregierende Element tragen (einen TCR-Antikörper), lösten keine T-Zell-Proliferation aus. Dagegen erwiesen sich Kügelchen mit Antikörpern gegen beide Rezeptoren als effiziente Aktivatoren der Proliferation.

Eine Erklärung für diese Beobachtungen ist darin zu sehen, dass die gleichzeitige Bindung von CD28 und TCR die Colokalisierung der Rezeptoren in einer Membranregion begünstigt, die als Lipid-Mikrodomäne bezeichnet wird. Die Lipid-Mikrodomänen könnten Signalkomponenten konzentrieren und so die Bildung reifer Signalkomplexe erleichtern. Unterstützt wird diese Deutung durch den Befund, dass ein Fluoreszenzmarker für solche Lipid-„Rafts“ (eine Fluorescein-markierte Untereinheit von Cholera-toxin B) in einem kleinen Bereich an der Kontaktstelle zwischen Kügelchen und T-Zelle konzentriert wurde. Dies verdeutlicht, dass die kombinierte Stimulation von TCR und den Corezeptoren die Verteilung auf der Zelloberfläche und damit die Immunantwort verändern kann. Da die REs bei diesen Experimenten auf dem multivalenten Kügelchen immobilisiert sind, können sie sich im Unterschied zu REs an der Zelloberfläche nicht umgruppieren. Mit einer antigenpräsentierenden Zelle als natürlichem „Liganden“ kam man jedoch zu ähnlichen Ergebnissen. Der Vergleich legt nahe, dass die mit REs versehenen Kügelchen antigenpräsentierende Zellen in einigen Gesichtspunkten effizient nachahmen.^[219] In Untersuchun-

gen, bei denen funktionalisierte Kügelchen als multivalente Liganden eingesetzt wurden, gingen daher von einer Beteiligung des CD28-Corezeptors an der Regulierung von Rezeptorumgebung und Immunfunktion aus.

4.1.4. Bakterielle Chemorezeptoren

Um zu überleben, müssen sich Bakterien zu Nährstoffen hin und von Toxinen weg bewegen. Die bakterielle Chemotaxis wird durch ein gut charakterisiertes Signalsystem gesteuert, das die Erkennung von Nährstoffen und Toxinen zur Aufgabe hat.^[220–222] Fünf Arten membrangebundener Chemorezeptoren (MCPs) vermitteln die Chemotaxis in *Escherichia coli*. Jede MCP-Art ist zuständig für die Entdeckung einer Untermenge niedermolekularer Substanzen oder anderer Reize und die folgende Chemotaxisauslösung. Um mit einer angemessenen Bewegung zu reagieren, müssen die Bakterien Signale von unterschiedlichen Quellen integrieren und in eine stimmige Antwort umsetzen. Da die Reaktionen von Stimuli ausgelöst werden, die in sehr niedriger Konzentration vorliegen, ist zudem eine erhebliche Signalverstärkung erforderlich.^[223–225]

Über den Mechanismus, mit dem Bakterien chemotaktische Signale verstärken und integrieren, wird schon lange gerätselt. Einer aktuellen Hypothese zufolge wird die Signalverstärkung durch Kommunikation zwischen den Rezeptoren erzielt.^[26,54,60,226,227] Interessanterweise befinden sich die MCPs im Zellinneren: Sie sind bei *Escherichia coli* und anderen Bakterienarten an den Zellpolen konzentriert.^[39,228] Diese Organisation von Chemorezeptoren wurde als entscheidend für die Signaltransduktion angesehen. Neuere Experimente mit synthetischen multivalenten Liganden und andere Ansätze stützen diese Sichtweise; sie deuten an, dass die Kommunikation zwischen homologen und heterologen MCPs innerhalb des Chemorezeptorfelds die chemotaktischen Reaktionen bestimmt.^[46,54,60,62,229–231]

Zunächst wurden multivalente Lockstoffe hergestellt, die die Chemorezeptoren in Aggregaten zusammenführen. Mithilfe von ROMP (ringöffnender Metathesepolymerisation) wurden multivalente Liganden mit einer ausreichenden Zahl chemotaktischer Kohlenhydratreste synthetisiert (ca. 25 Monomereinheiten), um MCPs zu mikroskopisch erkennbaren Aggregaten zusammenzuballen. Diese Änderung in der Rezeptorumgebung beeinflusste die Signaltransduktion durch die MCPs: Liganden, die zur MCP-Aggregation führen, aktivieren auch die Chemotaxis (Abbildung 9). Mithilfe einer Fluoreszenzsonde ließ sich zeigen, dass multivalente Liganden mit Galactose-Einheiten den Galactose-spezifischen Rezeptor Trg aggregieren. Überraschend war, dass sie auch den Serin-spezifischen Rezeptor Tsr aggregierten, obwohl Tsr nicht an Galactose bindet. Vermutlich wird der Rezeptor infolge Wechselwirkungen mit anderen Chemorezeptoren eingelagert. Es sind also auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Typen von Chemorezeptoren zu berücksichtigen.

Hinweise auf Effekte der Chemorezeptor-Chemorezeptor-Wechselwirkungen auf die Funktion lieferte eine Untersuchung zu Auswirkungen der Rezeptorzusammenlagerung auf das Ausgangssignal. Dazu wurden die Chemorezeptoren durch ein multivalentes Galactosederivat aggregiert. Nach-

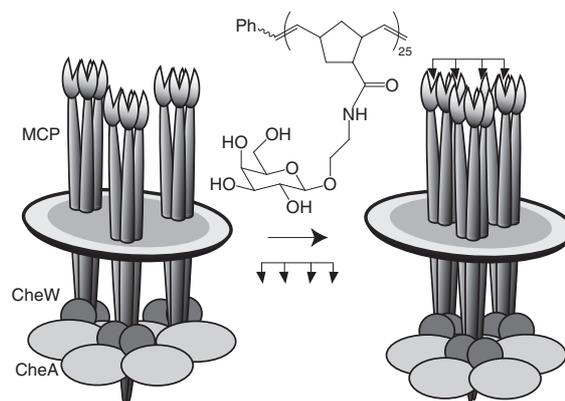


Abbildung 9. Untersuchung von Umgebungseffekten auf Rezeptoren in der bakteriellen Chemotaxis mithilfe eines synthetischen multivalenten Polymerliganden. Bei hinreichender Valenz des Liganden kann eine Reorganisation der MCPs induziert werden, die eine Signalauslösung ermöglicht und die Bewegung des Bakteriums aktiviert.

dem die Bakterien den multivalenten Lockstoff gebunden hatten, wurde der monovalente Lockstoff Serin zugegeben. Unter diesen Bedingungen war die chemotaktische Reaktion auf Serin 100- bis 1000mal stärker. Heterologe MCPs kommunizieren demnach miteinander und verstärken und integrieren chemotaktische Signale. Die Nähe unterschiedlicher Rezeptortypen zueinander ist entscheidend für die Signalverstärkung. Ein einzelner Rezeptor reicht also nicht aus, um eine bestimmte Verbindung zu registrieren – alle Chemorezeptortypen tragen zu einem genauen Nachweis und einer angemessenen Signalverstärkung bei.

In Untersuchungen der Rezeptorumgebung bei der Chemotaxis zeigt sich die Bedeutung multivalenter Lockstoffe: Man kann mit ihrer Hilfe die Signaltransduktion auch dann untersuchen, wenn eine Dimerisierung des Rezeptors erforderlich ist. Änderungen in der Rezeptororganisation wurden bei der Signaltransduktion für die Chemotaxis möglicherweise deswegen nicht erwartet, weil die bekannten Lockstoffe Monomere sind und die MCPs ohne Liganden als Dimere vorliegen. Dennoch weisen Untersuchungen mit multivalenten Liganden darauf hin, dass Veränderungen in der Umgebung der MCPs die Signalverstärkung beeinflussen. Der Einsatz dieser Liganden setzt keine genetische Manipulation der Bakterien voraus: So können die Reaktionen, die der multivalente Ligand auslöst, direkt unter weitgehend physiologischen Bedingungen in einem genetischen Wildtyp analysiert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass lösliche multivalente Liganden mit definierter Struktur wertvolle Sonden sind.

4.2. Rezeptororientierung

Viele Zelloberflächenrezeptoren enthalten enzymatisch aktive Domänen, andere gehen Wechselwirkungen mit Proteinen mit katalytischen Domänen ein. Die Substrate dieser enzymatischen Aktivitäten sind oft andere Signalübertragungsproteine. Die relative Orientierung von rezeptorassoziiertem aktivem Zentrum und Substrat bestimmt den

Umsatz; diese Enzymeffizienz beeinflusst ihrerseits die Signaltransduktion.^[225,229,230,232] Es ist oft nicht klar, ob die Aktivität eines zusammengesetzten Signalkomplexes auf die spezifische Orientierung der Rezeptoren innerhalb des Komplexes zurückgeht oder einfach auf die Lokalisierung der signalübertragenden Komponenten.^[233] Da multivalente Liganden Rezeptoren in einer spezifischen Orientierung organisieren, können sie einen Beitrag dazu leisten, die Bedeutung der Proteinorientierung in der Signalkaskade aufzuklären.

4.2.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Eine entscheidende Eigenschaft multivalenter Liganden ist ihre Fähigkeit, mehrere Bindestellen an einem einzelnen Rezeptor zu besetzen und somit den Chelateffekt zu nutzen (Abbildung 5 a).^[176] Multivalente Liganden können daher mit hoher funktionaler Affinität wechselwirken, die über agonistische oder antagonistische Wirkung entscheidet. Kürzlich wurde ein niedermolekulares Dimer hergestellt, das gleichzeitig an zwei Stellen des Rezeptors für den Corticotropin-Releasing-Faktor (CRFR-1) bindet. CRFR-1 ist ein GPCR, der die Freisetzung von adrenocorticotropen Hormonen (z. B. Testosteron) während der Stressreaktion reguliert.^[234]

Darauffin wurde eine Reihe von Dimeren erzeugt, in denen helicale und starre Linker unterschiedliche RE-Orientierungen festlegten. Die Zugabe dieser Dimere zu CRFR-1-exprimierenden Zellen löste die Freisetzung von Testosteron aus. Eine starke Aktivierung wurde von Dimeren hervorgerufen, deren terminale REs in *trans*-Orientierung vorlagen. Liganden mit anderen Orientierungen waren bezüglich der Freisetzung von Testosteron zehnfach weniger wirksam. Die Experimente schließen zwar nicht aus, dass die beobachteten Unterschiede von ligandinduzierten Veränderungen der Rezeptoroligomerisierung herrühren, doch liegt die Vermutung nahe, dass sich die Orientierung der REs auf die Aktivierung der Rezeptoren auswirken kann.^[117,235]

4.2.2. ZAP-70

Liganden für die Untersuchung der Proteinorientierung in assoziierten Signalkomplexen sind durch chemische Synthese zugänglich. Im vorherigen Beispiel bestimmte die relative Orientierung der bindenden Einheiten eines multivalenten Liganden seine Fähigkeit, ein Signal des Zielrezeptors auszulösen. Wenn ein multivalenter Ligand durch Rezeptoraggregation wirkt, sind die geometrischen Anforderungen an die bindenden Epitope nicht so strikt. In den wenigen bisher untersuchten Beispielen ist die Bildung eines Signalkomplexes oft wichtiger als die genaue Orientierung der Rezeptoren innerhalb des Komplexes.^[233,236] In Übereinstimmung hiermit können dimere Liganden ein Signal über ZAP-70 auslösen, das durch unterschiedliche RE-Orientierungen nur wenig verändert wird.^[107]

Die Kinase ZAP-70 wird von der T-Zelle für verschiedene Signalfunktionen benötigt. Wenn die Orientierung von ZAP-70 für seine Funktion von Bedeutung ist, sollten multivalente Liganden, die diese Orientierung steuern, unterschiedlich effizient bei der Aktivierung der T-Zellen sein. Zu diesem

Zweck wurden niedermolekulare dimere Liganden hergestellt, in denen identische REs durch Linker mit festgelegter Konformation verknüpft sind. Die Aktivitäten dieser CIDs wurden getestet, indem man sie zu Zellen gab, die in der Membran ein entsprechendes Bindeprotein (drei Kopien FKBP, fusioniert mit der Myristoylierungsdomäne von v-Scr) und ein ZAP-70-FKBP-Fusionsprotein trugen (Abbildung 10). Wenn die CIDs an die Fusionsproteine binden und

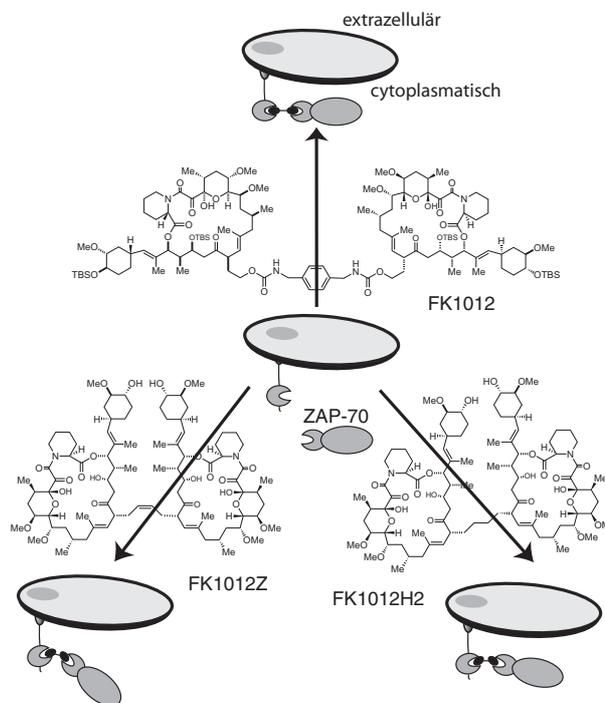


Abbildung 10. Der Einfluss der Orientierung auf die Kinasefunktion von ZAP-70 wurde mit einer CID-Strategie untersucht. Gezeigt sind die chemischen Strukturen der Dimerisierungsagentien FK1012, FK1012H2 und FK1012Z. Diese Dimere präsentieren die REs in drei unterschiedlichen relativen Orientierungen, ihre ZAP-70-Aktivierung war jedoch vergleichbar.

diese aggregieren, können sie ZAP-70 an der Membran fixieren. Alle synthetischen CIDs rekrutierten ZAP-70 und aktivierten die Signalauslösung. Zwar können große Änderungen bei der Orientierung die ZAP-70-Signale beeinflussen, die getesteten CIDs hatten diesbezüglich jedoch nur einen geringen Effekt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse mit CRFR-1 und ZAP-70 lassen eine gewisse Plastizität bei der Assoziation des Signalkomplexes erkennen: Wird das Signal durch dimere Liganden ausgelöst, die verschiedene Positionen an einem Rezeptor besetzen, dann ist die Orientierung der REs vorrangiger als wenn die Liganden nur die Rezeptorumgebung verändern. Dies bestätigten Experimente, in denen mit Fusionsproteinen getestet wurde, ob verschiedene Assoziationsproteine das Signal beeinflussen.^[233,236] Wie bei ZAP-70 war die Orientierung verschiedener Signaldomänen viel weniger wichtig als ihre Einbindung in einen Signalkomplex. Es wird sich zeigen, ob diese Befunde allgemein gültig sind.

4.3. Stöchiometrische Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes

Die Zahl der Rezeptoren in einem Komplex kann seine biologische Aktivität beeinflussen. Für die Zelladhäsion sollte dieser Effekt besonders groß sein, da die funktionelle Affinität des Rezeptorfeldes direkt mit der Zahl an Rezeptor-Ligand-Komplexen steigen sollte.^[100] Auch die Signaltransduktion kann empfindlich auf die Zahl der Rezeptoren im Komplex reagieren; es ist allerdings schwierig, den Effekt dieser Größe auf die Signalweitergabe zu quantifizieren. Um Zelladhäsion oder Signalzeugung zu untersuchen, können multivalente Liganden hergestellt werden, die sich in der Dichte und Zahl der REs unterscheiden und gezielt Aggregate aus unterschiedlich vielen Rezeptoren aufbauen. Mit dieser Strategie wurde der Einfluss der stöchiometrischen Zusammensetzung auf die Rezeptorfunktion bestimmt.

4.3.1. B-Zell-Antigenrezeptoren

Der B-Zell-Antigenrezeptor (BCR) besteht aus einem Proteinkomplex und ist an der Erkennung von Antigenen und der Erzeugung von Antikörpern während der erworbenen Immunantwort beteiligt.^[23, 85, 237] Die Aktivierung der BCR-vermittelten Funktionen muss streng reguliert werden, denn eine überschießende Aktivierung kann Autoimmunerkrankungen verursachen. Es ist daher wichtig, die Minimalanforderungen für die BCR-vermittelte Aktivität zu kennen. Synthetische multivalente Liganden waren entscheidend an der Untersuchung der Rolle der Antigenstöchiometrie für die Aktivierung dieses Systems beteiligt.

In bahnbrechenden Arbeiten zum BCR-Signalsystem nutzten Dintzis et al. und andere in den 1970er und 1980er Jahren synthetische multivalente Liganden, um die Rolle der Valenz für die B-Zell-Antwort zu untersuchen.^[238–242] Die Bindung eines multivalenten Antigens an den B-Zell-Rezeptor kann das Signal der B-Zelle auslösen. Um zu prüfen,

wie die Valenz T-Zell-unabhängiger Antigene die Antikörperproduktion beeinflusst, wurden multivalente Liganden mit Polyacrylamid, Dextran, Carboxymethylcellulose oder Polyvinylalkohol als Gerüstpolymeren hergestellt.^[243] Sie wurden Mäusen injiziert, und die Effizienz der Antikörperproduktion wurde bestimmt. Unabhängig von der Gerüststruktur oder dem Ausmaß der Polymerverzweigung hing die Immunogenität der Liganden jeweils streng von der RE-Zahl ab. Aus diesen Daten leiteten die Autoren ab, dass die Anzahl der BCRs in einem Aggregat wesentlich für dessen Funktion ist. Sie schlugen außerdem vor, dass die Besetzung von rund 12 BCRs für die Aktivierung der B-Zellen erforderlich ist. In diesem komplexen System werden zwischen der Aktivierung der B-Zelle und der Antikörperproduktion viele Schritte durchlaufen. Dennoch zeigt es, wie nützlich synthetische multivalente Liganden für die Untersuchung grundlegender biologischer Fragen sind.

4.3.2. L-Selectin

Die Migration von Leukocyten aus dem Blut in die lymphatischen Gewebe hängt von der Funktion von L-Selectin ab; L-Selectin vermittelt auch die Einwanderung von Leukocyten in Entzündungsherde.^[244] L-Selectin wird an der Oberfläche der Leukocyten exprimiert und ist typischerweise in Aggregaten an den Spitzen der zellulären Mikrovilli lokalisiert (Abbildung 11).^[237, 241–246] Die natürlichen Liganden von L-Selectin sind Glycoproteine auf dem Endothel der Blutgefäße.^[247] Bindet L-Selectin an diese Liganden, so verlangsamt dies die Wanderung der Zellen durch die Gefäße und ermöglicht eine feste Anheftung der Leukocyten an das Endothel. Physiologische L-Selectin-Liganden tragen meist zahlreiche Kopien von Derivaten des sulfatierten Sialyl-Lewis-Antigens x (sLe^x); synthetische multivalente Verbindungen mit diesen und verwandten Kohlenhydrat-Epitopen haben sich ebenfalls als Selectin-Liganden bewährt.^[248–253] Die

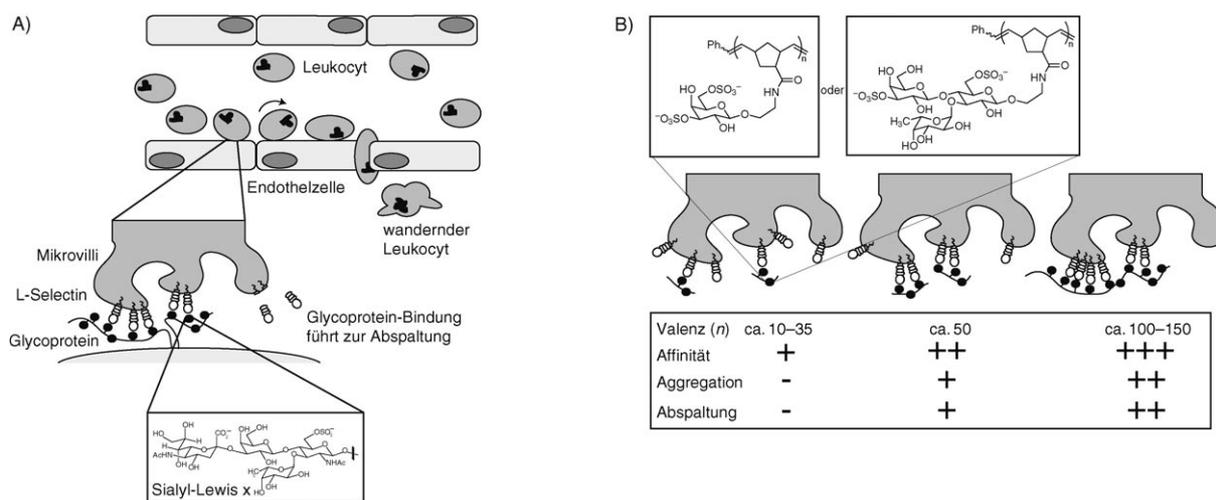


Abbildung 11. Multivalente L-Selectin-Liganden ahmen die Glycoproteine der Zelloberfläche nach. A) L-Selectin, das auf Lymphocyten exprimiert wird, bindet an Glycoproteine auf dem Endothel. Diese Wechselwirkung verlangsamt die Bewegung der Lymphocyten durch die Gefäße und löst die proteolytische Freisetzung von L-Selectin aus. B) Multivalente Polymere, die sulfatierte Kohlenhydrate tragen, binden ebenfalls mehrere Kopien von L-Selectin. Die folgende Rezeptoraggregation und proteolytische Absplattung von L-Selectin stehen direkt in Beziehung zur Valenz des Polymers, zur Anzahl gebundener L-Selectin-Proteine und zur Affinität der Wechselwirkung.

Valenz sollte bedeutsam für die L-Selectin-Funktion in vivo sein. In Experimenten mit synthetischen multivalenten Liganden wurde daher die Bedeutung der Valenz und stöchiometrischen Zusammensetzung der Selectin-Ligand-Aggregate für die L-Selectin-Erkennung untersucht.

Den Einfluss der stöchiometrischen Zusammensetzung der Rezeptoraggregate auf die Regulierung der Adhäsionsfunktion von L-Selectin zeigten Studien mit Liganden unterschiedlicher Valenz, die mithilfe von ROMP synthetisiert worden waren.^[254] Am Kettenende der Polymere wurde überdies ein Fluorophor angebracht, sodass es möglich war zu ermitteln, wieviele Kopien eines multivalenten Liganden an L-Selectin-positive Zellen binden.^[255] Beim Test dieser Verbindungen stellte sich heraus, dass die Zahl der L-Selectin-Kopien, die an ein multivalentes sulfatiertes Kohlenhydratderivat binden, von dessen Valenz abhängt (Abbildung 11).^[254] In ähnlicher Weise steht die funktionelle Affinität eines Liganden für Zellen, die L-Selectin tragen, in direkter Beziehung zu seiner Valenz. Eine Steigerung von 35 auf 150 Monomereinheiten erhöhte das Verhältnis von 1.1 auf fast 5 Kopien L-Selectin, und die funktionelle Affinität der Bindung stieg auf das Zehnfache. Folglich hängt die Adhäsionsstärke von L-Selectin von der stöchiometrischen Zusammensetzung des Selectin-Ligand-Komplexes ab.

Die Polymere binden nicht nur L-Selectin, sondern fördern auch seine proteolytische Freisetzung oder Abspaltung von der Zelloberfläche.^[256,257] Das zelluläre Signal scheint wichtig zu sein, um die Freisetzung von L-Selectin auszulösen.^[165,258] Möglicherweise aktiviert die Aggregation von L-Selectin die Signalkaskade, die zu seiner Spaltung führt; vielleicht beeinflussen auch physiologische Selectin-Liganden die Konzentration von L-Selectin in vivo. All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das stöchiometrische Verhältnis der Wechselwirkung zwischen L-Selectin und seinen Liganden die Adhäsions- und Signalfunktion des Proteins entscheidend lenkt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zelloberflächenrezeptoren vermitteln die lebenswichtigen Funktionen der Zelladhäsion und der Signalauslösung. In diesen Rollen sind die Rezeptoren allerdings nur selten als isolierte Moleküle aktiv. Stattdessen wirken sie zusammen mit anderen Verbindungen als Bestandteile makromolekularer Assoziate höherer Ordnung. Will man die Funktionsweise dieser Multirezeptorkomplexe verstehen, so müssen die Mechanismen aufgeklärt werden, die dem Zusammenwirken in den Aggregaten zugrundeliegen. Multivalente Liganden können dabei helfen, diese komplexen Beziehungen zu entwirren. Da der Einsatz synthetischer multivalenter Liganden komplementär zu anderen Methoden ist, lassen sich so neue und wichtige Fragestellungen angehen.

Über ihren Nutzen bei der Untersuchung von Rezeptorfunktionen hinaus eignen sich synthetische multivalente Liganden möglicherweise auch als Therapeutika. Ihnen stehen Bindungsmechanismen offen, die niedermolekularen Substanzen verschlossen sind. Whitesides, Collier und Mitarbeiter nutzten diesen Vorteil, um multivalente Liganden mit

Polyacrylamid-Gerüst als wirksame Inhibitoren des Anthraxtoxins zu erhalten.^[259] Der Erfolg dieser und weiterer In-vivo-Anwendungen multivalenter Liganden^[260,261] deutet darauf hin, dass sie nicht nur als Sonden für biologische Vorgänge, sondern auch als therapeutische Wirkstoffe dienen können. Abgesehen von ihrer Funktion als Inhibitoren können multivalente Liganden auch Zelloberflächenproteine aggregieren und dadurch als Effektoren wirken. Man kennt zwar viele niedermolekulare Inhibitoren, doch ist es meist erheblich schwieriger, kleine Moleküle zu finden, die als Aktivatoren wirken. Die Fähigkeit multivalenter Liganden, Signaltransduktionswege zu aktivieren, lässt hoffen, dass sie für komplementäre therapeutische Anwendungen geeignet sind.

Mit Multirezeptorkomplexen werden extrazelluläre Reize in angemessene Antworten der Zelle übersetzt. Kommunikation und Koordination zwischen den Rezeptoren verstärken, integrieren und verarbeiten die Signale. Um die Funktion biologischer Systeme aufzuklären, müssen diese Vorgänge auf molekularer Ebene verstanden sein. Mithilfe von monovalenten Liganden gelingt es zwar, solche Komplexe zu trennen, doch man kann mit ihnen nicht die Bedeutung der Komplexbildung untersuchen. Multivalente Liganden regeln dagegen die Bildung von Multiproteinkomplexen und/oder die Lokalisierung solcher Aggregate innerhalb der Zelle. Wir erwarten, dass solche Liganden, die wie niedermolekulare Substanzen zeitlich begrenzt wirken, Einblicke liefern, wie Proteinassoziation und/oder Proteinlokalisierung zelluläre Antworten steuern.

In diesem Aufsatz haben wir einige Anwendungen synthetischer multivalenter Liganden als Sonden vorgestellt. Weitere Fortschritte bei der ziel- und diversitätsorientierten Synthese werden neue multivalente Liganden für komplexere biologische Fragestellungen liefern. Solche Untersuchungen erfordern einen multidisziplinären Ansatz, der chemische und biologische Konzepte verschmilzt und die molekularen Mechanismen zellulärer Systeme aufdeckt.

Eingegangen am 7. August 2005

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] J.-P. Chaneux, J. Thiéry, Y. Tung, C. Kittel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *57*, 335.
- [2] C.-H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213.
- [3] J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 443.
- [4] J. D. Klemm, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 569.
- [5] H. Metzger, *J. Immunol.* **1992**, *149*, 1477.
- [6] J. C. Sacchettini, L. G. Baum, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3009.
- [7] F. D. Smith, J. D. Scott, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, R32.
- [8] A. Weiss, J. Schlessinger, *Cell* **1998**, *94*, 277.
- [9] J. T. Groves, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3524.
- [10] M. Mellado, J. Rodríguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernández, A. Martín de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran, C. Martínez-A, *EMBO J.* **2001**, *20*, 2497.
- [11] H. D. Madhani, *Cell* **2001**, *106*, 9.
- [12] D. J. Riese II, D. F. Stern, *BioEssays* **1998**, *20*, 41.
- [13] M. L. Dustin, A. C. Chan, *Cell* **2000**, *103*, 283.

- [14] D. Bray, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 59.
- [15] S. Tsunoda, J. Sierralta, Y. Sun, R. Bodner, E. Suzuki, A. Becker, M. Socolich, C. S. Zuker, *Nature* **1997**, *388*, 243.
- [16] E. Stein, A. A. Lane, D. P. Cerretti, H. O. Schoecklmann, A. D. Schroff, R. L. Van Etten, T. O. Daniel, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 667.
- [17] M. N. Levit, Y. Liu, J. B. Stock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6651.
- [18] M. N. Teruel, T. Meyer, *Cell* **2000**, *103*, 181.
- [19] D. A. Lauffenburger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5031.
- [20] M. B. Kennedy, *Science* **2000**, *290*, 750.
- [21] J. H. Kim, R. L. Haganir, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 248.
- [22] R. N. Germain, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, R640.
- [23] L. Matsuuchi, M. R. Gold, *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 270.
- [24] A. van der Flier, A. Sonnenberg, *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 285.
- [25] T. S. Shimizu, N. Le Novère, M. D. Levin, A. J. Beavil, B. J. Sutton, D. Bray, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 792.
- [26] D. Bray, M. D. Levin, C. J. Morton-Firth, *Nature* **1998**, *393*, 85.
- [27] P. T. Martin, *Glycobiology* **2002**, *12*, 1R.
- [28] S. Damjanovich, R. Gaspar, Jr., C. Pieri, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 67.
- [29] D. Holowka, B. Baird, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 79.
- [30] P. W. Janes, S. C. Ley, A. I. Magee, P. S. Kabouridis, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 23.
- [31] A. Cherukuri, M. Dykstra, S. K. Pierce, *Immunity* **2001**, *14*, 657.
- [32] D. A. Brown, E. London, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111.
- [33] C. Langlet, A.-M. Bernard, P. Drevot, H.-T. He, *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 250.
- [34] M. Edidin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 528.
- [35] E. D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 95.
- [36] T. E. Hébert, M. Bouvier, *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 1.
- [37] T. Bartfai, J. L. Benovic, J. Bockaert, R. A. Bond, M. Bouvier, A. Christopoulos, O. Civelli, L. A. Devi, S. R. George, A. Inui, B. Kobilka, R. Leurs, R. Neubig, J. P. Pin, R. Quirion, B. P. Roques, T. P. Sakmar, R. Seifert, R. E. Stenkamp, P. G. Strange, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 574.
- [38] P. R. Gouldson, C. R. Snell, R. P. Bywater, C. Higgs, C. A. Reynolds, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 1181.
- [39] J. R. Maddock, L. Shapiro, *Science* **1993**, *259*, 1717.
- [40] C. C. Yin, F. A. Lai, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 669.
- [41] L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Mulloy, T. L. Blundell, *Nature* **2000**, *407*, 1029.
- [42] J. Schlessinger, *Cell* **2000**, *103*, 211.
- [43] T. Brümendorf, V. Lemmon, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 611.
- [44] C. Chan, A. J. T. George, J. Stark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5758.
- [45] A. D. Douglass, R. D. Vale, *Cell* **2005**, *121*, 937.
- [46] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, *Nature* **2002**, *415*, 81.
- [47] D. J. Irvine, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 85.
- [48] I. Markovic, E. Leikina, M. Zhukovsky, J. Zimmerberg, L. V. Chernomordik, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 833.
- [49] A. H. Elcock, J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2990.
- [50] T. E. Hébert, M. Bouvier, *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 1.
- [51] M. K. Dean, C. Higgs, R. E. Smith, R. P. Bywater, C. R. Snell, P. D. Scott, G. J. G. Upton, T. J. Howe, C. A. Reynolds, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4595.
- [52] D. L. Milligan, D. E. Koshland, Jr., *Science* **1991**, *254*, 1651.
- [53] S. Terrillon, M. Bouvier, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 30.
- [54] V. Sourjik, H. C. Berg, *Nature* **2004**, *428*, 437.
- [55] S. W. Fesik, *Cell* **2000**, *103*, 273.
- [56] H. Wu, *Cell Surf. Recept.* **2004**, *68*, 225.
- [57] J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 531.
- [58] E. W. Yu, D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9517.
- [59] T. L. Blundell, D. F. Burke, D. Chirgadze, V. Dhanaraj, M. Hyvonen, C. A. Innis, E. Parisini, L. Pellegrini, B. L. Sayed, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 955.
- [60] P. J. Gardina, M. D. Manson, *Science* **1996**, *274*, 425.
- [61] I. Tatsuno, M. Homma, K. Oosawa, I. Kawagishi, *Science* **1996**, *274*, 423.
- [62] P. Ames, C. A. Studdert, R. H. Resier, J. S. Parkinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7060.
- [63] S.-H. Kim, W. Wang, K. K. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11611.
- [64] P. A. Thomason, P. M. Wolanin, J. B. Stock, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, R399.
- [65] A. Ullrich, J. Schlessinger, *Cell* **1990**, *61*, 203.
- [66] F. Alderton, S. Rakhit, K. C. Kong, T. Plamer, B. Sambhi, S. Pyne, N. J. Pyne, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28578.
- [67] F. Liu, Q. Wan, Z. B. Pristupa, Y. T. Yu, H. B. Niznik, *Nature* **2000**, *403*, 274.
- [68] C. C. Garner, J. Nash, R. L. Haganir, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 274.
- [69] T. Pawson, P. Nash, *Science* **2003**, *300*, 445.
- [70] M. Sheng, C. Sala, *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 1.
- [71] S. N. Gomperts, *Cell* **1996**, *84*, 659.
- [72] K. E. Prehoda, W. A. Lim, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 149.
- [73] W. A. Lim, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 61.
- [74] P. Friedl, A. T. den Boer, M. Gunzer, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 532.
- [75] M. F. Krummel, M. M. Davis, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 66.
- [76] R. N. Germain, I. Stefanova, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 467.
- [77] E. O. Long, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 875.
- [78] M. L. Hermiston, Z. Xu, R. Majeti, A. Weiss, *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 9.
- [79] L. Tuosto, I. Parolini, S. Schröder, M. Sargiacomo, A. Lanza-vecchia, A. Viola, *Eur. J. Immunol.* **2001**, *32*, 345.
- [80] P. A. van der Merwe, S. J. Davis, A. S. Shaw, M. L. Dustin, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 5.
- [81] A. Viola, S. Schroeder, Y. Sakakibara, A. Lanzavecchia, *Science* **1999**, *283*, 680.
- [82] S. K. Bromley, W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, M. L. Dustin, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 375.
- [83] Y. M. Vyas, K. M. Mehta, M. Morgan, H. Maniar, L. Butros, S. Jung, J. K. Burkhardt, B. Dupont, *J. Immunol.* **2001**, *167*, 4358.
- [84] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696.
- [85] J. I. Healy, C. C. Goodnow, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 645.
- [86] A. R. Asthagiri, D. A. Lauffenburger, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2*, 31.
- [87] T. Ideker, T. Galitski, L. Hood, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 343.
- [88] S. Krauss, M. D. Brand, *FASEB J.* **2000**, *14*, 2581.
- [89] J. Matko, M. Edidin, *Methods Enzymol.* **1997**, *278*, 444.
- [90] C. Philipona, Y. Chevolut, D. Léonard, H. J. Mathieu, H. Sigrist, F. Marquis-Weible, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 332.
- [91] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906.
- [92] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 444.
- [93] F. S. Wouters, P. J. Vermeer, P. I. H. Bastiaens, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 203.
- [94] Y. Liu, L. Xu, N. Opalka, J. Kappler, H.-B. Shu, G. Zhang, *Cell* **2002**, *108*, 383.
- [95] D. C. Tully, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **2001**, 1229.
- [96] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692.

- [97] N. V. Bovin, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 431.
- [98] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- [99] R. Roy, D. Page, S. F. Perez, V. V. Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251.
- [100] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- [101] L. L. Kiessling, L. E. Strong, *Top. Organomet. Chem.* **1998**, *1*, 199.
- [102] T. Kenakin, *FASEB J.* **2001**, *15*, 598.
- [103] M. D. Carrithers, M. R. Lerner, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 537.
- [104] M. B. Macek, L. C. Lopez, B. D. Shur, *Dev. Biol.* **1991**, *147*, 440.
- [105] H. Schneider, W. Chaovapong, D. J. Matthews, C. Karkaria, R. T. Cass, H. J. Zhan, M. Boyle, T. Lorenzini, S. G. Elliot, L. B. Giebel, *Blood* **1997**, *89*, 473.
- [106] D. Somjen, Y. Amirzaltsman, B. Gayer, G. Mor, N. Jaccard, Y. Weisman, G. Barnard, F. Kohen, *J. Endocrinol.* **1995**, *145*, 409.
- [107] I. A. Graef, L. J. Holsinger, S. Diver, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *EMBO J.* **1997**, *16*, 5618.
- [108] C. Torigoe, J. K. Inman, H. Metzger, *Science* **1998**, *281*, 568.
- [109] H. Nishizumi, K. Horikawa, I. Mlinaric-Rascan, T. Yamamoto, *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 1343.
- [110] D. Wright, L. Usher, *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 1107.
- [111] Y. Liu, X. Hong, J. Kappler, L. Jiang, R. Zhang, L. Xu, C.-H. Pan, W. Martin, R. C. Murphy, H.-B. Shu, S. Dai, G. Zhang, *Nature* **2003**, *423*, 49.
- [112] H. M. Kim, K. S. Yu, M. E. Lee, D. R. Shin, Y. S. Kim, S.-G. Paik, O. J. Yoo, H. Lee, J.-O. Lee, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 342.
- [113] R. Sasisekharan, G. Venkataraman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 626.
- [114] J. D. Esko, U. Lindahl, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 169.
- [115] L. L. Kiessling, L. E. Strong, J. E. Gestwicki, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 321.
- [116] P. A. Clemons, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 112.
- [117] P. S. Portoghese, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2259.
- [118] D. L. Boger, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 557.
- [119] H. E. Blackwell, P. A. Clemons, S. L. Schreiber, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1185.
- [120] M. Pattarawarapan, K. Burgess, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4469; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4299.
- [121] J. Goldberg, Q. Jin, S. Satoh, J. Desharnais, K. Capps, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 544.
- [122] M. J. Krantz, N. A. Holtzman, C. P. Stowell, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3963.
- [123] Y. C. Lee, C. P. Stowell, M. J. Krantz, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3956.
- [124] E. Gillitzer, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *Chem. Commun.* **2002**, 2390.
- [125] Q. Wang, T. Lin, L. Tang, E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459.
- [126] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718.
- [127] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, L. G. Griffith, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677.
- [128] N. Paran, B. Geiger, Y. Shaul, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4443.
- [129] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11782.
- [130] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 356.
- [131] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 782.
- [132] M. Mrksich, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267.
- [133] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140.
- [134] D. Lévy, A. Bluzat, M. Seigneuret, J.-L. Rigaud, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1025*, 179.
- [135] F. M. Menger, J. S. Keiper, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 726.
- [136] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7.
- [137] Y. Kim, S. C. Zimmerman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 733.
- [138] Y. Aoyama, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 588.
- [139] M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742.
- [140] W. B. Turnbull, S. A. Kalovidouris, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2988.
- [141] T. K. Lindhorst, *Host-Guest Chem.* **2002**, *218*, 201.
- [142] C.-H. Lin, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8031.
- [143] N. V. Bovin, H.-J. Gabius, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 413.
- [144] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271.
- [145] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- [146] D. J. Irvine, A.-V. G. Ruzette, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 545.
- [147] B. R. Griffith, B. L. Allen, A. C. Rapraeger, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1608.
- [148] V. Ladmiral, E. Melia, D. M. Haddleton, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 431.
- [149] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275.
- [150] T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18.
- [151] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931.
- [152] A. D. Schlüter, J. P. Rabe, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 860; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 864.
- [153] J. K. Pontrello, M. J. Allen, E. S. Underbakke, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14536.
- [154] L. E. Strong, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6193.
- [155] D. D. Manning, L. E. Strong, X. Hu, P. J. Beck, L. L. Kiessling, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11937.
- [156] H. Arimoto, K. Nishimura, T. Kinumi, I. Hayakawa, D. Uemura, *Chem. Commun.* **1999**, 1361.
- [157] V. C. Gibson, E. L. Marshall, M. North, D. A. Robson, P. J. Williams, *Chem. Commun.* **1997**, 1095.
- [158] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297.
- [159] D. M. Lynn, B. Mohr, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1627.
- [160] E. L. Dias, S. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3887.
- [161] C. Fraser, R. H. Grubbs, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7248.
- [162] K. H. Mortell, M. Gingras, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10253.
- [163] S. Iyer, S. Rele, G. Grasa, S. Nolan, E. L. Chaikof, *Chem. Commun.* **2003**, 1518.
- [164] D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10575.
- [165] E. J. Gordon, W. J. Sanders, L. L. Kiessling, *Nature* **1998**, *392*, 30.
- [166] C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615.
- [167] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922.
- [168] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964.
- [169] W. J. Hoekstra, B. L. Poulter, *Curr. Med. Chem.* **1998**, *5*, 195.
- [170] S. R. Wilson, A. W. Czarnik, *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Applications*, Wiley, New York, **1997**.
- [171] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, *Biopolymers* **2001**, *60*, 171.
- [172] J. A. Ellman, M. A. Gallop, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 317.
- [173] M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 405.
- [174] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4508; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4348.
- [175] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71.

- [176] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046.
- [177] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669.
- [178] Z. Zhang, E. A. Merritt, M. Ahn, C. Roach, Z. Hu, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991.
- [179] E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663.
- [180] A. L. Banerjee, D. Eiler, B. C. Roy, X. Jia, M. K. Haldar, S. Mallik, D. K. Srivastava, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3211.
- [181] S. Howorka, J. Nam, H. Bayley, D. Kahne, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 860; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 842.
- [182] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179.
- [183] M. P. Sheetz, D. P. Felsenfeld, C. G. Galbraith, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 51.
- [184] M. A. Schwartz, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 466.
- [185] S. M. Schoenwaelder, K. BurrIDGE, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 274.
- [186] D. Bouvard, C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Aszódi, T. Bengtsson, A. Berna, R. Fässler, *Circ. Res.* **2001**, *89*, 211.
- [187] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673.
- [188] R. H. Li, N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J. W. Weisel, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *Science* **2003**, *300*, 795.
- [189] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019.
- [190] I. A. Graef, F. Chen, A. Kuo, G. R. Crabtree, *Cell* **2001**, *105*, 863.
- [191] A. S. Yap, W. M. Briehner, M. Pruschy, B. M. Gumbiner, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 308.
- [192] S. K. Muthuswamy, M. Gilman, J. S. Brugge, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6845.
- [193] J. F. Amara, T. Clackson, V. M. Rivera, T. Guo, T. Keenan, S. Natesan, R. Pollock, W. Yang, N. L. Courage, D. A. Holt, M. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10618.
- [194] P. A. Clemons, B. G. Gladstone, A. Seth, E. D. Chao, M. A. Foley, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 49.
- [195] T. Hato, N. Pampori, S. J. Shattil, *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 1685.
- [196] N. J. Boudreau, P. L. Jones, *Biochem. J.* **1999**, *339*, 481.
- [197] E. R. Welsh, D. A. Tirrell, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 23.
- [198] D. G. Stupack, E. Li, S. A. Silletti, J. A. Kehler, R. L. Geahlen, K. Hahn, G. R. Nemerow, D. A. Cheresh, *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 777.
- [199] S. R. George, B. F. O'Dowd, S. P. Lee, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 808.
- [200] M. Mellado, J. Rodríguez-Frade, S. Mañes, C. Martínez-A, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 397.
- [201] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710.
- [202] G. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660.
- [203] B. P. England, P. Balasubramanian, I. Uings, S. Bethell, M.-J. Chen, P. J. Schatz, Q. Yin, Y.-F. Chen, E. A. Whitehorn, A. Tsavaler, C. L. Martens, R. W. Barrett, M. McKinnon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6862.
- [204] Y. He, J. W. Karpen, *Biochemistry* **2001**, *40*, 286.
- [205] J. M. Paar, N. T. Harris, D. Holowka, B. Baird, *J. Immunol.* **2003**, *169*, 856.
- [206] D. Chan, L. Gera, J. Stewart, B. Helfrich, M. Verella-Garcia, G. Johnson, A. Baron, J. Yang, J. P. Bunn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4608.
- [207] R. G. Bhushan, S. K. Sharma, Z. Xie, D. J. Daniels, P. S. Portoghesi, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2969.
- [208] M. Miyazaki, H. Kodama, I. Fujita, Y. Hamasaki, S. Miyazaki, M. Kondo, *J. Biochem.* **1995**, *117*, 489.
- [209] K. Yano, S. Kimura, Y. Imanishi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *7*, 41.
- [210] L. He, J. Fong, M. von Zastrow, J. L. Whistler, *Cell* **2002**, *108*, 271.
- [211] M. L. Dustin, *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 155.
- [212] W. W. A. Schamel, I. Arechaga, R. M. Risueno, H. M. van Santen, P. Cabezas, C. Risco, J. M. Valpuesta, B. Alarcon, *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 493.
- [213] J. J. Boniface, J. D. Rabinowitz, C. Wülfing, J. Hampl, Z. Reich, J. D. Altman, R. M. Kantor, C. Beeson, H. M. McConnell, M. M. Davis, *Immunity* **1998**, *9*, 459.
- [214] J. R. Cochran, D. Aivazian, T. O. Cameron, L. J. Stern, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 304.
- [215] J. R. Cochran, L. J. Stern, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 683.
- [216] S. Miyamoto, S. K. Akiyama, K. M. Yamada, *Science* **1995**, *267*, 883.
- [217] J. A. Hubbell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 123.
- [218] B. Lowin-Kropf, V. S. Shapiro, A. Weiss, *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 861.
- [219] C. R. F. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, A. Kupfer, *Nature* **1998**, *395*, 82.
- [220] J. Stock, M. Levit, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R11.
- [221] G. L. Hazelbauer, H. C. Berg, P. Matsumura, *Cell* **1993**, *73*, 15.
- [222] J. J. Falke, R. B. Bass, S. L. Butler, S. A. Chervitz, M. A. Danielson, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 457.
- [223] R. Jasuja, Y. Lin, D. R. Trentham, S. Khan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11346.
- [224] A. M. Stock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10945.
- [225] J. P. Armitage, C. J. Dorman, K. Hellingwerf, R. Schmitt, D. Summers, B. Holland, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 583.
- [226] X. Feng, J. W. Baumgartner, G. L. Hazelbauer, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6714.
- [227] B. A. Mello, Y. Tu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8223.
- [228] J. E. Gestwicki, A. C. Lamanna, R. M. Harshey, L. L. McCarter, L. L. Kiessling, J. Adler, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6499.
- [229] K. K. Kim, H. Yokota, S. H. Kim, *Nature* **1999**, *400*, 787.
- [230] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, D. A. Mann, R. M. Owen, L. L. Kiessling, *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 149.
- [231] V. Sourjik, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 569.
- [232] R. S. Syed, S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheetham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, J. Finer-Moore, S. Elliott, K. Sitney, B. A. Katz, D. J. Matthews, J. J. Wendoloski, J. Egrie, R. M. Stroud, *Nature* **1998**, *395*, 511.
- [233] J. E. Dueber, B. J. Yeh, R. P. Bhattacharyya, W. A. Lim, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 690.
- [234] M. Beyermann, S. Rothemund, N. Heinrich, K. Fecher, J. Ferkert, M. Dathe, R. Winter, E. Krause, M. Bienert, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5702.
- [235] D. Qin, R. Sullivan, W. F. Berkowitz, R. Bittman, S. A. Rotenberg, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1413.
- [236] S. H. Park, A. Zarrinpar, W. A. Lim, *Science* **2003**, *299*, 1061.
- [237] P. Hasler, M. Zouali, *FASEB J.* **2001**, *15*, 2085.
- [238] H. M. Dintzis, R. Z. Dintzis, B. Vogelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3671.
- [239] R. Z. Dintzis, B. Vogelstein, H. M. Dintzis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 884.
- [240] B. Sulzer, A. S. Perelson, *Mol. Immunol.* **1997**, *34*, 63.
- [241] P. K. A. Mongini, C. A. Blessinger, P. F. Highlet, J. K. Inman, *J. Immunol.* **1992**, *148*, 3892.
- [242] G. Ragupathi, L. Howard, S. Capello, R. R. Koganty, D. Qiu, B. M. Longnecker, M. A. Reddish, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, *48*, 1.
- [243] R. Z. Dintzis, M. Okajima, M. H. Middleton, G. Greene, H. M. Dintzis, *J. Immunol.* **1989**, *143*, 1239.
- [244] R. P. McEver, K. L. Moore, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11025.
- [245] S. R. Hasslen, U. H. von Andrian, E. C. Butcher, R. D. Nelson, S. L. Erlandsen, *Histochem. J.* **1995**, *27*, 547.

- [246] S. R. Hasslen, A. R. Burns, S. I. Simon, W. Smith, K. Starr, A. N. Barclay, S. A. Michie, R. D. Nelson, S. L. Erlandsen, *J. Histochem. Cytochem.* **1996**, *44*, 1115.
- [247] S. D. Rosen, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 129.
- [248] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833.
- [249] G. Thoma, R. O. Duthaler, J. L. Magnani, J. T. Patton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10113.
- [250] G. Thoma, J. T. Patton, J. L. Magnani, B. Ernst, R. Ohrlein, R. O. Duthaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5919.
- [251] D. D. Manning, X. Hu, P. Beck, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3161.
- [252] W. J. Sanders, E. J. Gordon, O. Dwir, P. J. Beck, R. Alon, L. L. Kiessling, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5271.
- [253] R. Stahn, H. Schäfer, F. Kernchen, J. Schreiber, *Glycobiology* **1998**, *8*, 311.
- [254] R. M. Owen, J. E. Gestwicki, T. Young, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2295.
- [255] E. J. Gordon, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, L. L. Kiessling, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 9.
- [256] E. J. Gordon, L. E. Strong, L. L. Kiessling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1293.
- [257] P. Mowery, Z. Q. Yang, E. J. Gordon, O. Dwir, A. G. Spencer, R. Alon, L. L. Kiessling, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 725.
- [258] E. J. Gordon, L. E. Strong, L. L. Kiessling, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1293.
- [259] M. Mourez, R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, R. J. Collier, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 958.
- [260] L. Bracci, L. Lozzi, A. Pini, B. Lelli, C. Falciani, N. Niccolai, A. Bernini, A. Spreafico, P. Soldani, P. Neri, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10194.
- [261] G. W. Byrne, A. Schwarz, J. R. Fesi, P. Birch, A. Nepomich, I. Bakaj, M. A. Velardo, C. Jiang, A. Manzi, H. Dintzis, L. E. Diamond, J. S. Logan, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 571.
- [262] Y. Minamoto, T. Hato, S. Nakatani, S. Fujita, *Thromb. Haemost.* **1996**, *76*, 1072-1079.
- [263] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, unveröffentlichte Ergebnisse.



GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

Ausschreibung der Georg-Manecke-Stiftung

Die zum Andenken an einen der Pioniere der Polymerforschung, Professor Dr. Georg Manecke, bei der Gesellschaft Deutscher Chemiker eingerichtete "Georg-Manecke-Stiftung" fördert den wissenschaftlichen Nachwuchs auf dem Gebiet der Polymerwissenschaften, insbesondere Synthese und Umwandlung makromolekularer Stoffe sowie deren biochemische und biotechnische Anwendung. Die Stiftung vergibt im Jahre 2006 ein **Stipendium** in Höhe von 8.000,- EUR an eine/n Doktorand/in bzw. Postdoktorand/in bevorzugt aus einem mittel- oder osteuropäischen Land. Der/die Stipendiat/in soll an einer deutschen Hochschule oder anderen Forschungseinrichtung für einen Zeitraum von nicht unter sechs Monaten wissenschaftlich arbeiten. Die GDCh ist bei der Auswahl der Gasteinrichtung bei Bedarf behilflich.

Kontakt

Gesellschaft
Deutscher Chemiker
Abt. Preise und Auszeichnungen
60444 Frankfurt a. M.

E-Mail: b.koehler@gdch.de

Tel. 069/79 17-323

Fax: 069/7917-307

Bewerbungen mit den üblichen Unterlagen (Lebenslauf, Zeugnisse, wissenschaftliches Arbeitsgebiet, Schriftenverzeichnis, mindestens zwei Referenzen) sind bis zum **30. Juni 2006** zu richten an:

Gesellschaft Deutscher Chemiker, Kuratorium der "Georg-Manecke-Stiftung", Postfach 90 04 40, 60444 Frankfurt am Main.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Barbara Köhler, E-Mail: b.koehler@gdch.de, Tel. 069 7917-323.