

Interaktionen von LN-Modulen zur Ausbildung von Laminin-Netzwerken

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von
Uwe Odenthal
aus Köln**

Köln 2002

Berichterstatter:

**Prof. Dr. M. Paulsson
Prof. Dr. D. Schomburg**

Tag der mündlichen Prüfung:

14.02.2003

Meinen Eltern

Kurzzusammenfassung

Die Ausbildung eines Laminin-Netzwerks ist ein notwendiger Schritt während der Entwicklung von Basalmembranen (Smyth et al., 1999; Li et al., 2002). Experimente mit proteolytischen Fragmenten von Laminin-1 zeigten, daß die für die Laminin-Polymerisation verwendeten Bindungsstellen in den N-terminalen Domänen der Laminin-Ketten liegen und es wurde ein Modell der Laminin-Polymerisation aufgestellt (Yurchenco & Cheng, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die N-terminalen Domänen von acht Laminin-Ketten rekombinant exprimiert. Eine Charakterisierung der Proteine mittels N-terminaler Sequenzierung, Western-Blot, Massenspektrometrie, CD-Spektroskopie und nativer Gelelektrophorese zeigte, daß es sich um intakte Proteine handelt. Für fünf der acht Laminin-Ketten konnte außerdem durch CD-Spektroskopie eine Bindung von zweiwertigen Kationen, vermutlich Calcium, nachgewiesen werden. Die durch EDTA verursachte Veränderung der Sekundärstruktur konnte jedoch in keinem Fall vollständig durch Zugabe von verschiedenen zweiwertigen Kationen umgekehrt werden. Weiterhin konnte für alle exprimierten Proteine eine N-Glykosylierung nachgewiesen werden.

Um ein umfassendes Bild der an der Laminin-Polymerisation verschiedener Isoformen beteiligten Interaktionen zu erhalten, wurden alle 36 möglichen Interaktionen zwischen den acht exprimierten N-terminalen Domänen mittels Biacore untersucht und mit dem Luminex-Suspensions-Assay bestätigt. Zusätzlich wurden noch Cross-Linking-Experimente in Lösung durchgeführt. Das aus den Interaktionsstudien hervorgehende Bindungsmuster ist viel komplexer als im Modell beschrieben und der entscheidende Unterschied ist, daß fünf der acht N-terminalen Domänen eine Selbstinteraktion zeigen. Für diese konnte durch Cross-Linking Experimente nicht nur die Ausbildung von dimeren sondern auch trimeren und noch größeren Komplexen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend verdeutlichen die Bindungsstudien, daß das existierende Modell der Laminin-Polymerisation zu starr und unvollständig ist, weshalb die Netzwerkbildung einzelner Laminin-Isoformen falsch beschrieben wird. Mit den neuen Erkenntnissen ist es theoretisch möglich, unterschiedliche Netzwerke zu erklären, was mit dem alten Modell unmöglich war.

Entscheidend für das Verständnis der Laminin-Polymerisation ist es, die Struktur einer N-terminalen Domäne zu lösen. Aus diesem Grund wurde - bis zum jetzigen Zeitpunkt ohne Erfolg - versucht, eine N-terminale Domäne zu kristallisieren.

Abstract

The formation of laminin-networks is an essential step during development of basement membranes (Smyth et al., 1999; Li et al., 2002). Experiments with proteolytic fragments of laminin-1 showed that the binding-sites used for the laminin-polymerization are located within the N-terminal domains and a model for laminin-polymerization was proposed (Yurchenco & Cheng, 1993).

Within this work recombinant N-terminal domains from eight laminin chains were expressed. The proteins were intact as was proved by N-terminal sequencing, western-blot, massspectrometry, CD-spectroscopy and native gel-electrophoresis. For five out of eight laminin-chains a binding of divalent cations, probably calcium, was shown by CD-spectroscopie. However the change in secondary-structure caused by EDTA could not be reversed by addition of different divalent cations. Furthermore it was confirmed that all expressed proteins were N-glycosylated.

To get an overall view of the interactions leading to the polymerization of different laminin-isoforms all 36 possible interactions between the eight expressed N-terminal domains were analyzed by Biacore and reproduced by Luminex-Suspension-Assay. Further cross-linking experiments were performed in solution. The interaction studies revealed a more complex binding pattern than described in the model (Yurchenco & Cheng, 1993). The significant difference is that five of the eight N-terminal domains self-interact and cross-linking experiments for those demonstrated the formation of dimeric, trimeric and even higher complexes.

Taken together the binding studies indicate that the existing model of the laminin-polymerization is too inflexible and incomplete. As a consequence the network-formation of some laminin-isoforms is described wrongly. With the new results it is theoretically possible to explain different networks which was not possible with the old model.

For the understanding of the laminin-polymerization it is necessary to solve the structure of one N-terminal domain. For this reason we tried, as yet unsuccessfully, to crystallize a laminin N-terminal domain.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die extrazelluläre Matrix	1
1.2	Die Basalmembran	1
1.3	Laminin	6
1.3.1	Struktur der Laminine	6
1.3.2	Zusammenlagerung und Sekretion der Laminin-Ketten	12
1.3.3	Funktion der Laminine	13
1.3.4	Laminin-Rezeptoren	14
1.3.5	Laminin-Polymerisation	15
1.4	Aufgabenstellung	21
2	Ergebnisse	23
2.1	Expression der N-terminalen Domänen	23
2.1.1	Synthese der cDNA	24
2.1.2	Sequenzierung	25
2.1.3	Überexpression in 293-EBNA Zellen	26
2.2	Proteinaufreinigung	28
2.3	Charakterisierung der rekombinanten Proteine	30
2.3.1	Identifizierung der Proteine	32
2.3.2	Massenspektrometrie	33
2.3.3	Deglykosylierung	35
2.3.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.3.5	CD-Spektroskopie	39
2.4	Interaktionsstudien	41
2.4.1	Oberflächen-Plasmon-Resonanz	41
2.4.2	LiquiChip Suspensions Assay	51
2.4.3	Cross-Linking von LN-Domänen	53
2.5	Kristallisationsversuche	57

3	Diskussion	61
3.1	Expression der N-terminalen Domänen	61
3.2	Proteinaufreinigung	63
3.3	Charakterisierung der rekombinanten Proteine	64
3.4	Interaktionsstudien	67
3.4.1	Oberflächen-Plasmon-Resonanz	67
3.4.2	Luminex-Suspensions-Assay	69
3.4.3	Cross-Linking	71
3.5	Kristallisation	72
3.6	Das Modell der Laminin-Polymerisation	75
4	Zusammenfassung und Ausblick	81
5	Material und Methoden	85
5.1	Molekularbiologische Methoden	85
5.1.1	RNA Isolierung	85
5.1.2	Reverse Transkription (RT)	85
5.1.3	PCR	86
5.1.4	Gerichtete Einführung von Punktmutationen	86
5.1.5	Transformation	86
5.1.6	Isolierung von Plasmiden aus Bakterien	86
5.1.7	DNA-Reinigung	86
5.1.8	DNA Sequenzierung	87
5.2	Zellkultur	87
5.2.1	Kultivierung von 293 EBNA Zellen	87
5.2.2	Transfektion und Selektion	87
5.2.3	Einfrieren, Lagerung und Auftauen	88
5.2.4	Gewinnung serumfreien Zellkulturüberstandes	88
5.3	Proteinchemie	88
5.3.1	TCA(Trichloressigsäure)-Fällung	88
5.3.2	His-Tag Reinigung	89
5.3.3	Strep-Tag Reinigung	89
5.3.4	Ionenaustausch-Chromatographie	90
5.3.5	Gelfiltration	90
5.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	91
5.3.7	Biacore	91
5.3.8	N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie	92
5.3.9	LiquiChip	92

5.3.10	Deglykosylierung	93
5.3.11	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	93
5.3.12	CD-Spektroskopie	93
5.3.13	Cross-Linking	93
5.3.14	Dynamische Lichtstreuung	93
5.3.15	Kristallisation	94
6	Literaturverzeichnis	95
A	Anhang	107
A.1	Abkürzungsverzeichnis	107
A.2	Primer	108
A.3	Danksagung	111
A.4	Lebenslauf	113
A.5	Erklärung	115

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein Geflecht aus Makromolekülen, welches die Mehrzahl der Zellen in höheren Organismen umgibt. Sie grenzt direkt an Epithel- bzw. Endothelgewebe und umschließt alle Zellen des Bindegewebes (Vracko et al., 1974). Auf diese Weise bestimmt die ECM die Morphologie, Orientierung, Differenzierung und den Stoffwechsel dieser Zellen. Hervorgerufen wird dieser Einfluß durch spezifische Zellrezeptoren der Matrixkomponenten. Der durch die Rezeptoren vermittelte Kontakt zwischen Zelle und ECM ermöglicht der Zelle jedoch auch eine Beeinflussung der sie umgebenden Makromoleküle. Es besteht demzufolge eine dynamische Wechselwirkung zwischen extrazellulärer Matrix und intrazellulären Vorgängen, die während der Embryogenese und bei Wachstums-, Entzündungs- oder Wundheilungsprozessen eine Schlüsselrolle spielen.

1.2 Die Basalmembran

Eine spezialisierte Form der ECM sind Basalmembranen. Diese dünnen Schichten (40 bis 120nm) extrazellulärer Matrix besitzen viele wichtige Funktionen. Eine offensichtliche Aufgabe ist es, Zellen vom Gewebe abzugrenzen (Abb. 1.1). Aus diesem Grund umschließen Basalmembranen Muskelzellen und trennen Epithelzellen vom darunter liegenden Bindegewebe (Abb 1.2). Der strukturelle Aspekt einer Basalmembran steht immer im Zusammenhang mit einer funktionellen Rolle. In der Niere z.B. dient die Basalmembran zwischen Epithelzellen des Nierenglomerulus und Endothelzellen der Arterien als makromolekularer Filter (Abb. 1.2).

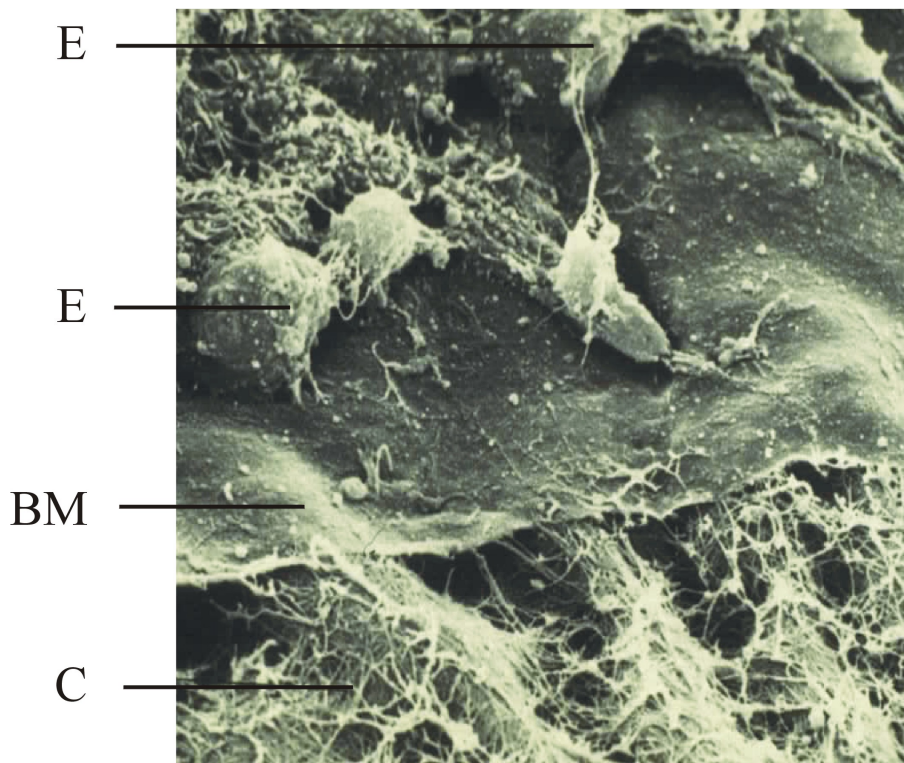


Abbildung 1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von der Basalmembran in der Hornhaut eines Hühnerembryos (Trelstad et al., 1974). Die Basalmembran (BM) trennt Epithelzellen (E) und Bindegewebe, von welchem Kollagen-Fibrillen (C) zu sehen sind.

Die den Basalmembranen zugeschriebenen Funktionen reichen deutlich weiter, beruhen aber größtenteils nicht auf Untersuchungen der ganzen Struktur sondern einzelner Komponenten. Zu diesen gehören immer Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Perlecan. Eine zeit- und gewebespezifische Expression dieser zum Teil in mehreren Isoformen vorkommenden Proteine führt zu Basalmembranen mit unterschiedlichen Funktionen.

Einen Einfluß auf Entwicklung und Wachstum verschiedenster Gewebe und Nerven (Forsten et al., 1997) konnte dem Heparansulfat Proteoglykan Perlecan nachgewiesen werden. Dieses fungiert durch seine Bindung von Wachstumsfaktoren als Wachstumsfaktor-Reservoir und beeinflusst deren Aktivität als Kofaktor (Aviezer et al., 1994; Walz et al., 1997). Eine variable Affinität zu unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) oder TGF (transforming growth factor) resultiert aus einer veränderten Glykosylierung des Perlecans (Joseph et al., 1996).

Weiterhin ermöglicht die Bindung einzelner Basalmembran-Moleküle an Rezeptoren einen direkten Einfluß auf Migration und Adhesion von Zellen (Ryan et al., 1996). Diese Vorgänge sind entscheidend bei der Entwicklung des Gewebes bzw.

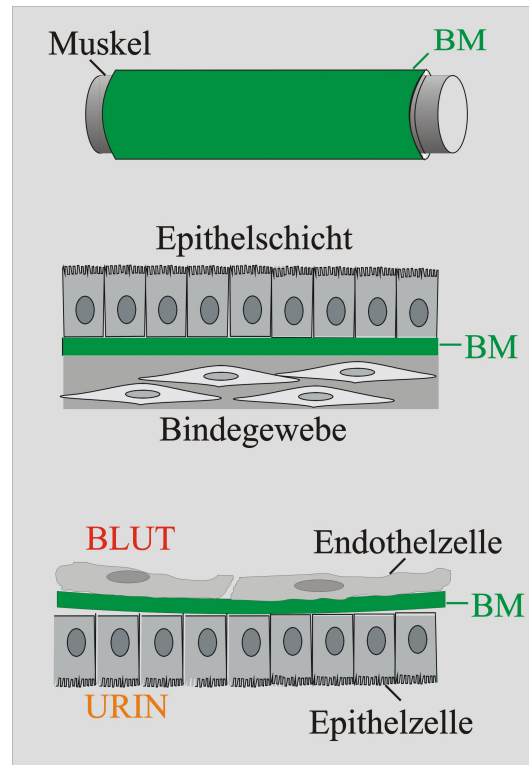


Abbildung 1.2: Drei verschiedene Arten von Basalmembranen. Diese umgeben z.B. Muskelzellen und trennen Epithelzellen vom Bindegewebe oder fungieren als makromolekularer Filter zwischen Epithelzellen des Nierenglomerulus und Endothelzellen der Arterien.

Reorganisation der Gewebearchitektur nach einer Verletzung. Auch die Migration und Zielsteuerung von Axonen ist abhängig von Basalmembranen. Für Laminin wurde weiterhin gezeigt, daß es an der Regeneration von peripheren Motoneuronen beteiligt ist (Martin et al., 1995).

In vitro Experimente mit den Komponenten der Basalmembranen haben zur Aufstellung eines Modells (Abb. 1.3) der molekularen Zusammensetzung von Basalmembranen geführt (Yurchenco et al., 1992). Demzufolge besteht die Basalmembran aus einem Kollagen IV- und einem Laminin-Netzwerk, welche durch das 150 kDa große Glykoprotein Nidogen nicht kovalent verknüpft werden (Aumailley et al., 1989; Ekblom et al., 1994). Nidogen vermittelt weiterhin die Bindung anderer Basalmembranproteine wie z.B. Perlecan an die Matrix (Reinhardt et al., 1993).

Eine Deletion von Kollagen IV (Pöschl E., persönliche Mitteilung) führt zwischen Tag acht und zehn der embryonalen Mausentwicklung zu einem letalen Phänotyp. Dieser wird hervorgerufen durch Defekte in Basalmembranen, welche z.B. zu einer Schwächung des Herzens führen. Die ersten Basalmembranen werden

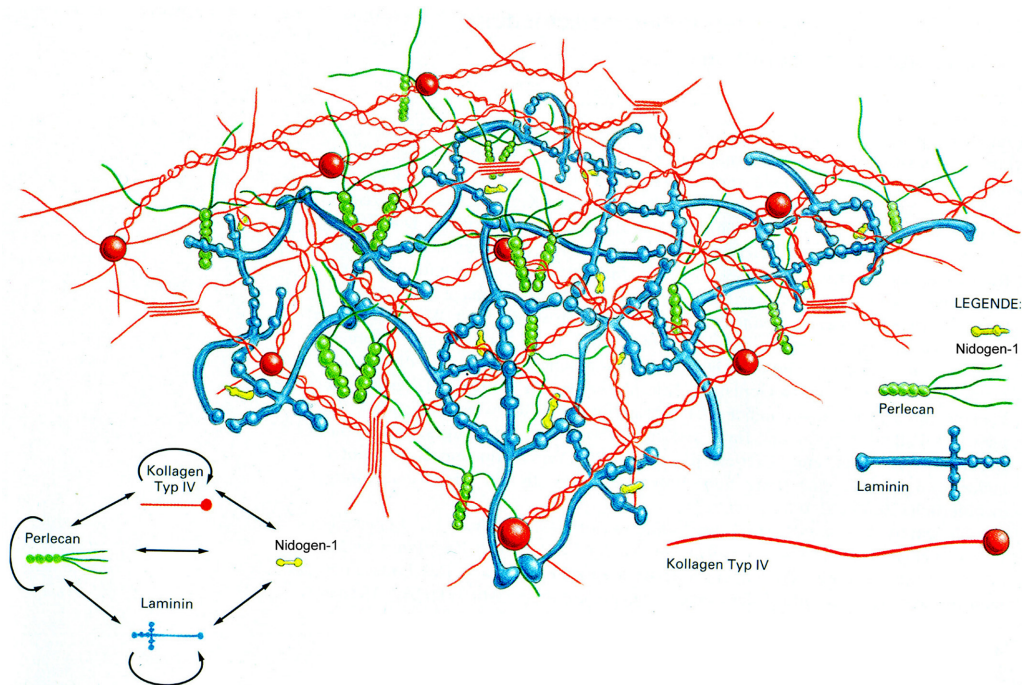


Abbildung 1.3: Modell der molekularen Zusammensetzung von Basalmembranen (entnommen aus Yurchenco & Schittny (1990) und modifiziert). Das Kollagen IV-Netzwerk (rot) und das Laminin-Netzwerk (blau) werden über Nidogen (gelb) verknüpft. Perlecan (grün), ein Heparansulfat Proteoglykan, bindet an Kollagen IV, Laminin, Nidogen und an sich selbst.

bereits am Tage 5.5 post conceptum unter dem Trophektoderm und zwischen der inneren Zellmasse und dem viszeralem Endoderm gebildet, weshalb Kollagen IV nicht essentiell für deren Bildung sein kann.

Die nicht fibrillären Kollagene vom Typ IV sind trimere Moleküle mit einer heterogenen Zusammensetzung aus den Ketten $\alpha 1(\text{IV})$ bis $\alpha 6(\text{IV})$ (Soininen et al., 1988; Mariyama et al., 1994; Leinonen et al., 1994; Zhou et al., 1994). Am häufigsten sind Trimere der Zusammensetzung $[\alpha 1(\text{IV})_2\alpha 2(\text{IV})]$, welche ubiquitär in Basalmembranen vorkommen (Hudson et al., 1993). Typ IV Kollagene besitzen N-terminal eine 7S- und C-terminal eine NC1-Domäne. Diese beiden nicht-kollagenen Domänen, welche für die Netzwerkbildung verantwortlich sind, werden von einer zentralen 350 nm langen Tripelhelix verbunden. Über die 7S-Domäne werden vier Kollagen-Moleküle zu einem Tetramer verknüpft, das wiederum über die NC1-Domänen mit vier weiteren Tetrameren verbunden wird. Durch Umorientierung von Disulfidbrücken entsteht ein kovalentes Gerüst, welches den Geweben mechanische Stabilität bietet (Timpl et al., 1981; Yurchenco und Ruben, 1987). Im Nierenglomerulus werden die Kollagen $\alpha 1(\text{IV})$ - und $\alpha 2(\text{IV})$ -Ketten im Laufe der

Entwicklung durch $\alpha 3(\text{IV})$ bis $\alpha 5(\text{IV})$ ersetzt (Lu et al., 1999). Mutationen in einer dieser Ketten führen beim Menschen (Kashtan & Michael, 1993) und im Mausmodell (Cosgrove et al., 1996; Miner & Sanes, 1996) zu einer spät entstehenden Form des Alport Syndroms mit chronischer Glomerulonephritis. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, daß ein aus den verbleibenden Kollagen-Ketten $\alpha 1(\text{IV})$ - und $\alpha 2(\text{IV})$ gebildetes Netzwerk aufgrund einer geringeren Quervernetzung weniger stabil ist.

Die Entstehung eines zweiten Netzwerks durch die Selbstinteraktion von Laminin wird zusammen mit dessen Struktur und Funktion in Abschnitt 1.3 beschrieben. Es soll jedoch bereits hier erwähnt werden, daß ohne Laminin (Smyth et al., 1999) keine Basalmembranen gebildet werden können.

Erstaunlicherweise besitzen Mäuse mit einem inaktivierten Gen von Nidogen-1 oder Nidogen-2, einer weiteren Isoform, intakte Basalmembranen (Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002). Diese Studien zeigten, daß jedes Nidogen-Molekül für sich nicht essentiell für die Ausbildung von funktionsfähigen Basalmembranen ist und die Funktion jeweils von der anderen Isoform übernommen werden kann. Erst die gleichzeitige Deletion beider Nidogene führt zu defekten Basalmembranen (Smyth, persönliche Mitteilung). Diese sind verbreitert, diskontinuierlich oder werden nicht gebildet, weshalb Defekte des Herzens und der Niere zum Tode führen. Daß der durch die Abwesenheit von Nidogenen hervorgerufene Effekt wirklich auf der Interaktion mit anderen Proteinen der Basalmembran beruht, zeigte die Deletion der Nidogen-Bindungsstelle in der Laminin $\gamma 1$ -Kette (Willem et al., 2002), welche zu einem ähnlichen jedoch nicht identischen Phänotyp führt wie der Nidogen-Doppelknockout.

Die durchgeführten Experimente verdeutlichen, daß für die Ausbildung einer Basalmembran zuerst Laminin benötigt wird und andere Proteine wie z.B Kollagen IV und Nidogen nicht essentiell für deren Bildung, jedoch für deren Stabilität und Funktion sind.

Entscheidend für die Entstehung von Basalmembranen sind nicht nur die Proteinkomponenten sondern auch deren Zellrezeptoren. Die Deletion der Laminin-Rezeptoren (siehe 1.3.3) α -Dystroglycan (Williamson et al., 1997) und $\beta 1$ -Integrin (Fässler & Meyer, 1995) inhibiert die Bildung von Basalmembranen. Ein Grund ist, daß die Proteine nicht auf der Zelloberfläche aufkonzentriert werden und deshalb ihre Polymerisation erschwert ist (Colognato et al., 1999). Weiterhin vermitteln die Rezeptoren bidirektionale Signale zwischen den extrazellulären Proteinen und der Zelle (siehe 1.3.5), ohne die keine Basalmembranen entstehen (Colognato et al., 1999).

1.3 Laminin

1.3.1 Struktur der Laminine

Laminine sind heterotrimere Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 400 bis 800 kDa, die sich aus den drei genetisch unterschiedlichen Ketten α , β und γ zusammensetzen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Laminin-1 ($\alpha1\beta1\gamma1$) zeigen eine kreuzförmige Struktur (Abb. 1.4) mit globulären und stabförmigen Bereichen (Beck et al., 1990), aufgrund derer sieben Laminin-Domänen (I-VI; G) unterschieden werden (Abb. 1.4 und 1.5). Die kurzen Arme werden von den N-terminalen Regionen der Ketten gebildet und bestehen aus globulären Domänen (VI, IV) welche durch stabförmige Abschnitte (V, III) getrennt werden. Eine aus den Domänen I und II gebildete dreifache coiled-coil α -Helix, welche das Trimer zusammenhält, bildet den langen Arm des Moleküls. Dieser endet in einer globulären G-Domäne, die ausschließlich durch den C-terminalen Bereich der α -Kette gebildet wird. Aufgrund dieser zusätzlichen Domäne sind α -Ketten (≤ 400 kDa) größer als β - bzw. γ -Ketten (≤ 200 kDa). Bis heute sind fünf α -, drei β - und drei γ -Ketten identifiziert worden (Abb. 1.3). Die Bezeichnung der Laminine bzw. der einzelnen Ketten erfolgt nach Burgeson et al. (1994) (Tab. 1.1 und 1.2).

Laminin-Kette	Genbezeichnung	Referenz
$\alpha1$	LAMA1	Nagayoshi et al., 1994
$\alpha2$	LAMA2	Zhang et al., 1996
$\alpha3$	LAMA3	Ryan et al., 1994
$\alpha4$	LAMA4	Richards et al., 1994
$\alpha5$	LAMA5	Miner et al., 1995
$\beta1$	LAMB1	Vuolteenaho et al., 1990
$\beta2$	LAMB2	Durkin et al., 1999
$\beta3$	LAMB3	Pulkkinen et al., 1995
$\gamma1$	LAMC1	Kallunki et al., 1991
$\gamma2$	LAMC2	Kallunki et al., 1992
$\gamma3$	LAMC3	Koch et al., 1999

Tabelle 1.1: Nomenklatur der bis heute gefundenen Lamininketten und deren Bezeichnung. Modifiziert übernommen aus Tunggal et al. (2000). Die Referenzen beschreiben die chromosomalen Lokalisationen.

Von den 45 theoretisch möglichen Heterotrimeren sind bis heute nur 15 beschrieben worden (Tab. 1.2). Der Grund hierfür liegt sowohl in der Synthese als auch in der Zusammenlagerung der einzelnen Ketten (siehe 1.3.2).

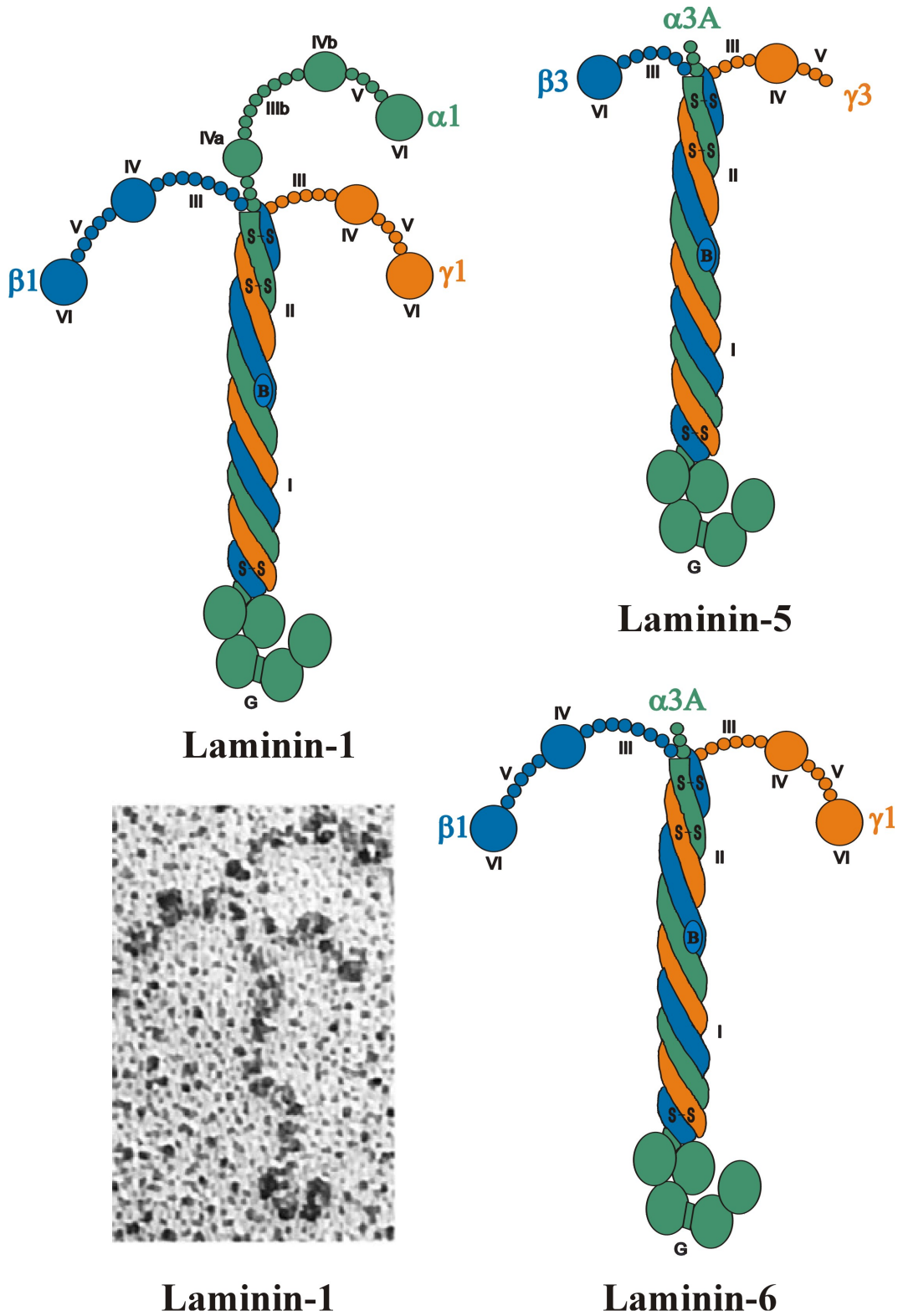


Abbildung 1.4: Verschiedene Laminin-Isoformen. Laminin-1 zeigt im Elektronenmikroskop eine kreuzförmige Struktur mit drei kurzen und einem langen Arm. Laminin-6 hat einen und Laminin-5 drei gekürzte Äste.

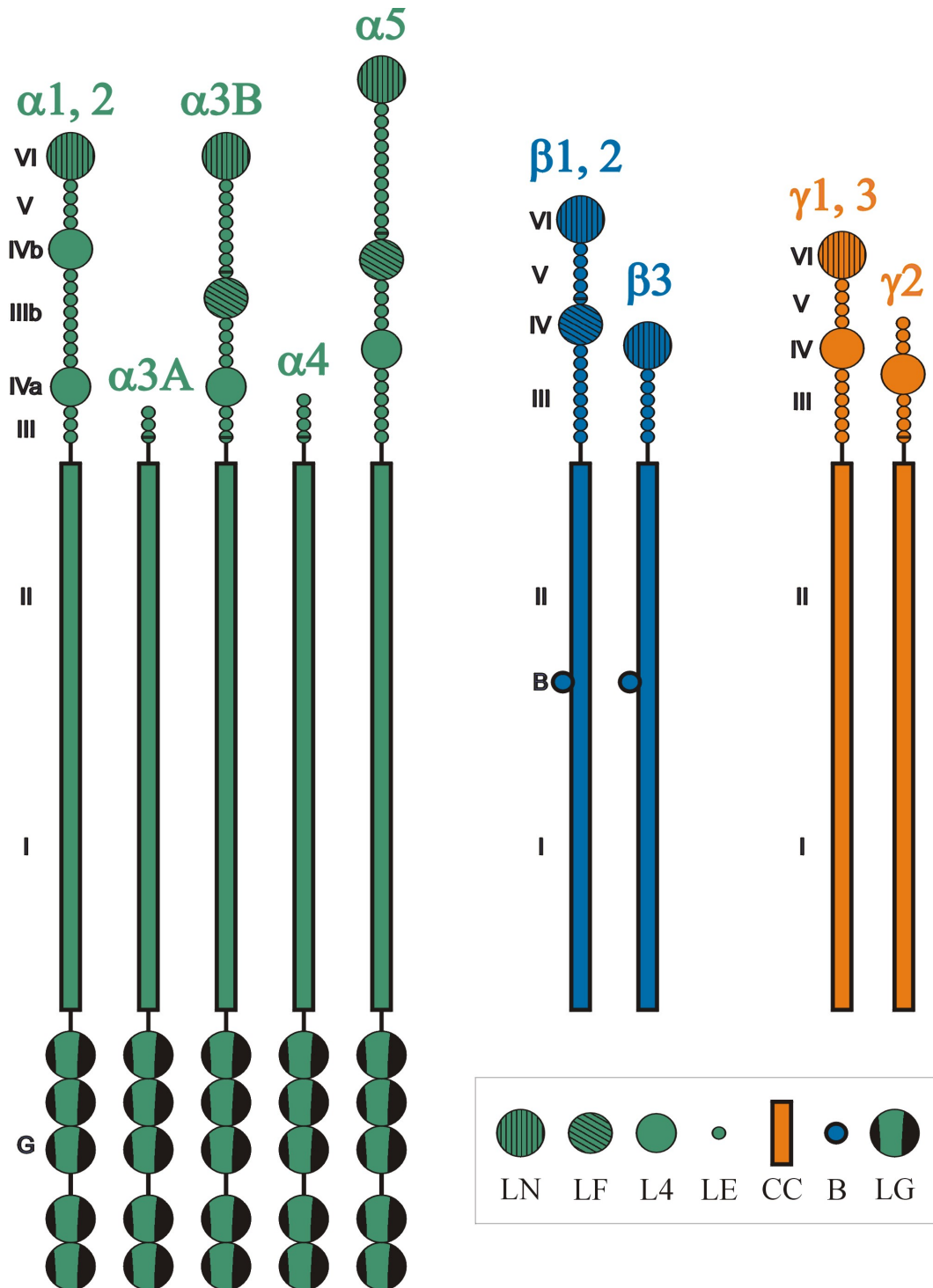


Abbildung 1.5: Darstellung der bekannten Laminin-Ketten. Domänen sind mit den römischen Ziffern I-VI bezeichnet. Die Ketten sind aus bis zu sieben Modulen (siehe Kasten) aufgebaut.

Name	Zusammensetzung	Referenz
Laminin-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Timpl et al., 1979
Laminin-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Ehrig et al., 1990
Laminin-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Hunter et al., 1989a
Laminin-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Sanes et al., 1990
Laminin-5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Rousselle et al., 1991
Laminin-6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Marinkovich et al., 1992
Laminin-7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Champlaud et al., 1996
Laminin-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin-12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Koch et al., 1999
Laminin-13	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000
Laminin-14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000
Laminin-15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000

Tabelle 1.2: Auflistung der in der Literatur beschriebenen Laminin-Isoformen.

Mit der Einschränkung, daß einige Laminine eine bis drei N-terminal gekürzte Ketten besitzen, haben alle Isoformen eine gemeinsame Domänenstruktur und sind aus bis zu sieben Modulen aufgebaut (Tunggal et al., 2000) (Abb. 1.4). Die Nomenklatur erfolgt nach der aus zwei Ziffern bestehenden Bezeichnung der SWISS-PROT Datenbank (Bairoch, 1999).

Domäne VI, welche im Elektronenmikroskop als globuläre Domäne am Ende der kurzen Arme (N-Terminus) zu erkennen ist, wird auch als LN-Modul bezeichnet und ist der am stärksten konservierte Teil des Moleküls. Wie die meisten Laminin-Domänen besitzt auch sie einen hohen Anteil an konservierten Cysteinen. LN-Module sind an der Ausbildung eines Laminin-Netzwerkes durch Polymerisation beteiligt (1.3.5) und kommen neben Laminin noch in Netrinen (Serafini et al., 1994, Koch et al., 2000) sowie in den kürzlich entdeckten Laminets vor (Yin et al., 2002).

Die globulären Module in den kurzen Armen werden durch die Domänen V und III getrennt. Diese bestehen aus einer Serie von drei bis acht epidermale Wachstumfaktor (EGF) ähnlichen Wiederholungen, die als Platzhalter dienen. Im Vergleich zu den homologen klassischen EGF-Modulen weisen diese LE-Module zusätzlich zu den sechs konservierten Cysteinen zwei weitere auf (Maurer et al., 1996). Die Auswertung der Kristallstruktur von LE-Modulen aus Domäne III der $\gamma 1$ -Kette (Stetefeld et al., 1996) bestätigte die strukturelle Homologie zu EGF-Modulen. Die Struktur besteht aus ineinander übergehenden Schleifen, die

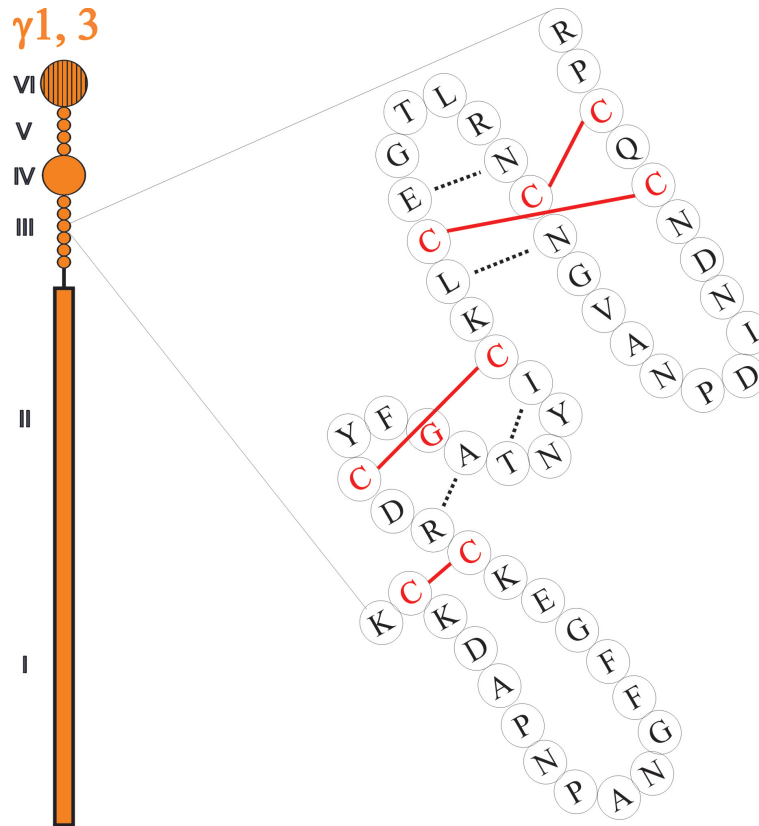


Abbildung 1.6: Schematische Struktur des LE-Moduls 4 aus Domäne III der γ 1-Kette. Die aus Schleifen bestehende Struktur wird hauptsächlich durch Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinen stabilisiert.

durch Disulfidbrücken und antiparallele β -Faltblätter stabilisiert werden (Abb. 1.6). Die Sequenz ist mit Ausnahme der Cysteine, die essentiell für die korrekte Faltung des Moduls sind, und eines Glycins, welches aus sterischen Gründen vorhanden sein muß, nicht hoch konserviert. Aus diesem Grund weisen LE-Module, obwohl sie eine konservierte, durch eine Konsensussequenz beschriebene Struktur besitzen, eine variable, die Funktion beeinflussende Sequenz auf. Für LE-Modul 4 aus Domäne III der γ 1-Kette konnte gezeigt werden, daß der Austausch von drei Aminosäuren gegen die entsprechenden aus der γ 2-Kette die Bindung an Nidogen-1 stark vermindert (Pöschl et al., 1996).

Domäne IV zeigt im Elektronenmikroskop eine globuläre Form. Die langen α -Ketten beinhalten zwei dieser Domänen, die als IVa und IVb bezeichnet werden. Domäne IVa aller α -Ketten und IVb von α 1/ α 2 sind homolog zu denen in den γ -Ketten vorkommenden Domänen IV, weshalb diese als L4-Module bezeichnet werden. Sequenzunterschiede zu den L4-Modulen weisen sowohl die Domänen IVb der α 3B und α 5 als auch die Domäne IV der β -Ketten auf, die deshalb als

LF-Modul bezeichnet werden (Abb 1.3). Die L4-Module werden auf beiden Seiten durch ein halbes LE-Modul mit drei Cysteinen auf der N-terminalen und fünf Cysteinen auf der C-terminalen Seite begrenzt. LE-Module mit ungerader Anzahl an Cysteinen werden nicht als eigenständige Faltungseinheit betrachtet, weshalb es sich bei Domäne IV um eine große Schleife zwischen Cystein drei und vier handeln könnte. LF-Module weisen nur N-terminal ein unvollständiges LE-Modul auf, welches vier Cysteine besitzt.

Die dreifache coiled-coil α -Helix, welche das Trimer zusammenhält und den langen Arm des Moleküls bildet, wird von den Domänen I/II gebildet (Barlow et al., 1984; Paulsson et al., 1985). Jede einzelne α -Helix, welche aus ca. 600 Aminosäuren besteht, enthält zu 90 % Heptapeptidwiederholungen (Abb. 1.7).

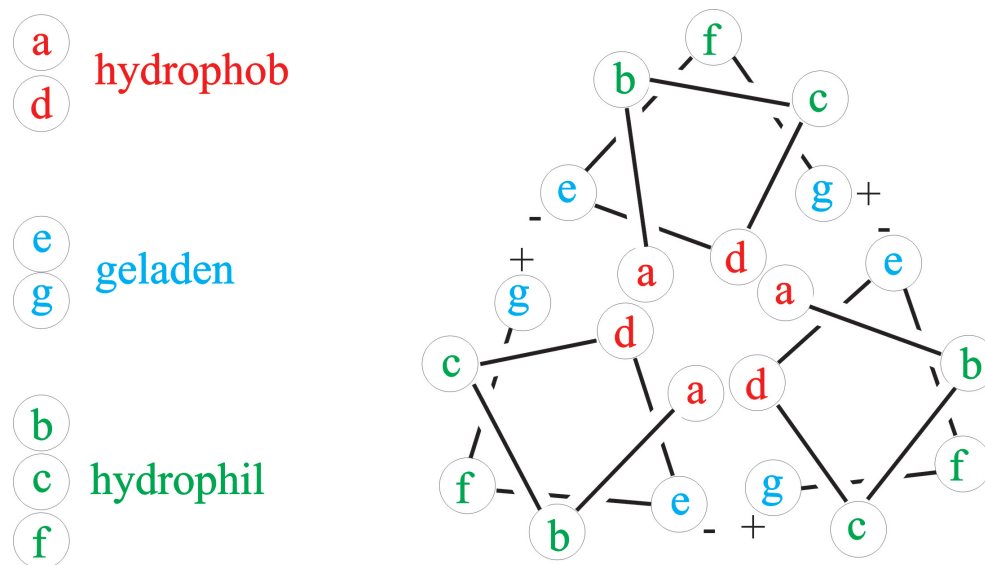


Abbildung 1.7: Heptapeptidwiederholungen der dreifachen coiled-coil α -Helix. Die Stabilisierung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren in den Positionen a bzw. d und zu einem geringeren Ausmaß durch ionische Interaktionen der geladenen Aminosäuren (e, g).

Aufgrund der Ladungen der sich in den Positionen e und g befindlichen Aminosäuren ist die Ausbildung einer stabilen coiled-coil Struktur aus homologen Ketten unwahrscheinlich (Beck et al., 1993). Zur Stabilisierung der α -helikalen coiled coil (CC) Struktur werden sowohl alle Ketten zu Beginn der Domäne I als auch die Ketten β und γ am Ende von Domäne II durch Disulfidbrücken verknüpft. Die Agrin-Bindungsstelle von Laminin-1 konnte in der CC-Region lokalisiert werden (Kammerer et al., 1999), weshalb diese nicht nur strukturelle sondern auch funktionelle Aspekte aufweist. Die Domänen I und II der β -Ketten werden durch eine ca. 35

Aminosäuren große Domäne B, welche hoch konserviert ist und einen hohen Anteil an Cysteinen aufweist, getrennt (Abb 1.4).

Die G-Domäne, welche in die Subdomänen LG1-LG5 unterteilt werden kann, kommt ausschließlich in den α -Ketten vor. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt die G-Domäne im Vergleich zu ihrer Sequenz, welche mit 900 Aminosäuren mehr als ein Drittel der Aminosäuresequenz einer α -Kette darstellt, eine relativ kleine und kompakte Struktur. Jedes einzelne LG-Modul besteht aus einem 14-strängigen antiparallelen β -Sandwich, das C-terminal durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird (Hohenester et al., 1999). Mittlerweile konnte die Struktur des Domänenpaares LG4-LG5 gelöst werden und die Bindungsstellen für α -Dystroglycan und Heparin identifiziert werden (Tisi et al., 2000).

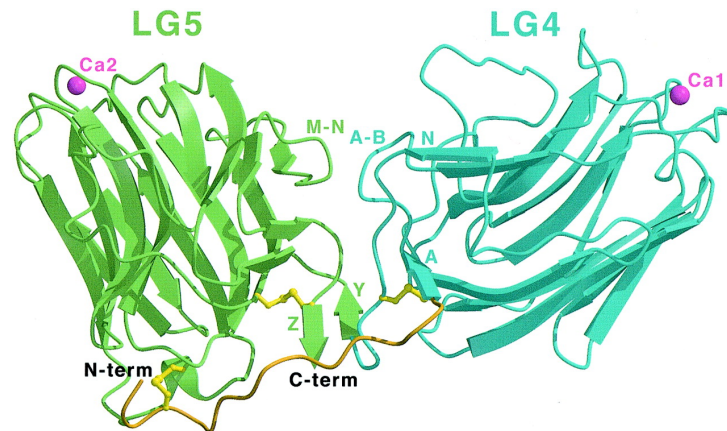


Abbildung 1.8: Struktur des Domänenpaares LG4-LG5 der Laminin α -Kette. Entnommen aus Tisi et al. (2000).

1.3.2 Zusammenlagerung und Sekretion der Laminin-Ketten

Welche Laminin-Isoformen von einer Zelle sekretiert werden, hängt davon ab, welche Ketten gleichzeitig synthetisiert und zusammengelagert werden. Bis heute konnten nur Heterotrimeren, für die Modellstudien eine hohe Stabilität zeigen (Hunter et al., 1992; Kammerer et al., 1995), isoliert werden. Von den 45 theoretisch möglichen Heterotrimeren wurden bis heute nur 15 identifiziert. Diese Tatsache läßt vermuten, daß bei der Ausbildung der dreifachen coiled-coil α -Helix Unterschiede zwischen den Mitgliedern der einzelnen Gruppen (α , β und γ) bestehen. Die genaue molekulare Ursache für die hohe Spezifität der Zusammenlagerung der Ketten ist noch nicht geklärt. Vermutet wird eine Abhängigkeit der Stabilität des Trimers von der Stärke der ionischen Wechselwirkungen zwischen den Ketten (Beck et al.,

1993). Die Zusammenlagerung der Trimere erfolgt intrazellulär in mehreren Schritten. Für Laminin-1 konnte gezeigt werden, daß sich zuerst Disulfid-verknüpfte $\beta 1/\gamma 1$ -Dimere bilden, die intrazellulär verbleiben. Erst die Anlagerung der $\alpha 1$ -Kette, die zu einer weiteren Stabilisierung und Ausbildung von zusätzlichen Disulfidbrücken führt, ermöglicht die Sekretion des Laminin-Moleküls (Yurchenco et al., 1997). Die treibende Kraft bei der Sekretion des Laminin-1 ist die $\alpha 1$ -Kette, welche im Gegensatz zu der $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette nach Überexpression auch als einzelne Kette im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann (Yurchenco et al., 1997).

1.3.3 Funktion der Laminine

Die verschiedenen Laminin-Isoformen ermöglichen ein breites Spektrum spezialisierter Basalmembranen. Diese stabilisieren Gewebe, dienen Zellen als Unterlage für Migration bzw. Adhesion (Ryan et al., 1996) und sind verantwortlich für Proliferation, Differenzierung sowie Entwicklung (Belkin & Stepp, 2000).

Entscheidend für die Funktionen der Laminine sind neben ihrer Gewebeverteilung und zeitlichem Expressionsmuster sowohl ihre unterschiedliche Fähigkeit zu Polymerisieren (siehe 1.3.5) als auch variierende Rezeptoren und Interaktionspartner. Aus diesen Gründen führen *Knockouts* oder Mutationen in einzelnen Laminin-Ketten zu unterschiedlichen Phänotypen (Colognato & Yurchenco, 2000).

Die Inaktivierung des LAMC1-Gens in Mäusen, welches für die in 10 der 15 Laminin-Isoformen vorkommende $\gamma 1$ -Kette kodiert, resultiert in einem embryonal letalen Phänotyp bereits am Tage 5,5 post conceptum (Smyth et al., 1999). Es zeigte sich, daß ohne diese Laminine keine Basalmembranen gebildet werden. Basalmembranen sind jedoch schon bei einer der ersten Entwicklungsstufen des Embryos, der Ausbildung eines proamniotischen Hohlraums (Coucouvanis & Martin, 1995), unerlässlich. Aus diesem Grund sind auch *Embryoid Bodies*, ein Modellsystem der frühen Mausentwicklung, aus LAMC1 defizienten murinen ES-Zellen nicht in der Lage einen Hohlraum zu bilden (Murray et al., 2000). Weitere Studien mit ES-Zellen lassen vermuten, daß Laminin das anfängliche Grundgerüst einer Basalmembran bildet (Li et al., 2002).

Deletionen von Laminin-Ketten mit einem restriktiven Expressionsmuster und spezifischer Funktion zeigen eine schwerwiegende jedoch nicht so drastische Auswirkung wie die Inaktivierung des LAMC1-Gens. Bei diesen kommt es zu funktionellen Defekten in einzelnen Organen oder Basalmembranen. Diese können gebildet werden, da meistens mehrere Laminine vorhanden sind, erfüllen aber aufgrund einer fehlenden Isoform ihre Funktion nicht. Eine Inaktivierung z.B. der Laminin $\beta 2$ -Kette führt entsprechend dem Expressionsmuster zu Defekten in der

neuro-muskulären Verbindungszone und des Glomerulums (Hunter et al., 1989; Noakes et al., 1995). Es kommt zu einer Glomerulonephritis, welche durch eine unzureichende Filterfunktion der Basalmembran zwischen Epithelzellen des Nierenglomerulus und Endothelzellen der Arterien hervorgerufen wird. Eine andere Auswirkung haben Mutationen in der Laminin $\alpha 2$ -Kette, welche beim Menschen schwere Muskeldystrophien und Erkrankungen des zentralen Nervensystems hervorrufen (Ehring et al., 1990; Sunada et al., 1995; Vuolteenaho et al., 1994; Xu et al., 1994).

Diese Beobachtungen können jedoch nicht auf Laminin-Isoformen sondern nur auf Ketten bezogen werden. Der Grund hierfür ist, daß Laminin-Ketten fast immer im mehreren Lamininen vorkommen. Eine Ausnahme stellt Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$), die einzige Isoform mit einer $\beta 3$ und $\gamma 2$ -Kette, dar. Seine Zusammensetzung erlaubt eine Isoform spezifische Charakterisierung der Funktion. Wie erwartet führen sowohl Mutationen in der $\beta 3$ - als auch der $\gamma 2$ -Kette zum gleichen Krankheitsbild beim Menschen, einer Form der junctionalen Epidermolysis Bullosa (JEB) (Pulkkinen et al., 1995). Die blasenbildende Hautkrankheit JEB entsteht durch eine Ablösung der Dermis von der Epidermis und kann durch ein nicht funktionsfähiges Laminin-5 Molekül hervorgerufen werden (Aberdam et al., 1994; Mc Grath et al., 1996). Die Aufgabe von Laminin-5 besteht darin, die epidermalen und dermalen Zellen über die Bindung an Hemidesmosomen- assoziierte Integrin $\alpha 6\beta 4$ -Zellrezeptoren (Carter et al., 1990) und die dermalen Kollagen VII Verankerungsfibrillen (Chen et al., 1999) zu fixieren.

1.3.4 Laminin-Rezeptoren

Die Fähigkeit der Laminin-Isoformen, zelluläre Aktivitäten wie Adhesion, Migration, Differenzierung, Polarität, Proliferation, Apoptose und Genexpression zu beeinflussen, beruht auf der Interaktion mit Rezeptoren (Belkin und Stepp, 2000). Zu den wichtigsten Laminin-Rezeptoren gehören Integrine und α -Dystroglykan.

Integrine sind heterodimere Transmembranmoleküle, die aus einer nicht kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit bestehen (Hynes, 1992). Eine Bindung an Laminin konnte für eine Vielzahl der Heterodimere, zu denen $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ gehören, gezeigt werden (Belkin und Stepp, 2000). Für die Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ wurde eine Bindungsstelle in den kurzen Armen von Laminin-1 identifiziert (Languiano et al., 1989; Goodman et al., 1991). Das Vorhandensein dieser Integrin-Bindungsstellen in anderen Laminin-Isoformen wird jedoch kontrovers diskutiert (Colognato et al., 1997; Pfaff et al., 1994). Die Mehrzahl der Integrine bindet an die Subdomänen LG1-LG3 der G-Domäne, für deren

Aktivität ein kurzes Stück der dreifachen coiled-coil α -Helix vorhanden sein muß (Deutzmann et al., 1990). Zur Interaktion mit Laminin benutzen die meisten Zellen $\alpha6\beta1$ und $\alpha3\beta1$ Integrin, deren Affinität zu den Laminin-Isoformen variiert (Aumailley et al., 1990; Sonnenberg et al., 1990, Carter et al., 1991). Integrin $\alpha7\beta1$ ist der Laminin-Rezeptor von Myoblasten (Kramer et al., 1991) und $\alpha6\beta4$ wird in Hemidesmosomen gefunden (Rousselle und Aumailley, 1994). Eine Deletion von $\beta1$ Integrin verhindert die Ausbildung von Basalmembranen (Fässler & Meyer, 1995). Zu einem großen Teil wird dieser Effekt in ES-Zellen durch eine Repression des LAMA1-Gens verursacht (Li et al., 2002).

α -Dystroglykan ist Bestandteil des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes und ist wichtig für die Funktion von Muskeln, da es die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett verbindet (Hemler et al., 1999). α -Dystroglykan bindet extrazellulär an Laminin-2 und verknüpft dieses indirekt über Transmembranproteine mit Dystrophin, welches seinerseits mit F-Actin interagiert (Campbell et al., 1995). Die Bindungsstelle von Laminin-2 für α -Dystroglykan konnte mit Hilfe der Struktur des Domänenpaares LG4-LG5 gelöst werden (Tisi et al., 2000). Die Inaktivierung von Dystroglykan im Mausmodell führt zu embryonaler Letalität, welche durch strukturelle und funktionelle Defekte einer der ersten Basalmembranen, der Reicherts-Membran, hervorgerufen wird (Williamson et al., 1997).

1.3.5 Laminin-Polymerisation

Laminine sind ein essentieller Bestandteil von Basalmembranen, weshalb Mäuse mit einem inaktivierten LAMC1-Gen nicht in der Lage sind, funktionelle Basalmembranen zu bilden (Smyth et al., 1999). Diese sind bereits im frühen Embryonalstadium wichtig und ihre Abwesenheit führt zu einem letalen Phänotyp am Tag 5,5 *post conceptum*. Wichtig für die Bildung von intakten Basalmembranen sind zwei sich gegenseitig beeinflussende Eigenschaften von Laminin: Einerseits die Bindung an Zellrezeptoren und andererseits die Polymerisation zu einem Netzwerk (Cognato et al., 1999).

In vitro konnte für EHS-Laminin (Laminin-1), welches durch EDTA aus Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS) Tumor extrahiert wurde, eine Polymerisation nachgewiesen werden (Yurchenco et al., 1985). Die Selbstassoziation war sowohl konzentrations- als auch temperaturabhängig. Die Möglichkeit, EHS-Laminin durch EDTA zu extrahieren, ließ bereits eine Abhängigkeit der Assoziation von zweiwertigen Kationen erkennen (Paulsson et al., 1987). Folgeexperimente bestätigten diese Beobachtung und es wurde eine Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung vermutet (Paulsson et al., 1988, Paulsson, 1988).

Eine weitere Charakterisierung der Laminin-Polymerisation erfolgte mit proteolytischen Fragmenten von EHS-Laminin (Abb. 1.9), die mit den Enzymen Elastase (E), Cathepsin G (C) und Pepsin (P) erhalten wurden (Yurchenco & Cheng, 1993).

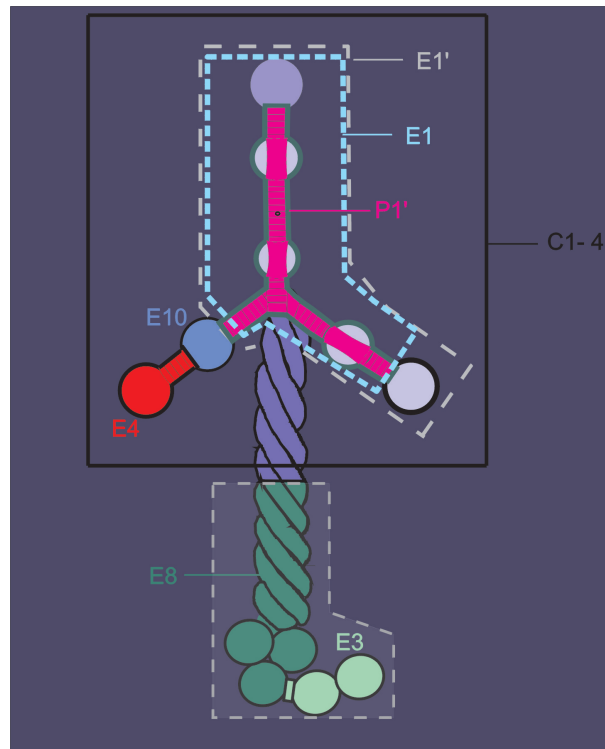


Abbildung 1.9: Proteolytische Fragmente von EHS-Laminin.

Fragment C1-4 wies im Gegensatz zu P1', welches keine der N-terminalen Domänen besitzt, ein mit EHS-Laminin vergleichbares Polymerisationsverhalten auf. Weiterhin konnte die Laminin-Polymerisation durch die proteolytischen Fragmente E1, E1' und E4, jedoch durch kein Fragment des langen Arms, inhibiert werden. Dies ließ vermuten, daß die für die Polymerisation verwendeten Bindungsstellen am N-Terminus der kurzen Arme liegen. Die Fähigkeit von E4, die Assoziation von Laminin zu blockieren, grenzte die Bindungsstelle der β 1-Kette auf die Domänen VI und V ein (Schittny & Schittny, 1993).

Einen wesentlichen Einfluß auf die Vorstellung der Laminin-Polymerisation hatten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Laminin bzw. seiner proteolytischen Fragmente, welche die Ausbildung von trimeren Komplexen mit Beteiligung der N-terminalen Domänen aller drei Ketten zeigten (Yurchenco et al., 1992; Yurchenco & Cheng, 1993). Komplexe aus E1' und E4, bei denen die einzelnen Ketten unterschieden werden können, ließen Kontakte jeder LN-Domäne mit den beiden LN-Domänen der anderen Ketten erkennen (Abb. 1.10).

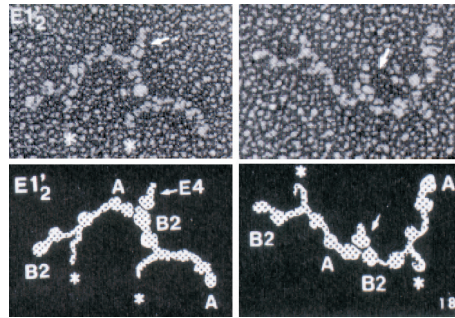


Abbildung 1.10: EM-Aufnahmen eines Komplexes aus zwei E1'- und einem E4-Fragment (entnommen aus Yurchenco & Cheng, 1993). Die Ketten können aufgrund der unterschiedlichen Länge der kurzen Arme von $\alpha 1$ (A) und $\gamma 1$ (B2) unterschieden werden.

Um die aus den EM-Aufnahmen gewonnen Erkenntnisse zu bestätigen, wurden Bindungsstudien mit den proteolytischen Fragmenten durchgeführt (Yurchenco et al., 1992; Yurchenco & Cheng, 1993; Schittny & Schittny, 1993). E4 zeigte - wie in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen - keine Selbstinteraktion. Wie erwartet reagierte sowohl E4 mit E1' als auch dieses mit sich selber. Die Dissoziationskonstante der E4-E1'-Interaktion war mit $1,4 \mu\text{M}$ zehn mal stärker als die E1'-Selbstinteraktion ($K_d \geq 17 \mu\text{M}$). E1, welches nur die N-terminale Domäne der $\alpha 1$ -Kette beinhaltet, interagiert nicht mit E4 ($K_d \geq 190 \mu\text{M}$). Aus diesem Grund wurde die E4-E1'-Interaktion einer $\beta 1$ - $\gamma 1$ -Bindung zugesprochen. Die Interaktion von E1' mit E1' konnte prinzipiell aus einer $\alpha 1$ - $\alpha 1$, $\alpha 1$ - $\gamma 1$ und $\gamma 1$ - $\gamma 1$ -Bindung resultieren. Eine E1-E1-Wechselwirkung ist in der Literatur nicht beschrieben und eine $\gamma 1$ - $\gamma 1$ -Bindung konnte mit den zugänglichen proteolytischen Fragmenten nicht untersucht werden. Mit Affinitätschromatographie konnte weiterhin gezeigt werden, daß E1' in der Lage ist, E4 mit immobilisiertem E4 zu verknüpfen und E1' somit mindestens zwei an der Laminin-Polymerisation beteiligte Bindungsstellen besitzen muß. Außerdem war die Bindung von E1' an immobilisiertes E4 stärker als der umgekehrte Fall. Dies wurde auf kooperative Bindungsverhältnisse im trimeren Komplex zurückgeführt und als Erklärung dafür verwendet, daß in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine durch Bindungsstudien nicht nachweisbare direkte Bindung von $\alpha 1$ an $\beta 1$ zu sehen ist (Schittny & Schittny, 1993).

Mit Hilfe eines Dot-Blots wurde untersucht, welche der proteolytischen Fragmente Calcium binden können. Es wurde gezeigt, daß $^{45}\text{Ca}^{2+}$ an die N-terminale Region der $\gamma 1$ -, jedoch nicht an die $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Kette bindet (Yurchenco & Cheng, 1993).

Mit den gewonnenen Erkenntnissen wurde ein Modell der Laminin-Polymerisation aufgestellt (Yurchenco & Cheng, 1993). Die Polymerisation erfolgt

demzufolge durch Interaktion der LN-Domänen unter Ausbildung eines trimeren Komplexes. Es wird vermutet, daß jede LN-Domäne zwei Bindungsstellen besitzt, mit denen sie an die anderen Ketten, jedoch nicht an sich selber binden kann.

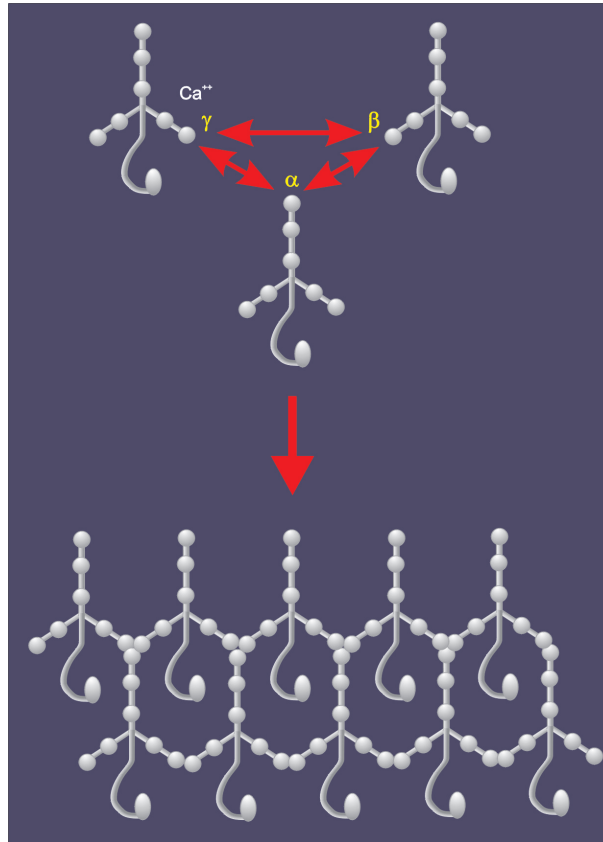


Abbildung 1.11: Modell der Laminin-Polymerisation nach Yurchenco & Cheng (1993). Durch Interaktion der LN-Module der drei Laminin-Ketten entsteht ein hexagonales Netzwerk. Der lange Arm ist nicht an der Assoziation beteiligt.

Für Laminin-1 konnte gezeigt werden, daß die *in vitro* nachgewiesene Polymerisation *in vivo* zur Ausbildung eines unabhängigen Netzwerks führt, welches über Nidogen mit dem Kollagen IV-Netzwerk verbunden wird (Yurchenco et al., 1992). Zur Überprüfung, ob auch andere Laminin-Isoformen *in vitro* polymerisieren können, wurden Experimente mit Laminin-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), Laminin-4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$), Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) und Laminin-6 ($\alpha 3A\beta 1\gamma 1$) durchgeführt (Cheng et al., 1997). Im Gegensatz zu Isoformen mit einem oder zwei gekürzten Armen besaßen Laminine mit drei LN-Domänen die Fähigkeit zu assoziieren und mit Laminin-1 zu copolymerisieren. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, daß alle drei Arme für die Ausbildung eines Netzwerks notwendig sind. Es wurden jedoch abgesehen von Laminin-5 nur trunkierte Laminine mit einer $\beta 1$ und $\gamma 1$ -Kette verwendet,

weshalb über die Polymerisation der Laminine 7, 9 und 11-15 keine Aussage getroffen werden kann.

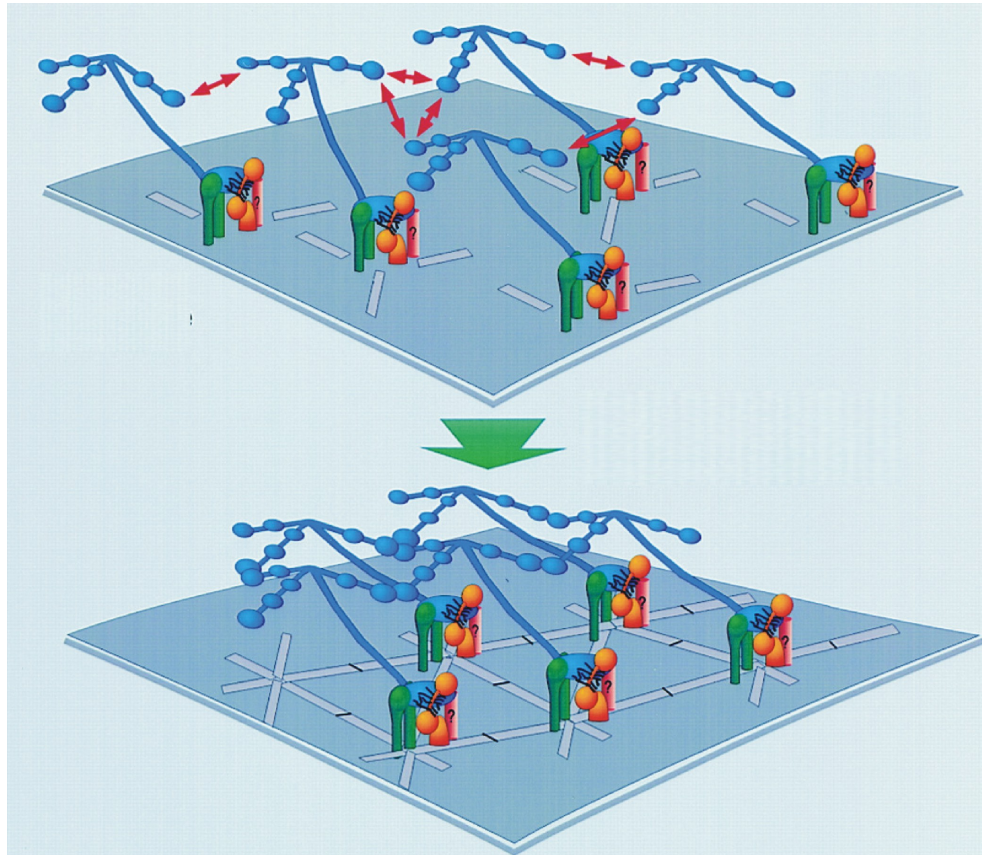


Abbildung 1.12: Die Polymerisation von Rezeptor-gebundenem Laminin führt zur Reorganisation der Zellrezeptoren und des Cytoskeletts (entnommen aus Colognato et al., 1999).

Basalmembranen und somit auch das Laminin-Netzwerk bilden sich immer im nahen Kontakt zu Zellen. Dies ließ vermuten, daß Zellrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Ausbildung eines Laminin-Netzwerks spielen. Einen ersten Hinweis gaben Experimente mit Laminin, welches an synthetische Phospholipid-Membranen gekoppelt war. Dieses polymerisierte bei deutlich geringeren Konzentrationen als das sich in Lösung befindliche Laminin (Kalb & Engel, 1991). Weitere Studien zeigten, daß Rezeptoren wie Integrin, α -Dystroglykan und Syndecan die Laminin-Polymerisation beeinflussen (Colognato et al., 1999; Klass et al., 2000; Li et al., 2002).

Die Zellrezeptoren vereinfachen durch ihre Bindung an den C-terminalen Bereich des langen Arms, welcher nicht an der Polymerisation beteiligt ist, die

Assoziation von Laminin indem sie das Protein an der Oberfläche der Zelle aufkonzentrieren. Eine Blockierung der Interaktion von Zellrezeptoren mit der G-Domäne verhindert die Ausbildung einer Basalmembran (Cognato et al., 1999). Weiterhin führt die Polymerisation von Rezeptor-gebundenem Laminin zu einer Reorganisation der Zellrezeptoren und des Cytoskeletts (Cognato et al., 1999). Diese Umstrukturierung der Rezeptoren und des Cytoskeletts zu einem polygonalen Netzwerk ist jedoch keine Folge sondern eine Notwendigkeit für die Bildung des Laminin-Netzwerks. Sowohl eine Blockierung des Auf- und Abbaus des Aktin-Filaments als auch eine Inhibierung von Tyrosinkinasen führten zum Ausbleiben eines Laminin-Netzwerks (Cognato et al., 1999). Die Reorganisation wiederum erfordert die Laminin-Assoziation, weshalb die Bindung von chemisch modifiziertem Laminin, welches nicht Polymerisieren kann, an Rezeptoren keinen Einfluß auf das Cytoskeletton hat (Cognato et al., 1999). Ein weiterer Einfluß der Rezeptoren auf die Ausbildung von Basalmembranen resultiert aus der Fähigkeit, die Genexpression an der Laminin-Polymerisation beteiligter Proteine zu regulieren. Für $\beta 1$ -Integrin konnte ein Auswirkung auf die Expression der Laminin $\alpha 1$ -Kette und α -Dystroglykan nachgewiesen werden (Li et al., 2002).

1.4 Aufgabenstellung

Studien lassen vermuten, daß durch die Polymerisation von Laminin ein anfängliches Grundgerüst von Basalmembranen gebildet wird, aus dem mit Hilfe der anderen Komponenten eine stabile und funktionsfähige Basalmembran entsteht.

Aus diesem Grund ist es wichtig, den genauen molekularen Mechanismus der Ausbildung eines Laminin-Netzwerkes zu kennen. Mit proteolytischen Fragmenten konnte deutlich gezeigt werden, daß die an der Polymerisation beteiligten Bindungsstellen in den kurzen Armen, präziser in den Domänen VI und V, liegen. Die durchgeführten Bindungsstudien und EM-Aufnahmen führten zur Aufstellung eines Modells der Laminin-Polymerisation, bei dem die N-terminalen Domänen der kurzen Arme einen trimeren Komplex mit Kooperativität bilden.

Mit den proteolytischen Fragmenten konnte jedoch keine einzige direkte Interaktion zwischen zwei LN-Domänen nachgewiesen werden. Außerdem werden im Modell keine Selbstinteraktionen berücksichtigt, obwohl diese nur für die β 1-Kette ausgeschlossen werden können. Die Untersuchung einer möglichen Selbstinteraktion von LN-Domänen ist jedoch wichtig, da sich ein Polymer aus rein heterotypischen Wechselwirkungen von einem mit hetero- und homotypischen Interaktionen unterscheidet. Auch die Möglichkeit einer Interaktion zwischen verschiedenen α -, β - bzw. γ -Ketten, welche bei der Co-Polymerisation unterschiedlicher Laminin-Isoformen von Bedeutung sein könnte, wurde noch nicht untersucht. Weiterhin beruht die Vorstellung eines trimeren Komplexes mit zwei Bindungsstellen in jeder einzelnen LN-Domäne auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen und konnte bis heute noch nicht durch Bindungsstudien bestätigt werden. Genau diese Annahme führte jedoch zu einem Modell der Laminin-Polymerisation, nachdem nur Laminine mit drei LN-Modulen in der Lage sind ein Netzwerk zu bilden. Eine weitere in Frage zu stellende Folge des vorhandenen Modells ist, daß unterschiedlich Laminin-Isoformen ein identisches Netzwerk bilden.

Aus diesen Gründen sollten die N-terminalen Domänen der Laminin-Ketten exprimiert und mit ihrer Hilfe alle möglichen Interaktionen zwischen LN-Domänen untersucht werden. Die aus den Bindungsstudien gewonnenen Daten sollten zeigen, ob das für EHS-Laminin aufgestellte Modell korrekt und auf alle anderen Laminin-Isoformen übertragbar ist. Weiterhin sollte durch Crosslinking-Experimente die Fähigkeit der LN-Domänen, trimere Komplexe zu bilden, überprüft werden.

In vitro ist die Polymerisation von Laminin abhängig von Kationen wie z.B. Ca^{2+} . Auch die Möglichkeit, Laminin aus Geweben mit EDTA zu extrahieren, zeigt, daß zweiwertige Kationen einen Einfluß auf die Ausbildung eines Laminin-Netzwerkes haben. Für die N-terminale Region der γ 1-Kette wurde bereits eine

Ca²⁺-Bindung in der Literatur beschrieben. Deshalb sollten alle rekombinant hergestellten LN-Domänen mittels CD-Spektroskopie auf eine mögliche Ca²⁺-abhängige Konformationsänderung untersucht werden.

Für eine genaue Beschreibung der Laminin-Polymerisation und der Identifizierung der Bindungsstellen in den LN-Domänen ist es unerlässlich, die Struktur einer N-terminalen Domäne zu lösen. Deshalb sollte versucht werden, ein rekombinantes Fragment zu kristallisieren und somit die Grundlage für eine röntgenkristallographische Strukturaufklärung zu legen.

Kapitel 2

Ergebnisse

2.1 Expression der N-terminalen Domänen

Von acht der bekannten Laminin-Ketten wurden Konstrukte hergestellt, die zur rekombinanten Expression der N-terminalen Domänen verwendet wurden. Alle klonierten Fragmente kodierten neben der LN-Domäne für eine variable Anzahl von LE-Modulen.

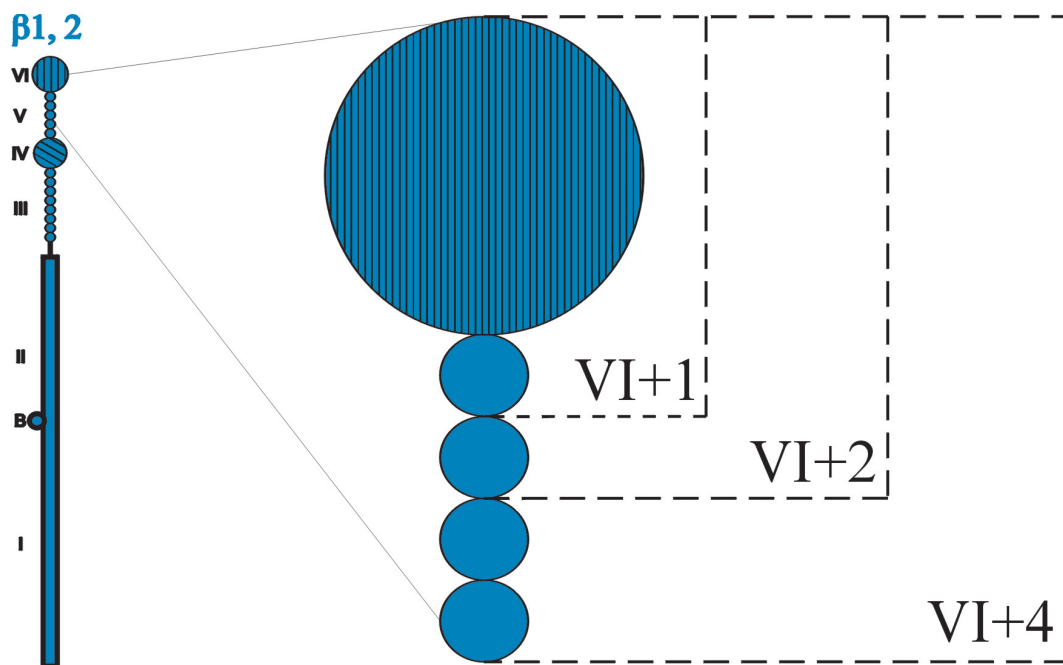


Abbildung 2.1: Auswahl der Domänengrenzen und Bezeichnung der Konstrukte am Beispiel der $\beta 1,2$ -Ketten. Neben der Domäne VI beinhalten die Fragmente eine variable Anzahl von LE-Modulen aus Domäne V.

Die für die Konzeption der Konstrukte nötigen Sequenzen wurden aus der SWISS-PROT- und NCBI-Datenbank entnommen. Zur Sekretion der Proteine wurde das in den Expressionsvektoren integrierte BM40 Signalpeptid verwendet, weshalb der Anfang der Konstrukte hinter die vom SignalP-Server vorausgesagte Schnittstelle des endogenen Signalpeptides gelegt wurde.

Gen	Protein	Konstrukt	Zugriffsnummer	Aminosäuresequenz
LAMA1	$\alpha 1$	VI+2	P19137	QQR...CRP (AS25-403)
LAMA2	$\alpha 2$	VI+4	Q60675	SQT...CEE (AS20-513)
LAMA5	$\alpha 5$	VI+4	Q61001	RTP...CHP (AS41-546)
LAMB1	$\beta 1$	VI+1	P02469	QEP...CKK (AS22-334)
LAMB1	$\beta 1$	VI+2	P02469	QEP...CEP (AS22-397)
LAMB1	$\beta 1$	VI+4	P02469	QEP...CRP (AS22-509)
LAMB2	$\beta 2$	VI+4	Q61292	QAP...CRP (AS36-524)
LAMB3	$\beta 3$	VI+1	Q61087	QQA...CQR (AS18-312)
LAMB3	$\beta 3$	VI+2	Q61087	QQA...CIP (AS18-375)
LAMB3	$\beta 3$	VI+4	Q61087	QQA...CEP (AS18-477)
LAMG1	$\gamma 1$	VI+2	P02468	AMD...CSP (AS34-395)
LAMG1	$\gamma 1$	VI+4	P02468	AMD...CTP (AS34-492)
LAMG3	$\gamma 3$	VI+2	Q9R0B6	ADM...PCR (AS29-390)

Tabelle 2.1: Übersicht über die klonierten Fragmente. Die aufgelisteten Zugriffsnummern sind der SWISS-PROT Datenbank entnommen. Die angegebenen Aminosäuresequenzen entsprechen den Domänengrenzen der Proteine. Spätere Veränderungen der Sequenz durch Anfügen eines Tags oder Reste des Signalpeptids sind nicht berücksichtigt.

2.1.1 Synthese der cDNA

Zur Herstellung der cDNA wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Die hierfür verwendete totale RNA wurde aus der Niere erwachsener Mäuse isoliert. Eine Ausnahme stellten LAMB3 und LAMC3 dar, deren RNA aus der Haut gewonnen wurde. Die cDNA wurde dann als Matrize verwendet, um die einzelnen Fragmente mittels PCR zu amplifizieren. Die für die PCR verwendeten Primer enthielten am 5'-Ende eine SpeI- und am 3'-Ende eine NotI-Schnittstelle. Im Falle von LAMC1 mußte anstelle der NotI- eine XhoI-Sequenz verwendet werden, da bereits eine NotI-Schnittstelle im Fragment enthalten ist. Einige Konstrukte wurden sowohl mit als auch ohne Stop-Codon kloniert. Weiterhin wurde bei der Auswahl des 5'-Primers darauf geachtet, daß es nicht zu einer Verschiebung des

Leserasters zwischen dem im Expressionsvektor vorhandenem BM40 Signalpeptid und dem jeweiligen Konstrukt kam. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die eingeführten Restriktionsschnittstellen in pBluescript KS(+) ligiert.

Gen	Konstrukt	RT-Primer	5'-Primer	3'-Primer	Stop
LAMA1	VI+2	lma1_rev	lma1_VI-5'	lma1_EGF2-3'	nein
LAMA2	VI+4	lma2_rev	lma2_VI-5'	lma2_EGF4-3'	nein
LAMA5	VI+4	lma5_rev	lma5_VI-5'	lma5_EGF4-3'	nein
LAMB1	VI+1	lmb1_rev	lmb1_VI-5'	lmb1_EGF1-3'	nein
LAMB1	VI+2	lmb1_rev	lmb1_VI-5'	lmb1_EGF2-3' stop	ja
LAMB1	VI+4	lmb1_rev	lmb1_VI-5'	lmb1_EGF4-3' stop	ja
LAMB2	VI+4	lmb2_rev	lmb2_VI-5'	lmb2_EGF4-3'	nein
LAMB3	VI+1	lmb3_rev	lmb3_VI-5'	lmb3_EGF1-3'(stop)	nein/(ja)
LAMB3	VI+2	lmb3_rev	lmb3_VI-5'	lmb3_EGF2-3'(stop)	nein/(ja)
LAMB3	VI+4	lmb3_rev	lmb3_VI-5'	lmb3_EGF4-3'	nein
LAMC1	VI+2	lmg1_rev	lmg1_VI-5'	lmg1_EGF2-3'	ja
LAMC1	VI+4	lmg1_rev	lmg1_VI-5'	lmg1_EGF4-3'	ja
LAMC3	VI+2	lmg3_rev	lmg3_VI-5'	lmg3_EGF2-3'	nein

Tabelle 2.2: Auflistung der zur Herstellung der cDNA verwendeten Primer. In Abhängigkeit vom später benutzten Expressionsvektor wurde, wenn nötig, ein 3' Stop-Codon eingeführt.

2.1.2 Sequenzierung

Mit Ausnahme der LAMB3-Fragmente wiesen alle Konstrukte die erwartete Sequenz auf. Ausnahmslos wurden in den verschiedenen Konstrukten des LAMB3-Gens Veränderungen der Sequenz vorgefunden, die zu einer modifizierten Aminosäuresequenz führten. Ein Sequenzvergleich (Abb. 2.2) zeigte, daß die in der Maussequenz veränderten Aminosäuren der humanen Sequenz entsprechen. Aus diesem Grund wurde angenommen, daß die in der Datenbank vorhandene Sequenz an diesen Stellen fehlerhaft ist.

Mutation	F34L	A284G	L320E	P354R	W361R	D420A

Tabelle 2.3: Auflistung der in den $\beta 3$ -Konstrukten im Vergleich zur publizierten Sequenz gefundenen Veränderungen der Aminosäuresequenz.

```

LMB3_Human  MRPFFLLCFALPGLLHAQQACSRGACYPVGDLLVGRTRFLRASSTCGLTKPETYCTQYG 60
LMB3_Mouse  MRAFFLLWLALPGFLCAQQACSRGACYPVGDLEIGRTQLLRASSTCGLTKPETYCTQYG 60
LMB3_mouse  MRAFFLLWLALPGFLCAQQACSRGACYPVGDLEIGRTQLLRASSTCGLTKPETYCTQYG 60

LMB3_Human  ...CVCQHNTAGPNCERCAPFYNNRPWRPAEGQDAHECQRCDGNGHSELTCHFDPVFAAS 335
LMB3_Mouse  ...CVCQHNTAAPNCDCRCAFYNNRPWRPAEGQDTHECQRCDGNGHSLTCHFDPVFAAS 332
LMB3_mouse  ...CVCQHNTAGPNCDCRCAFYNNRPWRPAEGQDTHECQRCDGNGHSELTCHFDPVFAAS 332

LMB3_Human  ...TEGKNCEPCQLHYFRNRRPPGASIQETCISCECDPDGAVPGAPCDPVTGQCVCKEH 404
LMB3_Mouse  ...TEGKNCEPCQLHYFRNRRPPSAPIHETCIPCECDPDGAVQGAPCDRLTGQCVCKEY 401
LMB3_mouse  ...TEGKNCEPCQLHYFRNRRPPSAPIHETCIPCECDPDGAVQGAPCDRLTGQCVCKEY 401

LMB3_Human  VQGERCDLCKPGFTGLTYANPQGCH 429
LMB3_Mouse  VQGERCDLCKPGFTGLTFDNPKGCH 426
LMB3_mouse  VQGERCDLCKPGFTGLTFANPKGCH 426

```

Abbildung 2.2: Sequenzvergleich zwischen humaner (LMB3 Human), muriner (LMB3 Mouse) und der durch Sequenzierung gefundenen murinen Sequenz (LMB3 mouse).

2.1.3 Überexpression in 293-EBNA Zellen

Für die Expression wurden die Konstrukte in pCEP-Pu/BM40SP (pCEP) (Kohfeld et al., 1997) bzw. in modifizierte Formen des Vektors, welche zusätzlich für ein N- oder C-terminales Tag (His, StrepII) kodieren (Smyth et al., 2000; Odenthal, 1998) kloniert (Tab. 2.4). Die mit SpeI/NotI aus pBluescript KS(+) ausgeschnittenen Konstrukte wurden in den mit NheI/NotI linearisierten Vektor ligiert. Für die Fragmente des LAMC1-Gens wurde anstelle der NotI- die dahinter liegende XhoI-Schnittstelle verwendet.

Kette	Konstrukt	pCEP	pCEP/C-His	pCEP/C-Strep	pCEP/N-His
$\alpha 1$	VI+2	-	+	+	-
$\alpha 2$	VI+4	-	+	+	-
$\alpha 5$	VI+4	-	+	+	-
$\beta 1$	VI+1	-	-	+	-
$\beta 1$	VI+2	-	-	-	+
$\beta 1$	VI+4	+	-	-	+
$\beta 2$	VI+4	-	+	+	-
$\beta 3$	VI+1	+	+	+	-
$\beta 3$	VI+2	+	+	+	-
$\beta 3$	VI+4	-	+	+	-
$\gamma 1$	VI+2	-	-	-	+
$\gamma 1$	VI+4	-	-	-	+
$\gamma 3$	VI+2	-	+	-	-

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren für die Expression der einzelnen Konstrukte. Die Plasmide basieren alle auf dem Expressionsvektor pCEP-Pu/BM40SP (pCEP).

Alle verwendeten Plasmide beinhalteten das BM40 Signalpeptid zur Sekretion der exprimierten Proteine. Insgesamt wurden die Fragmente in vier verschiedene Vektoren ligiert, was zur Herstellung von 23 Expressionsvektoren führte. Die korrekte Integration der Konstrukte sowie die Aufrechterhaltung des Leserasters wurde durch Sequenzieren mit den Primern SeqU (5'-Bereich) und Rev2 (3'-Bereich) überprüft.

Die Plasmide wurden in 293 EBNA-Zellen transfiziert, die nach der Selektion zur Gewinnung serumfreier Zellkulturüberstände verwendet wurden. Um die Expression zu überprüfen, wurde jeweils 1ml Zellkulturüberstand mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich, daß alle Konstrukte der N-terminalen Domänen exprimiert wurden. Weiterhin wurden die Proteine mit Tag im Western-Blot mit Antikörpern gegen das Tag nachgewiesen (siehe 2.3.1). Die Expressionsrate der Proteine erhöhte sich drastisch mit der Zahl der verwendeten LE-Module.

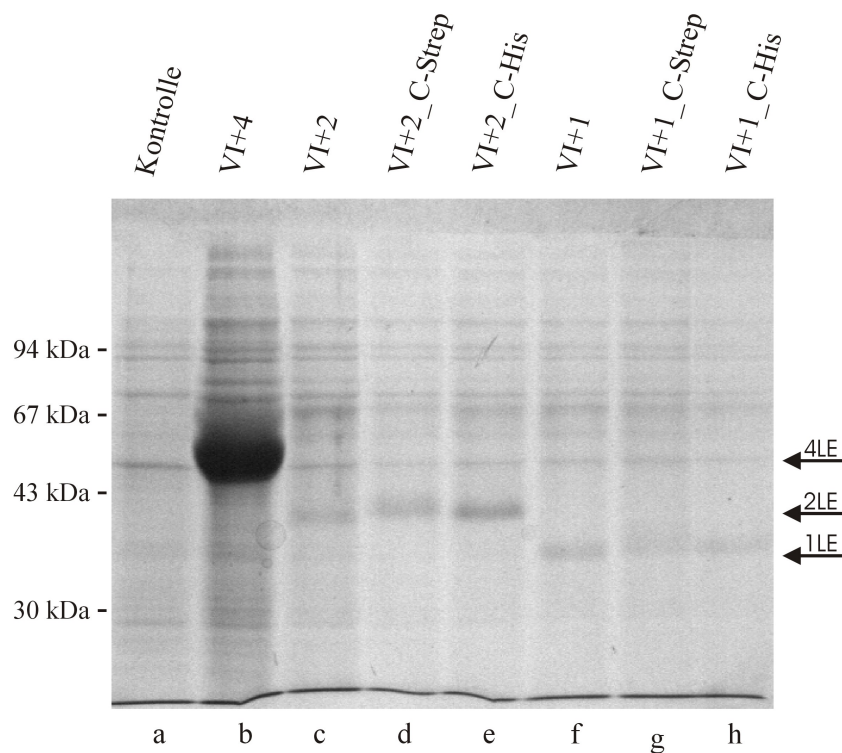


Abbildung 2.3: Abhängigkeit der Expressionsrate von der Zahl der verwendeten LE-Module am Beispiel der $\beta 3$ -Kette. Es wurde jeweils 1ml serumfreier Zellkulturüberstand mit TCA gefällt und auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen; a: untransfizierte EBNA Kontrolle; b: VI+4 C-Strep; c,d,e: VI+2; f,g,h: VI+1. Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied bei der Expression ohne (c,f) bzw. mit C-Strep (d,g) oder C-His Tag (e,h).

2.2 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der überexprimierten Proteine erfolgte in Abhängigkeit vom verwendeten Expressionsvektor entweder durch Affinitätschromatographie (His- bzw. StrepII-Tag) oder konventionell mittels Ionenaustauschchromatographie und Gel-filtration. Im Folgenden sind beispielhaft die Aufreinigungen von $\beta 3_{VI+2_C}$ -His, $\alpha 2_{VI+4_C}$ -Strep und $\beta 1_{VI+4}$ dargestellt.

Die Verwendung von Bindungsmodulen ermöglichte die Aufreinigung der rekombinanten Proteine in einem Schritt. Serumfreier Überstand wurde über eine mit Talon- (Clontech) bzw. StrepTactin-Matrix (IBA) gefüllte Säule gepumpt, von der die Fusionsproteine eluiert wurden, nachdem unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen entfernt waren. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte im Falle von StrepII-Tag in einem Schritt mit Desthiobiotin und bei einem His-Tag durch einen Imidazolgradienten (Abb. 2.5). Bei Verwendung des StrepII-Tags wurde jeweils ein Teil des überexprimierten Proteins im Durchfluß gefunden (Abb. 2.4). Eine verbesserte Bindung an die StrepTactin-Matrix konnte erst nach vorheriger Aufkonzentration des Fusionsproteins mit einem Ionenaustauscher erzielt werden.

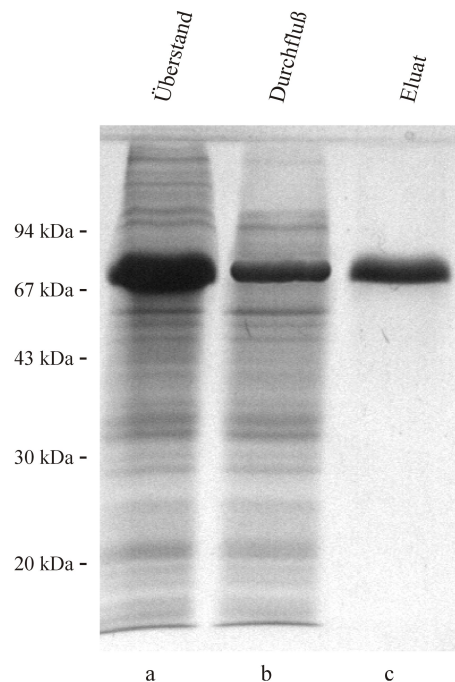


Abbildung 2.4: 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel der Aufreinigung von $\alpha 2_{VI+4_C}$ -Strep mit StrepTactin.: Überstand (a); Durchfluß (b) und Eluat (c). Vom Eluat wurden $30\mu\text{l}$ aufgetragen und vom Überstand bzw. Durchfluß 1ml mit TCA gefällt.

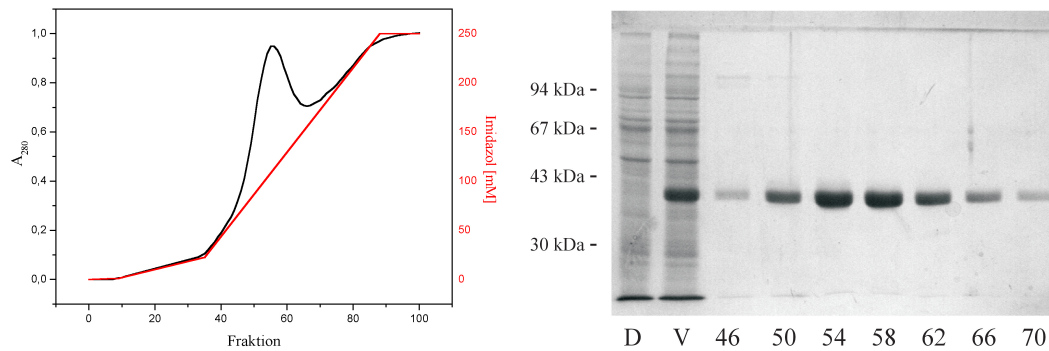


Abbildung 2.5: Aufreinigung von $\beta 3_{VI+2_C-His}$ mit Talon Matrix. Die Elution des Proteins von der Säule (8 ml Matrix) erfolgte mit einem Imidazolgradienten von 0-250 mM. Aufgrund der Absorption von Imidazol bei 280 nm kommt es mit zunehmender Konzentration zu einem erhöhten Hintergrund. Wie im Chromatogramm und 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel zu sehen ist, eluierte das Protein in den Fraktionen 46-70. Je 1ml Fraktion wurden $30\mu l$ aufgetragen. Der Durchfluß (D) zeigt, daß das im Überstand (V) enthaltene Protein vollständig gebunden wurde.

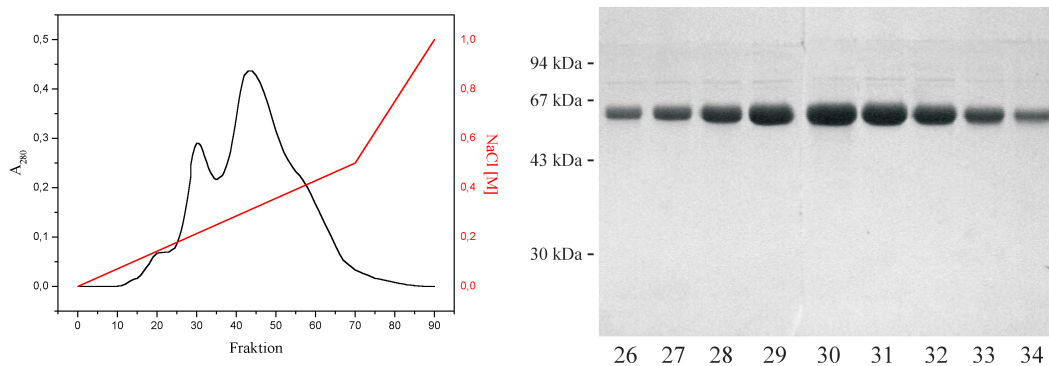


Abbildung 2.6: Reinigung von $\beta 1_{VI+4}$ aus serumfreiem Überstand mit einer DEAE-Sephrose (70 ml Matrix). Zur Elution des Proteins wurde ein NaCl-Gradient verwendet. Das Protein eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 200 mM. $30\mu l$ der 10 ml Fraktionen wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und es zeigte sich, daß das Protein fast rein war.

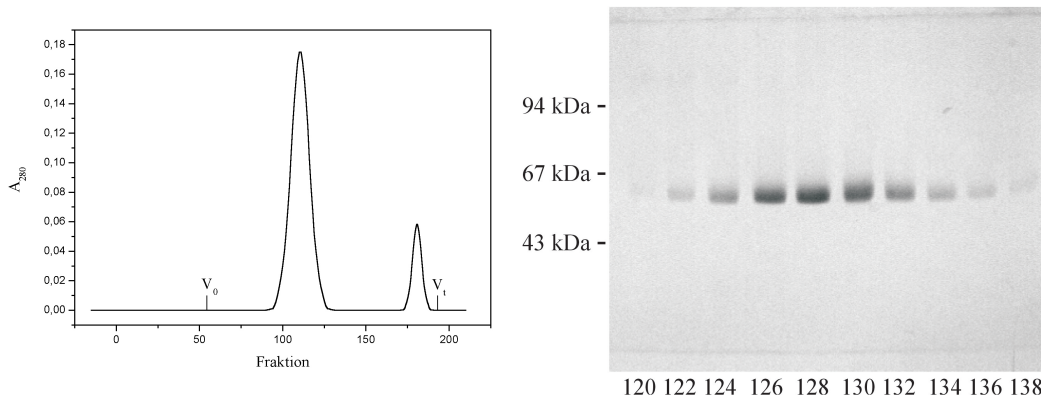


Abbildung 2.7: Zur weiteren Aufreinigung von $\beta 1_{VI+4}$ nach der DEAE-Sepharose wurde eine Gelfiltration mit einer CL6B-Sepharose (1800 ml) durchgeführt. Das Protein eluierte bei einem Volumen von ca. 1300 ml. Die Reinheit des Proteins wurde auf einem 8%igem SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft. Von den 10 ml Fraktionen wurden $30\mu\text{l}$ aufgetragen. Das Signal beim Totalvolumen der Säule resultierte von Phenolrot aus dem Medium, welches gleichzeitig mit dem Protein von der DEAE-Sepharose eluierte.

Die Reinigung der Proteine ohne Tag erfolgte primär durch Ionenaustauschchromatographie. Zunächst wurde durch Inkubation von Matrix (CM- bzw. DEAE-Sepharose) mit kleinen Mengen Überstand bei verschiedenen pH-Werten ermittelt, ob ein Anion- oder Kation-Austauscher verwendet werden sollte. Im Fall von $\beta 1_{VI+4}$ wurde entsprechend dem theoretischen pI-Wert von 5,20 eine DEAE-Sepharose verwendet (Abb. 2.6). Nach diesem Schritt war auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ein fast reines Protein zu sehen. Um die Reinheit des Proteins weiter zu verbessern, erfolgte noch eine Gelfiltration über eine Sepharose CL6B (Abb. 2.7).

2.3 Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Die Analyse der rekombinanten Proteine wird im folgenden exemplarisch für ein Konstrukt je Kette beschrieben. Die aufgereinigten Proteine wurden zuerst mittels Ultrafiltration (Vivaspin) eingengt und gegen HBS umgepuffert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit einem BCA-Assay ermittelt. Nachdem gezeigt wurde, daß Einfrieren und Auftauen nicht zu einer Präzipitation bzw. Degradation der Proteine führte, wurden diese in Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Abbildung 2.8 zeigt das Laufverhalten der Proteine auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Die Fragmente $\alpha 1_{VI+2_C\text{-His}}$, $\beta 3_{VI+4_C\text{-His}}$ und $\gamma 1_{VI+4_N\text{-His}}$ zeigen in beiden Fällen eine

einzelne scharfe Bande. Im Gegensatz zu $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His, welches unter beiden Bedingungen eine Doppelbande aufweist, zeigen $\beta 1_{VI+4}$ und $\beta 2_{VI+4_C}$ -His diese nur unter nicht reduzierenden Versuchsbedingungen. Die rekombinanten Proteine $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His und $\alpha 5_{VI+4_C}$ -His weisen sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen eine leichte Inhomogenität auf.

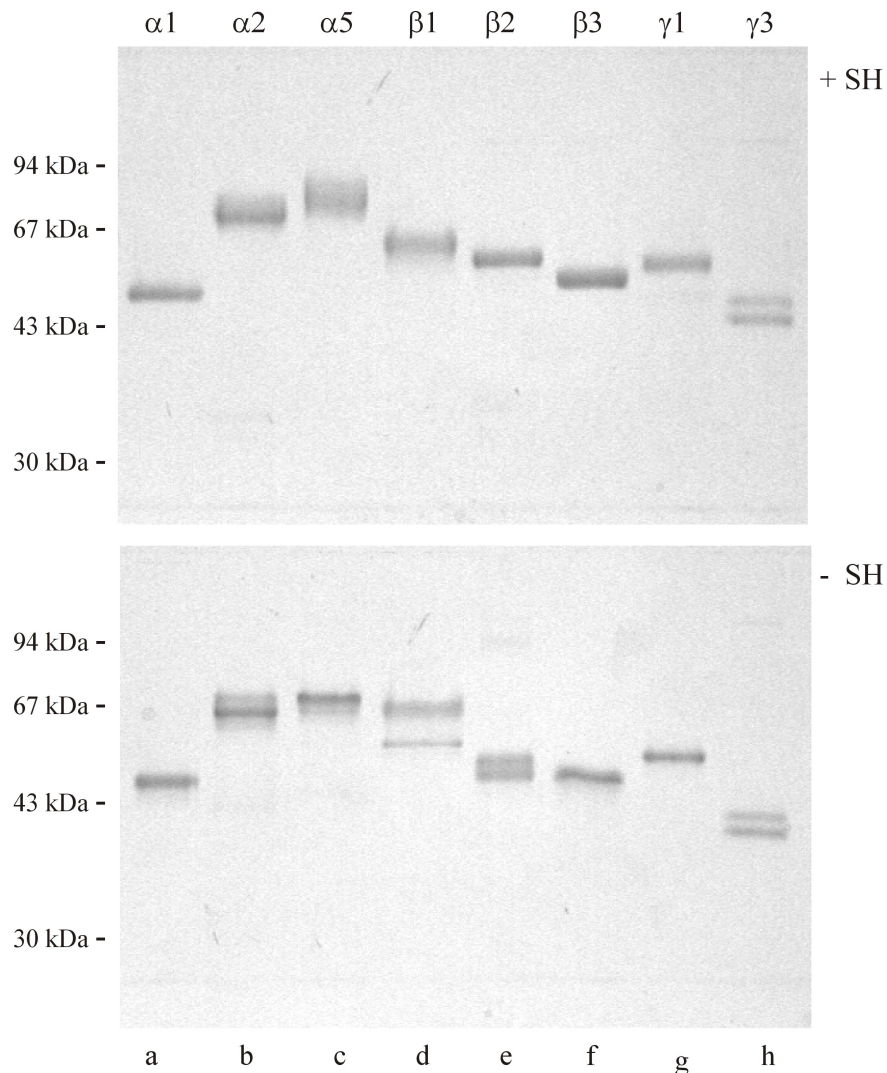


Abbildung 2.8: 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel der aufgereinigten Proteine unter reduzierenden (+ SH) und nicht reduzierenden (- SH) Bedingungen. Es wurden aufgetragen: $\alpha 1_{VI+2_C}$ -His (a), $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His (b), $\alpha 5_{VI+4_C}$ -His (c), $\beta 1_{VI+4}$ (d), $\beta 2_{VI+4_C}$ -His (e), $\beta 3_{VI+4_C}$ -His (f), $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His (g) und $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His (h).

2.3.1 Identifizierung der Proteine

Zur eindeutigen Identifizierung der isolierten Proteine erfolgte eine N-terminale Sequenzierung im ZMMK-Servicelabor. In allen Fällen wiesen die ersten acht Zyklen die erwartete Sequenz auf.

Proteien	N-terminale Sequenz
$\alpha 1_{VI+2_C}$ -His	NH ₂ -APLVQQRG
$\alpha 2_{VI+4_C}$ -His	NH ₂ -APLVSQTQ
$\alpha 5_{VI+4_C}$ -His	NH ₂ -APLV RTPG
$\beta 1_{VI+4}$	NH ₂ -APLVQEPE
$\beta 2_{VI+4_C}$ -His	NH ₂ -APLVQAPS
$\beta 3_{VI+4_C}$ -His	NH ₂ -APLVQQAC
$\gamma 1_{VI+4_N}$ -His	NH ₂ -APLVHHHH
$\gamma 3_{VI+2_C}$ -His	NH ₂ -APLVADMG

Tabelle 2.5: N-terminale Sequenzen der rekombinanten Proteine.

Es mußten relativ viele Zyklen durchgeführt werden, da nach Abspaltung des BM40 Signalpeptides jeweils vier Aminosäuren (APLV) am N-terminus des Proteins verbleiben.

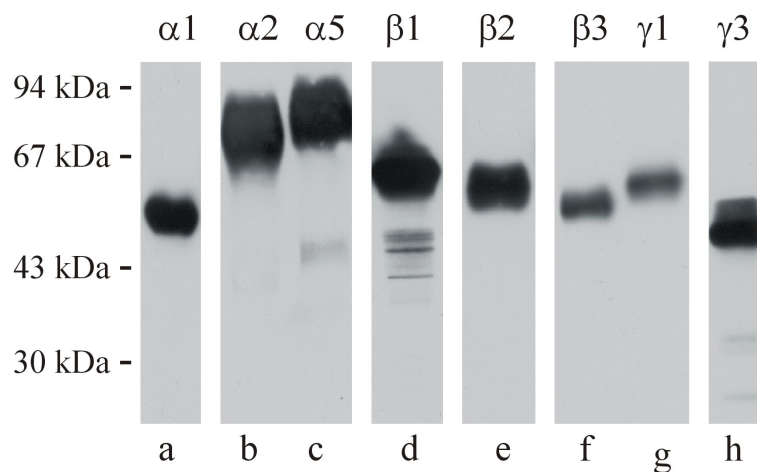


Abbildung 2.9: Nachweis von rekombinanten Proteinen mit Tetra His Antikörper. Die verwendeten Proteine waren $\alpha 1_{VI+2_C}$ -His (a), $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His (b), $\alpha 5_{VI+4_C}$ -His (c), $\beta 1_{VI+4_N}$ -His (d), $\beta 2_{VI+4_C}$ -His (e), $\beta 3_{VI+4_C}$ -His (f), $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His (g) und $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His (h).

Für $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His konnte weiterhin gezeigt werden, daß beide im reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel auftretenden Banden den selben N-Terminus besitzen. Zu diesem Zweck wurden die Banden auf eine PVDF-Membran überführt und getrennt ansequenziert. Es wurde demzufolge der Nachweis erbracht, daß alle Proteine N-terminal weder degradiert noch prozessiert sind.

Weiterhin wurden alle rekombinanten Proteine mit Bindungsmodul durch Antikörper gegen das His- bzw. StrepII-Tag im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 2.9). Für alle Proteine mit C-terminalem Tag konnte somit auch ein intakter C-Terminus nachgewiesen werden.

2.3.2 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein MALDI-TOF Spektrum (Abb. 2.10) von jedem Protein aufgenommen. Alle rekombinanten Proteine wiesen eine gegenüber dem theoretischen Molekulargewicht erhöhte Masse auf.

Protein	theoretische Masse	experimentelle Masse	Differenz
$\alpha 1_{VI+2_C}$ -His	44426,9 Da	50297,2 Da	5870,3 Da (13,2%)
$\alpha 2_{VI+4_C}$ -His	56650,6 Da	66244,9 Da	9594,3 Da (16,9%)
$\alpha 5_{VI+4_C}$ -His	57327,0 Da	67249,8 Da	9922,8 Da (17,3%)
$\beta 1_{VI+4}$	55249,3 Da	59278,7 Da	4029,4 Da (7,3%)
$\beta 2_{VI+4_C}$ -His	55885,9 Da	59699,1 Da	3813,2 Da (6,8%)
$\beta 3_{VI+4_C}$ -His	52682,2 Da	53682,2 Da	1581,4 Da (3,0%)
$\gamma 1_{VI+4_N}$ -His	52390,2 Da	55225,2 Da	2834,0 Da (5,4%)
$\gamma 3_{VI+2_C}$ -His 1	42053,3 Da	45720,1 Da	3666,8 Da (8,7%)
$\gamma 3_{VI+2_C}$ -His 2	42053,3 Da	47230,5 Da	5177,2 Da (12,3%)

Tabelle 2.6: Zusammenfassung der theoretischen und experimentell durch MALDI-TOF ermittelten Molekulargewichte der rekombinanten Proteine.

Von den exprimierten Proteinen zeigten die Fragmente der α -Ketten die größte und $\beta 3$ die geringste Abweichung. Im Fall von $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His bzw. $\alpha 5_{VI+4_C}$ -His war eine starke Verbreiterung der Signale zu sehen und für $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His wurden, wie bereits bei der Gelelektrophorese, zwei Populationen nachgewiesen.

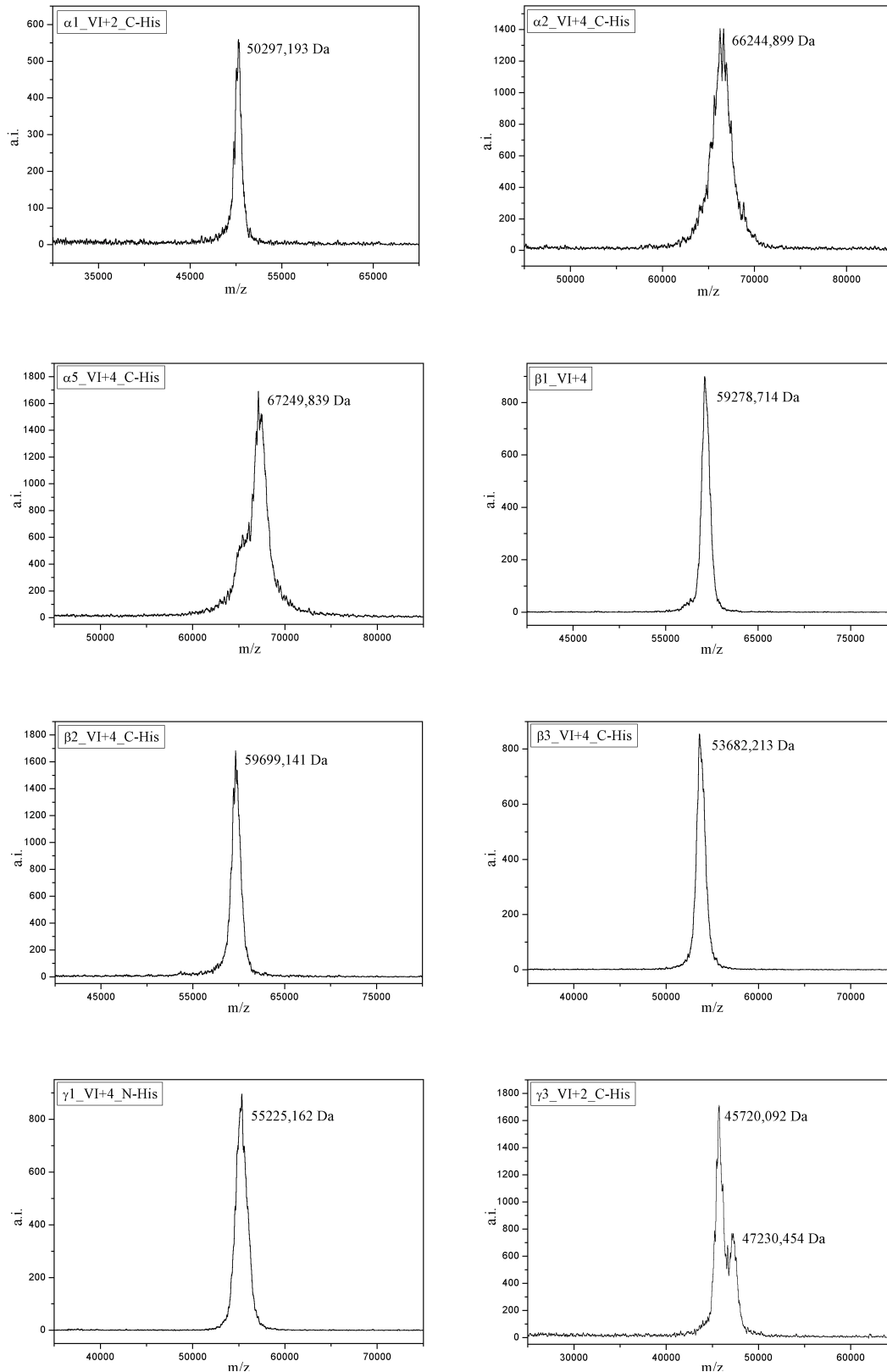


Abbildung 2.10: MALDI-TOF Spektren der aufgereinigten Proteine

2.3.3 Deglykosylierung

Die verbreiterten Signale der α -Ketten im MALDI-Spektrum ließen bereits eine Glykosylierung erahnen. Weiterhin zeigte sich ein lineares Verhältnis zwischen der Massenabweichung vom theoretischen Molekulargewicht und der Zahl der potentiellen Glykosylierungsstellen der Proteine, wenn davon ausgegangen wird, daß ein einfaches N-Glykan eine durchschnittliche Masse von 1,5 kDa aufweist. Genau diese Massendifferenz zeigen die beiden Formen der $\gamma 3$ -Kette, weshalb unterschiedlich glykosylierte Fragmente vermutet wurden.

Protein	#	LN	LE1	LE2	LE3	LE4
$\alpha 1_{VI+2}$	4	N45, N79	-	N370, N374	X	X
$\alpha 2_{VI+4}$	6	N51, N85	N299	N359, N376	-	N466
$\alpha 5_{VI+4}$	6	N100, N148, N248	-	N383	N457, N485	-
$\beta 1_{VI+4}$	2	N120	-	N356	-	-
$\beta 2_{VI+4}$	2	N251	-	N371	-	-
$\beta 3_{VI+4}$	1	N220	-	-	-	-
$\gamma 1_{VI+4}$	2	N58, N132	-	-	-	-
$\gamma 3_{VI+2}$	3	N128	N304	N337	X	X

Tabelle 2.7: Auflistung der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in den einzelnen Domänen der rekombinant exprimierten Proteine. LE1 bezeichnet das an die LN-Domäne grenzende LE-Modul. Ein X zeigt, daß die entsprechende Domäne nicht im Konstrukt enthalten ist.

Durch die Deglykosylierung sollte jedoch nicht nur eine Glykosylierung der Proteine nachgewiesen werden. Das hauptsächliche Anliegen war es, ein Protein zu identifizieren, welches nicht oder nur zu einem geringen Maße glykosyliert ist und somit für Kristallisationsexperimente besonders geeignet ist, da eine Glykosylierung zu einer Inhomogenität des Proteins führt.

Eine Deglykosylierung mit N-Glykosidase F unter denaturierenden Bedingungen führte in allen Fällen zu einer Veränderung der elektrophoretischen Mobilität (Abb. 2.12) und zeigte, daß alle Proteine glykosyliert sind. Wie anhand der potentiellen Glykosylierungsstellen zu erwarten war, sind die α -Ketten am stärksten und die $\beta 3$ -Kette am geringsten N-glykosyliert. Für $\gamma 3$ konnte auch gezeigt werden, daß das Protein in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen vorliegt, da sich beide durch N-Glykosidase F in eine einzelne überführen lassen.

Für die Kristallisation sollte jedoch ein Protein ohne Glykosylierung hergestellt werden. Aus diesem Grund wurde eine native Deglykosylierung durchgeführt, um zu überprüfen, ob auf diese Weise die Zucker entfernt werden können. Unter

nativen Bedingungen konnten aber nur Fragmente der β 3- und γ 3-Kette im selben Maße deglykosyliert werden wie unter denaturierenden Versuchsbedingungen.

Massenspektrometrische Untersuchungen von γ 3_VI+2_C-His nach Verdau mit N-Glykosidase F zeigten, daß die Masse des Proteins ohne Zucker der theoretischen entspricht und deshalb keine weiteren posttranslationalen Modifikationen neben der N-Glykosylierung vorliegen. Weiterhin verdeutlichen die Spektren, daß 293 EBNA-Zellen eine zweifach und dreifach glykosylierte Form von γ 3_VI+2_C-His exprimieren (Abb. 2.12).

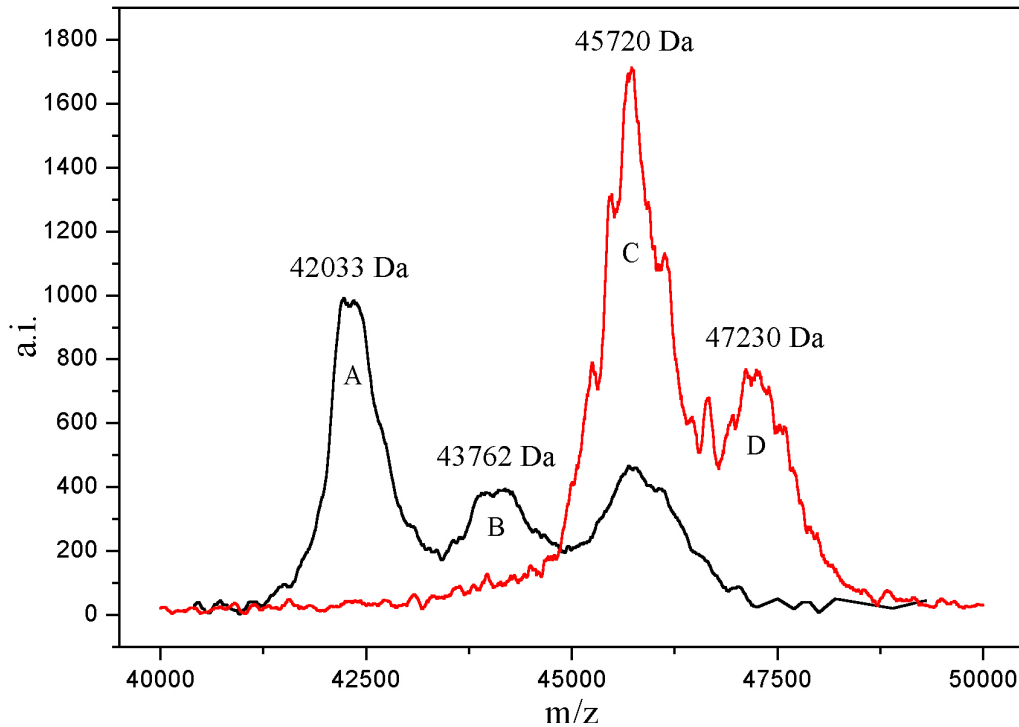


Abbildung 2.11: MALDI-TOF Spektrum von γ 3_VI+2_C-His vor (rot) und nach (schwarz) Deglykosylierung mit Endoglykosidase F unter nativen Bedingungen. Die Masse des Hauptsignals nach Abspalten der Zucker (A) entspricht im Rahmen der Fehlergrenzen dem theoretischen Molekulargewicht (42053,3 Da). N-Glykosidase F spaltet immer ein ganzes N-Glykan ab, weshalb bei drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen abgeleitet werden kann, daß 293 EBNA-Zellen hauptsächlich ein Protein mit zwei (C) und zu einem geringeren Anteil ein Protein mit drei (D) N-Glykosylierungen exprimieren. Signal B stellt somit eine Zwischenstufe bei der Deglykosylierung dar, welche nur einen Zucker trägt.

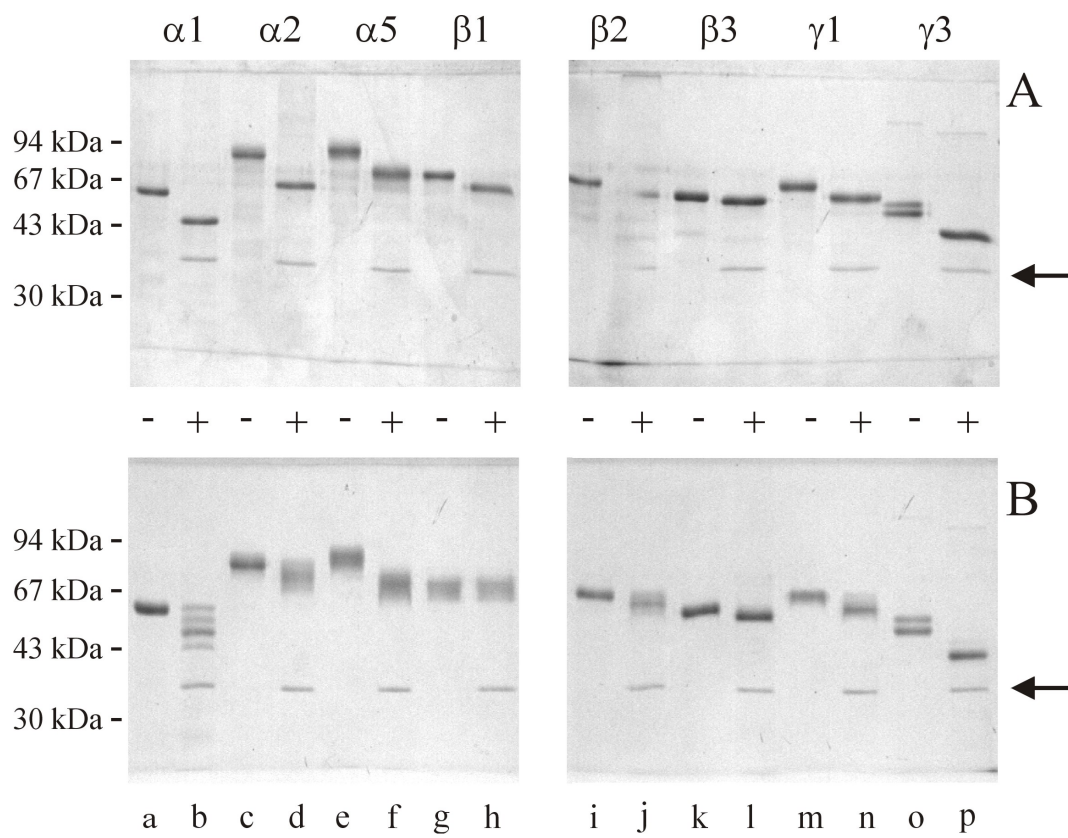


Abbildung 2.12: Deglykosylierung der aufgereinigten LN-Domänen mit N-Glykosidase F unter denaturierenden (A) und nativen (B) Versuchsbedingungen. Verwendet wurden die Proteine $\alpha 1_{VI+2_C}$ -His (a, b), $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His (c, d), $\alpha 5_{VI+4_C}$ -His (e, f), $\beta 1_{VI+4_N}$ -His (g, h), $\beta 2_{VI+4_C}$ -His (i, j), $\beta 3_{VI+4_C}$ -His (k, l), $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His (m, n) und $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His (o, p). Die Proteine wurden jeweils über Nacht mit (+) und ohne (-) Enzym inkubiert. Auf dem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel ist das Enzym bei 35 kDa zu sehen (Pfeil).

2.3.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Aggregationsverhaltens der aufgereinigten Proteine wurde eine native Gelelektrophorese bei pH 8,3 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen liefen $\alpha 1_{VI+2_C-His}$ und $\beta 3_{VI+4_C-His}$ nicht in das Gel ein. Mit Ausnahme von $\beta 2_{VI+4_C-His}$, welches zu einem geringen Teil in der Tasche stecken blieb, zeigten alle Proteine eine einzelne Bande.

Protein	$\alpha 1_{VI+2_C-His}$	$\alpha 2_{VI+4_C-His}$	$\alpha 5_{VI+4_C-His}$	$\beta 1_{VI+4}$
pI	8,00	6,77	6,10	5,20
Protein	$\beta 2_{VI+4_C-His}$	$\beta 3_{VI+4_C-His}$	$\gamma 1_{VI+4_N-His}$	$\gamma 3_{VI+2_C-His}$
pI	6,88	8,05	5,80	5,86

Tabelle 2.8: Theoretische pI-Werte der rekombinanten Proteine.

Aufgrund der theoretischen pI-Werte wurde im Fall von $\alpha 1_{VI+2_C-His}$ und $\beta 3_{VI+4_C-His}$ eine Elektrophorese bei pH 9,0 durchgeführt. Bei diesen Versuchsbedingungen gelangten auch diese Fragmente in das Gel und zeigten eine einzelne Bande.

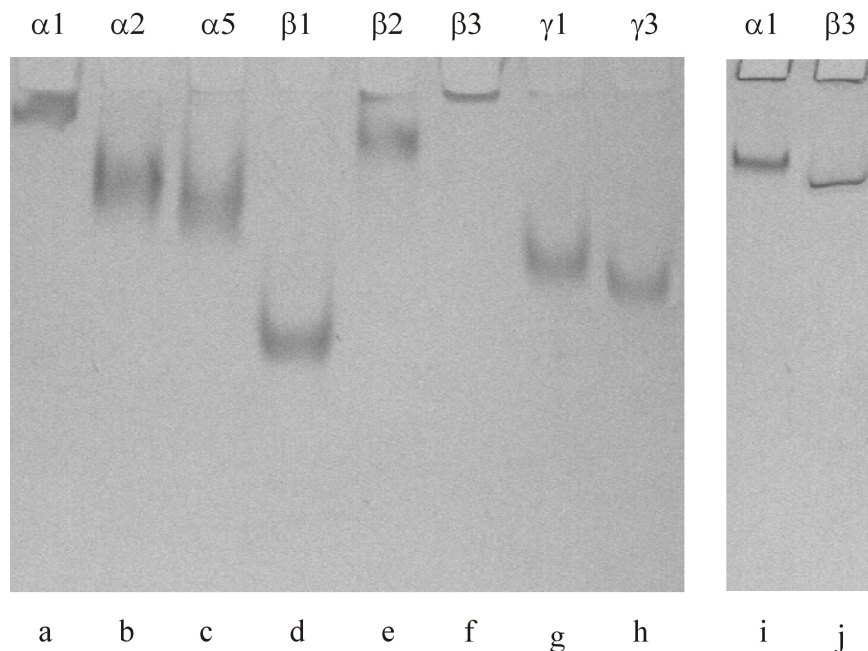


Abbildung 2.13: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (6 %) der aufgereinigten Proteine bei pH 8,3 (a-h) und pH 9,0 (i, j). Es wurden verwendet $\alpha 1_{VI+2_C-His}$ (a, i), $\alpha 2_{VI+4_C-His}$ (b), $\alpha 5_{VI+4_C-His}$ (c), $\beta 1_{VI+4}$ (d), $\beta 2_{VI+4_C-His}$ (e), $\beta 3_{VI+4_C-His}$ (f, j), $\gamma 1_{VI+4_N-His}$ (g) und $\gamma 3_{VI+2_C-His}$ (h)

2.3.5 CD-Spektroskopie

Von allen gereinigten Proteinen wurden CD-Spektren aufgenommen. Dabei sollte untersucht werden, ob die rekombinanten Proteine in Lösung eine Faltung und damit eine Sekundärstruktur aufweisen. Die Proteine zeigten Spektren mit einem Minimum bei ca. 205 nm und einem geringen Signal bei 222 nm. Mit Hilfe des Programms CONTIN (Greenfield, 1996) wurden weiterhin aus den Messdaten der CD-Spektren theoretische Berechnungen der Sekundärstruktur durchgeführt. Es zeigte sich in allen Fällen ein geringer Anteil an α -Helix und ein hoher Anteil an β -Faltblatt. Auffallend war der relativ hohe Anteil von β -Schleifen an der Gesamtstruktur der Proteine.

Protein	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Rest
α 1_VI+2_C-His	10%	37%	28%	25%
α 2_VI+4_C-His	11%	33%	29%	27%
α 5_VI+4_C-His	14%	36%	27%	24%
β 1_VI+4	9%	33%	31%	26%
β 2_VI+4_C-His	9%	34%	29%	27%
β 3_VI+4_C-His	12%	32%	31%	25%
γ 1_VI+4_N-His	15%	27%	31%	27%
γ 3_VI+2_C-His	12%	30%	31%	27%

Tabelle 2.9: Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur der rekombinanten Fragmente. Die Daten wurden mit dem Programm CONTIN aus den CD-Spektren der Proteine berechnet. Die Zahlen stehen für den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelementes an der Gesamtstruktur des Proteins.

Zur Überprüfung einer Calcium-induzierten Änderung der Sekundärstruktur wurden CD-Spektren in Anwesenheit von 2 mM Calcium bzw. 2 mM EDTA gemessen. Von den untersuchten Ketten zeigten α 2_VI+4_C-His, α 5_VI+4_C-His und γ 3_VI+2_C-His keine Konformationsänderung. Alle anderen zeigten eine veränderte Sekundärstruktur in Anwesenheit von EDTA, welche jedoch nur im Fall von β 3_VI+4_C-His und γ 1_VI+4_N-His teilweise reversibel war. Weder die Verwendung von EGTA anstelle von EDTA noch die Zugabe anderer zweiwertiger Kationen wie Magnesium, Mangan und Zink führten zu einer reversiblen Konformationsänderung.

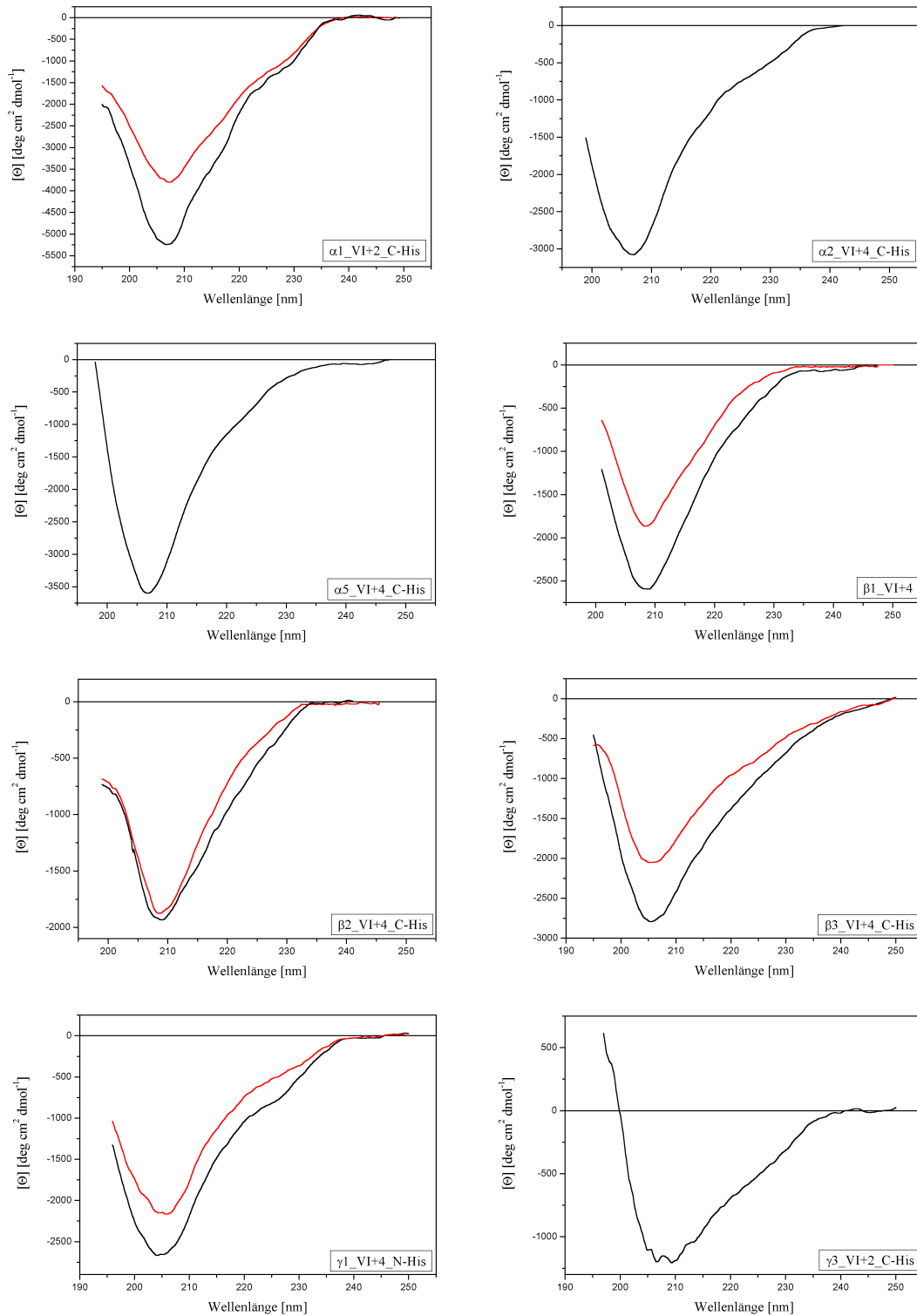


Abbildung 2.14: CD-Spektren der aufgereinigten Proteine. Die rekombinanten Proteine wurden bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ in 5 mM Tris pH 7.4 vermessen. Die schwarzen Linien zeigen die Spektren in Anwesenheit von 2 mM Calcium. In Abwesenheit von Calcium-Ionen zeigten fünf der acht N-terminalen Domänen eine Konformationsänderung (rot).

2.4 Interaktionsstudien

2.4.1 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Zur Untersuchung von Interaktionen mittels SPR (Surface Plasmon Resonanz) wurde ein Biacore 3000 verwendet. Für die Messung wurde ein Protein als Ligand auf einen CM5-Sensorchip gekoppelt und ein Protein als Analyt über die Oberfläche geleitet. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit der BIAevaluation 3.0-Software.

Kopplung

In einem Vortest wurde zuerst überprüft, bei welchem pH-Wert und bei welcher Konzentration das jeweilige Protein auf einer nicht aktivierten CM5-Sensorchip Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen aufkonzentriert werden konnte (Abb. 2.15). Es zeigte sich, daß alle Proteine in 10 mM Natriumacetat pH 5.0 und einer Konzentration zwischen 50-200 $\mu\text{g/ml}$ für die Kopplung verwendet werden konnten.

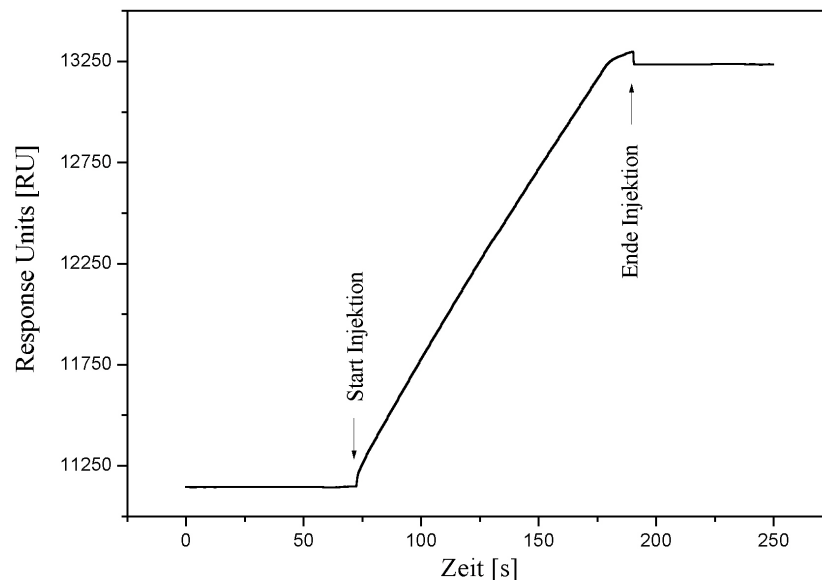


Abbildung 2.15: Vortest zur Kopplung von $\alpha 1_{VI+2_C}$ -His. Die Injektion des Proteins in 10 mM Natriumacetat pH 5.0 über einen nicht aktivierten CM5-Sensorchip führte zur Aufkonzentration des Proteins auf der Oberfläche und deshalb zu einem Anstieg der Response Units (RU).

Die Kopplung der Proteine erfolgte auf eine mit NHS/EDAC aktivierte CM5-

Sensorchip Oberfläche. Nachdem die gewünschte Menge an Protein (300-800 RU) gekoppelt war, wurden freie Bindungsstellen durch Injektion von Ethanolamin abgesättigt.

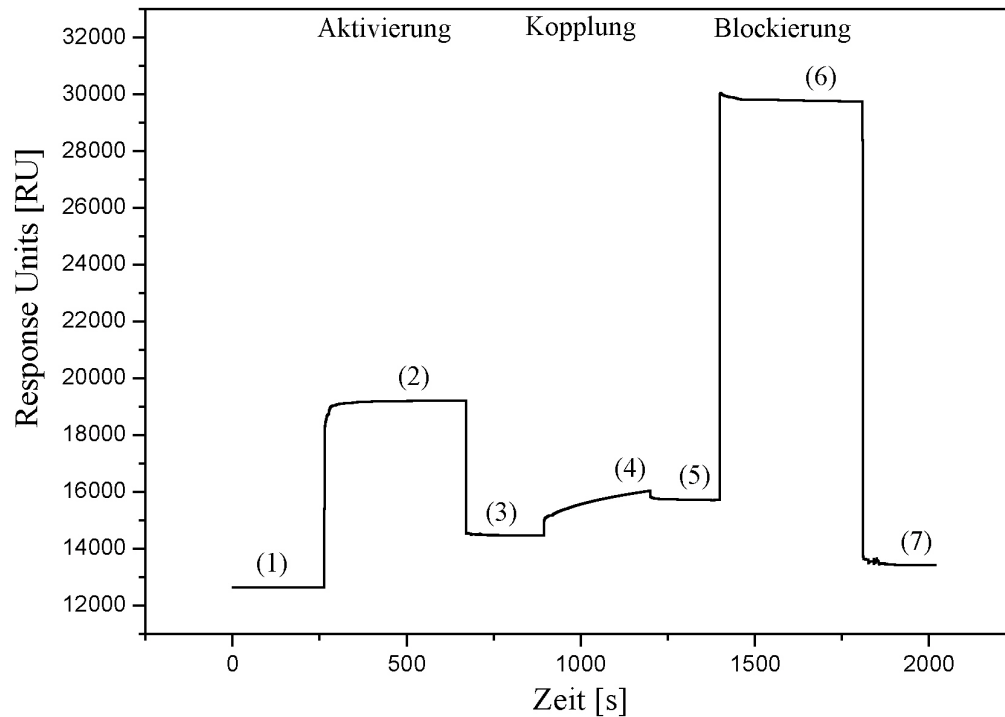


Abbildung 2.16: Typisches Sensogramm einer Kopplung auf einen CM5-Sensorchip. Die Nummern entsprechen den einzelnen Schritten der Immobilisierung:

1. Basislinie der nicht modifizierten Sensorchipoberfläche mit Laufpuffer.
2. Aktivierung der Oberfläche mit EDC/NHS führt zu einem Anstieg des SPR-Signals durch einen veränderten Refraktionsindex der Lösung.
3. Die aktivierte Oberfläche verursacht ein erhöhtes SPR-Signal der Basislinie.
4. Die Injektion des Liganden führt zu dessen Kopplung auf der Sensorchip Oberfläche.
5. Basislinie nach der Kopplung. Das Signal beinhaltet sowohl kovalent als auch ionisch gebundenen Liganden.
6. Blockierung von aktivierten Bindungsstellen mit Ethanolamin. Aufgrund der hohen Konzentration und dem daraus resultierenden Refraktionsindex der Lösung kommt es zu einem starken Anstieg des SPR-Signals. Die Blockierung führt auch zur Entfernung von ionisch gebundenem Liganden von der Oberfläche.
7. Basislinie mit kovalent immobilisiertem Liganden.

Interaktionen der LN-Domänen von Laminin-1

Zuerst wurden die Interaktionen der N-terminalen Domänen von Laminin-1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein Konstrukt der $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette auf eine der vier Oberflächen eines CM5-Sensorchips gekoppelt. Die vierte Oberfläche, auf die kein Protein gekoppelt wurde, die jedoch aktiviert und blockiert wurde wie die anderen, diente als Negativkontrolle. Nachdem das System in HBS/ Ca^{2+} -Puffer equilibriert war und die Basislinie konstant war, erfolgte die Injektion der Proteine mit *Kinject* (100 μl , 500 s Dissoziation). Dieses Injektionsverfahren wurde verwendet, da nur so eine kinetische Auswertung der Sensorgramme möglich ist. Die LN-Domänen von Laminin-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) interagierten alle miteinander. Ferner wurde im Fall von $\alpha 1$, im Gegensatz zu $\beta 1$ und $\gamma 1$, eine Selbstinteraktion nachgewiesen. Für jedes Bindungspaar wurden Messungen bei verschiedenen Analytkonzentrationen durchgeführt (Abb. 2.17) und jedes Protein wurde sowohl als Analyt als auch als Ligand verwendet. Die Injektionen erfolgten bei einer Flußgeschwindigkeit von 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Temperatur von 25 °C. Die Verwendung von Flußraten im Bereich von 20-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ beeinflusste das gemessene Signal nicht. Die Temperatur spielte jedoch eine entscheidende Rolle, da bei 13 °C kein und bei 37 °C ein nicht auswertbares Signal gemessen wurde.

Die Berechnung der kinetischen Daten aus den Sensogrammen erfolgte nach Subtraktion des Signals der Kontrolloberfläche mit Hilfe der BIAevaluation 3.0-Software. Die Auswertung beruht auf dem Marquardt-Levenberg Algorithmus (2.1) welcher die Quadratsumme (S) der Differenzen zwischen gemessenen (r_g) und berechneten (r_b) Datenpunkten minimiert.

$$S = \sum_{i=1}^n (r_b - r_g)^2 \quad (2.1)$$

Für die Berechnung der Datenpunkte wurden die aus der Annahme einer 1:1-Langmuir-Bindung resultierenden Geschwindigkeitsgesetze verwendet. Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Werten wird durch den statistischen Wert χ^2 beschrieben. Dieser kann im Fall von Sensogrammen aufgrund der großen Anzahl von Datenpunkten (n) vereinfacht werden zu:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_b - r_g)^2}{n} \quad (2.2)$$

Zur Überprüfung des Bindungsmodells erfolgte ein Fit über den gesamten Bereich von Assoziation und Dissoziation. Die Ermittlung der Assoziations- (k_a) und Dissoziationskonstanten (k_d) erfolgte jedoch getrennt in den Bereichen von

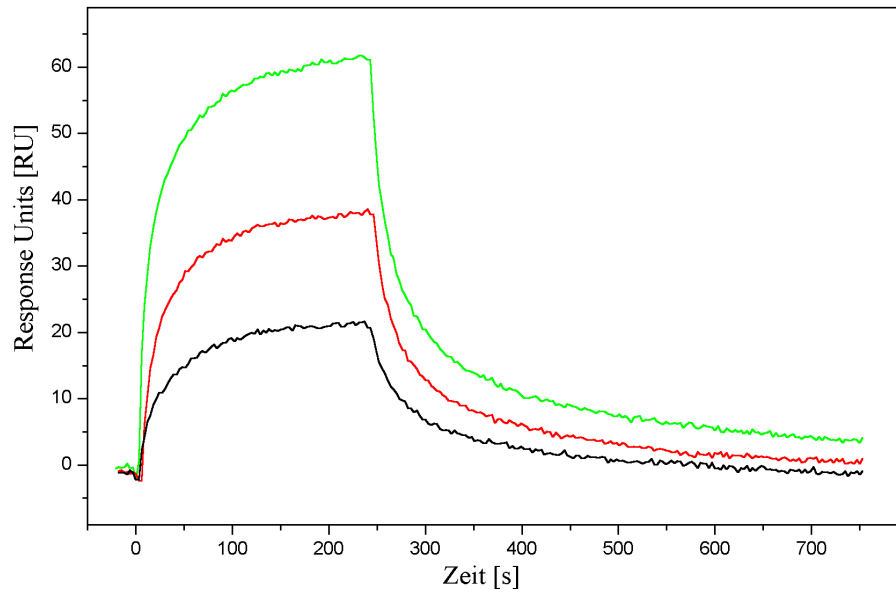


Abbildung 2.17: Typische SPR-Sensogramme einer Interaktion zwischen zwei LN-Domänen. $\alpha 1$ wurde als Ligand auf den Sensorchip gekoppelt (500 RU) und $\beta 1$ wurde bei verschiedenen Konzentrationen ($0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ und $2,0 \mu\text{M}$) über die Oberfläche geleitet.

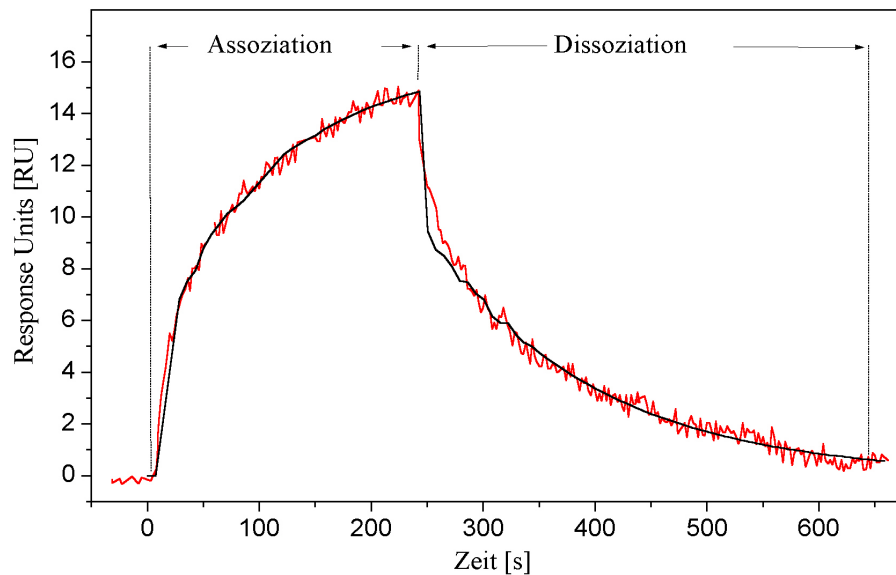


Abbildung 2.18: Gemessene (rot) und berechnete (schwarz) Daten für die Interaktion zwischen $\beta 1$ (Ligand) und $\gamma 1$ (Analyte). Der Fit erfolgte gleichzeitig über den gesamten Bereich von Assoziation und Dissoziation.

50 s - 230 s bzw. 300 s - 600 s nach Start der Injektion. Im Fall der LN-Domänen war die Übereinstimmung von experimentellen und berechneten Daten so gut, daß die Unterschiede dem Rauschen der Basislinie entsprachen (Abb 2.18). Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten und Dissoziationskonstanten der Interaktionen der LN-Domänen von Laminin-1 sind in den Tabellen 2.10 - 2.14 aufgelistet.

Als weitere Negativkontrolle erfolgte die Injektion von zwei Proteinen, BSA und $\beta 2_{IV}$, die nicht mit den N-terminalen Domänen interagieren sollten. Wie erwartet zeigten diese keine Bindung an die immobilisierten Proteine. Mit den Fragmenten $\beta 1_{VI+4}$, $\beta 1_{VI+1_C}$ -Strep und $\beta 1_{VI+2_N}$ -His wurde weiterhin für die $\beta 1$ -Kette gezeigt, daß die Anzahl der LE-Module und die Verwendung eines N- bzw. C-terminalen Tags keine Veränderung des Bindungsverhaltens hervorrufen.

Um den Einfluß von Calcium-Ionen auf die Interaktionen zu prüfen, wurde, nachdem die Interaktionen von Laminin-1 in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} untersucht waren, der Laufpuffer gegen einen Puffer mit 2 mM EDTA ersetzt. Unter diesen Ca^{2+} -freien Bedingungen konnte keine der zuvor beobachteten Bindungen nachgewiesen werden. Erneute Messungen in HBS/ Ca^{2+} ergaben in allen bereits beschriebenen Fällen wieder eine Interaktion und zeigten, daß es sich um reversible Ca^{2+} -abhängige Bindungen handelt.

Alle im Folgenden beschriebenen Interaktionen wurden unter den gleichen Bedingungen gemessen und ausgewertet wie die Wechselwirkungen der N-terminalen Domänen von Laminin-1.

Selbstinteraktionen der N-terminalen Domänen

Nachdem für $\alpha 1$ eine Selbstinteraktion nachgewiesen wurde, sollten Fragmente aller rekombinant exprimierten Ketten auf ihre Fähigkeit, mit sich selbst zu interagieren, überprüft werden. Alle α -Ketten gingen eine Bindung mit sich selbst ein. Im Gegensatz zu $\beta 1$ wurden für $\beta 2$ und $\beta 3$ Selbstinteraktionen beobachtet. Von den γ -Ketten besaß keine die Fähigkeit an sich selbst zu binden (Tab. 2.10). Die berechneten Geschwindigkeits- und Dissoziationskonstanten für die Selbstinteraktionen müssen unter Vorbehalt betrachtet werden. Bei den für die Injektion verwendeten Konzentrationen sollten nämlich in Lösung nicht nur Monomere vorliegen.

Interaktionen innerhalb der Subfamilien

Aufgrund der Selbstinteraktionen der Mehrzahl der LN-Domänen wurden mögliche Interaktionen innerhalb der Subfamilien der α -, β - und γ -Ketten untersucht. Im Gegensatz zu den γ -Ketten interagierten sowohl alle α - als auch alle β -Ketten untereinander (Tab. 2.11).

Ligand	Analyt	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	χ^2	K_d [M]
$\alpha 1$	$\alpha 1$	$1,80 \cdot 10^4$	$3,20 \cdot 10^{-3}$	0,08	$1,80 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 2$	$\alpha 2$	$5,50 \cdot 10^4$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	0,13	$2,00 \cdot 10^{-8}$
$\alpha 5$	$\alpha 5$	$3,60 \cdot 10^4$	$2,91 \cdot 10^{-3}$	0,17	$8,05 \cdot 10^{-8}$
$\beta 1$	$\beta 1$	KB	KB	KB	KB
$\beta 2$	$\beta 2$	$2,40 \cdot 10^4$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	0,19	$7,00 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\beta 3$	$3,90 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^{-3}$	0,18	$4,90 \cdot 10^{-8}$
$\gamma 1$	$\gamma 1$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 3$	$\gamma 3$	KB	KB	KB	KB

Tabelle 2.10: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten (k_a , k_d) und Dissoziationskonstanten (K_d) der Selbstinteraktionen der rekombinant exprimierten LN-Domänen. KB: Keine Bindung.

Ligand	Analyt	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	χ^2	K_d [M]
$\alpha 1$	$\alpha 2$	$8,70 \cdot 10^3$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	0,10	$5,10 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 2$	$\alpha 1$	$1,20 \cdot 10^4$	$4,40 \cdot 10^{-3}$	0,11	$3,70 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 1$	$\alpha 5$	$6,40 \cdot 10^3$	$5,90 \cdot 10^{-3}$	0,25	$9,20 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 5$	$\alpha 1$	$6,80 \cdot 10^3$	$6,90 \cdot 10^{-3}$	0,12	$1,00 \cdot 10^{-6}$
$\alpha 2$	$\alpha 5$	$8,20 \cdot 10^3$	$4,60 \cdot 10^{-3}$	0,18	$5,50 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 5$	$\alpha 2$	$6,00 \cdot 10^3$	$2,80 \cdot 10^{-3}$	0,09	$4,60 \cdot 10^{-7}$
$\beta 1$	$\beta 2$	$6,30 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	0,18	$2,80 \cdot 10^{-8}$
$\beta 2$	$\beta 1$	$5,80 \cdot 10^4$	$2,10 \cdot 10^{-3}$	0,15	$3,60 \cdot 10^{-8}$
$\beta 1$	$\beta 3$	$6,60 \cdot 10^4$	$2,80 \cdot 10^{-3}$	0,14	$4,30 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\beta 1$	$5,90 \cdot 10^4$	$3,10 \cdot 10^{-3}$	0,18	$5,30 \cdot 10^{-8}$
$\beta 2$	$\beta 3$	$4,90 \cdot 10^4$	$2,60 \cdot 10^{-3}$	0,19	$5,30 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\beta 2$	$3,90 \cdot 10^4$	$1,60 \cdot 10^{-3}$	0,15	$4,00 \cdot 10^{-8}$
$\gamma 1$	$\gamma 3$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 3$	$\gamma 1$	KB	KB	KB	KB

Tabelle 2.11: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten (k_a , k_d) und Dissoziationskonstanten (K_d) der Interaktionen innerhalb der Laminin Subfamilien. KB: Keine Bindung.

Ligand	Analyt	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	χ^2	K_d [M]
$\alpha 1$	$\beta 1$	$1,60 \cdot 10^4$	$6,70 \cdot 10^{-3}$	0,08	$4,20 \cdot 10^{-7}$
$\beta 1$	$\alpha 1$	$2,70 \cdot 10^4$	$6,40 \cdot 10^{-3}$	0,14	$2,40 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 1$	$\beta 2$	$9,00 \cdot 10^3$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,15	$1,10 \cdot 10^{-7}$
$\beta 2$	$\alpha 1$	$8,90 \cdot 10^3$	$8,40 \cdot 10^{-4}$	0,18	$9,40 \cdot 10^{-8}$
$\alpha 1$	$\beta 3$	$5,60 \cdot 10^3$	$5,00 \cdot 10^{-4}$	0,14	$8,90 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\alpha 1$	$1,10 \cdot 10^4$	$8,80 \cdot 10^{-4}$	0,13	$8,40 \cdot 10^{-8}$
$\alpha 2$	$\beta 1$	$7,20 \cdot 10^3$	$3,90 \cdot 10^{-3}$	0,11	$5,40 \cdot 10^{-7}$
$\beta 1$	$\alpha 2$	$6,30 \cdot 10^4$	$4,10 \cdot 10^{-3}$	0,18	$6,50 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 2$	$\beta 2$	$1,50 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	0,23	$1,20 \cdot 10^{-7}$
$\beta 2$	$\alpha 2$	$9,00 \cdot 10^3$	$2,80 \cdot 10^{-3}$	0,08	$3,20 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 2$	$\beta 3$	$2,20 \cdot 10^4$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	0,22	$5,20 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\alpha 2$	$3,80 \cdot 10^4$	$2,30 \cdot 10^{-3}$	0,21	$6,18 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 5$	$\beta 1$	$3,60 \cdot 10^3$	$4,70 \cdot 10^{-3}$	0,09	$1,30 \cdot 10^{-6}$
$\beta 1$	$\alpha 5$	$3,70 \cdot 10^4$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	0,09	$1,22 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 5$	$\beta 2$	$6,75 \cdot 10^3$	$1,41 \cdot 10^{-3}$	0,28	$2,10 \cdot 10^{-7}$
$\beta 2$	$\alpha 5$	$7,20 \cdot 10^4$	$1,45 \cdot 10^{-3}$	0,14	$2,00 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 5$	$\beta 3$	$1,00 \cdot 10^4$	$7,40 \cdot 10^{-4}$	0,16	$7,40 \cdot 10^{-8}$
$\beta 3$	$\alpha 5$	$1,30 \cdot 10^4$	$7,10 \cdot 10^{-3}$	0,19	$5,50 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 2.12: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten (k_a , k_d) und Dissoziationskonstanten (K_d) für Bindungen von α - an β -Ketten. KB: Keine Bindung.

Ligand	Analyt	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	χ^2	K_d [M]
$\alpha 1$	$\gamma 1$	$4,00 \cdot 10^3$	$7,00 \cdot 10^{-3}$	0,09	$1,80 \cdot 10^{-6}$
$\gamma 1$	$\alpha 1$	$2,90 \cdot 10^4$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	0,14	$1,20 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 2$	$\gamma 1$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 1$	$\alpha 2$	KB	KB	KB	KB
$\alpha 5$	$\gamma 1$	$2,30 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^{-3}$	0,09	$6,80 \cdot 10^{-7}$
$\gamma 1$	$\alpha 5$	$3,10 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	0,17	$5,50 \cdot 10^{-7}$
$\alpha 1$	$\gamma 3$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 3$	$\alpha 1$	KB	KB	KB	KB
$\alpha 2$	$\gamma 3$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 3$	$\alpha 2$	KB	KB	KB	KB
$\alpha 5$	$\gamma 3$	KB	KB	KB	KB
$\gamma 3$	$\alpha 5$	KB	KB	KB	KB

Tabelle 2.13: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten (k_a , k_d) und Dissoziationskonstanten (K_d) für Bindungen von α - an γ -Ketten. KB: Keine Bindung.

Interaktionen zwischen verschiedenen Ketten

Für alle mit den rekombinant exprimierten Proteinen möglichen Kombinationen der α - und β -Ketten konnte eine Bindung nachgewiesen werden (Tab. 2.12). Die Interaktionen mit γ -Ketten waren zum Teil limitiert. Von den α -Ketten reagierte keine mit Domäne VI der γ 3-Kette und nur α 1 bzw. α 5 interagierten mit der N-terminalen Domäne von γ 1 (Tab. 2.13). Im Fall der Wechselwirkung zwischen β - und γ - Ketten zeigten, mit Ausnahme der β 1- γ 3-Interaktion, wieder alle Kombinationen eine Interaktion (Tab. 2.14).

Ligand	Analyt	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	χ^2	K_d [M]
β 1	γ 1	$9,20 \cdot 10^3$	$5,70 \cdot 10^{-3}$	0,14	$6,20 \cdot 10^{-7}$
γ 1	β 1	$1,60 \cdot 10^4$	$7,70 \cdot 10^{-3}$	0,08	$4,70 \cdot 10^{-7}$
β 2	γ 1	$6,00 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^{-3}$	0,25	$2,60 \cdot 10^{-7}$
γ 1	β 2	$2,00 \cdot 10^4$	$3,40 \cdot 10^{-3}$	0,13	$1,70 \cdot 10^{-7}$
β 3	γ 1	$1,00 \cdot 10^4$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	0,16	$1,40 \cdot 10^{-7}$
γ 1	β 3	$1,91 \cdot 10^4$	$2,85 \cdot 10^{-3}$	0,14	$1,50 \cdot 10^{-7}$
β 1	γ 3	KB	KB	KB	KB
γ 3	β 1	KB	KB	KB	KB
β 2	γ 3	$1,30 \cdot 10^4$	$5,50 \cdot 10^{-3}$	0,15	$4,10 \cdot 10^{-7}$
γ 3	β 2	$2,90 \cdot 10^4$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	0,13	$1,00 \cdot 10^{-7}$
β 3	γ 3	$1,70 \cdot 10^4$	$2,90 \cdot 10^{-3}$	0,19	$1,70 \cdot 10^{-7}$
γ 3	β 3	$1,90 \cdot 10^4$	$3,30 \cdot 10^{-3}$	0,15	$1,80 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 2.14: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten (k_a , k_d) und Dissoziationskonstanten (K_d) für Bindungen von β - an γ -Ketten. KB: Keine Bindung.

Inhibierungsexperimente

Um einen Einfluß der Oberfläche auf die Interaktionen auszuschließen, sollte eine Bindung an einen Liganden durch diesen in Lösung inhibiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von β 1 an immobilisiertes γ 1 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von γ 1 in Lösung untersucht. γ 1 wurde ausgesucht, da es nicht mit sich selber interagiert. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Bindung (Abb. 2.19).

Ein unerwartetes Ergebnis wurde im Fall der Inhibierung der β 3- γ 1-Wechselwirkung beobachtet. Die Zugabe von γ 1 zu β 3 in Lösung inhibierte nicht, sondern verstärkte noch das Signal der Bindung von β 3 an immobilisiertes γ 1 (Abb. 2.20).

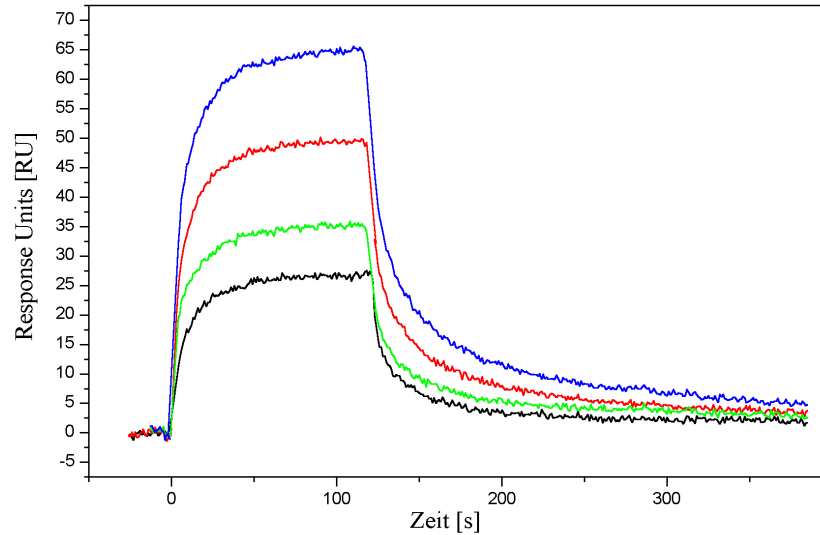


Abbildung 2.19: Inhibition der Bindung von $\beta 1$ an $\gamma 1$. $\beta 1$ ($1 \mu\text{M}$) wurde in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an $\gamma 1$ in Lösung ($0 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ und $2,0 \mu\text{M}$) über immobilisiertes $\gamma 1$ geleitet. Mit zunehmender Konzentration von $\gamma 1$ (blau \rightarrow schwarz) wurde das SPR-Signal kleiner.

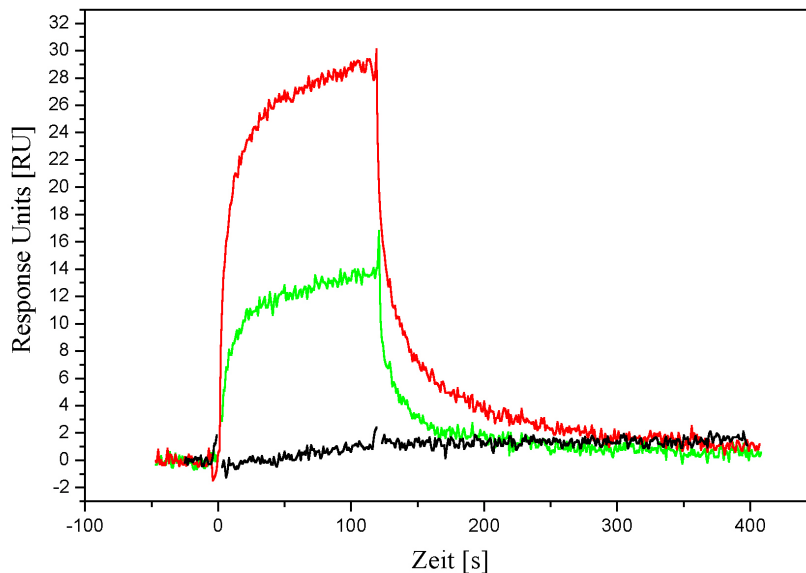


Abbildung 2.20: Bindung von $\beta 3$ an immobilisiertes $\gamma 1$ in Anwesenheit von $\gamma 1$ in Lösung. Die Injektion von $\gamma 1$ ($1 \mu\text{M}$) über gekoppeltes $\gamma 1$ führt zu keiner Bindung (schwarz). Das durch die Injektion von $\beta 3$ ($1 \mu\text{M}$) erhaltene Signal (grün) wurde durch $\gamma 1$ ($1 \mu\text{M}$) nicht inhibiert sondern verstärkt (rot).

Interaktionen mit Laminin-5

Zur Überprüfung der Interaktion von LN-Domänen mit einer nativen Laminin-Isoform wurde die Bindung von Laminin-5 an die γ -Ketten untersucht. Laminin-5, welches nur die N-terminale Domäne der $\beta 3$ -Kette besitzt, bindet wie die rekombinante LN-Domäne der $\beta 3$ -Kette an beide γ -Ketten. Die aus den Sensogrammen der Injektion von Laminin-5 ermittelten Dissoziationskonstanten lagen im Bereich der rekombinanten Fragmente. Aufgrund der verfügbaren Menge an Laminin-5 erfolgte nur ein Injektion von 50 μ l. Weiterhin war die Proteinkonzentration deutlich geringer als bei den rekombinanten Proteinen, weshalb ein deutlich schwächeres Signal und somit ein stärkeres Rauschen zu sehen ist.

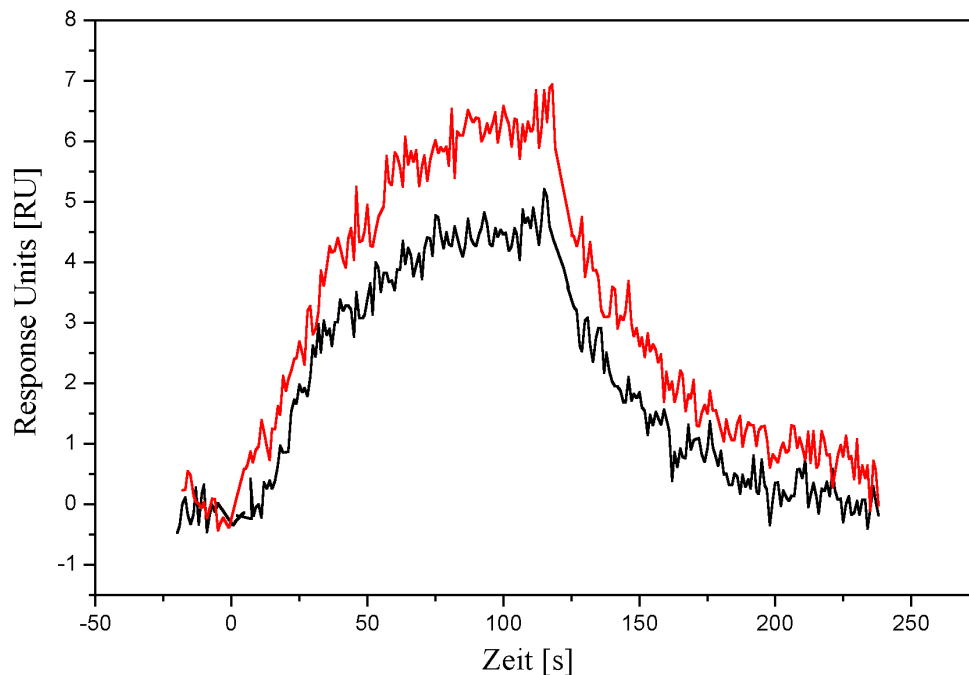


Abbildung 2.21: SPR-Sensogramme der Interaktion von Laminin-5 mit gekoppeltem $\gamma 1$ (500 RU). Laminin-5 wurde bei Konzentrationen von 0,2 μ M und 0,3 μ M über die Oberfläche geleitet.

2.4.2 LiquiChip Suspensions Assay

Um die mit Biacore erhaltenen Bindungsdaten mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde das LiquiChip System (QIAGEN) verwendet.

Mit Hilfe der LiquiChip Technologie kann in einer Suspension die Interaktion eines Proteins in Lösung mit einem auf Polystyren-Beads gekoppelten Protein gemessen werden. Die Beads beinhalten zwei Fluoreszenzfarbstoffe in verschiedenen Verhältnissen, weshalb bis zu 100 unterscheidbare Beads zur Verfügung stehen. Dies erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von Interaktionen eines Proteins mit bis zu 100 immobilisierten Proteinen. Obwohl mehrere Methoden für die Kopplung zur Verfügung stehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Proteine über ein His-Tag auf Ni-NTA-Beads gekoppelt. Zur Detektion wurde ein fluoreszenz-markierter Antikörper gegen das Protein in Lösung verwendet. In der Mehrzahl der Fälle wird ein markierter Sekundärantikörper gegen den proteinspezifischen Primärantikörper verwendet. Die Messung erfolgt ähnlich zu einem FACS (fluorescence-activated cell sorter), wobei im Rahmen der LiquiChip Technologie das Signal des Antikörpers nur gemessen wird, wenn er an einen Bead gekoppelt ist. Aus diesem Grund können die Messungen im Gleichgewicht und ohne Waschschrte nach der Inkubation erfolgen. Dies wiederum erlaubt die Identifikation von schwachen Bindungen, die z.B mit einem ELISA-ähnlichen Assay nicht messbar sind.

Zu Beginn der Messungen waren selbst von QIAGEN noch keine Proteininteraktionsstudien mit dem LiquiChip System durchgeführt worden. Aus diesem Grund wurde zuerst mit Hilfe der $\alpha 1$ - $\beta 1$ -Interaktion ein Protokoll erstellt. $\alpha 1$ _VI+2_C-His wurde auf die Ni-NTA-Beads gekoppelt und $\beta 1$ _VI+1_C-Strep in Lösung verwendet. Die Detektion erfolgte über ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen das StrepII-Tag und einen fluoreszenz-markierten Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen.

Ein sehr hilfreiches Ergebnis in Rahmen unserer Testphase war, daß ein fluoreszenz-markierter Antikörper gegen das His-Tag (Penta-His Alexa Fluor 532 Konjugat) keine Interaktion mit einem His-Fusionsprotein, welches an Ni-NTA-Beads gekoppelt ist, eingeht. Dies erlaubte einerseits die Verwendung von Proteinen mit His-Tag in Lösung und vereinfachte andererseits den Versuchsaufbau. Es konnte nicht nur ein Inkubationsschritt ausgelassen sondern auch auf eine Titrierung des Primärantikörpers verzichtet werden.

Nachdem die Interaktion von $\beta 1$ auch mit $\alpha 2$ und $\alpha 5$ nachgewiesen war, sollte die Möglichkeit, mehrere Interaktionen in einem Ansatz zu untersuchen (Multiplexing), überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die drei α -Ketten auf unterscheidbare Beads gekoppelt und ihre Bindung an ein Protein in Lösung

gleichzeitig gemessen. Auf diese Weise konnten 24 der mit Biacore nachgewiesenen Interaktionen durch das LiquiChip System reproduziert werden.

Protein	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\gamma 1$	$\gamma 3$
$\alpha 1$	+	+	+	+	+	+	+	-
$\alpha 2$	+	+	+	+	+	+	-	-
$\alpha 5$	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabelle 2.15: Mit Multiplexing nachgewiesene Interaktionen. Auf die Beads wurden $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ gekoppelt. In Lösung wurde dann von jeder Kette ein Fragment verwendet. Bindung (+); Keine Bindung (-).

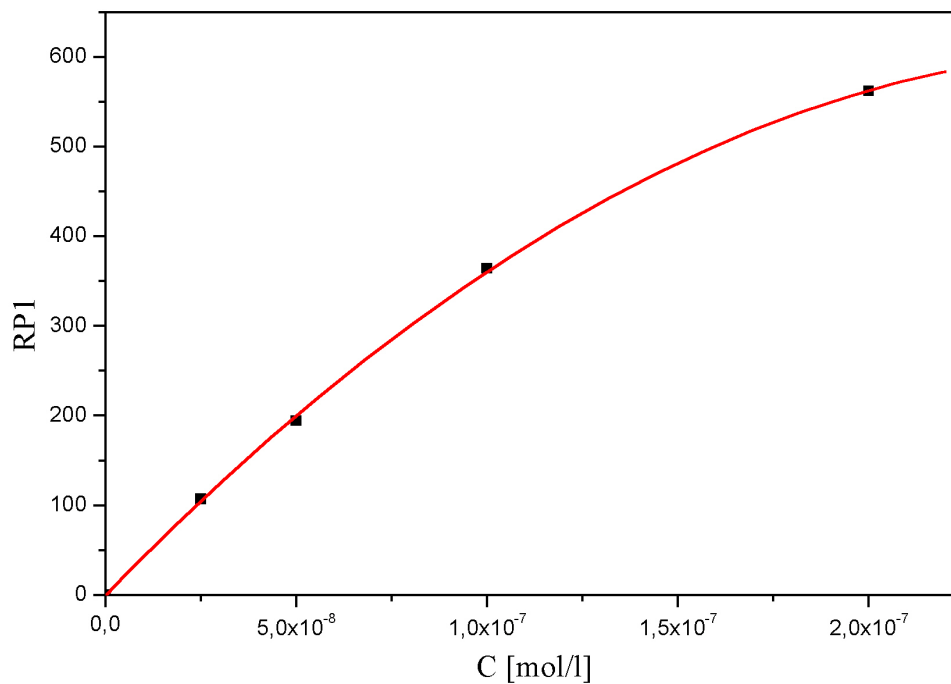


Abbildung 2.22: Nachweis der $\alpha 1$ - $\beta 3$ -Interaktion mit dem LiquiChip System. Das Fragment $\alpha 1$ _VI+2_C-His wurde auf Beads gekoppelt und mit verschiedenen Konzentrationen an $\beta 3$ _VI+4_C-His in Lösung inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Penta-His Alexa Fluor 532 Konjugat (RP1)

2.4.3 Cross-Linking von LN-Domänen

Zur Überprüfung, ob LN-Domänen einen trimeren Komplex eingehen können, sollten die rekombinanten Proteine über die freien Amingruppen von Lysinen, welche gleichmäßig über den gesamten Sequenzbereich der Konstrukte verteilt sind, quervernetzt werden. Zuerst sollten Bedingungen herausgefunden werden, bei denen es nur zu einer spezifischen Quervernetzung von aneinander gebundenen Proteinen kommt.

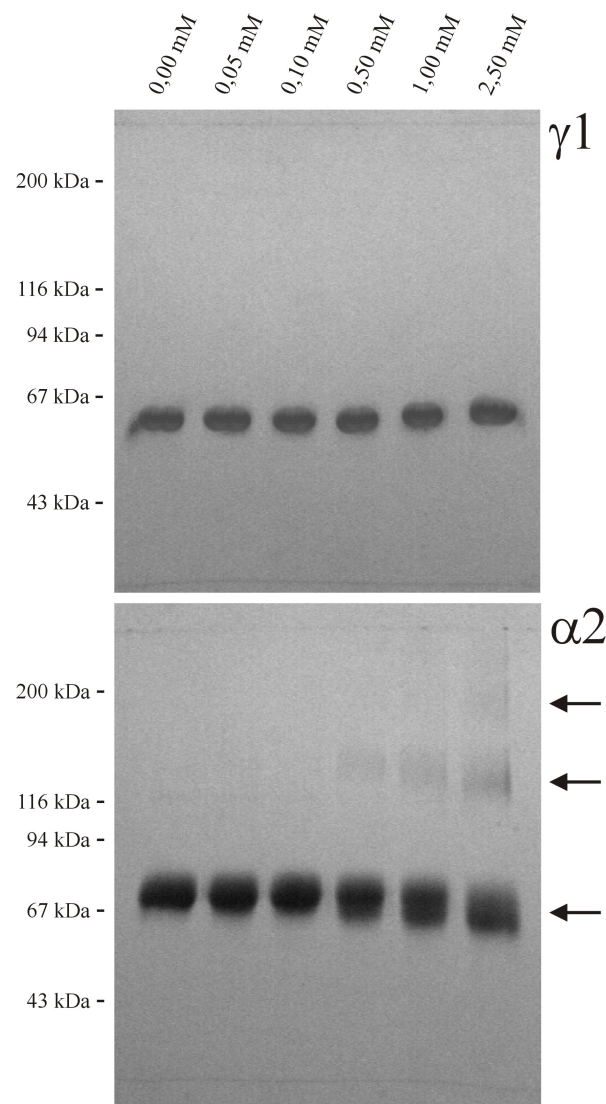


Abbildung 2.23: Cross-Linking von $\gamma 1_{VI+4_N-His}$ und $\alpha 2_{VI+4_C-His}$ mit BS³. Die Proteinkonzentration (2,5 μM) wurde konstant gehalten und mit einer zunehmenden Menge an Cross-Linker (0-2,5 mM) inkubiert. Mit steigender Cross-Linker Konzentration zeigen beide Proteine ein verändertes Laufverhalten, jedoch sind nur für $\alpha 2_{VI+4_C-His}$ auch Dimer und Trimer zu sehen.

Zu diesem Zweck wurden $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His, welches nicht mit sich selbst interagiert, und $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His, welches eine starke Selbstinteraktion aufweist, ausgesucht. Unter geeigneten Versuchsbedingungen sollte ein Cross-Linking von $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His jedoch nicht von $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His erfolgen. Beide Proteine wurden bei einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ mit einem 20-1000 fachen molaren Überschuß an Cross-Linker (Bis [Sulfosuccinimidyl]suberate)(BS³), welcher $11,4 \text{ \AA}$ lang ist, inkubiert. $\gamma 1_{VI+4_N}$ -His zeigte unter keiner der verwendeten Reaktionsbedingungen die Ausbildung von Komplexen (Abb. 2.23). $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His hingegen wurde bereits bei einer Cross-Linker-Konzentration von $500 \mu\text{M}$ quervernetzt (Abb. 2.23). Es wurden neben dem Monomer nicht nur Dimer sondern auch trimere Komplexe, welche durch massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt wurden (Abb. 2.24), nachgewiesen.

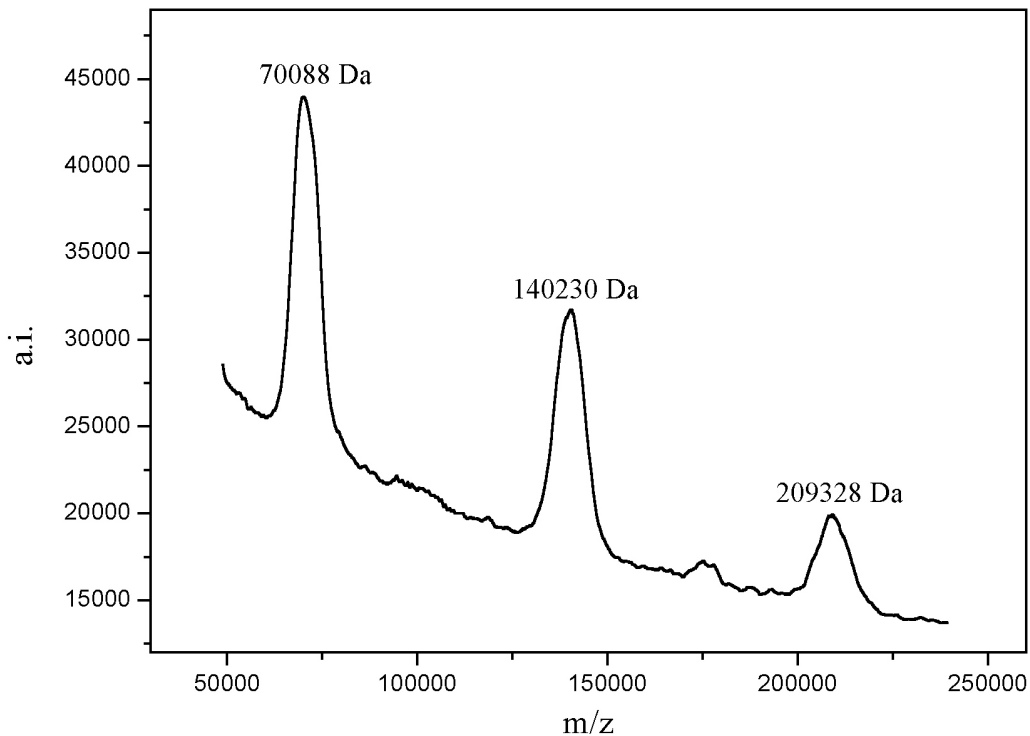


Abbildung 2.24: MALDI-TOF-Spektrum von quervernetztem $\alpha 2_{VI+4_C}$ -His. Neben dem Monomer sind sowohl Dimer als auch Trimer zu sehen.

Für das Konstrukt der $\alpha 2$ -Kette wurde weiterhin eine Konzentrationsabhängigkeit der Quervernetzung beobachtet. Experimente mit $1 \mu\text{M BS}^3$ zeigten mit zunehmender Proteinkonzentration eine Verschiebung zu höheren Komplexen (Abb. 2.25). Dabei sind im SDS-Polyacrylamidgel deutlich Banden oberhalb des Trimers zu sehen.

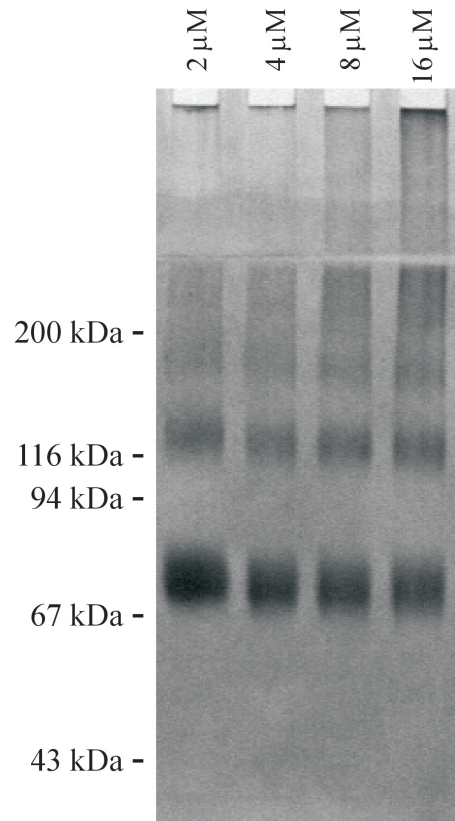


Abbildung 2.25: Konzentrationsabhängigkeit der Quervernetzung von $\alpha 2$. Mit zunehmender Proteinkonzentration werden bei gleichbleibender Cross-Linker-Konzentration mehr und größere Komplexe gebildet.

Nachdem durch Biacore-Messungen für die Mehrzahl der Ketten eine Selbstinteraktion nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob diese wie die $\alpha 2$ -Kette in der Lage sind, größere Komplexe zu bilden. Die Quervernetzungsexperimente erfolgten bei Konzentrationen von $2,5 \mu\text{M}$ Protein und 1 mM BS^3 . Alle bereits beschriebenen Selbstinteraktionen wurden bestätigt und jedes Protein, das mit sich selbst interagiert, war auch in der Lage einen trimeren Komplex zu bilden (Abb. 2.26).

Die rekombinanten Fragmente der $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette zeigten wie erwartet keine Selbstinteraktionen. Um die Bindung der beiden Proteine aneinander nachzuweisen, wurden diese bei einer Proteinkonzentration von jeweils $1,25 \mu\text{M}$ quervernetzt (1 mM BS^3). Es wurde ein Dimer, jedoch kein höherer Komplex, beobachtet (Abb. 2.26).

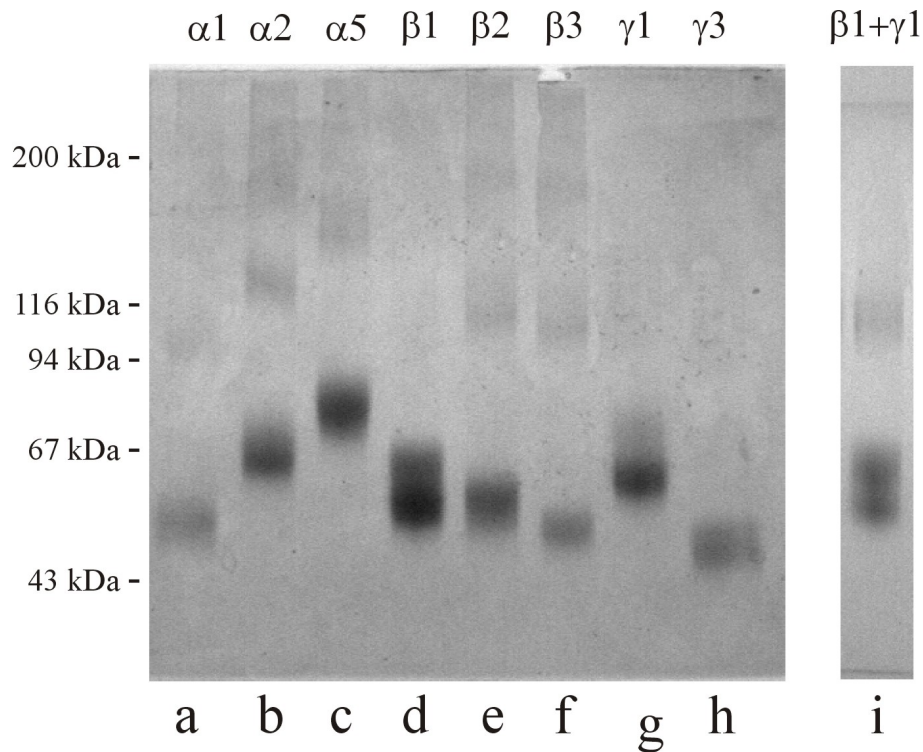


Abbildung 2.26: Nachweis von Selbstinteraktionen mittels Cross-Linking (a-h). Es wurden verwendet $\alpha 1_{\text{VI}+2}\text{-C-His}$ (a), $\alpha 2_{\text{VI}+4}\text{-C-His}$ (b), $\alpha 5_{\text{VI}+4}\text{-C-His}$ (c), $\beta 1_{\text{VI}+4}$ (d), $\beta 2_{\text{VI}+4}\text{-C-His}$ (e), $\beta 3_{\text{VI}+4}\text{-C-His}$ (f), $\gamma 1_{\text{VI}+4}\text{-N-His}$ (g) und $\gamma 3_{\text{VI}+2}\text{-C-His}$ (h). $\beta 1_{\text{VI}+4}$ und $\gamma 1_{\text{VI}+4}\text{-N-His}$, welche nicht mit sich selbst interagieren, bilden einen dimeren Komplex (i).

2.5 Kristallisationsversuche

Zu Beginn der Arbeit wurden vier Kriterien für die Auswahl des zu kristallisierenden Proteins aufgestellt:

1. Das Protein sollte keine Glykosylierung tragen, da diese zu einer Inhomogenität führt.
2. Das verwendete Konstrukt sollte neben der LN-Domäne so wenige LE-Module wie möglich enthalten, damit die Flexibilität des Proteins minimal ist.
3. Eine Selbstinteraktion sollte ausgeschlossen werden, um unterschiedliche Aggregationszustände zu verhindern.
4. Die Expressionsrate des Proteins sollte mindestens eine Ausbeute von 10 mg sauberem Protein aus einem realistischen Volumen an Zellkulturüberstand betragen.

Aus diesen Gründen war das erste Protein, welches versucht wurde zu Kristallisieren, $\beta 1_VI+1_C$ -Strep. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte aus 10 l Zellüberstand in drei Schritten. Zuerst wurde das Protein über eine DEAE-Säule aufkonzentriert und dann mit einer StrepTactin-Affinitätssäule gereinigt. Insgesamt wurden 13 mg Protein erhalten. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE zeigte sich jedoch eine Inhomogenität der Probe, welche durch eine Resource Q entfernt wurde. Dieser Schritt führte leider zu einem deutlichen Verlust an Protein, weshalb nach Aufkonzentration und Umpuffern (5 mM HEPES, pH 7,4) durch Ultrafiltration (Vivaspin) nur 1 ml Proteinstammlösung mit einer Konzentration von 8 mg/ml erhalten wurde.

Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben eine Masse von 39569 Da. Diese war 5 % größer als das theoretische Molekulargewicht (37584 Da). Hervorgerufen wurde diese Massendifferenz durch eine Glykosylierung des Proteins. Da das Protein unter nativen Bedingungen nicht deglykosyliert werden konnte, wurde es mit Zucker für die Kristallisation verwendet.

Vor den Kristallisationsansätzen wurde die Homogenität des aufgereinigten Proteins durch dynamische Lichtstreuung überprüft. Das Protein zeigte eine monomodale Verteilung und aus dem hydrodynamischen Radius konnte mit Hilfe des Modells für globuläre Proteine ein Molekulargewicht berechnet werden, welches im Bereich des Monomers liegt. Die Polydispersität liegt mit 17 % unter dem allgemein für kristallisierbare Proteine angenommenen Schwellenwert von 30 % (Ferre-D'Amare & Burley, 1997).

Scans	30
hydrodynamischer Radius [nm]	3,5
Polydispersität [%]	17
berechnetes Molekulargewicht [kDa]	52
Baseline	1,001
SOS-Error	1,991

Tabelle 2.16: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung von nativem $\beta 1_{VI+1}_C$ -Strep bei monomodaler Auswertung

Um Bedingungen für eine Kristallisation zu ermitteln, wurden sowohl Screens nach Jancarik und Kim (1991) (Screen 1 und Screen 2) als auch *Grid Screens* (Ammoniumsulfat, PEG, MPD und PEG/MPD) durchgeführt. Das *Screening* erfolgte mit Dampfdiffusion (sitting-drop-Variante) bei 293 K. Mit den durchgeführten Ansätzen konnte kein Kristall erzeugt werden und in der Mehrzahl der Kristallisationsansätze präzipitierte das Protein in diffuser Form, weshalb mit diesem Fragment nicht weitergearbeitet wurde.

Das Scheitern der Kristallisation wurde hauptsächlich auf die Glykosylierung des $\beta 1$ -Fragments zurückgeführt. Aus diesem Grund sollte bei dem nächsten für die Kristallisation verwendeten Protein sichergestellt werden, daß es nicht glykosyliert ist. Eine Deglykosylierung unter nativen Versuchsbedingungen ist im großen Maßstab oft nicht vollständig, weshalb die Glykosylierungsstellen mutiert werden sollten. Weiterhin sollte nun ein Protein mit zwei LE-Modulen verwendet werden, um deutlich mehr Protein zu erhalten. Aufgrund der durchgeführten SDS-PAGE aller Proteine (Abb. 2.8) verblieben noch die $\alpha 1$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 1$ -Kette für die Kristallisation. Da die $\alpha 1$ -Kette stark glykosyliert ist und $\beta 3$ -Fragmente mit sich selbst interagieren, wurde das Konstrukt $\gamma 1_{VI+2}_N$ -His ausgewählt. Es wurden beide Asparagine (N58, N132) der potentiellen N-Glykosylierungsstellen durch Einfügen von Punktmutationen in Alanine überführt und das neue Konstrukt in 293 EBNA-Zellen transfiziert. Nach der Selektion wurde serumfreier Zellkulturüberstand auf Proteinexpression untersucht. Es zeigte sich, daß das mutierte Protein ohne Glykosylierung nicht exprimiert wurde. Obwohl die Zellen einem noch größeren Selektionsdruck ausgesetzt und für mehrere Wochen in Kultur gehalten wurden, konnte das Protein nicht im Western-Blot nachgewiesen werden.

Als nächstes sollte nun ein Protein unter nativen Bedingungen deglykosyliert werden. Für diesen Zweck konnten nur Fragmente der $\beta 3$ -Kette und $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, daß alle $\beta 3$ -Fragmente nur eine Glykosylierung tragen, wurde $\beta 3_{VI+2}_C$ -His ausgewählt. Aus 31 Zellkulturüber-

stand konnten 12 mg Protein in einem Schritt aufgereinigt werden. Um die für die native Deglykosylierung benötigte Enzymmenge zu optimieren, wurden Experimente bei verschiedenen pH-Werten und in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Es zeigte sich, daß der pH-Wert von großer Bedeutung war - eine Deglykosylierung erfolgte am effektivsten bei pH 8,0 - und die Puffersubstanz keinen Einfluß hatte.

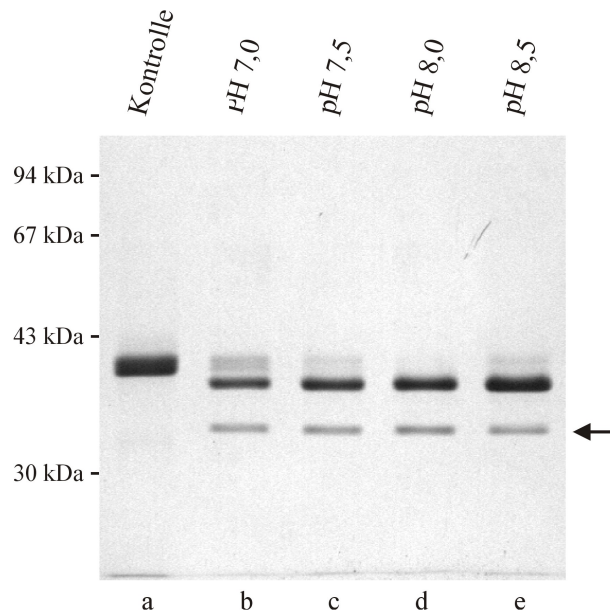


Abbildung 2.27: Native Deglykosylierung von $\beta 3_{VI+2_C}$ -His bei verschiedenen pH-Werten mit N-Glykosidase F (35 kDa, Pfeil). Es wurden verwendet: (a) Kontrolle ohne Enzym, (b) pH 7,0, (c) pH 7,5, (d) pH 8,0 und (e) pH 8,5.

Das saubere Protein wurde auf ein Volumen von 2 ml eingeengt und gegen HBS-Puffer (pH 8,0) umgepuffert. Nachdem die in 10 μ l enthaltene Proteinmenge ohne Probleme durch 10 U N-Glykosidase F (NEB) in 1h deglykosyliert werden konnte, erfolgte eine Deglykosylierung im großen Maßstab. Nach 1 h war die Deglykosylierung noch nicht vollständig und ein Teil des Proteins war ausgefallen. Aufgrund des pI-Werts (8,5) von $\beta 3_{VI+2_C}$ -His wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Protein präzipitierte nicht weiter. Um eine vollständige Deglykosylierung zu erreichen, mußte jedoch mehr Enzym zugegeben und über Nacht inkubiert werden. Mit einer erneuten Aufreinigung über eine His-Affinitätssäule konnte das Enzym entfernt werden und über einen Kationenaustauscher (CM-Sepharose) erfolgte noch ein zusätzlicher Reinigungsschritt. Nach Aufkonzentration und Umpuffern verblieb 1 ml Proteinstammlösung mit einer Konzentration von 9 mg/ml. Mit denen bis zum jetzigen Zeitpunkt durchgeführten Kristallisationsansätzen konnte bisher kein Kristall hergestellt werden.

Kapitel 3

Diskussion

3.1 Expression der N-terminalen Domänen

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob das für Laminin-1 aufgestellte Modell der Laminin-Polymerisation korrekt ist und auf andere Laminin-Isoformen übertragbar ist. Zu diesem Zweck sollten die N-terminalen Domänen aller bekannten Laminin-Ketten exprimiert und mit ihrer Hilfe die Interaktionen zwischen LN-Modulen untersucht werden. Demzufolge wurden aufgrund der bekannten Sequenzen Konstrukte von acht LN Domänen hergestellt. Die neunte LN-Domäne, eine neu entdeckte Variante der $\alpha 3$ -Kette (Garbe et al., 2002), wurde nicht berücksichtigt, da zu Beginn dieser Arbeit weder ihre vollständige Sequenz noch die biologische Relevanz bekannt war.

LN-Domänen stellen keine selbständigen Faltungseinheiten dar und können nur zusammen mit LE-Modulen aus Domäne V exprimiert werden (Ettner et al., 1998). Es ist weiterhin beschrieben, daß das Anfügen von 4 LE-Modulen zu einer sehr guten Expression führt während ein rekombinantes Fragment mit einem LE-Modul nur im Western-Blot, nicht aber im Coomassie-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel, nachgewiesen werden kann (Ettner et al., 1998). Aus diesem Grund wurde die Mehrzahl der Konstrukte mit 4 LE-Modulen kloniert. In einigen Fällen wurden jedoch auch kleinere Fragmente hergestellt. Ein Grund hierfür war, daß die für die Kristallisation verwendeten Fragmente neben der LN-Domäne so wenige LE-Module wie möglich enthalten sollten, damit die Flexibilität des Proteins minimal ist. Weiterhin besitzen viele LE-Module potentielle Glykosylierungsstellen, weshalb ein rekombinantes Protein mit weniger LE-Modulen mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht glykosyliert ist und somit besser für eine Kristallisation geeignet ist. Mit den kleinen Fragmenten der $\beta 1$ -Kette sollte auch der Einfluß der LE-Module aus Domäne V auf die Laminin-Polymerisation untersucht werden. Bisher

konnte mit dem proteolytischen Fragment E4 ($\beta 1$ VI+V) gezeigt werden, daß der für die Assoziation von Laminin wichtige Bereich in Domäne VI und/oder V liegt (Schittny & Schittny, 1993). Die Verwendung von Konstrukten, die neben der LN-Domäne für ein, zwei oder vier LE-Module aus Domäne V kodieren, sollte eine weitere Eingrenzung der Bindungsregion durch Interaktionsstudien ermöglichen. Ein zusätzlicher Grund für die Herstellung von Konstrukten mit unterschiedlicher Größe waren die geplanten Cross-Linking-Experimente und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Durch deutlich variierende Molekulargewichte bzw. Größen sollten die an einem Komplex beteiligten Fragmente besser zu unterscheiden sein.

Die rekombinanten Proteine sollten in 293-EBNA-Zellen und nicht in Bakterien hergestellt werden, da diese die Fragmente mit bis zu 20 Disulfidbrücken und Glykosylierungen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in nativer Form exprimieren. Weiterhin sollte für die Sekretion der Proteine nicht das endogene sondern das im Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) enthaltene BM40-Signalpeptid verwendet werden. Der Grund hierfür war, daß dieses Verfahren bei der Expression vieler extrazellulärer Proteine, insbesondere bei den N-terminalen Domänen einiger α -Ketten (Colognato-Pyke et al., 1995; Ettner et al., 1998;), zu einer starken Überexpression führte. Deshalb wurde der Anfang der Fragmente hinter die vorausgesagten Schnittstellen der endogenen Signalpeptide gelegt. Alle 5'-Primer fügten ein SpeI-Restriktionsschnittstelle, welche sowohl eine Ligation in den Klonierungsvektor pBluescript KS(+) als auch in verschiedene Formen des Expressionsvektors pCEP-Pu erlaubte, an. Um eine Verschiebung des Leserasters zwischen BM40-Signalpeptid und der zu exprimierenden Sequenz zu verhindern, mußte im Primer nach der Restriktionsschnittstelle eine zusätzliche Base eingefügt werden. Das 3'-Ende der Konstrukte konnte anhand der Konsensussequenz der LE-Module einfach identifiziert werden. Mit Ausnahme des LAMC1-Gens wurde allen Fragmenten eine NotI-Restriktionsschnittstelle angefügt. Im Fall des LAMC1-Gens wurde eine XhoI-Schnittstelle verwendet, da sich eine NotI-Erkennungssequenz im Fragment befindet und deshalb eine Klonierung mit SpeI/NotI nicht möglich war. In Abhängigkeit vom später verwendeten Expressionsvektor wurden die Fragmente mit bzw. ohne Stop-Codon kloniert.

Sequenzierungen wiesen nur für die Konstrukte des LAMB3-Gens eine Abweichung von der publizierten Sequenz auf. Mit den Fragmenten wurde jedoch weitergearbeitet, da durch einen Sequenzvergleich gezeigt werden konnte, daß die in der Mausequenz veränderten Aminosäuren der humanen Sequenz entsprachen und deshalb von einer fehlerhaften Sequenz in der Datenbank ausgegangen wurde.

Die 15 klonierten DNA-Bereiche wurden anschließend in Varianten des Vektors pCEP-Pu/BM40SP ligiert und in 293 EBNA-Zellen transfiziert. In der Mehrzahl der Fälle wurde ein Vektor, der zusätzlich für ein N- oder C-terminales Bindungsmodul (His bzw. StrepII) kodiert, verwendet. Dies sollte eine effiziente Aufreinigung der rekombinanten Proteine gewährleisten. Um einen möglichen Einfluß der Tags auf die Funktion der Proteine untersuchen zu können, wurden von der $\beta 1$ -Kette sowohl ein Protein ohne Tag als auch Proteine mit N- und C-terminalem Tag exprimiert.

Insgesamt wurden durch Variation der Größe und der Tags 23 rekombinante Proteine von acht Laminin-Ketten überexprimiert. Wie erwartet zeigte sich eine Abhängigkeit der Expressionsrate von der Zahl der verwendeten LE-Module. Die Tatsache, daß eine LN-Domäne mit vier LE-Modulen weit besser exprimiert wird als eine mit zwei LE-Modulen, ist erstaunlich, da die EGF-ähnlichen Wiederholungen eigenständige Faltungseinheiten darstellen (Stetefeld et al., 1996; Cooke et al., 1987; Montelione et al., 1987). Anders als in der Literatur beschrieben (Ettner et al., 1998) konnte die Expression der Fragmente mit einem LE-Modul in einem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel beobachtet werden. Weiterhin zeigte die Verwendung von Bindungsmodulen keinen auffallenden Einfluß auf die Menge an sekretiertem Protein.

3.2 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mit Bindungsmodul führte in allen Fällen zu einem saubereren Protein in einem Schritt. Die Reinigungen mit einem His-Tag waren jedoch deutlich besser als diejenigen mit einem StrepII-Tag. Im Gegensatz zur Talon- war eine StrepTactin-Matrix nicht in der Lage, das im Überstand enthaltene Protein vollständig zu binden. Ein erneutes Auftragen des Durchflusses bei geringerer Flußrate zeigte keine Verbesserung. Dies verdeutlichte, daß die Beobachtungen nicht auf eine Überladung der Säule zurückzuführen sind. Die Affinität zwischen StrepII-Tag und StrepTactin ist relativ schwach (Voss et al., 1997), weshalb die unvollständige Bindung des Proteins auch aus einem zu großen Beladungsvolumen resultieren konnte. Um dies zu überprüfen, wurde das Fusionsprotein vor dem Beladen der StrepTactin-Matrix über einen Ionenaustauscher aufkonzentriert. Unter diesen Bedingungen wurde nur noch ein geringer Teil des Proteins im Durchfluß der StrepTactin-Säule vorgefunden.

Proteine ohne Tag wurden in zwei Schritten aufgereinigt. Zuerst wurde jeweils ein Ionenaustauscher verwendet. Die Proteine verhielten sich entsprechend ihres theoretischen pI-Wertes, weshalb $\beta 1_{VI+4}$ über einen Anionen- und die Fragmente

der $\beta 3$ -Kette über einen Kationenaustauscher gereinigt wurden. Dieser eine Schritt resultierte bereits in einem fast reinen Protein, welches zusätzlich noch über eine Gelfiltration aufgereinigt wurde.

Aufgrund der möglichen Ca^{2+} -abhängigen Konformation der Proteine wurden für die Reinigungen der Proteine keine Calcium-Ionen entziehenden Substanzen wie Phosphatpuffer und Chelatoren (z.B EDTA) verwendet. Weiterhin wurde kein Tris-Puffer benutzt, da dieser freie Aminogruppen enthält und sowohl eine Kopplung auf einen CM5-Sensorchip als auch Cross-Linking Experimente bereits bei kleinsten Konzentrationen verhindert. Aus diesen Gründen wurden alle Aufreinigungen in HEPES-Puffer durchgeführt. Wie die Ergebnisse zeigen, weist dieser gegenüber den standardmäßigen Puffern (Phosphat, Tris) keine Nachteile sondern nur Vorteile auf.

3.3 Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Alle rekombinant exprimierten Proteine wurden durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Zur eindeutigen Unterscheidung der Proteine mußten jedoch acht Zyklen durchgeführt werden, da die ersten vier Aminosäuren (APLV) jeweils vom Signalpeptid stammten und die Fragmente homolog sind. Weiterhin zeigten die Proteine mit Ausnahme von $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His in einer reduzierenden SDS-PAGE eine einzelne Bande. Für beide Banden von $\gamma 3_{VI+2_C}$ -His wurde der Nachweis eines identischen N-Terminus erbracht, weshalb für alle Proteine eine N-terminale Modifizierung ausgeschlossen werden kann. Neben der Sequenzierung konnten alle Proteine mit Tag durch Antikörper gegen dieses nachgewiesen werden. Dies wiederum zeigt für alle Fusionsproteine mit C-terminalem Bindungsmodul, daß es auch am C-Terminus zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz durch Degradation oder proteolytische Prozessierung kommt und es sich somit um intakte Proteine handelt. Die Inhomogenität von $\beta 1_{VI+2}$ und $\beta 2_{VI+4_C}$ -His unter nicht reduzierenden Bedingungen könnte aus einer unvollständigen oder variablen Ausbildung von Disulfidbrücken resultieren.

Für alle exprimierten Proteine ergibt sich aus der elektrophoretischen Mobilität eine gegenüber dem theoretischen Molekulargewicht erhöhte Masse. Diese Beobachtung konnte durch massenspektrometrische Messungen bestätigt werden. Die α -Ketten weisen die mit Abstand größten Massendifferenzen auf. Insbesondere $\alpha 2$ und $\alpha 5$ zeigen mit bis zu 17 % Abweichung von der berechneten Masse extrem verbreiterte Signale im MALDI-TOF-Spektrum.

Da die Massenabweichung der rekombinanten Proteine eine Korrelation mit der Anzahl der potentiellen N-Glykosylierungsstellen aufwies, wurde analysiert inwieweit die Fragmente glykosyliert sind. Zu diesem Zweck wurden die gereinigten Proteine - nach Denaturierung - mit N-Glykosidase F inkubiert. Es zeigte sich, daß alle N-terminalen Domänen N-Glykane tragen. Wie erwartet waren die Fragmente der α -Ketten am stärksten glykosyliert. Für $\alpha 2$ und $\alpha 5$ erklärt der hohe Glykosylierungsgrad die verbreiterten Signale sowohl im MALDI-TOF-Spektrum als auch in der denaturierenden Gelelektrophorese. Weiterhin überführt eine Deglykosylierung beide in einer SDS-PAGE auftretenden Banden von $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His in eine einzelne. Dies zeigt, daß $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen vorliegt.

Die Glykosylierung eines Proteins stellt ein Problem für die Kristallisation dar, da Zuckerketten variieren und somit eine Inhomogenität des Proteins verursachen, welche eine Ausbildung von Kristallen erschwert bzw. unmöglich macht. Deshalb war der primäre Grund für die Deglykosylierung die Identifizierung eines Fragments ohne Glykosylierung. Nachdem gezeigt wurde, daß alle Proteine glykosyliert sind, sollte untersucht werden, ob die N-Glykane unter nativen Versuchsbedingungen abgespalten werden können. Unter nativen Bedingungen konnten nur die Fragmente der $\beta 3$ -Kette und $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His im selben Maße deglykosyliert werden wie nach Denaturierung. Die $\beta 2$ -Kette zeigt zwar auch unter nativen Bedingungen einen Schift im SDS-Polyacrylamidgel, doch konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen keine veränderte Masse nachgewiesen werden. Für $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His wurde gezeigt, daß 293 EBNA-Zellen ein rekombinantes Protein mit zwei bzw. drei N-Glykanen exprimieren. Nach Deglykosylierung entspricht die bestimmte der theoretischen Masse, weshalb für $\gamma 3_{VI+2}_C$ -His weitere posttranslationale Modifikationen ausgeschlossen werden können. Aus Sicht der Glykosylierung und Deglykosylierung sind die Fragmente der $\beta 3$ -Kette mit einer unter nativen Versuchsbedingungen abspaltbaren N-Glykosylierung am besten für eine Kristallisation geeignet.

CD-Spektren der gereinigten Proteine lassen eine Sekundärstruktur und somit eine Faltung erkennen. Wie aus der Sequenzhomologie der Konstrukte zu erwarten war, sind die Spektren der rekombinanten Fragmente ähnlich. Theoretische Berechnungen der Sekundärstruktur mit dem Programm CONTIN (Greenfield, 1996) zeigen einen im Vergleich zur α -Helix (9-15 %) großen Anteil an β -Faltblatt (27-37 %). Aus der Struktur der LE-Module (Stetefeld et al., 1996) ist bekannt, daß ein LE-Modul neben 2,5 % α -Helix und 18,5 % β -Faltblatt hauptsächlich aus durch Disulfidbrücken stabilisierten Schleifen besteht. Da die meisten Konstrukte mehrere

LE-Module enthalten, ist verständlich weshalb das Programm CONTIN bis zu 31 % β -Schleifen berechnet. Für die Struktur der LN-Domäne läßt sich im Vergleich zum LE-Modul zumindest ein höherer Anteil an α -Helix ableiten.

Die Laminin-Polymerisation ist abhängig von Calcium-Ionen (Yurchenco et al., 1985; Paulsson et al., 1987; Paulsson, 1988) und es ist eine Ca^{2+} -Bindung für die N-terminale Region der γ 1-Kette beschrieben (Yurchenco & Cheng, 1993). Aus diesem Grund sollten die exprimierten Proteine mittels CD-Spektroskopie auf eine Calcium-induzierte Konformationsänderung untersucht werden. Fünf der acht rekombinanten Fragmente zeigten eine Änderung der Sekundärstruktur nach Entzug von zweiwertigen Kationen mit EDTA. Die Konformationsänderung war jedoch in keinem Fall vollständig reversibel. Weder Ca^{2+} noch andere zweiwertige Kationen waren in der Lage, die durch EDTA verursachte Veränderung der Konformation umzukehren. Es muß davon ausgegangen werden, daß das Entfernen von zweiwertigen Kationen zu einem Verlust an Sekundärstruktur führt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Laminin-Moleküle nach Extraktion mit EDTA (Paulsson et al., 1987) eine Ca^{2+} -abhängige Polymerisation zeigen. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß der Strukturverlust die Polymerisation nicht beeinflußt und daß die an der Assoziation von Laminin beteiligte reversible Calcium-Bindung im CD-Spektrum nicht beobachtet wird. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist nicht möglich, da noch keine CD-Spektren publiziert wurden, obwohl einige N-terminale Domänen zur Verfügung standen (Cognato-Pyke et al., 1995; Ettner et al., 1998; Garbe et al., 2002). In der Arbeit von Ettner et al. (1998) wird zwar CD-Spektroskopie verwendet, um eine Faltung zu demonstrieren, jedoch werden die Spektren in der Veröffentlichung nicht gezeigt.

Zur Überprüfung, ob die N-terminalen Domänen aggregieren, wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Für alle Fragmente konnte gezeigt werden, daß sie unter den verwendeten Versuchsbedingungen hauptsächlich in einer Form vorliegen. Vermutlich handelt es sich hierbei um die monomeren Proteine. Eine genaue Aussage kann nicht getroffen werden, da das Laufverhalten sowohl von der Größe und Ladung des Proteins als auch vom pH-Wert des Puffers abhängt.

3.4 Interaktionsstudien

3.4.1 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Die Messung von Interaktionen mittels SPR-Technologie von Biacore erfordert die Kopplung von Proteinen auf eine Sensorchipoberfläche. Eine generelle Voraussetzung für eine effiziente Immobilisierung auf einen CM5-Sensorchip ist, daß das zu koppelnde Protein auf der Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen aufkonzentriert wird. Alle untersuchten Proteine erfüllten bei pH 5,0 und einer Konzentration von 50-200 $\mu\text{g/ml}$ diese Bedingung. Die Menge an immobilisiertem Protein verhielt sich antiproportional zum theoretischen pI-Wert der Proteine, weshalb z.B. $\alpha 1_{\text{VI}+2_{\text{C}}\text{-His}}$ (pI = 8,00) deutlich besser aufkonzentriert wurde als $\beta 1_{\text{VI}+4}$ (pI = 5,20). Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da bei pH 5,0 die Carboxylgruppen auf der Oberfläche des Chips negativ geladen sind und deshalb die elektrostatischen Wechselwirkungen mit einem Protein umso stärker sind, je positiver dieses geladen ist. Dieser Effekt konnte jedoch teilweise durch höhere Proteinkonzentrationen kompensiert werden.

Die kovalente Immobilisierung der Proteine erfolgte durch Aminkopplung auf eine aktivierte CM5-Sensorchipoberfläche in 10 mM Natriumacetat. Essentiell war, daß der Puffer frei von primären Aminen war, weshalb bereits bei der Aufreinigung der Proteine auf Tris verzichtet wurde. Bei der gekoppelten Proteinmenge mußten zwei gegenläufige Effekte berücksichtigt werden. Während sich das für eine Interaktion gemessene Signal mit der Menge an immobilisiertem Protein erhöht, steigt auch die sterische Behinderung der gekoppelten Proteine untereinander, was zu schlechter auswertbaren Signalen führt. Einen guten Kompromiß stellten Proteinmengen im Bereich von 300 bis 800 RU dar.

Die ersten Interaktionsstudien sollten mit den rekombinanten Fragmenten von Laminin-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) durchgeführt werden, weshalb diese zuerst hergestellt wurden. Der Grund für dieses Vorgehen war, daß das Modell der Laminin-Polymerisation zu einem großen Teil auf Studien mit proteolytischen Fragmenten von Laminin-1 beruht und diese überprüft werden sollten. Weiterhin sind im Modell der Laminin-Assoziation Interaktionen enthalten, die noch nicht durch Bindungsstudien nachgewiesen sind und mit den rekombinanten N-terminalen Domänen untersucht werden sollten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig eine direkte $\alpha 1$ - $\beta 1$ - und $\beta 1$ - $\gamma 1$ -Bindung nachgewiesen werden. Eine ebenfalls gezeigte $\alpha 1$ - $\gamma 1$ Interaktion wurde vor kurzem auch in der Literatur beschrieben (Garbe et al., 2002). Diese Ergebnisse ließen bereits einen Aktivitätsverlust der proteolytischen Fragmente vermuten, da mit diesen theoretisch eine direkte $\alpha 1$ - $\beta 1$ Bindung (E4-

E1) hätte nachgewiesen werden können. Bis zu diesem Punkt bestand jedoch noch keine Diskrepanz zum aufgestellten Modell der Laminin-Polymerisation (Yurchenco & Cheng, 1993), welche erst bei der Untersuchung von Selbstinteraktionen auftrat. Im Gegensatz zu $\beta 1$ und $\gamma 1$, welche wie erwartet nicht mit sich selbst interagierten, wies $\alpha 1$ eine Bindung an sich selbst auf. Diese Interaktion hätte mit dem Fragment E1 untersucht werden können, doch ist in der Literatur nicht einmal der Versuch beschrieben.

Jedes Protein wurde als Ligand und als Analyte verwendet, um Oberflächenartefakte, welche aus der kovalenten Kopplung eines Proteins an die Chip-Oberfläche resultieren können, so weit wie möglich auszuschließen. Ebenfalls konnte die Bindung von $\beta 1$ an immobilisiertes $\gamma 1$ durch $\gamma 1$ in Lösung inhibiert werden. Unter diesen Bedingungen konnte somit eine Interaktion in Lösung demonstriert werden. Außerdem zeigten die gekoppelten Proteine keine Bindung an Proteine, die nicht mit LN-Domänen reagieren sollten. Die Injektionen erfolgten mit *Kinject*, da nur so eine kinetische Auswertung der Sensogramme erfolgen kann. Weiterhin konnte für die verwendete Flußgeschwindigkeit gezeigt werden, daß es nicht zu einer Verfälschung der gemessenen Signale durch Limitation des Massentransports zur Oberfläche kommt. Für alle beschriebenen konzentrationsabhängigen Interaktionen ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Daten, was sich in χ^2 -Werten von deutlich unter eins zeigt. Ein Fit wird generell als gut betrachtet, wenn die χ^2 -Werte unterhalb von zwei liegen. Das die Interaktionen mit $\alpha 1$ durch eine 1:1-Langmuir-Bindung beschrieben werden können, ist auf den ersten Blick erstaunlich, da dieses an sich selbst bindet. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß ausschließlich das Monomer bindet und nur die für die Berechnung der kinetischen Daten verwendete Proteinkonzentration verfälscht ist. Dies hätte zur Folge, daß die Bindung stärker ist als berechnet. Weiterhin könnte das Dimer ebenfalls binden und die erhöhte Masse des Komplexes, welche zu einem stärkeren Signal führen würde, durch die verringerte Anzahl von Molekülen ausgeglichen werden.

In der Literatur ist neben einer Ca^{2+} - auch eine Temperaturabhängigkeit der Laminin-Polymerisation beschrieben (Yurchenco et al., 1985). Beide Beobachtungen konnten durch eigene Experimente bestätigt werden und bekräftigen somit die ermittelten Bindungsdaten. Die Bindungsstudien zeigten auch, daß die durch EDTA hervorgerufenen Veränderungen im CD-Spektrum keinen Einfluß auf die Interaktionen haben und die an der Polymerisation beteiligte Ca^{2+} -Bindungsstelle reversibel ist.

Mit den Fragmenten der $\beta 1$ -Kette konnte die an der Assoziation von Laminin beteiligte Bindungsregion weiter auf die LN-Domäne mit nur einem LE-Modul eingegrenzt und ein Einfluß der Tags auf die Interaktionen ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte durch Interaktionen von N-terminalen Domänen mit Laminin-5 gezeigt werden, daß die in den rekombinanten Proteinen enthaltenen Bindungsstellen auch in den nativen Lamininen vorkommen.

Um ein umfassendes Bild der an der Laminin-Polymerisation verschiedener Isoformen beteiligten Interaktionen zu erhalten, wurden alle 36 möglichen Interaktionen zwischen den acht exprimierten N-terminalen Domänen untersucht. Es wurden 28 Wechselwirkungen identifiziert, von denen bisher nur zwei direkt nachgewiesen werden konnten (Garbe et al., 2002).

Die identifizierten Selbstinteraktionen verdeutlichten endgültig die unzureichende Beschreibung von LN-Interaktionen im Modell der Polymerisation von Laminin. Mit Ausnahme von $\beta 1$, $\gamma 1$ und $\gamma 3$ waren alle anderen Domänen VI in der Lage, an sich selbst zu binden. Für die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte LN-Domäne der $\alpha 3B$ konnte auch eine Selbstinteraktion nachgewiesen werden (Garbe et al., 2002).

In der Literatur ist eine Co-Polymerisation von verschiedenen Lamininen beschrieben (Cheng et al., 1997). Die hierfür verwendeten Bindungen konnten fast vollständig im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Es zeigte sich, daß fast jede erdenkliche α - α , α - β , β - β - und β - γ -Interaktion stattfindet. Am stärksten limitiert in ihren Interaktionsmöglichkeiten sind die γ -Ketten und von besonderem Interesse ist, daß die $\alpha 2$ - nicht an die $\gamma 1$ -Kette bindet.

Die Auswirkungen dieser Ergebnisse auf die Laminin-Polymerisation werden zusammen mit denen der Cross-Linking-Experimente in Abschnitt 3.6 beschrieben.

3.4.2 Luminex-Suspensions-Assay

Die Messungen erfolgten im Rahmen der Testphase des LiquiChip Systems der Firma QIAGEN. Zu Beginn der Studien waren mit dem Gerät noch keine Proteininteraktionen gemessen worden, weshalb zuerst ein Protokoll erarbeitet werden mußte. Mit dem Luminex-Suspensions-Assay wurden anschließend 24 Interaktionen untersucht und die Ergebnisse stimmten mit denen der Biacore-Messungen überein. Es konnten demzufolge Wechselwirkungen zwischen N-terminalen Domänen von Laminin mit zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen werden.

Eine mögliche Fehlerquelle bei den Biacore-Messungen kann aus der kovalenten Kopplung des Proteins an die Chip-Oberfläche resultieren. Durch die Im-

mobilisierung kann die Faltung des Proteins beeinflußt werden, weshalb artifizielle Bindungsstellen für andere Proteine entstehen können. Aus diesem Grund wurden, damit sich die Luminex- so weit wie möglich von den SPR-Messungen unterscheiden, die Proteine über ein His-Tag an die Beads gekoppelt. Das Problem bei einer gerichteten Immobilisierung, welche die Kopplung über ein Tag darstellt, ist, daß Bindungsstellen nicht zugänglich sein können. Da davon ausgegangen wird, daß die Bindungsstellen in den LN-Modulen liegen, wurden für die Kopplung nur C-terminale Tags verwendet. Aus sterischen Gründen sollte daraufhin eine Bindungsstelle in den LE-Modulen schwer zugänglich sein, weshalb ein weiterer indirekter Beweis für die Lokalisation der Bindungsstellen in den LN-Domänen erbracht wurde.

Für die Untersuchungen mit dem LiquiChip System erwies es sich als vorteilhaft, daß die meisten Proteine mit zwei unterschiedlichen Tags exprimiert wurden. Die Fragmente mit His Tag wurden gekoppelt und Strep-Fusionsproteine wurden in Lösung verwendet. Zur Detektion konnte dann ein Primärantikörper gegen das Strep-Tag und ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper gegen den Strep-Antikörper verwendet werden.

Die Messungen mit dem Luminex-Suspensions-Assay erfolgen im Gleichgewicht und ohne Waschschrte, weshalb selbst schwache Bindungen nachgewiesen werden können. Weiterhin werden für die Kopplung maximal 20 ng Protein je Datenpunkt benötigt, was deutlich weniger ist als für einen ELISA.

Ein Problem der Methode ist, daß vom Interaktionspartner in Lösung selbstverständlich nicht nur der gebundene Teil mit dem zur Detektion verwendeten Antikörper interagiert. Gemessen wird zwar nur der an die Beads gebundene Antikörper jedoch muß dieser im Überschuß eingesetzt werden. Aus diesem Grund mußte für jede Proteinkonzentration in Lösung sowohl die Verdünnung des 1. als auch des 2. Antikörpers optimiert werden. Für die Bestimmung von Bindungskonstanten von schwachen Interaktionen ergibt sich ein weiterer Nachteil der Methode, da die für die Sättigung benötigten Proteinkonzentrationen auch enorme Mengen an Antikörper erfordern. Eine Verbesserung des Antikörperproblems ergibt sich, wenn der Antikörper gegen das Protein in Lösung direkt fluoreszenzmarkiert ist und somit nur ein Antikörper verwendet werden muß. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein fluoreszenz-markierter Antikörper gegen das His-Tag nicht an ein über ein His-Tag gekoppeltes Protein bindet. Da es bei den verwendeten Proteinkonzentrationen nicht zu einer Verdrängung bzw. einem Austausch der His-Fusionsproteine kommt, konnte der Versuchsaufbau deutlich verbessert werden.

Der große Vorteil des Luminex-Suspensions-Assays besteht darin, viele Inter-

aktionen gleichzeitig untersuchen zu können (Multiplexing). Es können momentan bereits bis zu 100 vom System unterscheidbare Beads verwendet werden, weshalb die Interaktion eines Proteins in Lösung mit vielen gekoppelten Proteinen gleichzeitig in einem Ansatz untersucht werden kann. Das Gerät stand zu Beginn dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung. Die große Anzahl von möglichen Interaktionen zwischen den LN-Domänen hätte viel schneller untersucht werden können als mit der SPR-Technologie von Biacore. Diese wiederum hat deutliche Vorteile bei der Ermittlung von Bindungskonstanten, weshalb die Kombination von beiden eine sehr gute Möglichkeit für die Untersuchung von Wechselwirkungen darstellt. Weiterhin bietet das LiquiChip System gute Voraussetzungen für Inhibierungsexperimente. Es könnte z.B. die Bindung von $\beta 1$ an gekoppeltes $\alpha 1$ mit und ohne $\gamma 1$ in Lösung untersucht werden. Wenn der Versuch so aufgebaut wird, daß die Bindung von $\gamma 1$ an $\alpha 1$ nicht detektiert wird, sollte es möglich sein zu zeigen, ob $\beta 1$ und $\gamma 1$ unterschiedliche Bindungsstellen besitzen. Diese Experimente konnten noch nicht durchgeführt werden, da das Gerät nach der Testphase zurückgegeben werden mußte und das vor kurzem bestellte noch nicht zur Verfügung steht.

3.4.3 Cross-Linking

Im Modell der Laminin-Polymerisation ist die Ausbildung eines trimeren Komplexes mit Beteiligung der α , β und γ -Kette Voraussetzung für ein stabiles Netzwerk. Durch Cross-Linking der rekombinanten N-terminalen Domänen sollte die Bildung von Komplexen, welche noch nicht durch biochemische Experimente nachgewiesen wurde und nur auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen beruht, untersucht werden.

Die Schwierigkeit beim Cross-Linking von Proteinen ist es, Versuchsbedingungen zu ermitteln, bei denen ausschließlich aneinander gebundene Proteine quervernetzt werden. Die exprimierten Proteine und die bereits durchgeführten Bindungsstudien stellten jedoch optimale Voraussetzungen dar, da strukturell homologe Proteine zur Verfügung standen, die mit sich selbst interagierten bzw. diese Eigenschaft nicht aufwiesen. Wie erwartet zeigte $\gamma 1$ im Gegensatz zu $\alpha 2$ keine Ausbildung von Komplexen. Erstaunlicherweise bildete $\alpha 2$ neben dem Dimer auch Trimer und noch größere Komplexe. Durch dieses Experiment konnte auf biochemischem Wege zum ersten mal gezeigt werden, daß LN-Domänen zumindest einen trimeren Komplex bilden können und daß die N-terminale Region der $\alpha 2$ -Kette mindestens zwei an der Laminin-Polymerisation beteiligte Bindungsstellen enthält. Weiter Untersuchungen zeigten, daß jedes Protein, welches mit sich selbst interagiert, in der Lage ist einen trimeren Komplex zu bilden. Demzufolge besitzen mindestens

fünf der acht exprimierten N-terminalen Domänen zwei Bindungsstellen für LN-Domänen.

Die Fragmente der β 1- und γ 1-Kette weisen keine Selbstinteraktion auf. Cross-Linking Experimente zeigten dann, daß sie zusammen einen dimeren Komplex bilden können. Demzufolge konnte für beide Ketten nur eine Bindungsstelle identifiziert werden. Ob es eine weitere für die α -Ketten gibt oder ob sie nur eine Bindungsstelle besitzen, konnte nicht nachgewiesen werden. In einem trimeren Komplex mit einer α -Kette besteht keine Unterscheidungsmöglichkeit, ob β 1- und γ 1 weitere Bindungsstellen benutzen oder für die Bindung an die α -Kette dieselbe verwenden wie für die Interaktion untereinander.

3.5 Kristallisation

Für das Verständnis der Laminin-Polymerisation ist es unerlässlich, die Struktur eines LN-Moduls zu lösen. Aus diesem Grund sollte ein rekombinantes Protein kristallisiert werden.

Die ersten Proteine, die hergestellt wurden, waren die Fragmente der α 1-, β 1- und γ 1-Ketten. Der Grund hierfür war, daß nicht alle Konstrukte gleichzeitig in Zellkultur gehalten werden konnten und diese die Grundlage für die Bindungsstudien darstellten. Alle Proteine waren glykosyliert und die Zucker konnten nicht unter nativen Bedingungen abgespalten werden. Aus Sicht der potentiellen Glykosylierungsstellen wurden in Voraussicht der Schwierigkeiten von der β 1-Kette Konstrukte in verschiedener Größe hergestellt. Dieser Schritt erwies sich als sehr hilfreich, da die Proteine mit weniger als vier LE-Modulen deutlich besser exprimiert wurden als in der Literatur beschrieben (Ettner et al., 1998). Aufgrund der Glykosylierung, welche ein großes Problem bei der Kristallisation darstellen kann, wurde das Protein β 1_VI+1_C-Strep mit nur einem N-Glykan gewählt. Die Kristallisation eines Proteins mit Glykosylierung ist kritisch, da die Zucker zu einem inhomogenen Protein führen können, jedoch nicht unmöglich wie sich z.B für das extrazelluläre Protein BM40 zeigte (Hohenester et al., 1996). Weiterhin sprach für dieses Protein, daß für die N-terminale Region der β 1-Kette eine Selbstinteraktion ausgeschlossen werden konnte (Schittny & Schittny, 1993) und bei der Verwendung von nur einem LE-Modul die Flexibilität des Proteins minimal war. Damit sich die Kristallisationsansätze überhaupt lohnen, sollten mindestens 10 mg sauberes Protein hergestellt werden. Hierfür wurden 10 l Zellkulturüberstand - eine Menge, die an die Grenze des Möglichen stößt - gesammelt. Nach Reinigung und Aufkonzentrierung zeigte das Protein eine monomodale Verteilung und somit gute

Startbedingungen für eine Kristallisation. Es wurden aber mit den durchgeführten Ansätzen keine Kristallisationsbedingungen gefunden. Außerdem präzipitierte das Protein bei den meisten Bedingungen in diffuser Form, weshalb mit diesem Protein keine weiteren Versuche durchgeführt wurden.

Der Grund für das schlechte Kristallisationsverhalten wurde hauptsächlich in der Glykosylierung des Proteins gesehen. Aus diesem Grund sollte für weitere Experimente nur ein Protein ohne Zucker benutzt werden. Weiterhin sollte nun ein Protein mit mindestens zwei LE-Modulen, welches deutlich besser sekretiert wird als eins mit einem LE-Modul, verwendet werden. Nachdem nun von allen Ketten rekombinante Proteine exprimiert und aufgereinigt waren, stand eine Vielzahl von Proteinen zur Verfügung. Aufgrund der durchgeführten SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und der Zahl der Glykosylierungen verblieben jedoch nur die Fragmente der $\beta 3$ - und $\gamma 1$ -Kette.

Für die Entfernung der Zucker standen zwei Verfahren zur Auswahl. Einerseits können die potentiellen Glykosylierungsstellen durch Einfügen von Punktmutationen zerstört werden und andererseits können Proteine unter nativen Bedingungen deglykosyliert werden. Zuerst sollte der molekularbiologische Ansatz ausprobiert werden, obwohl für die Fragmente der $\beta 3$ -Kette eine Deglykosylierung unter nativen Versuchsbedingungen erfolgreich durchgeführt werden konnte. Der Grund hierfür war, daß die Enzymmengen, welche für die Deglykosylierung verwendet wurden, im großen Maßstab kaum zu bezahlen sind und die Reaktion oft nicht vollständig abläuft.

Der Versuch wurde mit der $\gamma 1$ -Kette durchgeführt, obwohl diese eine Glykosylierungsstelle mehr besitzt als die $\beta 3$ -Kette, da die $\gamma 1$ -Kette im Gegensatz zur $\beta 3$ -Kette keine Selbstinteraktion aufweist. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit von mehreren Aggregationszuständen in Lösung geringer. Das mutierte Protein, bei dem die Asparagine beider Glykosylierungsstellen gegen Alanine ausgetauscht waren, wurde von 293 EBNA-Zellen nicht exprimiert. Entweder werden die N-Glykosylierungen für eine korrekte Faltung benötigt oder die veränderten Aminosäuren verursachen eine Konformationsänderung, welche wiederum zur Degradierung des Proteins führt.

Anschließend wurde nun doch ein Fragment der $\beta 3$ -Kette unter nativen Versuchsbedingungen deglykosyliert. Um die benötigte Enzymmenge so gering wie möglich zu halten, wurden die Bedingungen der Deglykosylierung optimiert. Obwohl es im kleinen Maßstab keine Probleme gab, präzipitierte das deglykosylierte Protein beim großen Ansatz teilweise. Der Grund hierfür wurde in der schlechten Löslichkeit des Proteins nach Abspalten der Zucker gesehen. Aufgrund des ermittel-

ten pH-Optimums der Endoglykosidase F wurde die Reaktion bei pH 8,0, in der Nähe des theoretischen pI-Werts des $\beta 3$ -Fragments, durchgeführt. Im kleinen Maßstab wurde wahrscheinlich kein Präzipitat beobachtet, weil die Menge zu gering war. Es wurde demzufolge der pH-Wert gesenkt, was zur Folge hatte, daß mehr Enzym und viel längere Inkubationszeiten verwendet werden mußten. Mit dem aufkonzentrierten Protein wurden bereits die ersten Kristallisationsansätze durchgeführt, jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Kristallbildung beobachtet.

Aus persönlichen Mitteilungen (Hohenester E., Koch M., Stetefeld J.) ist bekannt, daß mehrere Gruppen seit längerem versuchen, die Struktur eines LN-Moduls zu lösen. Einige Gruppen haben bereits aufgegeben doch es ist gelungen, ein Konstrukt der $\gamma 1$ -Kette, welches aus Domäne VI und V besteht, zu kristallisieren (Stetefeld J., persönliche Mitteilung). Die Kristalle erlauben jedoch keine röntgenkristallographische Strukturlösung und bis jetzt konnte das Problem nicht gelöst werden.

Die Kristallisation des $\gamma 1$ -Fragments, welches zwei Glykosylierungen trägt, zeigt deutlich, daß die Glykosylierungen eine Kristallisation der N-terminalen Domänen nicht prinzipiell verhindern. Für die Ermittlung der Kristallisationsbedingungen des rekombinanten Proteins der $\gamma 1$ -Kette wurden enorme Proteinmengen verbraucht (Stetefeld J., persönliche Mitteilung). Dies war nur dadurch möglich, daß ein Konstrukt mit mehr als zwei LE-Modulen verwendet wurde. Dies zeigt, daß die Anzahl der LE-Module keinen negativen Effekt auf die Kristallisation haben muß, weshalb in Zukunft Konstrukte mit vier LE-Modulen, welche deutlich besser exprimiert werden, verwendet werden sollen. Vielleicht sind es gerade die LE-Module, die benötigt werden um das LN-Modul zu kristallisieren. Ein LN-Modul kann nicht ohne LE-Module exprimiert werden und mit der Zahl der LE-Module nimmt die Expressionsrate - vermutlich aufgrund einer zunehmenden Stabilität - zu. LE-Module stellen eigenständige Faltungseinheiten dar, weshalb die Stabilisierung eigentlich nur durch eine Interaktion zwischen LE-Modulen und LN-Modul erklärt werden kann.

Weiterhin wurde das kristallisierte $\gamma 1$ -Fragment ohne Tag exprimiert. Aus diesem Grund soll nun das LN-Modul der $\beta 3$ -Kette mit vier LE-Modulen und ohne Tag für die Kristallisation exprimiert werden. Da das $\beta 3$ -Fragment deutlich weniger Zucker trägt als das entsprechende $\gamma 1$ -Konstrukt, soll das Protein mit Glykosylierung für die Kristallisation verwendet werden. Die Interaktionen zwischen LN-Modulen sind temperaturabhängig, weshalb mögliche Aggregationsprobleme aufgrund der Selbstinteraktion der N-terminalen Region der $\beta 3$ -Kette über die für die Kristallisation verwendete Temperatur aufgehoben werden können.

3.6 Das Modell der Laminin-Polymerisation

Die Stabilität des Laminin-Netzwerks resultiert nach dem existierenden Modell (Yurchenco & Cheng, 1993) aus der Bildung eines trimeren Komplexes mit Interaktionen zwischen allen beteiligten N-terminalen Domänen. Im Modell werden keine Selbstinteraktionen berücksichtigt, weshalb immer eine α -, β - und γ -Kette am Trimer beteiligt sein muß. Es entsteht demzufolge ein symmetrisches Netzwerk (Abb. 3.1), welches nur von Lamininen mit drei kurzen Armen (Laminine: 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 15) und nicht von gestutzten Isoformen (Laminine: 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14) gebildet werden kann (Cheng et al., 1997).

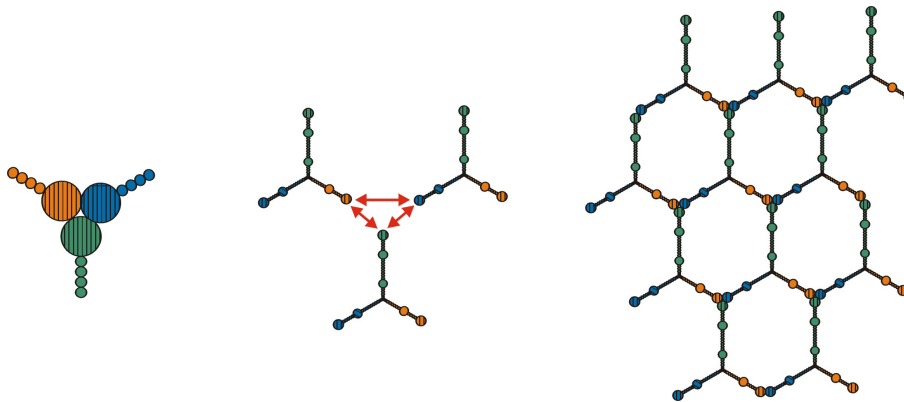


Abbildung 3.1: Vereinfachtes Modell des Laminin-Netzwerks (Typ A). Der lange Arm des Laminins, welcher für die Bindung an Rezeptoren verwendet wird, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. Zur weiteren Vereinfachung liegen die kurzen Arme aller Laminine in einer Ebene und die Winkel zwischen den kurzen Armen sind identisch.

Auch wenn Laminin-Moleküle in Wirklichkeit viel flexibler sind als im Modell beschrieben und es sich um ein weniger symmetrisches 3D-Netzwerk handelt, haben die erforderlichen Interaktionen zur Folge, daß es nur ein mögliches Laminin-Netzwerk gibt und deshalb unterschiedliche Isoformen nur im geringen Maße die Form und Stabilität des Polymers beeinflussen. Diese Auswirkung des Modells der Laminin-Polymerisation ist zweifelhaft, da Basalmembranen unterschiedliche Stabilitäten aufweisen und Studien belegen, daß Laminin nicht nur, wie früher angenommen, Kollagen IV unterstützt, sondern entscheidend an der Bildung und Stabilität von Basalmembranen beteiligt ist (Smyth et al., 1999; Li et al., 2002). In der Niere, wo die Basalmembran als molekularer Filter fungiert und die Funktion stark von der Stabilität und Form der Basalmembran abhängig ist, zeigen sich sowohl Unterschiede zwischen den Laminin- als auch Kollagen IV-Isoformen. Während der Mausentwicklung werden in der Niere die Kollagen $\alpha 1(\text{IV})$ - und $\alpha 2(\text{IV})$ -Ketten

durch $\alpha 3(\text{IV})$ bis $\alpha 5(\text{IV})$ ersetzt (Lu et al., 1999). Letztere bilden aufgrund einer stärkeren Quervernetzung stabilere Netzwerke und sind entscheidend für die Filterfunktion der Basalmembran, weshalb Mutationen in einer dieser Ketten, welche nicht durch $\alpha 1(\text{IV})$ - und $\alpha 2(\text{IV})$ kompensiert werden können, zu einer späten Form des Alport Syndroms mit chronischer Glomerulonephritis führen (Cosgrove et al., 1996; Miner & Sanes, 1996). Auffallende Ähnlichkeiten weisen die Laminin-Ketten $\beta 1$ und $\beta 2$ auf. Mit fortschreitender Entwicklung wird die Funktion der $\beta 1$ - von der $\beta 2$ -Kette übernommen und Defekte in der Laminin $\beta 2$ -Kette führen wie bei den Kollagen (IV)-Ketten $\alpha 3(\text{IV})$ bis $\alpha 5(\text{IV})$ zu einer Glomerulonephritis (Noakes et al., 1995). Auch wenn andere Effekte nicht ausgeschlossen werden können, so kann doch vermutet werden, daß sich die Eigenschaften der $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Kette in Bezug auf Stabilität und Form des gebildeten Netzwerks unterscheiden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen diese Vermutung und verdeutlichen, daß das existierende Modell der Laminin-Polymerisation nicht nur unvollständig und zu starr sondern auch unzureichend ist, um die Netzbildung einzelner Laminin-Isoformen zu beschreiben. Das aus den Interaktionsstudien hervorgehende Bindungsmuster der Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Domänen ist viel komplexer als im Modell beschrieben. Mit den Einschränkungen, daß die $\beta 1$ -Kette nicht mit sich selbst interagiert, die $\alpha 2$ - nicht an die $\gamma 1$ -Kette bindet und die $\gamma 3$ -Kette für sich betrachtet wird, sind folgende Interaktionen möglich: α - α , α - β , β - β , α - $\gamma 1$, β - $\gamma 1$.

Eine genaue Beschreibung der Zahl und Art der Bindungsstellen kann noch nicht erfolgen, doch zeigten Cross-Linking-Experimente, daß die Selbstinteraktionen nicht nur zur Bildung von dimeren sondern auch trimeren und vielleicht noch größeren Komplexen führen. Aus diesem Grund sollten Fragmente, die an sich selbst binden, mindestens zwei Bindungsstellen besitzen. Wenn es sich bei den Komplexen mit mehr als drei identischen Untereinheiten nicht um Artefakte handelt, was noch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dann besitzen die N-terminalen Domänen entweder mehr als zwei Bindungsstellen oder im Trimer muß es nicht zu Interaktionen zwischen allen Ketten kommen, weshalb zwei LN-Module noch eine Bindungsstelle für weitere Interaktionen frei hätten. Auf diese Weise könnte, wenn dies nicht nur für die Homotrimere gilt, ein noch stabileres und kompakteres Netzwerk gebildet werden (Abb. 3.2).

Wichtig für die Laminin-Polymerisation ist die Bindung an Rezeptoren. Von Bedeutung ist nicht nur die Bindung an sich, welche zu einer Aufkonzentration des Proteins führt, sondern auch die daraus resultierende Signalübertragung, die zu einer Reorganisation des Cytoskeletts führt (Colognato et al., 1999). Die

Umstrukturierung ist wahrscheinlich nötig, um die Rezeptoren so auszurichten, daß eine Laminin-Polymerisation möglich ist. Die von Rezeptoren vermittelten Signale sind oft bidirektional, weshalb durch die Zellrezeptoren auch ein Einfluß auf das Netzwerk ausgeübt werden könnte. Demzufolge könnte über die Abstände zwischen den Rezeptoren, welche wiederum von Cytoskeletts abhängen, die Art des Netzwerks bestimmt werden. Vielleicht sind beide beschriebene Arten von Komplexen möglich und die Anordnung der Rezeptoren entscheidet, entsprechend den Bedürfnissen der Zelle, welches Netzwerk gebildet wird. Ein Netzwerk vom Typ B würde besser zu Rezeptor-Clustern, welche z.B. in Fokalkontakten vorkommen, passen als ein Typ A.

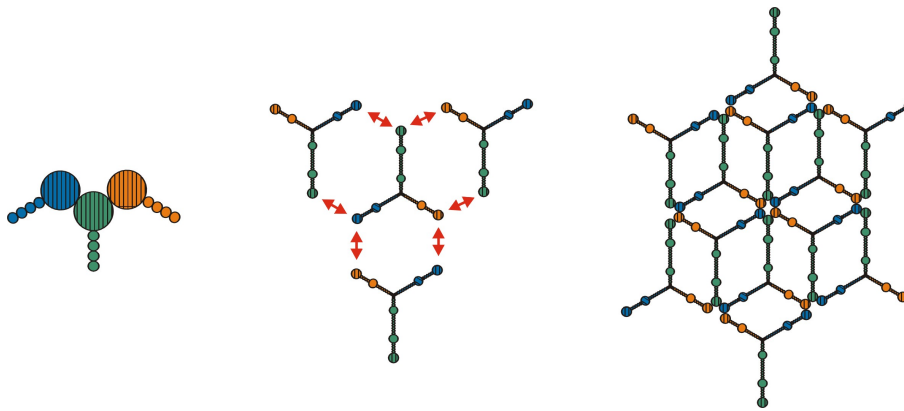


Abbildung 3.2: Theoretische Ausbildung eines alternativen Laminin-Netzwerks (Typ B). Die Zahl der von einem Laminin ausgehenden Bindungen ist identisch mit denen im Typ A und jede N-terminale Domäne wird wie zuvor durch die Interaktion mit zwei anderen an ihrem Platz gehalten, weshalb es zu einer stärkeren Bindung durch Kooperativität kommt. Diese wird noch erhöht, da jedes Laminin-Molekül nun nicht mit sechs sondern drei weiteren Lamininen interagiert und somit mit jedem zwei Bindungen eingeht.

Problematisch ist die Beschreibung des Netzwerks von Laminin-2, da die $\alpha 2$ -Kette, wie auch unabhängig gezeigt wurde (Garbe et al., 2002), nicht an die $\gamma 1$ -Kette bindet und deshalb nach dem alten Modell kein trimerer Komplex, welcher notwendig für die Stabilität des Polymers sein sollte, gebildet wird. Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die Interaktion von $\alpha 2$ an $\gamma 1$ erfolgt nur im Komplex und erfordert eine Konformationsänderung.
2. Die Bindung ist unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar, da sie nur unter kooperativen Verhältnissen im Komplex erfolgt.

3. Die γ 1-Kette nimmt nicht an der Ausbildung des Netzwerks teil.
4. Dimere Komplexe sind an der Laminin-Polymerisation beteiligt.

Durch Cross-Linking-Experimente konnte gezeigt werden, daß β 1 und γ 1 nur einen dimeren Komplex bilden können. Wenn ein Trimer mit Interaktionen zwischen jedem LN-Modul wirklich eine Voraussetzung für die Ausbildung von Bindungen zwischen Laminin-Molekülen ist, dann spricht dieses Ergebnis auch für den dritten Punkt. Unter diesen Bedingungen wäre ohne die Selbstinteraktion der α 2-Kette keine Polymerisation möglich. Weiterhin mußte ein Trimer aus zwei α 2- und einer β 1-Kette gebildet werden können (Abb. 3.3).

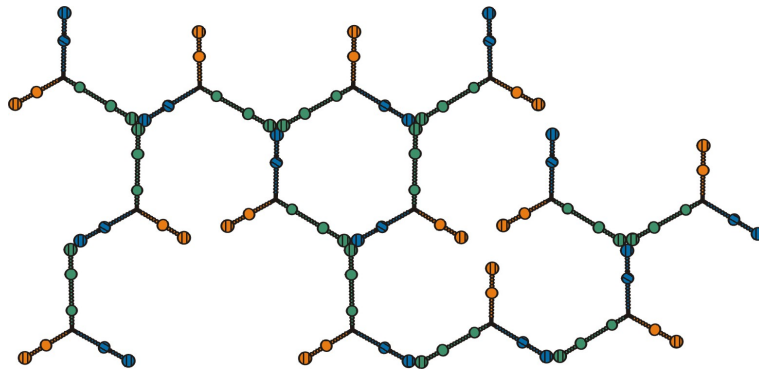


Abbildung 3.3: Eine mögliche Ausbildung eines Netzwerks von Laminin-2 ohne Beteiligung der γ 1-Kette (orange). Das Polymer wäre schwächer und hätte relativ große Lücken.

Theoretisch ist es aufgrund der Selbstinteraktion denkbar, daß Laminine mit nur zwei kurzen Armen ein Netzwerk bilden (Abb. 3.4). Die Ausbildung von trimeren Komplexen mit Beteiligung von zwei Ketten ist wahrscheinlich, aber noch nicht experimentell nachgewiesen worden. Inhibierungsexperimente lassen jedoch ihre Existenz erahnen.

Die Vorstellung eines Komplexes mit Interaktionen zwischen jedem LN-Modul resultierte aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und sollte die Stabilität eines Netzwerks aus sehr schwachen Bindungen durch Kooperativität erklären (Yurchenco & Cheng, 1993). Die ermittelten Bindungskonstanten und der Nachweis von Bindungen, die mit den proteolytischen Fragmenten nicht identifiziert werden konnten, zeigen deutlich, daß die proteolytischen Fragmente zum Teil geschädigt waren. Die mit der SPR-Technologie von Biacore bestimmten Bindungskonstanten weisen nicht auf sehr starke Wechselwirkungen hin, sind aber zum Teil deutlich stärker, als die mit den proteolytischen Fragmenten ermittelten. Weiterhin werden die Laminine durch die Bindung an Rezeptoren in räumlicher Nähe gehalten, weshalb

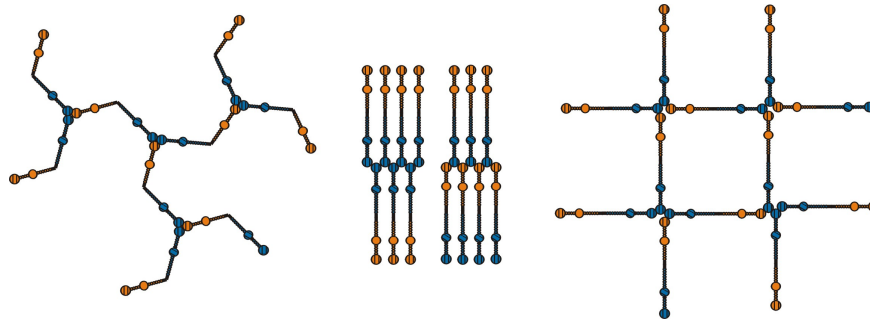


Abbildung 3.4: Die Selbstinteraktion ermöglicht theoretisch Lamininen mit zwei Armen die Ausbildung von Netzwerken. Die Form ist abhängig von der Art der Komplexe.

die Bindungen noch stabiler sein sollten. Aus diesem Grund ist ein trimerer Komplex mit Kooperativität nicht unbedingt Voraussetzung für ein stabiles Netzwerk. Dieses könnte auch dadurch entstehen, daß Laminin-Moleküle durch viele Interaktionen in räumlicher Nähe bleiben und es somit zu einer Kooperativität kommt, die durch die Zahl der möglichen Interaktionen bestimmt wird. Auf diese Weise könnten Laminin-Isoformen unterschiedliche Netzwerke mit variierender Stabilität bilden, was mit dem alten Modell nicht möglich war. Unter diesen Voraussetzungen könnte z.B. erklärt werden, warum der Verlust der $\beta 2$ -Kette in der Niere, welcher zu einer unzureichenden Filterfunktion führt, nicht durch die $\beta 1$ -Kette kompensiert werden kann. Laminine mit einer $\beta 2$ -Kette sollten aufgrund der Selbstinteraktion stabilere und engmaschigere Netzwerke bilden als diejenigen mit einer $\beta 1$ -Kette.

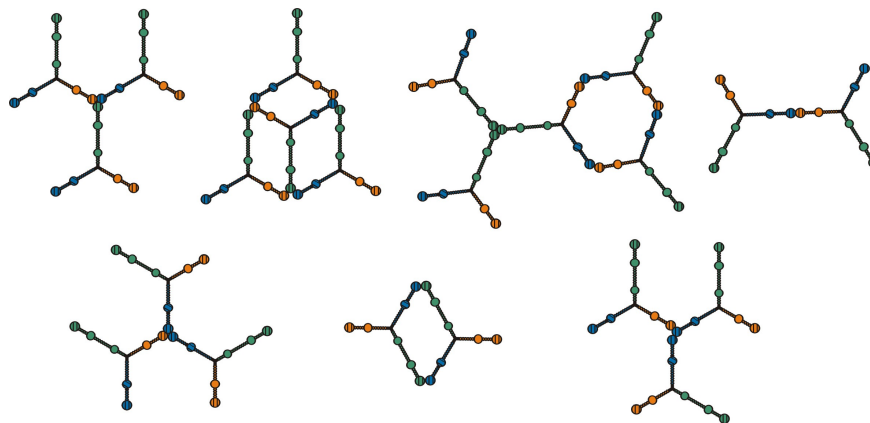


Abbildung 3.5: Auswahl einiger Komplexe, die an der Netzwerkbildung von Laminin beteiligt sein könnten.

Kapitel 4

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurden von acht Laminin-Ketten verschiedene Konstrukte der N-terminalen Domänen hergestellt, die neben dem LN-Modul für eine variable Anzahl von LE-Modulen kodieren. Die in 293 EBNA-Zellen überexprimierten Proteine sollten zum Teil mit und ohne Tag zur Verfügung stehen, weshalb insgesamt 23 Proteine exprimiert und aufgereinigt wurden.

Eine Charakterisierung der Proteine mittels N-terminaler Sequenzierung, Massenspektrometrie, Western-Blot, CD-Spektroskopie und nativer Gelelektrophorese zeigte, daß es sich um intakte Proteine handelt. Für fünf der acht Laminin-Ketten konnte weiterhin durch CD-Spektroskopie eine Bindung von zweiwertigen Kationen, vermutlich Calcium, nachgewiesen werden. Die durch EDTA verursachte Veränderung der Sekundärstruktur konnte jedoch in keinem Fall vollständig durch Zugabe von verschiedenen zweiwertigen Kationen umgekehrt werden. Aus diesem Grund soll nun durch Gleichgewichtsdialyse eine Bindung von Calcium untersucht werden.

Um ein umfassendes Bild der an der Laminin-Polymerisation verschiedener Isoformen beteiligten Interaktionen zu erhalten, wurden alle 36 möglichen Interaktionen zwischen den acht exprimierten N-terminalen Domänen mittels Biacore untersucht und mit dem Luminex-Suspensions-Assay bestätigt. Es wurden 28 Wechselwirkungen identifiziert, von denen durch andere Gruppen bisher nur zwei direkt nachgewiesen wurden (Garbe et al., 2002). Weiterhin konnte die an der Laminin-Polymerisation beteiligte Bindungsregion durch die Verwendung von unterschiedlich großen Fragmenten auf das LN-Modul mit nur einem LE-Modul eingegrenzt werden. Das aus den Interaktionsstudien hervorgehende Bindungsmuster ist viel komplexer als im Modell beschrieben und der entscheidende Unterschied ist, daß fünf der acht N-terminalen Domänen eine Selbstinteraktion zeigen. Für diese konnte durch Cross-Linking Experimente nicht nur die Ausbildung von dimeren sondern

auch trimeren und noch größeren Komplexen nachgewiesen werden. Deshalb besitzen diese Proteine mindestens zwei Bindungsstellen.

Zusammenfassend verdeutlichen die Bindungsstudien, daß das existierende Modell der Laminin-Polymerisation zu starr und unvollständig ist, weshalb die Netzwerkbildung einzelner Laminin-Isoformen falsch beschrieben wird. Mit den neuen Erkenntnissen ist es theoretisch möglich, unterschiedliche Netzwerke zu erklären, was mit dem alten Modell unmöglich war. Außerdem ist die Bildung von Laminin-Netzwerken aus Lamininen mit nur zwei kurzen Armen denkbar. Um ein genaueres Verständnis der Bindungsstellen in Bezug auf Spezifität und Anzahl zu erlangen, sollen nun Inhibierungsexperimente mit dem Luminex-Suspensions-Assay durchgeführt werden. Für diese Versuche ist es von großem Vorteil, daß Fragmente sowohl ohne als auch mit verschiedenen Tags exprimiert wurden. Weiterhin soll mittels Massenspektrometrie quervernetzter N-terminaler Domänen versucht werden, die Bindungsregion weiter einzuengen, um anschließend durch Punktmutationen Bindungsstellen zu identifizieren.

Viel eleganter und entscheidend für das Verständnis der Laminin-Polymerisation wäre es, die Struktur einer N-terminalen Domäne zu lösen. Aus diesem Grund wurde - bis zum jetzigen Zeitpunkt ohne Erfolg - versucht, eine N-terminale Domäne zu kristallisieren. Ein Problem könnte sein, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, daß alle N-terminalen Domänen glykosyliert sind. Deshalb wurden durch Einfügen von Punktmutationen beide Asparagine der potentiellen Glykosylierungsstellen der $\gamma 1$ -Kette in Alanine überführt. Das mutierte Protein wurde jedoch von 293 EBNA-Zellen nicht exprimiert und es muß jetzt untersucht werden, ob das Protein generell ohne Zucker nicht exprimiert wird oder ob ein Protein mit anderen Mutationen, welche ebenfalls die Konsensussequenz der Glykosylierung verändern, sekretiert wird.

Eine weitere Möglichkeit, die Zucker zu entfernen, besteht darin, die N-Glykane unter nativen Bedingungen abzuspalten. Aufgrund der Ergebnisse der nativen Deglykosylierung wurde ein Fragment der $\beta 3$ - Kette verwendet. Bei einer Deglykosylierung im großen Maßstab ergaben sich jedoch Probleme und es zeigte sich, daß eine enzymatische Entfernung der Zucker in diesem Fall sehr schwierig und kostspielig ist.

Für die Kristallisation wurden bisher nur Proteine mit ein bis zwei LE-Modulen verwendet, um einerseits die Proteine so unflexibel wie möglich zu halten und andererseits die Zahl der potentiellen Glykosylierungsstellen zu minimieren. Die Expressionsrate von N-terminalen Domänen steigt jedoch deutlich mit der Zahl der LE-Module, was eine bessere Stabilität vermuten läßt, weshalb nun ein Konstrukt

mit vier LE-Modulen für die Kristallisation verwendet werden soll. Weiterhin steht unter diesen Voraussetzungen viel mehr Protein für Kristallisationsansätze zur Verfügung. Aus Sicht der Glykosylierung stellen die zusätzlichen LE-Module bei der $\beta 3$ -Kette kein Problem dar, da in diesen keine potentiellen Glykosylierungsstellen enthalten sind. Außerdem soll das Protein nun ohne Tag für die Kristallisation verwendet werden, weil ein Einfluß des Tags auf die Kristallisation möglich ist.

Um die Bedeutung der *in vitro* untersuchten Interaktionen zu demonstrieren, soll im Experiment geprüft werden, ob die Ausbildung von Basalmembranen in *Embryoid Bodies*, einem Modellsystem der frühen Mausentwicklung in Zellkultur, durch die Inhibierung der Polymerisation von Laminin mit den rekombinanten Proteinen verhindert werden kann.

Kapitel 5

Material und Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden und Puffer sind aus Sambrook et al. (1989) entnommen worden.

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 RNA Isolierung

RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert und in Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser resuspendiert.

5.1.2 Reverse Transkription (RT)

1 μg RNA in 20 μl DEPC Wasser wurde 5 min auf 70 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von:

1.	0,5 μl RNase Inhibitor
2.	2,5 μl Reverse Transkriptions Puffer
3.	1,0 μl Primer (10 pmol/ μl)
4.	0,5 μl dNTPs (25 mM)
5.	5,0 U Reverse Transkriptase (AMV RTase; 22 U/ μl ; ONCOR Appligene)

Nach 30 min bei 40 °C wurden weitere 5 U Reverse Transkriptase zugegeben und für 30 min auf 45 °C erhitzt. Zur Enzymaktivierung wurde für 2 min auf 100 °C erhitzt.

5.1.3 PCR

Als Vorlage diente die durch RT gewonnene cDNA oder bereits gereinigte DNA.

Programm:

Reaktionsansatz:

Zyklen	Temperatur		
1x	94 °C / 2 min	1.	37,0 µl H ₂ O
25x	94 °C / 1 min	2.	5,0 µl PCR-Puffer
	56 °C / 1 min	3.	2,5 µl Sense-Primer (10 pmol/µl)
	72 °C / 3 min	4.	2,5 µl Antisense-Primer (10 pmol/µl)
1x	72 °C / 10 min	5.	0,5 µl dNTPs (25 mM)
Pause	4 °C	6.	0,5 µl RT-Reaktionsansatz oder DNA
		7.	2,0 U Polymerase (Expand High Fidelity, 3,5 U/µl)

5.1.4 Gerichtete Einführung von Punktmutationen

Die gezielte Einführung von Punktmutationen erfolgte mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Für die Mutationen des LAMC1-Gens wurden die Primer LAMC1_132N-A, LAMC1_132N-Acomp, LAMC1_58N-A und LAMC1_58N-A verwendet.

5.1.5 Transformation

Die Transformation sowie Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien (DH5 α) erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983).

5.1.6 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Plasmid-DNA im 10 µg Maßstab wurde nach der Methode von Birnboim (1983) isoliert. Die Gewinnung größerer Mengen DNA (100 µg) erfolgte mit Hilfe des Midi-Prep Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

5.1.7 DNA-Reinigung

Die Aufreinigung von DNA erfolgte entweder durch Phenol/Chloroform Extraktion oder Isolierung aus einem Agarosegel (GeneClean-Kit).

Phenol/Chloroform-Extraktion:

Die DNA-haltige Lösung wurde mit Wasser auf 200 μ l aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform(1:1) versetzt und gemischt. Anschließend wurde 1 min bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und 200 μ l Chloroform zugegeben. Die Probe wurde gemischt, zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Zu dieser wurden 20 μ l 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 600 μ l Ethanol (96%) gegeben und zentrifugiert (15000 rpm, 20 min, 4 °C). Anschließend wurde die Probe mit 70 % Ethanol gewaschen und in H₂O aufgenommen.

GENECLEAN-KIT:

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Geneclean Kit (Dianova BIO 101) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

5.1.8 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten im Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln).

5.2 Zellkultur

Die rekombinante Expression der Proteine erfolgte mit humanen embryonalen Nierenzellen der Linie 293-EBNA (Invitrogen).

5.2.1 Kultivierung von 293 EBNA Zellen

Die Zellen wurden adhärent auf Zellkulturschalen bei 37 °C in einer wasser-gesättigten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium (Gibco BRL: 500 ml Medium (DMEM Nut Mix F-12), 50 ml FCS, 10 ml Streptomycin/Penicillin (10 mg/ml), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 3,5 ml G418 (50 mg/ml)) der nicht trans-fizierten Zellen wurde alle zwei Tage gewechselt.

5.2.2 Transfektion und Selektion

Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation in 0,4 cm Küvetten (Biorad) bei 230 V und 500 μ F. Es wurden $5 \cdot 10^5$ 293 EBNA-Zellen in 800 μ l Medium und 10 μ g Plasmid verwendet. Nach 24 h wurde mit der Selektion begonnen. Alle ver-wendeten Variationen des Vektors pCEP-Pu beinhalteten eine Puromycinresistenz, weshalb im Selektionsmedium G418 durch Puromycin (1 μ g/ml) ersetzt wurde.

Nach drei Wochen und zweimaligem Vereinzeln (1:10) der Zellen starben diese nicht mehr und die Proteinexpression konnte überprüft werden.

5.2.3 Einfrieren, Lagerung und Auftauen

Nach Trypsinierung wurden die Zellen in Einfriermedium (Selektionsmedium + 10 % FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in Tieftemperaturlagerröhrchen überführt. In speziellen Einfrierboxen (Nalgene Cryo), mit einer Abkühlrate von 1 °C/min, wurden die Zellen auf -80 °C abgekühlt und dann in einem Stickstofftank gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte so schnell wie möglich bei 37 °C. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und zentrifugiert (900 rpm, 5 min). Das DMSO enthaltene Medium wurde abgesaugt und die Zellen in Medium auf eine Kulturschale überführt.

5.2.4 Gewinnung serumfreien Zellkulturüberstandes

Für die Gewinnung serumfreien Zellkulturüberstandes wurden konfluent bewachsene Kulturschalen verwendet. Zuerst wurde das Selektionsmedium vollständig entfernt. Um dies zu erreichen, wurde die Schale nach dem Absaugen des Mediums in eine fast senkrechte Position gebracht und nach 2 min das restliche Medium abgesaugt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor das Medium ohne FCS und ohne Antibiotikum zugegeben wurde. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt.

5.3 Proteinchemie

Die Proteinaufreinigungen wurden im Kühlraum (6 °C) durchgeführt. Weitere Arbeiten erfolgten wenn nicht anders erwähnt, auf Eis und die Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

5.3.1 TCA(Trichloressigsäure)-Fällung

Nach der Zugabe von 250 μ l 50% TCA und 100 μ l 1% Triton X 100 zu 1 ml Zellkulturüberstand wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde zentrifugiert (15000 rpm, 15 min, 4 °C) und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet, bevor es in H₂O aufgenommen wurde.

5.3.2 His-Tag Reinigung

Der Zellkulturüberstand wurde über eine mit 5 Säulenvolumina Puffer A equilibrierte Säule gepumpt. Anschließend wurde mit 1 % Puffer B gewaschen bis der Schreiber eine Basislinie anzeigte. Die Elution erfolgte dann mit dem folgenden Gradienten:

Volumen (ml)	0	20	80	100
% Puffer B	1	8	100	100

Zur Regeneration wurden 5 Säulenvolumina Puffer C über die Säule gepumpt.

Säule	XK 16 (Pharmacia)
Matrix	8 ml Talon-Matrix (Clontech)
Puffer A	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0
Puffer B	Puffer A + 250 mM Imidazol
Puffer C	25 mM MES, 100 mM NaCl, pH 5,0
Flußgeschwindigkeit	0,5 ml/min
Schreibergeschwindigkeit	0,2 cm/min
Empfindlichkeit	range 0,2
Fraktionen	120 à 1 ml

5.3.3 Strep-Tag Reinigung

Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer A equilibriert und dann mit dem Zellüberstand beladen. Zum Waschen wurden wieder 5 Säulenvolumina Puffer A verwendet. Die anschließende Elution erfolgte mit 4 Säulenvolumina Puffer B.

Säule	XK 16 (Pharmacia)
Matrix	5 ml StrepTactin-Matrix (IBA)
Puffer A	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0
Puffer B	Puffer A + 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer C	Puffer A + 1 mM HABA
Flußgeschwindigkeit	0,25 ml/min
Schreibergeschwindigkeit	0,2 cm/min
Empfindlichkeit	range 0.2
Fraktionen	20 à 1 ml

Zur Regeneration wurde die Säule zuerst mit Puffer C gewaschen bis sie rot gefärbt war und dann mit Puffer A equilibriert.

5.3.4 Ionenaustausch-Chromatographie

Entsprechend dem pI-Wert der Proteine wurde entweder ein Anionen- oder ein Kationen-Austauscher verwendet. Abgesehen von der Matrix und dem Puffer waren die verwendeten Versuchsbedingungen gleich.

Über die mit 2 Säulenvolumina Puffer A equilibrierte Säule wurde der Zellkulturüberstand gepumpt. Nachdem mit Puffer A gewaschen war, erfolgte die Elution mit einem NaCl-Gradienten. Dabei wurde der Gradient wie folgt verwendet: linearer Gradient von 0-500 mM NaCl innerhalb des 10-fachen Säulenvolumens (700 ml) gefolgt von einem linearen Gradienten im Bereich 0,5-1 M NaCl (200 ml).

Säule	XK 26 (Pharmacia)
Matrix (Anionenaustauscher)	70 ml DEAE-Sepharose FF
Matrix (Kationenaustauscher)	70 ml CM-Sepharose FF
Puffer A (Anionenaustauscher)	25 mM HEPES, pH 8,6
Puffer A (Kationenaustauscher)	25 mM Natriumacetat pH 4,8
Puffer B	Puffer A + 1 M NaCl
Flußgeschwindigkeit	1,0 ml/min
Schreibergeschwindigkeit	0,05 cm/min
Empfindlichkeit	range 0,5
Fraktionen	90 à 10 ml

5.3.5 Gelfiltration

Die Säule wurde mit 1.5 Säulenvolumina Puffer equilibriert. Anschließend wurde das Protein in einem Volumen von maximal 50 ml aufgetragen und der Lauf nach 2 l gestoppt.

Säule	XK 50 (Pharmacia)
Matrix	1800 ml Sepharose CL6B
Puffer	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4
Flußgeschwindigkeit	1 ml/min
Schreibergeschwindigkeit	0,02 cm/min
Empfindlichkeit	range 0,02
Fraktionen	200 à 10 ml

5.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce).

5.3.7 Biacore

Die Messungen erfolgten mit einem Biacore 3000 und die Auswertung mit der BIAevaluation 3.0-Software.

Für den Vortest und die Kopplung wurde das System im Kopplungspuffer equilibriert. Nachdem die Basislinie konstant war, erfolgte die Injektion des zu kopplenden Proteins auf eine nicht aktivierte CM5-Sensorchip Oberfläche. Die Proteinkonzentration wurde so eingestellt, daß nach Injektion von 35 μ l Lösung die Basislinie ein um ca. 1000 RU erhöhtes SPR-Signal aufwies. Die ermittelte Konzentration wurde dann für die Kopplung verwendet. Die Oberfläche wurde aktiviert, das Protein (Ligand) gekoppelt und freie Bindungsstellen blockiert.

Kopplung:

Sensorchip	CM5
Kopplungspuffer	10 mM Natriumacetat pH 5,0
Flußgeschwindigkeit	5 μ l/min
Proteinkonzentration	50 - 200 μ g/ml
Injektionstyp	Inject
Aktivierung	35 μ l 0,05 M NHS/ 0,2 M EDC
Ligand	35 μ l
Blockierung	35 μ l 1 M Ethanolamin pH 8,5

Nach der Kopplung wurde das System im Laufpuffer equilibriert. Nachdem die Basislinie konstant war, erfolgten die Messungen:

Laufpuffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0,005 % P20, pH 7,4
Flußgeschwindigkeit	25 μ l/min
Proteinkonzentration	0,1 - 10 μ M
Injektionstyp	Kinject
Injektionsvolumen	100 μ l
Dissoziation	500 s

5.3.8 N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie

Die N-terminalen Sequenzierungen und massenspektrometrischen Messungen erfolgten im Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln).

5.3.9 LiquiChip

Kopplung auf NTA-Beads:

1)	Je Ansatz (1 well einer 96-well Platte) 1 μ l homogene Bead-Suspension
2)	Zugabe von 1 μ l Proteinlösung (20 μ g/ml) je Ansatz
3)	30 s vortexen
4)	Inkubation bei 4 °C für 2 h
5)	zentrifugieren (10000 rpm; 5 min; RT)
6)	Überstand entfernen
7)	Zugabe von 500 μ l Reaktionspuffer, 30 s vortexen
8)	Wiederholung Schritt 5-7 (2x)
9)	Überstand entfernen und Beads in Reaktionspuffer aufnehmen (je Ansatz 20 μ l)
10)	1 min vortexen

Die Messungen wurden in einem Endvolumen von 60 μ l in 96-well Platten, welche mit 1 % BSA blockiert waren, durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt:

1)	20 μ l gekoppelte Bead-Suspension
2)	20 μ l Proteinlösung (1-10 ng/ μ l)

Nach 1 h Inkubation erfolgte die Zugabe der Antikörper. Entweder wurde Penta His Alexa Fluor 532 (20 μ l mit bis zu 250 ng) oder ein Primär- und ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper zugegeben. Der Primärantikörper wurde in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, während der Sekundärantikörper (goat anti rabbit Alexa 532) konstant (200 ng) gehalten wurde. Mit jedem Antikörper wurde für 1 h inkubiert. Die Messung erfolgte dann mit dem LiquiChip System.

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4

Reaktionspuffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4, 1 % BSA

5.3.10 Deglykosylierung

Deglykosylierungen erfolgten mit N-Glykosidase F (NEB) bei 37 °C. Experimente unter denaturierenden Bedingungen erfolgten nach Angaben des Herstellers. Native Deglykosylierungen erfolgten standardmäßig in 25 mM HEPES bei pH 8,0. In Abhängigkeit vom Verhältnis von Protein zu Enzym wurden Inkubationszeiten von 1-12 h verwendet.

5.3.11 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Daniel Safer (1998).

5.3.12 CD-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten in 5 mM HEPES pH 7,4 und einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Die Spektren wurden bei 25 °C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Für die Auswertung wurde das Programm CONTIN verwendet.

5.3.13 Cross-Linking

Das Cross-Linking von Proteinen erfolgte in HBS-Puffer in Anwesenheit von 2 mM Calcium. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 40 μ l durchgeführt. Die jeweils benötigte Proteinmenge wurde mit Puffer auf 20 μ l aufgefüllt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Cross-Linkers (Pierce; (Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate)) welcher in HBS-Puffer mit Calcium gelöst wurde. Es wurde für 30 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 0,5 M Tris pH 7,4 abgestoppt wurde.

5.3.14 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung wurde mit dem Gerät DynaPro-801 durchgeführt. Die Proteinprobe mit einer Konzentration von 0,8-9,0 mg/ml wurde vor der Messung durch einen 0,2 μ m Filter filtriert. Es wurden 20-50 Einzelmessungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte monomodal oder bimodal mit Durchschnittsproteinen 24-110 kDa als Standard für die Berechnung der Molmasse aus dem hydrodynamischen Radius mit der Software des Gerätes.

5.3.15 Kristallisation

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in Linbro-Platten durchgeführt. Die Tropfen wurden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additiven sowie Detergenzien gemischt. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht und protokolliert. Die Reservoirs wurden von Hand gemischt. Der pH-Wert der Puffer wurde in den systematischen Screens per pH-Meter in einer 1 M Lösung eingestellt. Die ersten Versuche wurden mit den *sparse matrix screens* durchgeführt. Ausgehend von diesen ersten Untersuchungen wurden systematische Ansätze mit der Variation von einem und/oder zwei Parametern durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Aberdam, M. F. Galliano, J. Vailly, L. Pulkkinen, J. Bonifas, A. M. Christiano, K. Tryggvason, J. Uitto, Jr. Epstein, E. H., and J. P. Ortonne. Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (*lamc2*) for the gamma 2 subunit of nicein/kalinin (laminin-5). *Nat Genet*, 6(3), 1994.
- [2] M. Aumailley, M. Gerl, A. Sonnenberg, R. Deutzmann, and R. Timpl. Identification of the arg-gly-asp sequence in laminin a chain as a latent cell-binding site being exposed in fragment p1. *FEBS Lett*, 262(1), 1990.
- [3] M. Aumailley, R. Timpl, and A. Sonnenberg. Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8. *Exp Cell Res*, 188(1), 1990.
- [4] M. Aumailley, H. Wiedemann, K. Mann, and R. Timpl. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type iv. *Eur J Biochem*, 184(1), 1989.
- [5] D. Aviezer, D. Hecht, M. Safran, M. Eisinger, G. David, and A. Yayon. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*, 79(6), 1994.
- [6] A. Bairoch and R. Apweiler. The swiss-prot protein sequence data bank and its supplement trembl in 1999. *Nucleic Acids Res*, 27(1), 1999.
- [7] D. P. Barlow, N. M. Green, M. Kurkinen, and B. L. Hogan. Sequencing of laminin b chain cdnas reveals c-terminal regions of coiled-coil alpha-helix. *Embo J*, 3(10), 1984.
- [8] K. Beck, T. W. Dixon, J. Engel, and D. A. Parry. Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J Mol Biol*, 231(2), 1993.

- [9] K. Beck, I. Hunter, and J. Engel. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J*, 4(2), 1990.
- [10] A. M. Belkin and M. A. Stepp. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech*, 51(3), 2000.
- [11] R. E. Burgeson, M. Chiquet, R. Deutzmann, P. Ekblom, J. Engel, H. Kleinman, G. R. Martin, G. Meneguzzi, M. Paulsson, J. Sanes, and et al. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol*, 14(3), 1994.
- [12] K. P. Campbell. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, 80(5), 1995.
- [13] S. E. Campbell, J. S. Janicki, and K. T. Weber. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin ii or aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, 27(8), 1995.
- [14] W. G. Carter, P. Kaur, S. G. Gil, P. J. Gahr, and E. A. Wayner. Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (sac) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol*, 111(6 Pt 2), 1990.
- [15] W. G. Carter, M. C. Ryan, and P. J. Gahr. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, 65(4), 1991.
- [16] M. F. Champlaud, G. P. Lunstrum, P. Rousselle, T. Nishiyama, D. R. Keene, and R. E. Burgeson. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*, 132(6), 1996.
- [17] M. Chen, M. P. Marinkovich, J. C. Jones, E. A. O'Toole, Y. Y. Li, and D. T. Woodley. Nc1 domain of type vii collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol*, 112(2), 1999.
- [18] Y. S. Cheng, M. F. Champlaud, R. E. Burgeson, M. P. Marinkovich, and P. D. Yurchenco. Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem*, 272(50), 1997.
- [19] H. Colognato, M. MacCarrick, J. J. O'Rear, and P. D. Yurchenco. The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J Biol Chem*, 272(46), 1997.

- [20] H. Colognato, D. A. Winkelmann, and P. D. Yurchenco. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol*, 145(3), 1999.
- [21] H. Colognato and P. D. Yurchenco. The laminin alpha2 expressed by dystrophic dy(2j) mice is defective in its ability to form polymers. *Curr Biol*, 9(22), 1999.
- [22] H. Colognato and P. D. Yurchenco. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218(2), 2000.
- [23] H. Colognato-Pyke, J. J. O'Rear, Y. Yamada, S. Carbonetto, Y. S. Cheng, and P. D. Yurchenco. Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. *J Biol Chem*, 270(16), 1995.
- [24] R. M. Cooke, A. J. Wilkinson, M. Baron, A. Pastore, M. J. Tappin, I. D. Campbell, H. Gregory, and B. Sheard. The solution structure of human epidermal growth factor. *Nature*, 327(6120), 1987.
- [25] D. Cosgrove, D. T. Meehan, J. A. Grunkemeyer, J. M. Kornak, R. Sayers, W. J. Hunter, and G. C. Samuelson. Collagen col4a3 knockout: a mouse model for autosomal alport syndrome. *Genes Dev*, 10(23), 1996.
- [26] E. C. Coucouvanis, G. R. Martin, and J. H. Nadeau. Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. *Methods Cell Biol*, 46, 1995.
- [27] Safer D. Nondenaturing polyacrylamid gel elektrophoresis as a method for studying protein interactions. *Cell Biology: A laboratory Handbook*, 4, 1998.
- [28] R. Deutzmann, M. Aumailley, H. Wiedemann, W. Pysny, R. Timpl, and D. Edgar. Cell adhesion, spreading and neurite stimulation by laminin fragment e8 depends on maintenance of secondary and tertiary structure in its rod and globular domain. *Eur J Biochem*, 191(2), 1990.
- [29] M. E. Durkin, A. C. Jager, T. S. Khurana, F. C. Nielsen, R. Albrechtsen, and U. M. Wewer. Characterization of the human laminin beta2 chain locus (lamb2): linkage to a gene containing a nonprocessed, transcribed lamb2-like pseudogene (lamb2l) and to the gene encoding glutaminyl trna synthetase (qars). *Cytogenet Cell Genet*, 84(3-4), 1999.

- [30] G. R. Ehring, G. Zampighi, J. Horwitz, D. Bok, and J. E. Hall. Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes. *J Gen Physiol*, 96(3), 1990.
- [31] T. Ehring and G. Heusch. Left ventricular asynchrony: an indicator of regional myocardial dysfunction. *Am Heart J*, 120(5), 1990.
- [32] P. Ekblom, M. Ekblom, L. Fecker, G. Klein, H. Y. Zhang, Y. Kadoya, M. L. Chu, U. Mayer, and R. Timpl. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development*, 120(7), 1994.
- [33] N. Ettner, W. Gohring, T. Sasaki, K. Mann, and R. Timpl. The n-terminal globular domain of the laminin alpha1 chain binds to alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett*, 430(3), 1998.
- [34] R. Fassler and M. Meyer. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev*, 9(15), 1995.
- [35] A. R. Ferre-D'Amare and Burley S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolekular assemblies. *Structure*, 1994.
- [36] K. E. Forsten, N. A. Courant, and M. A. Nugent. Endothelial proteoglycans inhibit bfgf binding and mitogenesis. *J Cell Physiol*, 172(2), 1997.
- [37] S. L. Goodman, M. Aumailley, and H. von der Mark. Multiple cell surface receptors for the short arms of laminin: alpha 1 beta 1 integrin and rgd-dependent proteins mediate cell attachment only to domains iii in murine tumor laminin. *J Cell Biol*, 113(4), 1991.
- [38] M. E. Hemler. Dystroglycan versatility. *Cell*, 97(5), 1999.
- [39] E. Hohenester, P. Maurer, C. Hohenadl, R. Timpl, J. N. Jansonius, and J. Engel. Structure of a novel extracellular ca(2+)-binding module in bm-40. *Nat Struct Biol*, 3(1), 1996.
- [40] E. Hohenester, D. Tisi, J. F. Talts, and R. Timpl. The crystal structure of a laminin g-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell*, 4(5), 1999.

- [41] B. G. Hudson, S. T. Reeders, and K. Tryggvason. Type iv collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. molecular basis of good-pasture and alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem*, 268(35), 1993.
- [42] D. D. Hunter, B. E. Porter, J. W. Bullock, S. P. Adams, J. P. Merlie, and J. R. Sanes. Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein s-laminin. *Cell*, 59(5), 1989.
- [43] D. D. Hunter, V. Shah, J. P. Merlie, and J. R. Sanes. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*, 338(6212), 1989.
- [44] I. Hunter, T. Schulthess, and J. Engel. Laminin chain assembly by triple and double stranded coiled-coil structures. *J Biol Chem*, 267(9), 1992.
- [45] R. O. Hynes. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 1992.
- [46] J. Jancaric and S. H. Kim. *J. Appl. Cryst*, 24, 1991.
- [47] S. J. Joseph, M. D. Ford, C. Barth, S. Portbury, P. F. Bartlett, V. Nurcombe, and U. Greferath. A proteoglycan that activates fibroblast growth factors during early neuronal development is a perlecan variant. *Development*, 122(11), 1996.
- [48] E. Kalb and J. Engel. Binding and calcium-induced aggregation of laminin onto lipid bilayers. *J Biol Chem*, 266(28), 1991.
- [49] P. Kallunki, K. Sainio, R. Eddy, M. Byers, T. Kallunki, H. Sariola, K. Beck, H. Hirvonen, T. B. Shows, and K. Tryggvason. A truncated laminin chain homologous to the b2 chain: structure, spatial expression, and chromosomal assignment. *J Cell Biol*, 119(3), 1992.
- [50] T. Kallunki, J. Ikonen, L. T. Chow, P. Kallunki, and K. Tryggvason. Structure of the human laminin b2 chain gene reveals extensive divergence from the laminin b1 chain gene. *J Biol Chem*, 266(1), 1991.
- [51] R. A. Kammerer, P. Antonsson, T. Schulthess, C. Fauser, and J. Engel. Selective chain recognition in the c-terminal alpha-helical coiled-coil region of laminin. *J Mol Biol*, 250(1), 1995.

- [52] R. A. Kammerer, T. Schulthess, R. Landwehr, B. Schumacher, A. Lustig, P. D. Yurchenco, M. A. Ruegg, J. Engel, and A. J. Denzer. Interaction of agrin with laminin requires a coiled-coil conformation of the agrin-binding site within the laminin gamma1 chain. *Embo J*, 18(23), 1999.
- [53] C. E. Kashtan and A. F. Michael. Alport syndrome: from bedside to genome to bedside. *Am J Kidney Dis*, 22(5), 1993.
- [54] C. M. Klass, J. R. Couchman, and A. Woods. Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci*, 113 (Pt 3), 2000.
- [55] M. Koch, J. R. Murrell, D. D. Hunter, P. F. Olson, W. Jin, D. R. Keene, W. J. Brunken, and R. E. Burgeson. A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol*, 151(2), 2000.
- [56] M. Koch, P. F. Olson, A. Albus, W. Jin, D. D. Hunter, W. J. Brunken, R. E. Burgeson, and M. F. Champlaud. Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol*, 145(3), 1999.
- [57] E. Kohfeldt, P. Maurer, C. Vannahme, and R. Timpl. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett*, 414(3), 1997.
- [58] R. H. Kramer, M. P. Vu, Y. F. Cheng, D. M. Ramos, R. Timpl, and N. Waleh. Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regul*, 2(10), 1991.
- [59] L. R. Languino, K. R. Gehlsen, E. Wayner, W. G. Carter, E. Engvall, and E. Ruoslahti. Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol*, 109(5), 1989.
- [60] A. Leinonen, M. Mariyama, T. Mochizuki, K. Tryggvason, and S. T. Reeders. Complete primary structure of the human type iv collagen alpha 4(iv) chain. comparison with structure and expression of the other alpha (iv) chains. *J Biol Chem*, 269(42), 1994.
- [61] S. Li, D. Harrison, S. Carbonetto, R. Fassler, N. Smyth, D. Edgar, and P. D. Yurchenco. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*, 157(7), 2002.

- [62] R. T. Libby, M. F. Champliand, T. Claudepierre, Y. Xu, E. P. Gibbons, M. Koch, R. E. Burgeson, D. D. Hunter, and W. J. Brunken. Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel cns laminins. *J Neurosci*, 20(17), 2000.
- [63] W. Lu, C. L. Phillips, P. D. Killen, T. Hlaing, W. R. Harrison, F. F. Elder, J. H. Miner, P. A. Overbeek, and M. H. Meisler. Insertional mutation of the collagen genes col4a3 and col4a4 in a mouse model of alport syndrome. *Genomics*, 61(2), 1999.
- [64] M. P. Marinkovich, G. P. Lunstrum, D. R. Keene, and R. E. Burgeson. The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol*, 119(3), 1992.
- [65] M. Mariyama, A. Leinonen, T. Mochizuki, K. Tryggvason, and S. T. Reeders. Complete primary structure of the human alpha 3(iv) collagen chain. coexpression of the alpha 3(iv) and alpha 4(iv) collagen chains in human tissues. *J Biol Chem*, 269(37), 1994.
- [66] P. T. Martin, A. J. Ettinger, and J. R. Sanes. A synaptic localization domain in the synaptic cleft protein laminin beta 2 (s-laminin). *Science*, 269(5222), 1995.
- [67] P. maurer and J. Engel. Structure of laminins and their chain assembly. *The Laminins, harwood Academic publishers*, 2, 1996.
- [68] J. A. McGrath, S. Kivirikko, S. Ciatti, C. Moss, A. M. Christiano, and J. Uitto. A recurrent homozygous nonsense mutation within the lama3 gene as a cause of herlitz junctional epidermolysis bullosa in patients of pakistani ancestry: evidence for a founder effect. *J Invest Dermatol*, 106(4), 1996.
- [69] J. H. Miner, R. M. Lewis, and J. R. Sanes. Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol Chem*, 270(48), 1995.
- [70] J. H. Miner, B. L. Patton, S. I. Lentz, D. J. Gilbert, W. D. Snider, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and J. R. Sanes. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol*, 137(3), 1997.

- [71] J. H. Miner and J. R. Sanes. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(iv): implications for alport syndrome. *J Cell Biol*, 135(5), 1996.
- [72] G. T. Montelione, K. Wuthrich, E. C. Nice, A. W. Burgess, and H. A. Scheraga. Solution structure of murine epidermal growth factor: determination of the polypeptide backbone chain-fold by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 1987.
- [73] P. Murray and D. Edgar. Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J Cell Biol*, 150(5), 2000.
- [74] M. Murshed, N. Smyth, N. Miosge, J. Karolat, T. Krieg, M. Paulsson, and R. Nischt. The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol*, 20(18), 2000.
- [75] T. Nagayoshi, M. G. Mattei, E. Passage, R. Knowlton, M. L. Chu, and J. Uitto. Human laminin a chain (lama) gene: chromosomal mapping to locus 18p11.3. *Genomics*, 5(4), 1989.
- [76] P. G. Noakes, J. H. Miner, M. Gautam, J. M. Cunningham, J. R. Sanes, and J. P. Merlie. The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet*, 10(4), 1995.
- [77] U. Odenthal. *Diplomarbeit, Universität zu Köln, Vereinfachte Aufreinigung von sekretorischen Proteinen aus eukaryontischen Zellen*, 1998.
- [78] M. Paulsson. The role of ca^{2+} binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes. *J Biol Chem*, 263(11), 1988.
- [79] M. Paulsson, M. Aumailley, R. Deutzmann, R. Timpl, K. Beck, and J. Engel. Laminin-nidogen complex. extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem*, 166(1), 1987.
- [80] M. Paulsson, R. Deutzmann, R. Timpl, D. Dalzoppo, E. Odermatt, and J. Engel. Evidence for coiled-coil alpha-helical regions in the long arm of laminin. *Embo J*, 4(2), 1985.
- [81] M. Paulsson, K. Saladin, and R. Landwehr. Binding of ca^{2+} influences susceptibility of laminin to proteolytic digestion and interactions between domain-specific laminin fragments. *Eur J Biochem*, 177(3), 1988.

- [82] M. Pfaff, W. Gohring, J. C. Brown, and R. Timpl. Binding of purified collagen receptors (alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1) and rgd-dependent integrins to laminins and laminin fragments. *Eur J Biochem*, 225(3), 1994.
- [83] E. Poschl, U. Mayer, J. Stetefeld, R. Baumgartner, T. A. Holak, R. Huber, and R. Timpl. Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin gamma1 chain. *Embo J*, 15(19), 1996.
- [84] L. Pulkkinen, D. R. Gerecke, A. M. Christiano, D. W. Wagman, R. E. Burgeson, and J. Uitto. Cloning of the beta 3 chain gene (lamb3) of human laminin 5, a candidate gene in junctional epidermolysis bullosa. *Genomics*, 25(1), 1995.
- [85] D. Reinhardt, K. Mann, R. Nischt, J. W. Fox, M. L. Chu, T. Krieg, and R. Timpl. Mapping of nidogen binding sites for collagen type iv, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *J Biol Chem*, 268(15), 1993.
- [86] A. J. Richards, L. al Imara, N. P. Carter, J. C. Lloyd, M. A. Leversha, and F. M. Pope. Localization of the gene (lama4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin alpha chain. *Genomics*, 22(1), 1994.
- [87] P. Rousselle and M. Aumailley. Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol*, 125(1), 1994.
- [88] P. Rousselle, G. P. Lunstrum, D. R. Keene, and R. E. Burgeson. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol*, 114(3), 1991.
- [89] M. C. Ryan, A. M. Christiano, E. Engvall, U. M. Wewer, J. H. Miner, J. R. Sanes, and R. E. Burgeson. The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol*, 15(6), 1996.
- [90] M. C. Ryan, R. Tizard, D. R. VanDevanter, and W. G. Carter. Cloning of the lama3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. expression in wound repair. *J Biol Chem*, 269(36), 1994.
- [91] J. R. Sanes, D. D. Hunter, T. L. Green, and J. P. Merlie. S-laminin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 1990.

- [92] J. C. Schittny and C. M. Schittny. Role of the b1 short arm in laminin self-assembly. *Eur J Biochem*, 216(2), 1993.
- [93] J. Schymeinsky, S. Nedbal, N. Miosge, E. Poschl, C. Rao, D. R. Beier, W. C. Skarnes, R. Timpl, and B. L. Bader. Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol Cell Biol*, 22(19), 2002.
- [94] T. Serafini, T. E. Kennedy, M. J. Galko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, and M. Tessier-Lavigne. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *c. elegans* unc-6. *Cell*, 78(3), 1994.
- [95] N. Smyth, U. Odenthal, B. Merkl, and M. Paulsson. Eukaryotic expression and purification of recombinant extracellular matrix proteins carrying the strep ii tag. *Methods Mol Biol*, 139, 2000.
- [96] N. Smyth, H. S. Vatansever, P. Murray, M. Meyer, C. Frie, M. Paulsson, and D. Edgar. Absence of basement membranes after targeting the *lamc1* gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol*, 144(1), 1999.
- [97] R. Soininen, M. Huotari, S. L. Hostikka, D. J. Prockop, and K. Tryggvason. The structural genes for alpha 1 and alpha 2 chains of human type iv collagen are divergently encoded on opposite dna strands and have an overlapping promoter region. *J Biol Chem*, 263(33), 1988.
- [98] A. Sonnenberg, C. J. Linders, P. W. Modderman, C. H. Damsky, M. Aumailley, and R. Timpl. Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (p1, e3, e8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment e8. *J Cell Biol*, 110(6), 1990.
- [99] J. Stetefeld, U. Mayer, R. Timpl, and R. Huber. Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (le) modules of laminin gamma1 chain harboring the nidogen binding site. *J Mol Biol*, 257(3), 1996.
- [100] Y. Sunada, T. S. Edgar, B. P. Lotz, R. S. Rust, and K. P. Campbell. Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology*, 45(11), 1995.

- [101] R. Timpl, H. Rohde, P. G. Robey, S. I. Rennard, J. M. Foidart, and G. R. Martin. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254(19), 1979.
- [102] R. Timpl, H. Wiedemann, V. van Delden, H. Furthmayr, and K. Kuhn. A network model for the organization of type iv collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*, 120(2), 1981.
- [103] D. Tisi, J. F. Talts, R. Timpl, and E. Hohenester. Structure of the c-terminal laminin g-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin. *Embo J*, 19(7), 2000.
- [104] R. L. Trelstad, K. Hayashi, and B. P. Toole. Epithelial collagens and glycosaminoglycans in the embryonic cornea. macromolecular order and morphogenesis in the basement membrane. *J Cell Biol*, 62(3), 1974.
- [105] P. Tunggal, N. Smyth, M. Paulsson, and M. C. Ott. Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech*, 51(3), 2000.
- [106] S. Voss and A. Skerra. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the strep-tag ii peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, 10(8), 1997.
- [107] R. Vracko. Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol*, 77(2), 1974.
- [108] R. Vuolteenaho, L. T. Chow, and K. Tryggvason. Structure of the human laminin b1 chain gene. *J Biol Chem*, 265(26), 1990.
- [109] R. Vuolteenaho, M. Nissinen, K. Sainio, M. Byers, R. Eddy, H. Hirvonen, T. B. Shows, H. Sariola, E. Engvall, and K. Tryggvason. Human laminin m chain (merosin): complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the m and a chain in human fetal tissues. *J Cell Biol*, 124(3), 1994.
- [110] A. Walz, S. McFarlane, Y. G. Brickman, V. Nurcombe, P. F. Bartlett, and C. E. Holt. Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. *Development*, 124(12), 1997.
- [111] M. Willem, N. Miosge, W. Halfter, N. Smyth, I. Jannetti, E. Burghart, R. Timpl, and U. Mayer. Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development*, 129(11), 2002.

- [112] R. A. Williamson, M. D. Henry, K. J. Daniels, R. F. Hrstka, J. C. Lee, Y. Sunada, O. Ibraghimov-Beskrovnaya, and K. P. Campbell. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of reichert's membrane in dag1-null mice. *Hum Mol Genet*, 6(6), 1997.
- [113] H. Xu, X. R. Wu, U. M. Wewer, and E. Engvall. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (lama2) gene. *Nat Genet*, 8(3), 1994.
- [114] Y. Yin, J. H. Miner, and J. R. Sanes. Laminets: laminin- and netrin-related genes expressed in distinct neuronal subsets. *Mol Cell Neurosci*, 19(3), 2002.
- [115] P. D. Yurchenco and Y. S. Cheng. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. a three-arm interaction model. *J Biol Chem*, 268(23), 1993.
- [116] P. D. Yurchenco, Y. S. Cheng, and H. Colognato. Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol*, 117(5), 1992.
- [117] P. D. Yurchenco, Y. Quan, H. Colognato, T. Mathus, D. Harrison, Y. Yamada, and J. J. O'Rear. The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 1997.
- [118] P. D. Yurchenco and G. C. Ruben. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type iv collagen network. *J Cell Biol*, 105(6 Pt 1), 1987.
- [119] P. D. Yurchenco, E. C. Tsilibary, A. S. Charonis, and H. Furthmayr. Laminin polymerization in vitro. evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem*, 260(12), 1985.
- [120] X. Zhang, R. Vuolteenaho, and K. Tryggvason. Structure of the human laminin alpha2-chain gene (lama2), which is affected in congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem*, 271(44), 1996.
- [121] J. Zhou, A. Leinonen, and K. Tryggvason. Structure of the human type iv collagen col4a5 gene. *J Biol Chem*, 269(9), 1994.

Anhang A

Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption (Extinktion)
Abb.	Abbildung
BM	Basalmembran
BS ³	(Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate)
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementär DNA
CM	Carboxymethyl
EADC	N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide
EBNA	Epstein Barr Nuclear Antigen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbrecht-Holm-Swarm
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
DEAE	Diethylaminoethyl
DLS	Dynamische Lichtstreuung
h	Stunden
HBS	HEPES Buffered Saline
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA

NHS	N-hydroxysuccinimide
kDa	Kilodalton
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	Resonse Units
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance
TCA	Trichloressigsäure
Tab.	Tabelle
TOF	Time Of Fflight
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

A.2 Primer

Primer	Sequenz
lma1_rev	5'-GCAGAAGCACTCGGAGC-3'
lma2_rev	5'-CATCTGTTTGATACTCC-3'
lma5_rev	5'-GTCACAGAGGCTGTTGG-3'
lmb1_rev	5'-CAAGGTCACAGTCACAAGG-3'
lmb2_rev	5'-CACACTGAGGATCCAAGG-3'
lmb3_rev	5'-CGACAAGGACACTGTCC-3'
lmg1_rev	5'-CACTGTAGCCAACAGA-3'
lmg3_rev	5'-GCTTGCAGGGACAGACG-3'

Primer	Sequenz
lma1_VI-5'	5'-AATTACTAGTTCAGCAGAGAGGCTTGTTC-3'
lma2_VI-5'	5'-TTAAACTAGTTTCCCAGACTCAGCGG-3'
lma5_VI-5'	5'-TTAAACTAGTTCGCACTCCCGGGGGCGATGG-3'
lmb1_VI-5'	5'-AATTACTAGTTCAGGAACCGGAGTTCAGCTATGG-3'
lmb2_VI-5'	5'-TTAAACTAGTTCAGGCCCCCGTCCTTGG-3'
lmb3_VI-5'	5'-TTAAACTAGTTCAGCAAGCCTGCTCCCGAGG-3'
lmg1_VI-5'	5'-AATTACTAGTTGCCATGGACGAGTGC-3'
lmg3_VI-5'	5'-AAAGCTAGCTGCGGACATGGGCTCTTGC-3'
lma1_EGF2-3'	5'-AATTGCGGCCGCGGGACGGCAAGGGTG-3'
lma2_EGF4-3'	5'-TTAAGCGGCCGCCTCCTCACAGCCTTTC-3'
lma5_EGF4-3'	5'-TTAAGCGGCCGCTGGGTGGCAGCTAGGC-3'
lmb1_EGF1-3'	5'-AATTGCGGCCGCTTTTTTGCAGGCGTTGCTG-3'
lmb1_EGF2-3'	5'-AATTGCGGCCGCTGGTTCACAGAGATTGGG-3'
lmb1_EGF4-3'(stop)	5'-AATTGCGGCCGC(TCA)AGGTTCGACACCCATCC-3'
lmb2_EGF4-3'	5'-TTAAGCGGCCGCGGGACGGCAGCCCAGC-3'
lmb3_EGF1-3'(stop)	5'-TTAAGCGGCCGC(TCA)CCTTTGGCACTCGTGG-3'
lmb3_EGF2-3'(stop)	5'-TTAAGCGGCCGC(TCA)GGGAATACAAGTCTCATG-3'
lmb3_EGF4-3'	5'-TTAAGCGGCCGCGGGCTCGCAGCCCAGGCC-3'
lmg1_EGF2-3'	5'-AATTCTCGAGTTACGGAGAGCAGGCTTCAG-3'
lmg1_EGF4-3'	5'-AATTCTCGAGTTAGGGTGTGCAGCCCTTAGG-3'
lmg3_EGF2-3'	5'-AAAGCGGCCGCTTGGCATGGTGTCTTCGG-3'
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SeqU	5'-TAGTGAACCGTCAGATCT-3'
Rev2	5'-CTGGATCCGGCCTTGCC-3'

A.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für das interessante Thema, ein hervorragendes Arbeitsumfeld und seinen Rat und Tat mit dem er immer helfend zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Schomburg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Coreferats.

Herrn Dr. N. Smyth gilt mein Dank für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, seine stete Bereitschaft zur Diskussion und vor allen für alles was er mir beigebracht hat.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für Hilfestellungen bei Kristallisationsversuchen.

Annette danke ich herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern unserer Instituts sowie meinen ehemaligen Kollegen. Insbesondere möchte ich erwähnen Barbara, Frau Peltzer, Christian, Patrick, Judith, Anju, Kerstin, Annette, Susan, Petra und Brigitte.

Danken möchte ich auch Dr. R. Wagener, Dr. M. Plomann, Dr. P. Maurer, Dr. U. Hartmann, Dr. F. Zauke und Prof. Dr. M. Aumailley für die kompetente Vermittlung ihres großen Wissensschatzes.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei meiner Klassenlehrerin Frau Jaensch-Steffens für ihre Unterstützung.

Letztlich gilt mein größter Dank meiner Familie und meinen Freunden. Ich danke meinen Eltern, Michaela, Tante Ulrike und meinem besten Freund Tekin für ihre ständige Unterstützung und Hilfe.

A.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Uwe Odenthal
Am Alten Brauhaus 6, 50769 Köln
geboren am 27.03.1974 in Köln
ledig
evangelisch

Schulbildung

1980 - 1984 Peter-Petersen Grundschule in Köln-Höhenhaus
1984 - 1993 Hansa-Gymnasium in Köln

Hochschulbildung

Diplomstudium im Fach Chemie an der Universität zu Köln
01.10.1993 - 16.02.1996 Grundstudium
16.02.1996 - 16.02.1998 Hauptstudium
16.02.1998 - 16.11.1998 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: Vereinfachte Aufreinigung von sekretorischen Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Auslandspraktikum

18.11.1998 - 18.12.1998 DAAD finanziertes Praktikum im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Patricia Rousselle am Institut de Biologie et Chimie des Proteines in Lyon

Doktorarbeit

01.01.1999 - dato Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Fach Physiologische Chemie am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. Mats Paulsson

A.5 Erklärung

“Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat, daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.”