

# **Rekombinante Analyse der N-terminalen Region von Laminin $\alpha$ -Ketten**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von  
**Dipl.-Biochem. Jörg Garbe**  
geb. am 30. August 1966 in Göttingen

Martinsried 2001

Referent: Prof. Dr. W. Müller  
Koreferent: Prof. Dr. B. Otto  
Tag der Promotion: 14. Dezember 2001

Die vorliegende Dissertation wurde von November 1998 bis Oktober 2001 in der Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried unter Anleitung von Herrn Dr. Rupert Timpl angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Garbe, J.H.O., Göhring, W., Mann, K., Timpl, R. & Sasaki, T. (2002) Complete sequence, recombinant analysis and binding to laminins and sulfated ligands of the N-terminal domains of laminin  $\alpha$ 3B and  $\alpha$ 5 chains. *Biochem J* 362, 213-221.

## ***Kurzfassung***

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung von LN-Modulen der Laminin  $\alpha$ -Ketten bezüglich ihrer Bindungseigenschaften und ihrer Fähigkeit, die Polymerisation von Lamininen zu vermitteln. Die N-terminalen Sequenzen der murinen Laminin-Ketten  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  sowie ihrer Signalpeptide wurden durch RT-PCR vervollständigt. Diese Information wurde für die Darstellung stabiler rekombinanter Fragmente der N-terminalen Domänen VI/V von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  benutzt. Die Fragmente VI/V beinhalten das LN-Modul (Domäne VI) sowie stabilisierende LE-Module der Domäne V. Durch umfassende Bindungsstudien konnte die Fähigkeit zur Polymerisation aller nicht-verkürzten Laminin  $\alpha$ -Ketten bestätigt werden. Damit wurde deren Teilnahme an der Ausbildung extrazellulärer Strukturen gezeigt und die Grundlage für weiterführende Untersuchungen geschaffen. Das LN-Modul wurde als maßgeblicher Vermittler der Selbstaggregation identifiziert, welche zur Bildung quasi-hexagonaler Strukturen führt und durch sulfatierte Moleküle beeinflusst wird. Eine eingehende Analyse der Interaktion mit den potentiellen Modulatoren der Aggregation Heparin, Heparansulfat und Sulfatid konnte durch die Kartierung der korrespondierenden Bindungs epitope auf Laminin  $\alpha 1VI/V$  vervollständigt werden. Die Bindungspartner zeigen die wichtige Rolle des LN-Moduls in der Regulation der extrazellulären Architektur und der Zell-Kommunikation auf. In biophysikalisch-chemischen Untersuchungen wurden ferner die molekularen Eigenschaften der Fragmente analysiert. Zur Röntgenstrukturanalyse wurde Laminin  $\alpha 1VI/V$  kristallisiert. Die Kristalle lieferten einen hochaufgelösten Datensatzes, die Lösung des Phasenproblems und der Struktur ist noch nicht abgeschlossen. Durch die Herstellung polyklonaler Antiseren gegen die Fragmente waren immunologische Studien zur Verteilung der  $\alpha 3B$ - und  $\alpha 5$ -Ketten in verschiedenen Geweben möglich. Erstmals konnte ein Antikörper hergestellt werden, der nur gegen Laminin  $\alpha 3B$  gerichtet ist und eine Differenzierung der  $\alpha 3$ -Isoformen erlaubt.

*Schlüsselwörter:* rekombinante Laminin  $\alpha$ -Ketten · Selbstaggregation & Heparinbindung · Immunhistologie

***Abstract***

The aim of this thesis was the analysis of LN modules of laminin  $\alpha$  chains with regard to their binding properties and their potential to mediate the polymerisation of laminins. The N-terminal sequences of murine laminin  $\alpha$ 3B and  $\alpha$ 5 chains and their signal peptides have been completed. This information was used to produce stable recombinant fragments of the N-terminal domains VI/V of laminin  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3B and  $\alpha$ 5. The fragments VI/V comprised the LN module (domain VI) and stabilising LE modules of domain V. The ability of all non-shortened laminin  $\alpha$  chains to polymerize was confirmed by extensive binding analyses, indicating their participation in the formation of complex extracellular structures. The LN module was shown to be the main mediator of self-assembly, which leads to the formation of quasi-hexagonal structures and is affected by sulfated molecules. A detailed analysis of interactions with the potential modulators of self-assembly heparin, heparansulfate and sulfatide was carried out and the corresponding binding epitopes in laminin  $\alpha$ 1VI/V were identified. The nature of the binding partners reveals the prominent role of the LN module in regulation of the extracellular architecture and cell communication. The molecular properties of the fragments were analysed by biophysical-chemical studies. Laminin  $\alpha$ 1VI/V was crystallized and the collection of a high resolution data set was achieved. The phasing and the structure were not yet solved. The production of polyclonal antibodies against the fragments VI/V facilitated immunohistological analyses of the distribution of  $\alpha$ 3B and  $\alpha$ 5 chains in various tissues. For the first time antibodies against laminin  $\alpha$ 3B could be raised, which makes it possible to differentiate between  $\alpha$ 3 isoforms.

*Key words:* recombinant laminin  $\alpha$  chains · self-assembly & heparin binding · immunohistology

**Abkürzungen**

A	Adenin
AA	Aminosäure(n)
B	Base(n)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BES	<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Bis-Tris	Bis-(2-Hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan
BM	Basalmembran(en)
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CBB	Coomassie Brilliant Blau
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CS	Chondroitinsulfat
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatansulfat
EBNA	nukleares Epstein-Barr-Antigen
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	Enzymimmun-Test
EM	Elektronenmikroskopie
FKS	fötale Kälberserum
FPLC	Mitteldruck-Flüssigchromatographie
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin G 418
GAG	Glykosaminoglykan(e)
GalN	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GlkA	D-Glukuronsäure
GlkN	<i>N</i> -Acetylglukosamin
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	demineralisiertes steriles Wasser
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
I.E.	internationale Einheiten
IdoA	L-Iduronsäure
k	kilo
$k_{\text{ass}}$	kinetische Assoziationskonstante
k.B.	keine Bindung

$K_d$	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
$k_{diss}$	kinetische Dissoziationskonstante
KS	Keratansulfat
l	Liter
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
LE	EGF-ähnliches Modul in Laminin
Ln	Laminin
LN	N-terminales Modul in Laminin
LPLC	Niederdruck-Flüssigchromatographie
m	milli
M	molar
$\mu$	mikro
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOPS	$\gamma$ -Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
NP40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
OPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese(n)
PCR	Polymerasekettenreaktion(en)
pH	$-\log[H^+]$
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PET	PBS/EDTA/Trypsin
PG	Proteoglykan(e)
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response units</i>
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SLRP	kleine Leucin-reiche Proteoglykane
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TN	TBS/ NaCl
TNT	TBS/ NaCl/ Tween 20
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	Einheit(en)
Ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Basalmembran und ihre Hauptkomponenten</b>	<b>1</b>
1.1.1 Kollagene	3
1.1.2 Nidogene	4
1.1.3 Laminine	4
1.1.3.1 Polymerisation und Bindungsaktivitäten der Laminine	7
1.1.3.2 Laminine in Entwicklung, Morphologie und Pathogenese	9
1.1.3.3 Laminin $\alpha$ -Ketten	11
<b>1.2 Potentielle Bindungspartner der N-terminalen Region der Laminine</b>	<b>14</b>
1.2.1 Glykosaminoglykane	14
1.2.1.1 Heparin und Heparansulfat	14
1.2.2 Proteoglykane	15
1.2.2.1 Perlecan	15
1.2.3 Moleküle der Zelloberfläche	16
1.2.3.1 Integrine	16
1.2.3.2 $\alpha$ -Dystroglykan	17
1.2.3.3 Sulfatid	17
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2 Material &amp; Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>19</b>
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Radiochemikalien	19
2.1.3 Geräte	19
2.1.4 Standard-Puffer	20
2.1.5 Nährmedien	21
2.1.6 Nährböden	21
2.1.7 Bakterienstämme	21
2.1.8 Zelllinien	22
2.1.9 Enzyme	22
2.1.10 Vektoren	22
2.1.11 Proteine & Liganden	22
2.1.12 Antikörper	23



<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.1.1 Standard-Methode	24
2.2.1.2 RT-PCR zur Vervollständigung von cDNA-Enden	24
2.2.1.3 PCR-Mutagenese	25
2.2.1.4 Oligonukleotide	25
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	26
2.2.4 Schneiden mit Restriktionsendonukleasen	26
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.6 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	27
2.2.7 Transformation in kompetente Zellen	27
2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA	27
2.2.8.1 Mini-Präparation	28
2.2.8.2 Maxi-Präparation	28
2.2.9 Phenol-Chloroform-Extraktion	29
2.2.10 DNA-Fällung	29
2.2.11 DNA-Sequenzierung	29
2.2.12 <sup>32</sup> P-Markierung von cDNA	30
2.2.13 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	30
2.2.14 Northern-Analyse	30
<b>2.3 Proteinchemische Methoden</b>	<b>32</b>
2.3.1 Ultrafiltration von Protein	32
2.3.2 Chromatographische Verfahren	32
2.3.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie	32
2.3.2.2 Präparative Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose	32
2.3.2.3 Gelfiltration	33
2.3.2.4 Umkehrphasen-HPLC	33
2.3.3 Präzipitation von Protein	33
2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.3.5 Aminosäure- und Hexosamin-Analyse	34
2.3.6 Chemische Modifikationen	34
2.3.7 Proteolytische Degradation	35
2.3.8 N-Deglykosylierung	35
2.3.9 Abspaltung N-terminaler Pyroglutamyreste	35
2.3.10 N-terminale Sequenzierung nach Edman-Abbau	36
2.3.11 <sup>125</sup> I-Markierung von Proteinen	36
2.3.12 Elektronenmikroskopie nach Kegelbedampfung	36
2.3.13 CD-Spektroskopie	37
2.3.14 Analytische Affinitätschromatographie	37
2.3.15 Ligandenbindungstest	37
2.3.16 Inhibition der Lamininpolymerisation	38
2.3.17 Oberflächen-Plasmonresonanz	39
2.3.18 Kristallisation von Protein	39
<b>2.4 Immunologische Methoden</b>	<b>40</b>
2.4.1 Herstellung und Reinigung polyklonaler Antisera	40
2.4.2 Immunmarkierung nach Western-Transfer	40
2.4.3 ELISA-Farbreaktion	41
2.4.4 ELISA-Titration zur Bestimmung von Antikörpertitern	41
2.4.5 Radioimmuntest	41
2.4.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	42
<b>2.5 Zellkultur-Methoden</b>	<b>43</b>
2.5.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	43
2.5.2 Transfektion von Zellen	43
2.5.3 Herstellung konditionierten Mediums	43
2.5.4 Lagerung von Zellen	43

---

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Rekombinante Analyse der N-terminalen Regionen muriner Laminin <math>\alpha</math>-Ketten</b>	<b>44</b>
3.1.1 Sequenzen: Herkunft und Komplettierung	44
3.1.2 Laminin-Fragmente VI/V: Rekombinante Produktion und Darstellung	47
3.1.2.1 Expressionsstudie zur Bestimmung der Mindestanzahl stabilisierender LE-Module	47
3.1.2.2 Herstellung der Expressionskonstrukte	50
3.1.2.3 Transfektion und Expression	51
3.1.2.4 Reinigung	52
3.1.2.5 Identifizierung durch N-terminale Sequenzierung	54
<b>3.2 Strukturelle Charakterisierung der Fragmente VI/V</b>	<b>54</b>
3.2.1 Vergleich von wichtigen Struktureigenschaften	54
3.2.1.1 Elektrophoretische Mobilität	54
3.2.1.2 Sekundärstruktur	56
3.2.1.3 Elektronenmikroskopische Struktur	57
3.2.2 Kristallographische Untersuchung von Laminin $\alpha$ 1VI/V	58
3.2.3 Modifizierung durch Oligosaccharide	58
3.2.4 Proteasestabilität	59
3.2.5 Herstellung der Domäne V durch Pepsinabbau	63
3.2.6 Charakterisierung des LN-Moduls von Laminin $\alpha$ 1 durch Sequenzanalyse von Pepsin-Fragmenten	64
<b>3.3 Bindungseigenschaften der Fragmente VI/V</b>	<b>67</b>
3.3.1 Bindung an Heparin	67
3.3.2 Bindung an Sulfatid und Heparansulfat	69
3.3.3 Bindung an Laminin & Inhibition der Polymerisation	70
3.3.4 Übersicht der Bindungsaktivitäten	73
3.3.5 Modulare Lokalisierung gefundener Interaktionen	74
3.3.6 Kartierung von Bindungsstellen auf Laminin $\alpha$ 1VI/V	74
3.3.6.1 Chemische Modifikationen	75
3.3.6.1.1 Lysin-Modifikation	75
3.3.6.1.2 Arginin-Modifikation	75
3.3.6.2 Mutationsstudie zur Lokalisierung der Bindungsstellen	77
<b>3.4 Immunologische Untersuchungen</b>	<b>82</b>
3.4.1 Herstellung und Charakterisierung von Antisera	82
3.4.2 Lokalisierung der Laminin-Ketten $\alpha$ 3B und $\alpha$ 5 in Geweben	83
<b>4 Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Molekulare Eigenschaften der N-terminalen Regionen muriner Laminin <math>\alpha</math>-Ketten</b>	<b>87</b>
<b>4.2 Nicht-verkürzte Laminin <math>\alpha</math>-Ketten können aggregieren</b>	<b>90</b>
<b>4.3 Die Interaktion mit Modulatoren der Polymerisation</b>	<b>92</b>
<b>4.4 Die beteiligten Bindungsepitope</b>	<b>94</b>
<b>4.5 Gewebeverteilung der Laminin-Ketten <math>\alpha</math>3B und <math>\alpha</math>5</b>	<b>96</b>
<b>4.6 Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>

## ***1 Einleitung***

### **1.1 Die Basalmembran und ihre Hauptkomponenten**

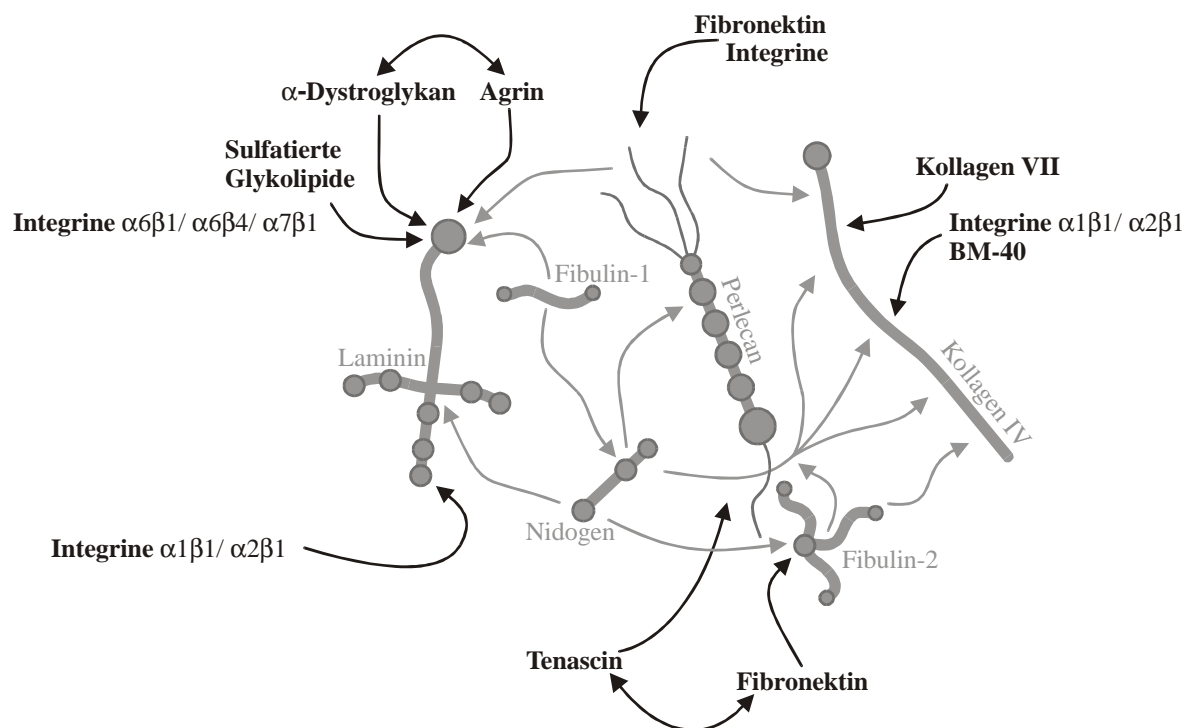
Die Rolle der extrazellulären Matrix (ECM) beschränkt sich nicht nur auf ihre Gerüst- und Stützfunktion für viele Gewebe, z.B. Haut, Endothelien, Knorpel und Sehnen. Durch die hohe Verschiedenartigkeit ihrer Zusammensetzung bringt sie dabei Strukturen von Kornea bis Knochen hervor.

Die ECM steuert zudem wichtige zellbiologische Prozesse, die durch Interaktionen mit ihrer Umgebung erzeugt werden. Für die spezifischen Wechselwirkungen zwischen der ECM und Zellen sind (Oberflächen-) Rezeptoren, wie Integrine,  $\alpha$ -Dystroglykan oder membranständige Proteoglykane, verantwortlich. Durch das Zusammenwirken mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen werden Zelladhäsion, Proliferation, Wanderung und Teilung von Zellen sowie ihre Differenzierung beeinflusst. Zudem werden Gewebsentwicklung und -reparatur sowie Apoptose durch Komponenten der ECM kontrolliert. Während der Embryogenese wird die Ausprägung der ECM entscheidend von Proteinasen und ihren Inhibitoren mitbestimmt, die je nach Gewebetyp wachsende Matrices modulieren. So entstehen durch das Zusammenspiel vieler komplexer (Selbstaggregations-) Prozesse aus einer Vielzahl extrazellulärer Moleküle hochspezifische Strukturen, die direkt oder indirekt in die Kontrolle der biologischen Aktivität eingreifen.

Die Basalmembran (BM) ist eine hochspezialisierte Ausprägung der ECM. In annähernd allen Organen bildet sie das Substrat für die Anheftung von Epithel- und Mesenchymzellen. Die 50 bis 100 nm dicke Basalmembran wirkt als selektiv-permeable Barriere und grenzt Gewebe voneinander ab. Ihre Komponenten sind wichtige Regulatoren biologischer Aktivität. Schon in der frühen Embryogenese wird der Phänotyp der Zellen beeinflusst und deren Gestalt, Migrations-, Proliferationsverhalten sowie Genexpression und Reparatur bzw. Apoptose kontrolliert (Aumailley & Krieg, 1996; Timpl, 1996b; Aumailley & Gayraud, 1998; Colognato & Yurchenco, 2000; Tumova *et al.*, 2000).

Besonders gut untersuchte Beispiele der BM sind die epidermal-dermale Verbindungszone, die Auskleidung von Blutgefäßen sowie die Filtermembran der Nierenglomeruli. Basalmembranen umgeben zudem neuronale und muskuläre Zellen.

Die Basalmembran wird im Wesentlichen aufgebaut durch die Netzwerke von Laminin und Kollagen IV sowie Nidogen-1, welches beide verbindet. Das Kollagen IV-Netz zeichnet sich durch seine Stabilität und Zugfestigkeit aus. Die hohe Quervernetzung wird durch Disulfidverbrückung und Lysinderivate erreicht. Das Laminin-Netzwerk basiert auf nicht-kovalenten Interaktionen und ist dadurch flexibel für schnelle Anpassung, z.B. Akkommodation des Lumens von Blutkapillaren sowie Rekonstruktion innerhalb Wachstums- oder Remodellierungsprozessen. Durch Einlagerung weiterer Komponenten, wie Perlecan, Agrin, Tenascin, Fibronectin und das Basalmembranprotein BM-40, entstehen Strukturen unterschiedlichster Beschaffenheit und Funktion.



**Abb. 1: Übersicht der molekularen Interaktionen**, die zur Ausbildung der supramolekularen Struktur und zur Kommunikation der Basalmembran beitragen. Die strukturelle Basis wird durch die Netzwerke von Laminin und Kollagen IV gebildet. Nidogen fungiert als zentraler Anker, der die Strukturkomponenten (grau) miteinander vernetzt. Moleküle, die an Kommunikation oder Zellverankerung teilnehmen, sind schwarz dargestellt. Modifiziert nach Timpl & Brown (1996).

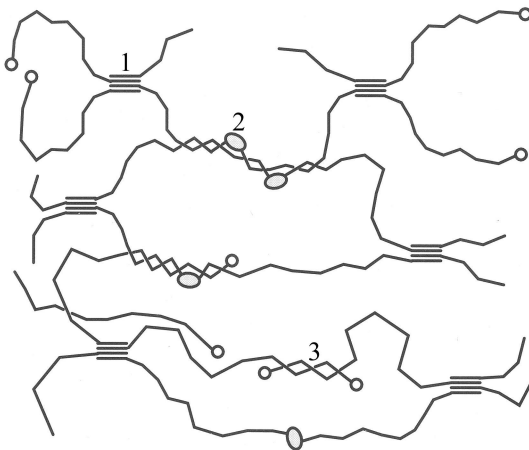
In folgenden Abschnitten werden die Hauptkomponenten der Basalmembran näher vorgestellt. Besondere Berücksichtigung erhält die Familie der Laminine.

### 1.1.1 Kollagene

Die Kollagene sind modulare Proteine der ECM, die in Vertebraten über 30% des Gesamtproteins ausmachen (Brown & Timpl, 1995). Bisher wurden mehr als 20 Kollagentypen beschrieben (Koch *et al.*, 2001), die durch unterschiedliche  $\alpha$ -Ketten aufgebaut werden. Die Tripelhelix der Kollagene wird aus sich wiederholenden G-X-Y-Motiven gebildet. Durch nicht-tripelhelikale Bereiche wird die Flexibilität der sonst starren Struktur erhöht. Globuläre nicht-kollagene Domänen (NC) sorgen für die hohe Varianz der Kollagene.

Die *fibrillären Kollagene* I, II, III, V und XI und die *Fibrillen-assoziierten Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices* (FACIT) IX, XII, XIV, XVI, XIX und XX sind nicht Bestandteil der BM (Shaw & Olsen, 1991; Van der Rest & Garrone, 1991).

Die Kollagen IV, VI, VII, VIII, X, XV und XVIII werden als *nicht-fibrilläre Kollagene* bezeichnet. Die vier Isoformen des Netzwerk-bildenden Kollagen IV formen neben Laminin das zweite Netzwerk der Basalmembran und machen deren Hauptbestandteil aus.

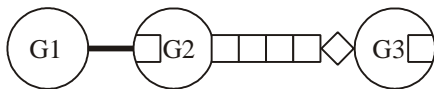


**Abb. 2: Schematische Darstellung des Kollagen IV-Netzwerkes.** Mehrere Assoziationsmotive der Kollagen-Moleküle führen zur Ausbildung eines unregelmäßigen Netzwerkes: Tetramere der N-terminalen 7S-Domäne (1), Dimere der globulären NC1-Domäne des C-Terminus (2) und laterale Verdrillungen der tripelhelikalen Bereiche (3) (Kühn, 1995). Aus Timpl & Brown (1996).

Kollagen VII vernetzt als Verankerungsfibrille die BM mit dem Stroma. Auch die als Multiplexine (*Multiple Tripelhelix-Domäne mit Interruptionen*) bezeichneten Kollagene XV und XVIII findet man in der BM, ohne die makromolekulare Organisation zu kennen. Die proteolytisch abgespaltenen C-terminalen Domänen von Kollagen XVIII bilden Endostatin, einen Hemmstoff von Angiogenese und tumoralem Wachstum (O'Reilly *et al.*, 1997). Die Kollagene XIII und XVII sind Transmembranproteine der Hemidesmosomen (Burgeson & Christiano, 1997) und vermitteln via Zelladhäsion Zell-Matrix-Interaktionen (Hägg *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Nidogene

Nidogen-1 ist ein 150 kDa großes Protein, welches ubiquitär in der BM embryonaler und adulter Gewebe vorkommt (Mayer & Timpl, 1994). Das Molekül wird aus drei globulären Domänen G1 bis G3 aufgebaut (Abb. 3), die durch stabförmige Abschnitte getrennt werden (Fox *et al.*, 1991). Die C-terminale Domäne G3 besteht aus fünf LDL-ähnlichen LY-Modulen und einem EGF-ähnlichen EG-Modul. Die Verbindung zwischen G3 und G2 wird aus vier EG-Modulen und einem Thyroglobulin-ähnlichen TY-Modul gebildet. Die kleinere G1-Domäne enthält zwei EF-Hand-Motive und G2 ein weiteres EG-Modul.



**Abb. 3: Modularer Aufbau von Nidogen-1.** Die globulären Domänen G1 und G2 werden durch ein flexibles Segment verbunden. Die Domänen G2 und G3 sind durch eine Tandem-Anordnung von 4 EG-Modulen (□) und einem TY-Modul (◇) getrennt. Weitere EG-Module befinden sich auf G2 und G3.

Nidogen-1 besitzt Bindungsaktivitäten für Laminin, Kollagen IV, Perlecan, Fibuline und Fibronectin. Eine hochaffine Bindungsstelle für Laminin  $\gamma$ 1LEIII4 (Pöschl *et al.*, 1996) befindet sich auf der Domäne G3. Diese enthält ebenfalls Bindungsstellen für Kollagen IV und Fibulin-2. G2 bindet an Kollagen IV, Perlecan, Fibulin-1 und Fibronectin (Ries *et al.*, 2001). Die Domäne G1 bindet Fibulin-2. Das erst 1998 von Kohfeldt *et al.* beschriebene Nidogen-2 hat den gleichen modularen Aufbau und ähnliche Expressionsmuster wie Nidogen-1. Es zeigt jedoch schwächere Bindung an Laminin-1.

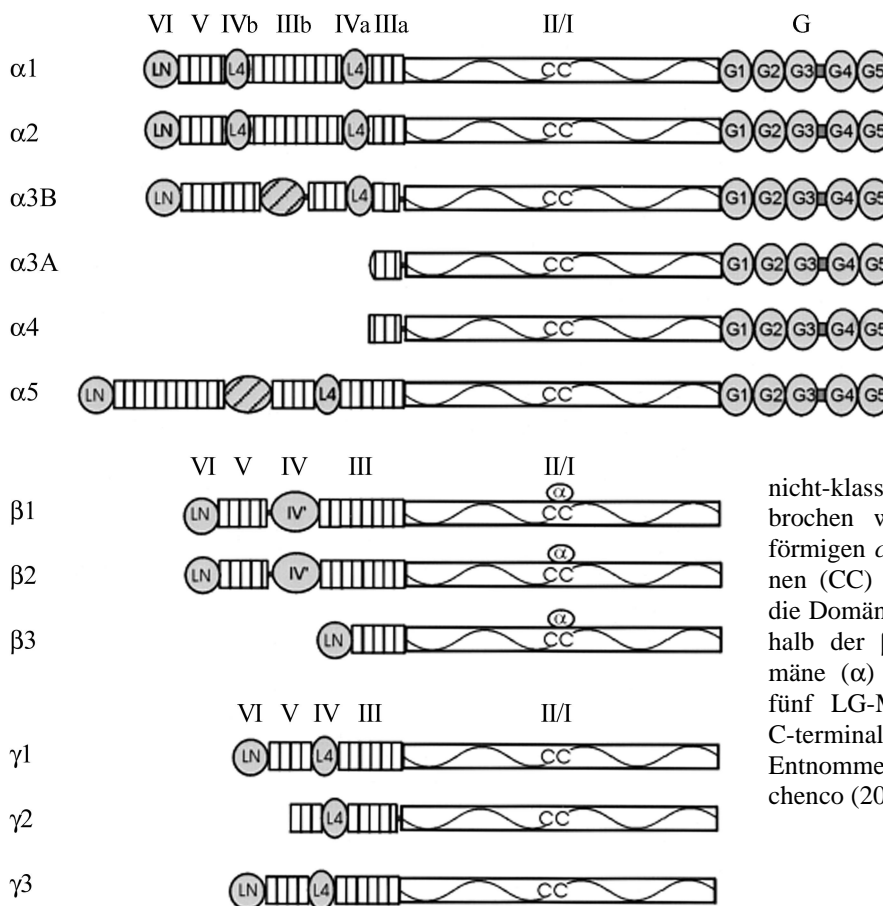
Durch seine Fähigkeit Laminine und Kollagen IV zu verbrücken und mit wichtigen Komponenten der BM zu interagieren, könnte Nidogen eine zentrale Rolle bei der Konstitution der BM und ihrer makromolekularen Organisation besetzen (Brown *et al.*, 1994; Yurchenco & O'Rear, 1994; Timpl & Brown, 1996). Diese postulierte Funktion wurde im Mausmodell bisher nicht bestätigt. Nidogen-1-defiziente Mäuse besitzen keinen signifikanten Phänotyp (Murshed *et al.*, 2000), was eine Kompensation durch Nidogen-2 möglich erscheinen lässt.

### 1.1.3 Laminine

Die Laminine stellen einen Hauptbestandteil aller Basalmembranen dar, werden aber auch außerhalb gefunden, z.B. auf der apikalen Oberfläche ziliarer Epithelzellen (Koch *et al.*, 1999). Als Heterotrimere bestehen sie aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Kette (Burgesson *et al.*, 1994). Die Bildung der Laminin-Heterotrimere erfolgt intrazellulär. Die an-

schließende Sekretion in die entstehende BM wird vermutlich durch die  $\alpha$ -Ketten gesteuert (Yurchenco *et al.*, 1997): Ohne  $\alpha$ -Kette verweilen  $\beta\gamma$ -Dimere in der Zelle. Nur die  $\alpha$ -Kette kann extrazellulär monomer nachgewiesen werden. Bisher sind 15 verschiedene Laminine bekannt, die sich aus 5  $\alpha$ , 3  $\beta$  und 3  $\gamma$ -Ketten ableiten. Von drei der Ketten ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$ ) sind alternative Spleißvarianten bekannt (Talts & Timpl, 1999; Galliano *et al.*, 1995; Airene *et al.*, 1996).

Abb. 4 stellt die Isoformen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten vor.



**Abb. 4: Modularer Aufbau der Laminin-Ketten.** Die Proteine bestehen aus Tandem-Anordnungen globulärer und stabförmiger Module. Die N-terminalen Domänen VI werden durch das LN-Modul (LN) gebildet. Es folgen die LE-Module ( $\square$ ) der Domänen V und III, die durch L4-Module (L4) der Domänen IVb/a oder

nicht-klassifizierte Domänen IV unterbrochen werden. Die langen, stabförmigen *coiled coil*-bildenden Regionen (CC) der Proteine werden durch die Domänen II/I aufgebaut, die innerhalb der  $\beta$ -Ketten durch die B-Domäne ( $\alpha$ ) unterbrochen werden. Die fünf LG-Module (G1-5) bilden die C-terminale G-Domäne der  $\alpha$ -Ketten. Entnommen aus Colognato & Yurchenco (2000).

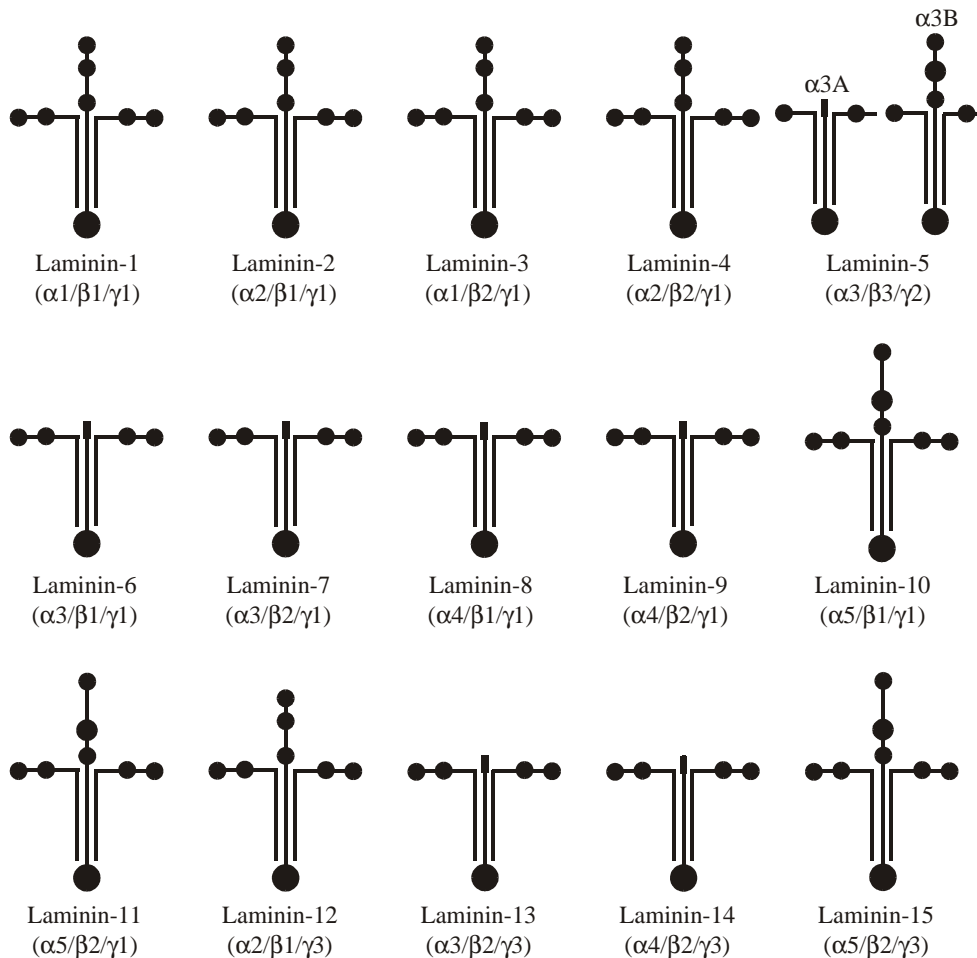
Die N-Termini fast aller Laminin-Ketten bestehen aus dem globulären LN-Modul. Es schließen sich Tandem-Anordnungen von LE-Modulen an, die durch ein bis zwei globuläre L4-Module oder andere nicht-klassifizierte globuläre Domänen unterbrochen werden. Alle Ketten enthalten eine Region aus sich wiederholenden Heptadsequenzen. Die Interaktion dieser Regionen innerhalb eines Heterotrimer führt zur Ausbildung der *coiled coil*-Struktur (Beck *et al.*, 1993; Antonsson *et al.*, 1995). In den  $\beta$ -Ketten ist zwischen Domäne I und II die 31-33 Aminosäure lange B-Domäne (Domäne- $\alpha$ ) eingeschoben, deren Bedeutung ungeklärt ist. Nur die  $\alpha$ -Ketten besitzen an ihrem C-terminalen Ende fünf LG-Module.

Die bisher beschriebenen Laminine sind schematisch in Abb. 5 dargestellt. Die kreuzförmige Anordnung der Ketten wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Laminin-1 abgeleitet (Beck *et al.*, 1990). Laminine können in drei Gruppen unterteilt werden:

*Kreuzförmige* Laminine enthalten drei kurze Arme: Laminin-1, -2, -3, -4, -10, -11, -12, -15.

*T-förmige* Laminine besitzen eine verkürzte  $\alpha$ -Kette: Laminin-6, -7, -8, -9, -13, -14.

*Stabförmiges* Laminin wird durch drei N-terminal verkürzte Ketten aufgebaut: Laminin-5.



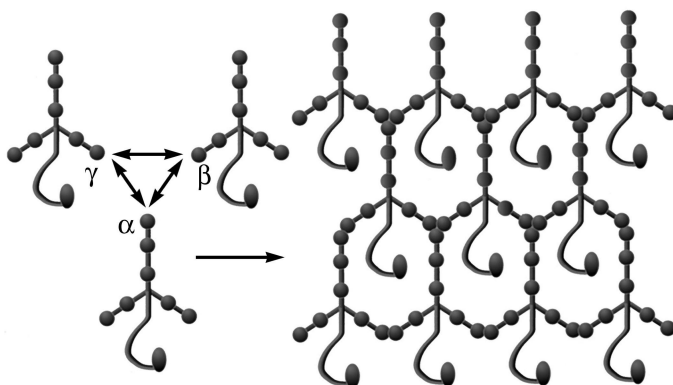
**Abb. 5: Schematische Darstellung der Laminine-1 bis -15.** Der N-Terminus ist jeweils oben dargestellt. Die  $\alpha$ -Kette enthält die LG-Module und ist mittig angeordnet. Die  $\beta$ -Kette liegt links, die  $\gamma$ -Kette rechts davon.

Laminine sind nicht nur ubiquitäre Bestandteile der BM von Vertebraten, sondern werden auch in Invertebraten gefunden. Lamininisoforamen wurden in der Cnidarie *Hydra vulgaris*, der Mesozoe *Katharella antarctica*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* und dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen (Sarras *et al.*, 1994; Keppel *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 1999; Colognato & Yurchenco, 2000; Czaker, 2000).



### 1.1.3.1 Polymerisation und Bindungsaktivitäten der Laminine

Durch die Fähigkeit zur Selbstaggregation leisten Laminine einen wichtigen Beitrag zum Aufbau der BM und deren supramolekularer Organisation (Yurchenco & O'Rear, 1994; Timpl & Brown, 1996). Der zweistufige Polymerisationsprozess von Laminin-1 ist Konzentrations-, Temperatur- und Zeit-abhängig (Yurchenco *et al.*, 1985). Die kritische Konzentration liegt bei 0,1 mg/ml oder  $10^{-7}$  M. Bei 35°C liegt der Großteil der Moleküle polymer vor, bei 4°C ist der Prozess reversibel. In *in vitro*-Polymerisationsstudien bleibt nach 100 min die Konzentration an gebildeten Laminin-Komplexen konstant. Die initiale Nukleation der Moleküle ist positiv-kooperativ und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Die anschließende Vermehrung ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und EDTA-reversibel. Die Aggregation wird zudem von Heparin beeinflusst: Die Heparinbindung an das LG4-Modul von Laminin-1 verändert die Thermodynamik des Aggregationsprozesses (Yurchenco *et al.*, 1990). Niedrige Heparinkonzentrationen ( $< 4 \mu\text{M}$ ) beschleunigen den Prozess, ab Konzentrationen  $> 6 \mu\text{M}$  wird er inhibiert. Heparin hat somit modulatorische Funktion in der Entstehung extrazellulärer Strukturen. Allgemein wird sulfatierten Liganden, wie auch Sulfatid, die Fähigkeit zugesprochen, durch Bindung an Laminin dessen Akkumulation und orientierte Ausrichtung zu fördern. Die lokale Erhöhung der Laminin-Konzentration geht mit einer einsetzenden Aggregation einher (Kalb & Engel, 1991). Nach dem 3-Arm-Interaktionsmodell von Yurchenco & Cheng (1993) bilden sich bei der Polymerisation zunächst trimere Einheiten, die dann das Netzwerk aufbauen.



**Abb. 6: 3-Arm-Interaktionsmodell der Selbstaggregation von Laminin** nach Yurchenco & Cheng (1993).

Für die Ausbildung nicht-kovalenter Netzwerke sind drei verschiedene LN-Module notwendig (Cheng *et al.*, 1997), deren Aggregation als essentiell für die Integrität der BM gilt (Yurchenco & O'Rear, 1994). Die Mutation  $dy^{2J}$  im LN-Modul von Laminin  $\alpha 2$  (Ln $\alpha 2$ ) verursacht die kongenitale Muskeldystrophie (CMD) (Xu *et al.*, 1994).

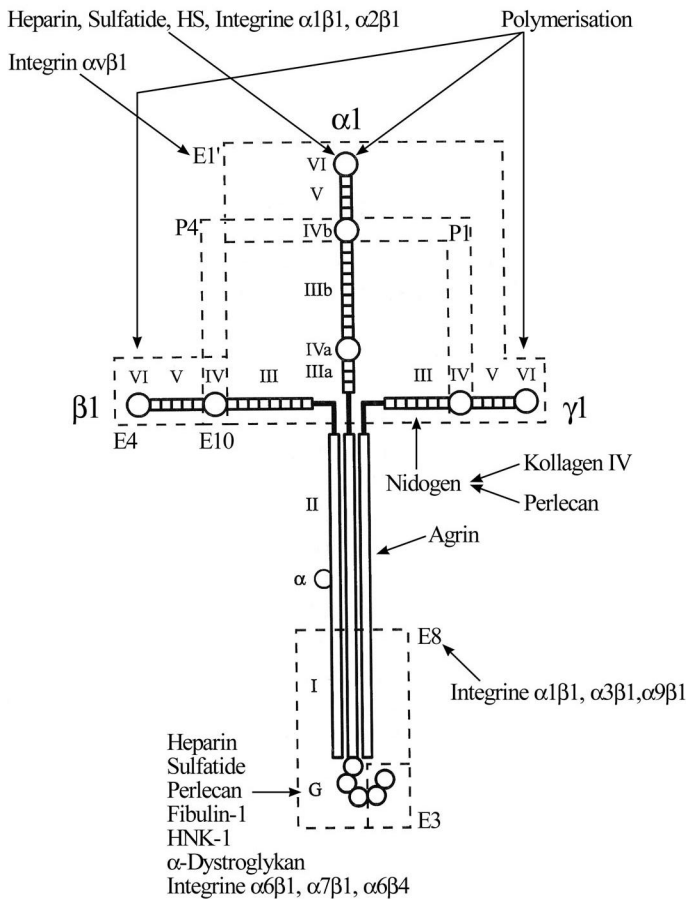
Die  $\text{Ln}\alpha 2$ -enthaltenden Laminine-2/4 ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1/\beta 2$ ) sind ebenfalls zur Selbstaggregation befähigt und können mit Laminin-1 kopolymerisieren. Für die  $\alpha 3A$ -Kette von Laminin-5 und -6 wurde dieser Mechanismus nicht bestätigt (Cheng *et al.*, 1997). Die Laminine-5, -6, -7 und -13 werden von der N-terminal verkürzten  $\alpha 3A$ -Kette aufgebaut. Laminin-5 enthält drei am N-Terminus verkürzte Ketten und ist somit nicht zur Polymerisation befähigt. Es kann jedoch eine kovalente Bindung mit Laminin-6 bzw. -7 eingehen, wobei der N-terminale Bereich von Laminin-5 mit der zentralen Region von Laminin-6 oder -7 durch eine Disulfidbindung vernetzt wird (Champlaud *et al.*, 1996). Nur die kreuzförmigen Laminine polymerisieren zu Netzwerken, außer Laminin-5 binden jedoch alle an Nidogen. Auf Muskelzellen polymerisiert Laminin, welches an seiner G-Domäne bereits gebunden an Zellrezeptoren ( $\alpha 7\beta 1$ -Integrin oder  $\alpha$ -Dystroglykan) vorliegt. Dieser kooperative Prozess führt direkt zur Integration von Rezeptoren in die BM (Colognato *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2001).

Während die N-Termini der Laminine zur Struktur der BM beitragen, findet die Kommunikation mit Zellen vorwiegend über die C-terminalen LG-Module der  $\alpha$ -Ketten statt, die Bindungsstellen für die Integrine  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  sowie  $\alpha$ -Dystroglykan besitzen (Sonnenberg *et al.*, 1990; Calof *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1992; Colognato & Yurchenco, 2000; Andac *et al.*, 1999). Weitere Integrine der  $\beta 1$ -Familie ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ) binden an das C-terminale E8-Fragment von Laminin-1. Die Bindungsstellen sind noch nicht lokalisiert (Tomaselli *et al.*, 1990; Forsberg *et al.*, 1994; Aumailley *et al.*, 1996).

Andere Bestandteile der BM binden ebenfalls an die G-Domäne der  $\alpha 1$ -Kette: Heparin, Sulfatid (Andac *et al.*, 1999), Perlecan (Battaglia *et al.*, 1992), Fibulin-1 (Pan *et al.*, 1993). Die LG-Module der  $\alpha 2$ -Kette binden außerdem an Fibulin-2 und Nidogen-2 (Talts *et al.*, 1999). Das Kohlenhydrat HNK-1, welches auf der Oberfläche von Glykolipiden und Zellen zu finden ist und Zelladhäsion vermittelt, bindet an  $\alpha 1\text{LG}2$  (Hall *et al.*, 1997). Laminin-1 aus EHS-Tumor besitzt einen Kohlenhydrat-Anteil von 15 bis 25 %, welcher aus etwa 40 *N*-verbrückten Oligosacchariden resultiert (Timpl, 1996a). Die Kohlenhydrate von Laminin-1 bilden Liganden für diverse pflanzliche Lektine und tierisches Galektin-1 (Shibata *et al.*, 1982a; Shibata *et al.*, 1982b; Knibbs *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1983; Barondes *et al.*, 1994). Galektine sind auf der Zelloberfläche und als Bestandteil der ECM zu finden. Neben strukturellen und zelladhäsiven Funktionen beeinflussen sie biologische Aktivitäten, indem sie mit Molekülen wie Laminin-1 oder Integrin  $\alpha 7\beta 1$  interagieren (Barondes *et al.*, 1994; Ochieng & Warfield, 1995). Die Initiation der Ausbreitung von

Zellen durch Laminin wird durch die Bindung seiner Oligosaccharide an  $\beta 1$ -Integrine vermittelt (Chandrasekaran *et al.*, 1994a; Chandrasekaran *et al.*, 1994b).

Abb. 7 fasst die Bindungsaktivitäten von Laminin-1 zusammen und führt die proteolytischen Fragmente ein, die für Bindungsstudien eingesetzt wurden.



**Abb. 7: Schema von Laminin-1: Domänenstruktur, proteolytische Fragmente und Bindungsaktivitäten.** Die durch Abbau mit Elastase (E) und Pepsin (P) hergestellte Fragmente sind durch gestrichelte Linien begrenzt. Die Pfeile weisen die Bindungspartner den interagierenden Regionen auf Laminin-1 zu. Modifiziert nach Timpl (1996a).

### 1.1.3.2 Laminine in Entwicklung, Morphologie und Pathogenese

Laminin-1 wurde während der Mausentwicklung schon vor dem Blastozystenstadium nachgewiesen (Dziadek & Timpl, 1985; Ekblom *et al.*, 1996) und tritt während der Organogenese in vielen epithelialen Geweben auf, wie durch spezifische Antikörper gegen die  $\alpha 1$ -Kette gezeigt wurde. In den meisten endothelialen BM und in allen embryonalen Mesenchymen konnte  $\text{Ln}\alpha 1$ , im Gegensatz zu der  $\beta 1$ - und  $\gamma 1$ -Kette, nicht nachgewiesen werden. Ihr restriktives Expressionsmuster lässt auf die wichtige Rolle der  $\alpha 1$ -Kette in der Morphogenese epithelialer Zellen schließen (Ekblom *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1990) und verdeutlicht die zeitlich und lokal begrenzte Expression der Laminine innerhalb diskreter Entwicklungsstadien. Im adulten Gewebe der Muskeln ist Laminin-1 regulär nicht mehr zu

finden (Paulsson, 1996; Falk *et al.*, 1999). Viele adulte Neuronen exprimieren Laminin-1, während der Entwicklung des Gehirns wird es nicht gefunden (Smalheiser, 1996).

Wie *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen, leisten Laminine einen großen Beitrag zur Kommunikation der BM mit den Zellen. Sie fördern das Anhaften und Ausbreiten von Zellen (Colognato *et al.*, 1997), die Zellwanderung, die Leitung und das Wachstum neuronaler Axone (Calof *et al.*, 1994; Tang & Goldberg, 2000). Das axonale Wachstum wird durch Bindung an Integrine vermittelt (Tomaselli *et al.*, 1990). Ferner sind Laminine an der Induktion von Zellorganisationen beteiligt: Laminin-1 reguliert das Agrin-induzierte Zusammenlagern von Acetylcholin-Rezeptoren (Burkin *et al.*, 2000).

Laminine kontrollieren Zelldifferenzierung und Organbildung während der embryonalen Entwicklung (Ekblom *et al.*, 1996). Mäuse mit einer fehlenden Laminin-Kette zeigen deutliche Phänotypen, die aus der fehlerhaft-unvollständigen Differenzierung und/oder Erhaltung verschiedener Gewebetypen von frühen embryonalen Stadien bis ins Erwachsenenalter resultieren (Ryan *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 1999; Colognato & Yurchenco, 2000).

Defekte von Laminin-Ketten sind ursächlich für Krankheiten verschiedener Organe, z.B. Haut, Muskeln und Nerven. Defekte von Laminin-5 und -6 führen zur junktionalen Epidermolysis bullosa (JEB), einer bläschenartigen Erkrankung der Haut, die auf die mangelhafte Verankerung der Hautschichten zurückzuführen ist (Bruckner-Tuderman & Bruckner, 1998). Laminin-2 verbrückt in Muskelzellen das Aktin-Zytoskelett mit der ECM. Mutationen in dieser Isoform führen zur langsamen Apoptose der Muskelzellen, der autosomal-rezessiven (AMD) oder der kongenitalen Muskeldystrophie (CMD) (Xu *et al.*, 1994; Relan & Schuger, 1999; O'Brien *et al.*, 2001). Diverse neuronale Krankheiten werden mit Laminin in Verbindung gebracht, wie Demyelination und periphere Neuropathien. Laminin ist verstärkt in Alzheimer-Plaques zu finden und wird, aufgrund seiner Rolle im neuronalen (Aus-) Wachsen, als ein pathogenetischer Modulator des Alzheimer-Syndroms diskutiert (Luckenbill-Edds, 1997; McGowan & Marinkovich, 2000). Laminine beeinflussen die Bildung verschiedener Arten von Tumoren (Goodman *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998; Tani *et al.*, 1999; Kuratomi *et al.*, 1999; Giannelli & Antonaci, 2000; Määttä *et al.*, 2001). Tumor-Progression ist an die gesteigerte Remodellierung der ECM gebunden (Liétard *et al.*, 1998; Theret *et al.*, 2001). Das 67 kDa-Laminin-Bindungsprotein wird verstärkt auf der Oberfläche von Krebszellen gefunden (Ménard *et al.*, 1997; Ardini *et al.*, 1997; Buto *et al.*, 1998; Ford *et al.*, 1999).

### 1.1.3.3 Laminin $\alpha$ -Ketten

Bisher wurden fünf  $\alpha$ -Ketten der Laminine beschrieben. Sie gleichen sich im C-terminalen Bereich der G-Domäne und der linearen Domänen I/II. Die N-terminalen Regionen unterscheiden sich in Länge und modularer Struktur (Abb. 4, Seite 5). Sie bauen Laminine auf, die sich in Form, Funktion und ihrer Gewebelokalisation während verschiedener Entwicklungsstadien gegeneinander abgrenzen. Allgemein bilden die Ketten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  Laminine in BM epithelialer Strukturen, während  $\alpha 2$  und  $\alpha 4$  endothelialen bzw. mesenchymalen Ursprungs sind. Tab. 1 fasst die wichtigsten Merkmale der bekannten Laminin  $\alpha$ -Ketten zusammen.

**Tab. 1: Laminin  $\alpha$ -Isoformen: Lokalisation, Funktion und abgeleitete Laminine.** Die Referenzen sind in Klammern numeriert und im unteren Teil der Tabelle angefügt.

Kette	Expressionsmuster	Laminine & deren Komposition		
$\alpha 1$	frühe Embryogenese, fötale Nierenentwicklung, Neuroretina und Gehirn, (Neugeborenen-) Niere, Gonaden (1)	1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	(7, 8)
		3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	(7, 9)
$\alpha 2$	Skelett- und Herzmuskel, periphere Nerven, Kapillaren, Plazenta, Gehirn, andere Gewebe (2)	2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	(7, 10)
		4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	(7, 11)
		12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	(12)
$\alpha 3$	Haut und andere Epithelien (3), Neuroretina (4)	5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	(7, 13)
		6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	(7, 14)
		7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	(7, 14, 15)
		13	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	(4)
$\alpha 4$	primäres Mesenchym adulter Zellen von Muskel, Lunge, Nerven, Blutgefäßen, Fett, anderen Geweben (5), Neuroretina (4)	8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	(16)
		9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	(16)
		14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	(4)
$\alpha 5$	diverse Endo- und Epithelien, Niere, Leber, Muskel- und Nervenentwicklung sowie -regeneration, Basalmembran der Synapsen (6), Neuroretina (4)	10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	(16)
		11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	(16)
		15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	(4)

- 1 (Falk *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1988; Smyth *et al.*, 1999; Vuolteenaho *et al.*, 1994)  
 2 (Ehrig *et al.*, 1990; Sunada *et al.*, 1995a; Sunada *et al.*, 1995b; Vuolteenaho *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994)  
 3 (McGrath *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1999)  
 4 (Libby *et al.*, 2000)  
 5 (Iivanainen *et al.*, 1995; Iivanainen *et al.*, 1997; Niimi *et al.*, 1997; Richards *et al.*, 1994; Richards *et al.*, 1996)  
 6 (Colognato & Yurchenco, 2000; Miner *et al.*, 1995; Miner *et al.*, 1997; Miner *et al.*, 1998; Miner & Li, 2000; Patton *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1998; Seebacher *et al.*, 1997; Son *et al.*, 2000)  
 7 (Burgeson *et al.*, 1994)  
 8 (Timpl *et al.*, 1979)  
 9 (Hunter *et al.*, 1989)  
 10 (Ehrig *et al.*, 1990)  
 11 (Sanes *et al.*, 1990)  
 12 (Koch *et al.*, 1999)  
 13 (Rousselle *et al.*, 1991)  
 14 (Marinkovich *et al.*, 1992b)  
 15 (Champlaud *et al.*, 1996)  
 16 (Miner *et al.*, 1997)

Aus Vergleichen der Primärsequenzen bzw. Domänenstrukturen der  $\alpha$ -Ketten lassen sich evolutionäre Beziehungen ableiten. Die  $\alpha 5$ -Kette besitzt hohe Ähnlichkeit zur  $\alpha$ -Kette

von *Drosophila melanogaster* ( $\alpha$ D) und hat eine vergleichbare modulare Struktur wie  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2. Innerhalb der Domänen, die in allen Ketten enthalten sind, zeigen  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 4 höhere Ähnlichkeit zu  $\alpha$ 5 als zu  $\alpha$ 1/2. Man nimmt an, die Ketten  $\alpha$ 3/4 und  $\alpha$ 5 leiten sich von einer Vorläuferform ab, die sich in der Evolution von  $\alpha$ 1/2 getrennt, durch Rekombination aber wieder angenähert hat (Miner *et al.*, 1995). Die später in Laminin  $\alpha$ 3A umbenannte  $\alpha$ 3-Kette wurde als 200 kDa großes Protein isoliert (Marinkovich *et al.*, 1992a). In folgenden genomischen Studien wurden zwei Spleißvarianten des Proteins gefunden, die  $\alpha$ 3A und  $\alpha$ 3B benannt wurden (Ryan *et al.*, 1994; Galliano *et al.*, 1995) und unter der Kontrolle verschiedener Promotoren stehen (Ferrigno *et al.*, 1997). Die längere Isoform  $\alpha$ 3B (300 kDa) gleicht in ihrem modularen Aufbau der  $\alpha$ 5-Kette (Doliana *et al.*, 1997; Miner *et al.*, 1997). Die Ketten  $\alpha$ 3A und  $\alpha$ 4 gleichen sich in Länge und Modulstruktur. Die Sequenzen der N-terminalen Regionen und der Signalpeptide von  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 sind noch nicht restlos bekannt.

Das LN-Modul von Laminin  $\alpha$ 2 enthält Bindungsaktivitäten für die Integrine  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, die N-terminalen Domänen  $\alpha$ 2(VI-IVb)' binden Heparin (Colognato *et al.*, 1997). Die Polymerisation der Ln $\alpha$ 2-enthaltenden Laminine-2 und -4 kann durch N-terminale Fragmente von Laminin-1 (E1' und E4) inhibiert werden, was die Laminin-Bindung der N-Termini von Laminin  $\alpha$ 2 wahrscheinlich macht (Cheng *et al.*, 1997). Für die N-Termini von Laminin  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 liegen noch keine Bindungsdaten vor. Die Laminine  $\alpha$ 3A und  $\alpha$ 4 enthalten kein LN-Modul (Abb. 4, Seite 5). Dem N-Terminus der Ln $\alpha$ 1-Kette wurden bereits mehrere Bindungspartner zugeordnet. Das best-charakterisierte Laminin ist das aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumor isolierte Laminin-1 (Timpl *et al.*, 1979). Die Vielzahl aller Untersuchungen wurde an dieser Isoform durchgeführt. Kouzi-Koliakos *et al.* (1989) benutzten elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Identifizierung von Heparinbindungsstellen auf Laminin-1. Sie fertigten Präparate an, die in Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration der Kegelbedampfung unterzogen worden waren. Es wurden zwei stark bindende Epitope (0,2 M NaCl) und ein schwach bindendes Epitop (0,15 M NaCl) gefunden. Ein stark bindendes Epitop wurde den N-Termini des Proteins (Domänen VI) zugeordnet. Hierbei wurde nicht zwischen den einzelnen Ketten unterschieden. Das zweite stark bindende Epitop lag auf der G-Domäne der  $\alpha$ -Kette. Die schwach-affine Bindungsstelle lag auf Domäne IVa der  $\alpha$ -Kette. Yurchenco *et al.* (1990) setzen zur Kartierung der Heparinbindungsstellen auf Laminin-1 proteolytisch erzeugte Fragmente ein. Mittels Bindungsstudien wurden Epitope auf dem kurzen Arm der  $\alpha$ 1-Kette (Fragment E1') und in der C-terminalen Region (E3/E8) lokalisiert. Durch Studien an einem weiteren Fragment (E1X) wurde die Heparinbindung dem LN-Modul zugeordnet (Colognato-Pyke *et al.*, 1995).

Mit Hilfe spezifischer Antikörperinhibitionen konnten dem LN-Modul Bindungsaktivitäten für  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin (Hall *et al.*, 1990; Tomaselli *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1991; Colognato-Pyke *et al.*, 1995) sowie  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (Colognato *et al.*, 1997) zugeordnet werden.

Ettner *et al.* (1998) bestätigten mittels Bindungsstudien an rekombinanten Fragmenten mehrere Bindungspartner des LN-Moduls: Heparin, Integrin  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  sowie Heparansulfate der Perlecan-Fragmente IA und Vc. Mit dem rekombinanten Fragment  $\alpha 1VI/V$  konnten Talts *et al.* (1999) Interaktion mit  $\alpha$ -Dystroglykan zeigen.

Roberts *et al.* (1985) fanden die Bindung von Sulfatid an die globulären Regionen der N-Termini aller kurzen Arme von Laminin-1. Die Bindungsstudien wurden mit dem Fragment  $\alpha 3$  durchgeführt, welches durch  $\alpha$ -Thrombin-Degradation von Laminin-1 entsteht (Rao *et al.*, 1982; Terranova *et al.*, 1983).

Bisher publizierte Bindungsaktivitäten sind in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 2: Publizierte Bindungsaktivitäten der N-terminalen Region von Laminin  $\alpha 1$**

Bindungspartner	Bindende Region	Methode	Referenzen
Heparin	LN	EM-Studie	(Kouzi-Koliakos <i>et al.</i> , 1989)
	E1'	Bindungsstudien mit proteolytischen Fragmenten	(Yurchenco <i>et al.</i> , 1990)
	LN	Bindungsstudie mit rekombinantes Protein	(Ettner <i>et al.</i> , 1998)
Heparansulfat	LN	Bindungsstudie mit rekombinantes Protein	(Ettner <i>et al.</i> , 1998)
Integrin $\alpha 1\beta 1$	LN	Antikörperinhibition	(Hall <i>et al.</i> , 1990; Tomaselli <i>et al.</i> , 1990; Goodman <i>et al.</i> , 1991; Colognato-Pyke <i>et al.</i> , 1995)
	E1XNd	Bindungsstudie mit proteolytischen Fragmenten	(Pfaff <i>et al.</i> , 1994)
	LN	Bindungsstudie mit rekombinantes Protein	(Ettner <i>et al.</i> , 1998)
Integrin $\alpha 2\beta 1$	E1XNd	Bindungsstudie mit proteolytischen Fragmenten	(Pfaff <i>et al.</i> , 1994)
	LN	Antikörperinhibition	(Colognato <i>et al.</i> , 1997)
	LN	Bindungsstudie mit rekombinantes Protein	(Ettner <i>et al.</i> , 1998)
$\alpha$ -Dystroglykan	LN-LE4	Bindungsstudie mit rekombinantes Protein	(Talts <i>et al.</i> , 1999)
Laminin	E1'	Polymerisationsstudien mit proteolytischen Fragmenten	(Schittny & Yurchenco, 1990; Schittny & Schittny, 1993)
	LN	bzw. rekombinantes Proteinen	(Yurchenco <i>et al.</i> , 1985; Cheng <i>et al.</i> , 1997)

## 1.2 Potentielle Bindungspartner der N-terminalen Region der Laminine

Neben der Interaktion mit Zellrezeptoren und Proteoglykanen der Zelloberfläche vermitteln die N-Termini der Laminin-Ketten die Polymerisation zum quasi-hexagonalen Netzwerk der BM, die durch sulfatierte Liganden moduliert wird. Die beteiligten Moleküle werden in folgenden Abschnitten vorgestellt und ihre Rolle im Zusammenspiel extrazellulärer Strukturen erläutert.

### 1.2.1 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) sind sulfatierte Polysaccharide, die aus Tandem-Anordnungen von 40 bis 100 Disacchariden aufgebaut werden. Diese setzen sich zusammen aus den Hexosaminen D-Glukosamin (GlcN) und D-Galaktosamin (GalN), den Hexuronsäuren D-Glukuronsäure (GlcA) und L-Iduronsäure (IdoA) oder N-Acetyllaktosamin und sulfatierter Galaktose in Keratansulfat. Zu den wichtigsten GAG zählen die Glukosaminoglykane Heparin, Heparinsulfat (HS) und Keratansulfat (KS) sowie die Galaktosaminoglykane Chondroitinsulfat (CS) und Dermatansulfat (DS). Diese GAG sind regulär an Proteine gebunden. Eine Ausnahme macht das Hyaluronan, welches ausschließlich in freier Form erscheint (Kjellén & Lindahl, 1991) und aus GlcA und GlcN besteht (Lee & Spicer, 2000).

#### 1.2.1.1 Heparin und Heparansulfat

Heparin und Heparansulfat (HS) werden durch GlcA, IdoA und *N*-Acetylglukosaminen aufgebaut. Innerhalb einer einzelnen GAG-Kette können sich sulfatreiche und weniger sulfatierte Abschnitte abwechseln. Heparin/HS zeigt große Heterogenitäten bezüglich Sulfatierungsmuster und Konformation (Wong & Burgess, 1998). Ein typisches Heparin-Disaccharid enthält drei Sulfatgruppen (Faham *et al.*, 1996). Verglichen mit HS besitzt Heparin einen höheren Sulfatierungsgrad, einen stärkeren anionischen Charakter sowie mehr IdoA-reiche Regionen (Salmivirta *et al.*, 1996). HS bauen die Proteoglykane (PG) der BM (Kleinman *et al.*, 1982; Fujiwara *et al.*, 1984; Klein *et al.*, 1988) und die Heparansulfat-PG (HSPG) der Zelloberfläche (Stow & Farquhar, 1987; Ruoslahti, 1988) auf. Somit beeinflussen sie einen Großteil ihrer Funktionen und Eigenschaften in fast allen Zellen und Geweben der Vertebraten und Invertebraten (Tumova *et al.*, 2000).



### 1.2.2 Proteoglykane

Proteoglykane (PG) bilden eine Klasse von Proteinen, die kovalent mit einem sulfatierten Glykosaminoglykan substituiert sind. Sie sind ein verbreiteter Bestandteil der BM, von Bindegewebe sowie Knorpel und werden auch auf Zelloberflächen gefunden. Die Interaktion von PG mit Proteinen beruht meist auf elektrostatischen Kräften und wird hauptsächlich durch die GAG-Substitution vermittelt. Das Repertoire der Wechselwirkungen reicht von der einfachen Verankerung zellulärer Strukturen bis hin zu spezifischen Interaktionen mit Komponenten der ECM, Schutz vor proteolytischer Degradation sowie Modulation biologischer Aktivitäten durch sterische Inhibition funktioneller Gruppen. Dadurch ist der Eingriff in das Wechselspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen möglich. Den PG wird Bedeutung in der Morphogenese, der Angiogenese, der Blutgerinnung, der Zelladhäsion und -proliferation, im Fettstoffwechsel sowie der Tumorsuppression zugesprochen (Kjellén & Lindahl, 1991; Chung & Erickson, 1997; Lindahl *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Lander & Selleck, 2000; Selleck, 2000; Franco *et al.*, 2001).

Die Proteinkomponente der PG besitzt neben der GAG-Substitution auch *N*- oder *O*-verknüpfte Oligosaccharide. PG sind teilweise hochglykosyliert (Kjellén & Lindahl, 1991; Iozzo, 1998). Die Gruppe der PG kann unterschieden werden in kleine Leucin-reiche (SLRP) und modulare Proteoglykane (Aumailley & Gayraud, 1998). Genannt seien die modularen PG der BM *Perlecan*, *Agrin* und *Bamacan* sowie die HSPG der Zelloberfläche *Syndecan* und *Glycican*. (Kjellén & Lindahl, 1991; Iozzo, 1998; Liu *et al.*, 1998; Bernfield *et al.*, 1999; Iozzo, 1999; Bandtlow & Zimmermann, 2000; Selleck, 2000).

#### 1.2.2.1 Perlecan

Im Rahmen der Bindungsstudien dieser Arbeit wurden Perlecan-Fragmente als Modell für GAG-substituierte Liganden eingesetzt. Das PG Perlecan ist Bestandteil aller BM. In elektronenoptischen Aufnahmen fällt seine Unterteilung in mehrere globuläre Abschnitte auf, die wie Perlen auf einer Schnur gereiht sind (Abb. 1, Seite 2). Dieser Struktur verdankt das Protein seinen Namen. Perlecan ist aus sieben extrazellulären Proteinmodulen aufgebaut, aus deren Tandem-Anordnung sich eine Organisation in fünf Domänen (I bis V) ableiten lässt (Bork *et al.*, 1996; Iozzo, 1998). Die N-terminale Domäne I besteht aus einer Region, die reich an sauren Aminosäuren ist und drei GAG-besetzte Ser/Gly-Motive enthält. Insgesamt ist die Domäne mit drei GAG substituiert (HS und/oder CS) (Iozzo, 1998). Es folgt ein SEA-Modul, welches in Spermprotein, Enterokinase und Agrin gefunden wird (Bork *et al.*, 1996) und die Bindung an die Kohlenhydrate der Zelloberfläche vermittelt.

Die C-terminale Domäne V wird durch LG- und EG-Module aufgebaut und trägt eine GAG-Modifikation (Friedrich *et al.*, 1999). Durch die Interaktion mit anderen Komponenten der BM, wie Laminin, Nidogen, Fibronectin und Tenascin-C, trägt Perlecan wesentlich zur Stabilität der BM bei, greift aber auch modulativ in biologische Aktivitäten ein (Chung & Erickson, 1997; Mongiat *et al.*, 2000; Tumova *et al.*, 2000). Mit Hilfe der polyanionischen GAG-Ketten reguliert Perlecan die Filtrier-Eigenschaften der glomerulären und anderer vaskulärer BM (Iozzo *et al.*, 1994).

### **1.2.3 Moleküle der Zelloberfläche**

Die Kommunikation der ECM mit Zellen wird vermittelt über transmembrane Glykoproteine (Integrine, Dystroglykan) bzw. Zelloberflächenproteine, wie Proteoglykane (Syndecan, Glycican), CD44 und das Laminin-bindende Protein sowie über Ganglioside und Glykolipide (Sulfatid) (Aumailley *et al.*, 1996; Mecham & Hinek, 1996; Liu *et al.*, 1998; Klass *et al.*, 2000). Die wichtigsten Moleküle seien hier vorgestellt.

#### **1.2.3.1 Integrine**

Integrine bilden eine Familie heterodimerer Rezeptoren, die aus nicht-kovalent assoziierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Bisher wurden 22 Isoformen gefunden, die sich aus 16  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Ketten kombinieren (Aumailley & Gayraud, 1998). Jede Kette besteht aus einer großen extrazellulären, einer kleinen transmembranen sowie einer kleinen zyttoplasmatischen Region. Integrine interagieren mit vielen Komponenten der ECM, wie Laminin, Kollagen, Perlecan, Fibronectin, BM-40, Tenascin. Integrine vermitteln bidirektionale Signale, welche die Aktivität zytoplasmatischer Kinasen, Wachstumsfaktoren, Ionenkanäle, etc. beeinflussen. Dabei werden auch *cis*-Interaktionen mit anderen Transmembranproteinen eingegangen (Porter & Hogg, 1998). So kontrollieren Integrine Morphologie, Migration, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und andere zelluläre Aktivitäten. Ferner dienen Integrine als mechanische Rezeptoren und stellen eine Verbindung zwischen der ECM und dem Zytosklett her, wobei sie die Aktivität des intrazellulären Aktin-Zytoskletts kontrollieren (Hynes, 1996; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Cappelino & Dedhar, 2000). Die Aktivität der Integrine wird durch die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran beeinflusst (Pande, 2000).

Ein Hauptbindungsmotiv für Integrine ist die Aminosäure-Sequenz RGD, welche in vielen Komponenten der ECM gefunden wird. Zudem existieren komplexe konformations-

abhängige Bindungsstellen: Das Bindungsepitop für das  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin im Kollagen IV verteilt sich über alle drei Peptidketten der Tripelhelix (Golbik *et al.*, 2000; Heino, 2000). Die klassischen Kollagen-Rezeptoren Integrin  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  binden an die LN-Module der Laminin-Ketten. Die LG-Module der  $\alpha$ -Ketten besitzen Bindungsstellen für die  $\beta 1$ -Integrine  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 7\beta 1$  sowie für  $\alpha 6\beta 4$  (Colognato *et al.*, 1997; Belkin & Stepp, 2000).

### 1.2.3.2 $\alpha$ -Dystroglykan

Der Transmembranrezeptor Dystroglykan stellt wie Integrin eine Verbindung zwischen ECM und Zytoskelett her. Das Dimer besteht aus dem extrazellulären  $\alpha$ -Dystroglykan und dem transmembranen  $\beta$ -Dystroglykan. Dieses bindet Dystrophin-vermittelt an das Aktin-Skelett (Schwarzbauer, 1999).

Die biologischen Aktivitäten von Dystroglykan sind nicht so umfassend untersucht wie die der Integrine. Ihm wird jedoch eine analoge Rolle in Entwicklung, Signaltransduktion und Adhäsion zugesprochen.  $\alpha$ -Dystroglykan besitzt hohe Affinität zu LG-Modulen der Laminin  $\alpha$ -Ketten, Perlecan und Agrin (Andac *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999; Winder, 2001).

### 1.2.3.3 Sulfatid

Das anionische Glykolipid Sulfatid (Galaktosylceramid- $I^3$ -sulfat) ist eine weitverbreitete Komponente von Zellmembranen. Es wurde ursprünglich aus der weißen Gehirnschicht isoliert, ist aber auch in anderen Organen wie Niere, Milz, Magen und Hoden zu finden. Zudem ist es auf der Oberfläche von Erythrozyten, Granulozyten und Blutplättchen lokalisiert (Roberts *et al.*, 1987). Sulfatid besteht aus einem Galaktoserest, dessen  $\beta 1$ -Position mit einem Ceramid substituiert ist. Die  $C_3$ -Hydroxygruppe des Zuckers ist sulfatiert, woraus sich der Name dieses Zelloberflächenproteins ableitet.

Sulfatid hat ähnliche biologische Eigenschaften wie Heparin/HS. Diese sulfatierten Moleküle unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Oligosaccharid-Seitenketten und in ihren Sulfatierungsmustern. Daher besitzen die genannten Moleküle oft die gleichen Bindungspartner. Die Stärke der Interaktionen ist abhängig von ihrem ionischen Charakter. Viele Komponenten des Blutplasmas binden Sulfatid, wie Thrombospondin und der Von-Willebrand-Faktor (Roberts & Ginsburg, 1988). Bindungsepitope für Sulfatid im Laminin wurden bisher nur auf den LG-Modulen von  $Ln\alpha 1$  und  $Ln\alpha 2$  identifiziert (Taraboletti *et al.*, 1990; Andac *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die N-terminale Region der Laminin-Ketten ist an der Polymerisation des Laminin-Netzwerkes beteiligt und trägt damit sowohl strukturell als auch regulatorisch zum Auf- und Umbau der ECM bei. Die Polymerisationskompetenz wurde bisher nur für die Ketten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  gezeigt, wird aber auch für die Ketten  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  vermutet. In Laminin-10/11 liegt  $Ln\alpha 5$  in Assoziation mit  $\beta 1/\beta 2$  bzw.  $\gamma 1$  vor, was auf eine polymere Struktur hindeutet (Kikkawa *et al.*, 1998). Das LN-Modul wird als Polymerisations-vermittelnde Domäne der Laminine vorgeschlagen (Yurchenco & Cheng, 1993; Cheng *et al.*, 1997). Sulfatierte Liganden werden als Modulatoren der Lamininpolymerisation angesehen (Yurchenco *et al.*, 1990; Kalb & Engel, 1991).

Eine weiterführende Erforschung von Mechanismus und Regulation der Polymerisation setzt die Kenntnis der beteiligten Bindungspartner und der interagierenden Epitope im Laminin voraus. Die Intention der Arbeit liegt in der Charakterisierung der LN-Module von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  hinsichtlich Polymerisation und Interaktion mit beteiligten Liganden. Die vermutete Polymerisationskompetenz dieser  $\alpha$ -Ketten soll bestätigt werden. Im Einzelnen sind hierfür folgende Arbeiten geplant:

(1) Durch die Darstellung rekombinanter N-terminaler Fragmente sollen erstmals die LN-Module aller nicht-verkürzten Isoformen für Studien zugänglich gemacht werden. Dafür ist die Vervollständigung der N-terminalen Sequenzen von  $Ln\alpha 3B$  und  $Ln\alpha 5$  erforderlich, welche durch Verlängerung der codierenden cDNA am 5'-Ende erreicht werden soll.

(2) Die wichtigsten strukturellen und molekularen Eigenschaften der hergestellten Fragmente sollen in biophysikalisch-chemischen Untersuchungen ermittelt werden.

(3) Es sollen umfassende Polymerisationsstudien sowie Bindungsanalysen mit sulfatierten Liganden (Heparin, Sulfatid, GAG-modifizierte Proteoglykane) durchgeführt werden.

(4) Um identifizierte Interaktionen dem LN-Modul zuordnen zu können, sollen die Domänen V der Fragmente proteolytisch hergestellt und analysiert werden.

(5) Ferner sollen die Bindungsepitope der gefundenen Bindungspartner auf der bestcharakterisierten Isoform Laminin  $\alpha 1$  durch eine Mutationsanalyse lokalisiert werden.

(6) Durch die Herstellung polyklonaler Antiseren gegen die Fragmente soll die Grundlage für immunologische Studien geschaffen werden. Mittels indirekter Immunfluoreszenz soll die Verteilung von Laminin  $\alpha$ -Ketten in verschiedenen Geweben untersucht werden.

## 2 *Material & Methoden*

### 2.1 **Material**

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Difco Laboratories (USA), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Serva (Heidelberg) sowie Sigma-Aldrich (Deisenhofen), sofern nicht anders angegeben.

#### 2.1.2 Radiochemikalien

Deoxycytidin-5'-[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-triphosphat	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<sup>125</sup> Iod	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

#### 2.1.3 Geräte

Aminosäure-Analysator	Biotronik LC 3000/ Eppendorf, Hamburg
FPLC-Anlage	Controller LCC-500 Plus/ Pharmacia, Schweden 2141 Variable Wavelength Monitor/ LKB, Schweden 2-Kanalschreiber 2210/ LKB Kolbenpumpe P-500/ LKB Fraktionssammler Frac-100/ LKB
HPLC-Anlage	2152 HPLC Controller/ LKB, Schweden UV-Detektor 2238 UVICORD/ LKB 2-Kanalschreiber 2210/ LKB 2150 HPLC-Pumpe/ LKB Fraktionssammler Frac-100/ LKB
LPLC-Anlage	UV-Detektor 2238 UVICORD/ LKB, Schweden 2-Kanalschreiber 2210/ LKB Peristaltikpumpe P1, Pharmacia/ LKB Fraktionssammler Linear II/ Reichelt Chemie-technik, Heidelberg
Begasungsbrutschrank	BB6220/ Heraeus, Hanau
Brutschrank	B6120/ Heraeus, Hanau
CD-Spektropolarimeter	Modell J-715/ JASCO, Groß-Umstadt
Digitales Kamerasystem	12 bit-CCD-Kamera Sensicam/ PCO, Kelheim
Digitale Photodokumentation	BioCapt/ LTF-Labortechnik, Wasserburg

DNA-Sequenzierautomat	373A-DNA-Sequencer, Perkin-Elmer Applied Biosystems/ USA
Elektrophoresekammern	hauseigene Werkstatt
ELISA-Lesegerät	Modell MR 5000/ Dynatec, Grossbritannien
Filmentwicklungsmaschine	CURIX 60/ Agfa, Leverkusen
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiophot/ Zeiss, Oberkochen
Kryomikrotom	Jung CM 3000/ Leica Microsystems, Wetzlar
Nassblot-Apparatur	hauseigene Werkstatt
pH-Meter	691 pH Meter/ Metrohm, Schweiz
Protein-Sequenzierautomaten	Gasphasen-Sequenzierapparate 473A und 492A/ Applied Biosystems, USA
Röntgen-Plattendetektor	MAR Image Plate Detector System/ X-ray Research, Norderstedt
Schüttelinkubator	Modell HT KF-4/ Infors, Schweiz
Schüttler	Modell 3016/ Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spannungsgeräte	2301 Macrodrive/ LKB, Schweden Modell 500/ BioRad, München
Thermocycler	Peltier Thermocycler Trio/ Biometra, Göttingen RoboCycler Gradient 96/ Stratagene Europe, Holland
Transilluminatoren	(354 nm) Spectroline EN-160LF/ Spectronics, USA (302 nm) Modell TFX-20M/ Peqlab, Erlangen
Wasseraufbereitung	MilliQ Plus/ Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Tischzentrifuge Microliter/ Hettich, Tuttlingen Varifuge3.0R/ Heraeus-Christ, Hanau Avanti J-25, Rotor JA-14/ Beckmann, USA Kühlzentrifuge CS-15R, Rotor F2402, Beckmann

#### 2.1.4 Standard-Puffer

<b>PBS</b>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / pH 7,4/ 150 mM NaCl/ autoklaviert
<b>PET</b>	PBS/ 0,005 % (w/v) EDTA/ 0,05 % (w/v) Trypsin/ sterilfiltriert
<b>TBE</b>	100 mM Tris-HCl, pH 8,3/ 45 mM Borsäure/ 2 mM EDTA
<b>TBS</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7,4/ 150 mM NaCl
<b>TBST</b>	TBS/ 0,04 % (v/v) Tween 20
<b>Blockierpuffer</b>	TBS/ 1 % (w/v) BSA
<b>TN</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 150 mM NaCl
<b>TNT</b>	TN/ 0,05 % (v/v) Tween 20

### 2.1.5 Nährmedien

Für die phänotypische Expression nach Transformation und die Vermehrung von Bakterien wurde LB-Medium in Anlehnung an Sambrook & Russel (2001) verwendet. Die eingesetzten Klone trugen Ampizillinresistenz. Zur Selektion wurde dem Kulturmedium sterilfiltriertes Ampizillin in der Endkonzentration 0,5 mg/l zugesetzt.

**LB-Medium**                    1 % (w/v) Trypton/ 0,5 % (w/v) Hefeextrakt/ 0,5 % (w/v) NaCl/  
pH 7,4

Für die Kultivierung und das Einfrieren eukaryontischer Zellen wurde Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Nährstoffen F12 benutzt. Medium und Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen. Für Transfektionen wurde DMEM ohne F12 (Biochrom AG, Berlin) verwendet. Die Antibiotika stammten ebenfalls von der Firma Biochrom AG.

**DMEM-Medium**            500 ml DMEM/ F12/ 10 % (v/v) FKS/ 2 mM L-Glutamin/  
0,01 % (w/v) Streptomycin/ 50.000 I.E. Penizillin

**Einfriermedium**            70 % (v/v) DMEM/ F12/ 20 % (v/v) FKS/ 10 % (v/v) DMSO

**Transfektionsmedium**    90 % (v/v) DMEM/ 10 % (v/v) FKS/ 2 mM L-Glutamin/  
0,01 % (w/v) Streptomycin/ 50.000 I.E. Penizillin

### 2.1.6 Nährböden

Für die Selektion nach Transformation wurde LB-Agar verwendet. Nach Autoklavierung und Abkühlung unter 50°C wurde sterilfiltriertes Ampizillin in der Endkonzentration 0,5 mg/l zugesetzt.

**LB-Agar**                        LB-Medium/ 1,2 % (w/v) Agar

### 2.1.7 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$                     F<sup>-</sup>/ *endA1* *hsR17* ( $r_K^- m_K^+$ ) *glnV44* *thi-1* *recA1* *gyrA* (Nal<sup>R</sup>) *relA1D*  
(*lacIZYA-argF*)U169 *deoR* ( $\Phi$ 80*dlacD* (*lacIZ*)M15)

**2.1.8 Zelllinien**

293-EBNA	Humane embryonale Nierenzelllinie (Invitrogen, Holland)
----------	---

**2.1.9 Enzyme**

$\alpha$ -Chymotrypsin (Pankreas)	Serva, Heidelberg
Elastase (Pankreas)	Serva, Heidelberg
N-Glykosidase F	Boehringer Mannheim, Mannheim
Pepsin (Magen)	Boehringer Mannheim, Mannheim
<i>Pfu</i> -Pyroglutamat-Aminopeptidase	TaKaRa Biomedicals, Japan
Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RNase A	Boehringer Mannheim, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Trypsin (Pankreas)	Serva, Heidelberg
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

**2.1.10 Vektoren**

pCEP-Pu	Episomaler Expressionsvektor (Kohfeldt <i>et al.</i> , 1997)
---------	--

**2.1.11 Proteine & Liganden**

Die Proteine, welche als Liganden in Bindungstests eingesetzt wurden, entstammten der Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried. Die Extraktion aus Gewebe bzw. die rekombinante Produktion in eukaryontischen Zellen sowie die anschließende Präparation erfolgte nach den angegebenen Standardprotokollen.

**Gewebe**

Laminin-1/Nidogen-1-Komplex (EHS-Tumor)	(Paulsson <i>et al.</i> , 1987)
---	---------------------------------



Rekombinant

Laminin $\alpha$ 1LG4-5	(Andac <i>et al.</i> , 1999)
Laminin-Fragment E4	(Timpl <i>et al.</i> , 1987)
Perlecan Fragment IB	(Costell <i>et al.</i> , 1997)
Perlecan Fragmente V/ Vc	(Brown <i>et al.</i> , 1997)

Kommerziell erworbene Liganden

Sulfatid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
----------	-----------------------------

**2.1.12 Antikörper**

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen entstammten der Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried. Eine Ausnahme bildete der Antikörper Anti-Nd1 gegen murines Nidogen-1, der von Dr. M. Dziadek (Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt wurde (Dziadek *et al.*, 1988). Für Immunfluoreszenz-Messungen wurden die Antikörper affinitätsgereinigt.

Als sekundärer Antikörper in Immunmarkierungen und Ligandenbindungstests wurde Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-Immunglobulin aus Ziege in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt (GAR-HRP: Goat Anti Rabbit IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt/ BioRad, München).

Für Immunfärbungen wurden folgende Fluorophor-gekoppelte Antikörper in der Verdünnung 1:500 verwendet: Cy3-konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin aus Ziege (AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG/ Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) und Alexa Fluor 488-konjugiertes Anti-Ratte-Immunglobulin aus Ziege (MoBiTec, Göttingen).

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.1.1 Standard-Methode

Für die Amplifikation von cDNA und die Einführung terminaler Schnittstellen wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Die DNA-Polymerisation erfolgte unter Einsatz von Vent-DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers (Abschnitt 2.1.9). Die verwendeten Didesoxynukleotide wurden von der Fa. New England Biolabs (Frankfurt a.M.) bezogen.

Die PCR wurde wie in Tab. 3 beschrieben gestaltet.

**Tab. 3: Temperaturprogramm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Zyklus	Anzahl	Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]
Initiales Schmelzen	1	Denaturierung	120	95
Amplifikation	25	Denaturierung	60	95
		Anlagerung	75	55
		Kettenverlängerung	75	68
Auffüll-Zyklus	1	Kettenverlängerung	300	68

Nach erfolgter Amplifikation schloss sich die Reinigung des PCR-Ansatzes über ein Agarose-Gel an (Abschnitt 2.2.2).

#### 2.2.1.2 RT-PCR zur Vervollständigung von cDNA-Enden

Die Vervollständigung der 5'-cDNA-Sequenz von Ln $\alpha$ 3B und Ln $\alpha$ 5 wurde durchgeführt mit dem 5'-Full RACE-Kit (TaKaRa, Japan) von Dr. T. Sasaki, Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried.

Die Methode zur rapiden Amplifikation von cDNA-Enden (RACE) wurde modifiziert nach Maruyama *et al.* (1995). Die unbekanntc cDNA-Sequenz wurde durch RT-PCR vervollständigt. Dieses wurde durch Verlängerung eines 5'-Phospho-Oligoribonukleotids erreicht, welches komplementär zur bekannten mRNA-Sequenz war. Nach der RT-PCR wurden die generierten DNA-Stränge mittels ssDNA-Ligase zyklisiert und die mRNA-Vorlage mittels RNase H abgebaut. Abschließend fand die Amplifikation des gesamten Konstruktes durch Standard-PCR statt.

### 2.2.1.3 PCR-Mutagenese

Zur Einführung gerichteter Punktmutationen wurde eine zweistufige Fusions-PCR durchgeführt. Im ersten Schritt wurde an der zu mutierenden Position der amplifizierte DNA-Strang in zwei Fragmente unterteilt. Die hierfür benutzten Oligonukleotide trugen die einzuführende Mutation in komplementärer Nukleotidsequenz und überlappten mit mindestens 20 B. Das 5'-Fragment und das 3'-Fragment wurden in separaten Reaktionen erzeugt. Im zweiten Schritt wurden die Fragmente miteinander fusioniert und abschließend durch Zugabe beider terminalen Oligonukleotide amplifiziert.

Die Bedingungen der Fusions-PCR sind in Tab. 4 zusammengefasst.

**Tab. 4: Temperaturprogramm zur Fusion von DNA-Fragmenten**

Zyklus	Anzahl	Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]
Initiales Schmelzen	1	Denaturierung	120	95
Fusion	10	Denaturierung	60	95
		Anlagerung	90	40
		Kettenverlängerung	300	68
Addition der Oligonukleotide				
Amplifikation	25	Denaturierung	60	95
		Anlagerung	75	55
		Kettenverlängerung	75	68
Auffüll-Zyklus	1	Kettenverlängerung	300	68

Nach erfolgter Amplifikation schloss sich die Reinigung des Fusionsproduktes über ein Agarose-Gel an (Abschnitt 2.2.2).

### 2.2.1.4 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Fa. Metabion (Martinsried) bezogen und werden jeweils im Ergebnisteil erläutert.

### **2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurden submarine Horizontalgele (1% (w/v) Agarose) verwendet. Als Laufpuffer diente TBE. Die DNA-Lösungen wurden auf 1xDNA-Auftragspuffer eingestellt. Zur Größenbestimmung wurde Marker-DNA benutzt (1 kB-Leiter/ Gibco BRL, Eggenstein). Nach Ablauf der Elektrophorese bei 100 V wurden die Gele in 1 µg/ ml Ethidiumbromid geschwenkt und die DNA im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mittels digitaler Photographie.

Präparative Gele wurden nur niederenergetischer UV-Strahlung (354 nm) ausgesetzt und abschließend aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 2.2.3).

**5xDNA-Auftragspuffer** 40 % (w/v) Saccharose/ 0,25 % (w/v) Bromphenolblau/ 0,25 % (w/v) Xylencyanol

### **2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen fand mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) dem Protokoll des Herstellers folgend statt. Die Elution der DNA erfolgte mit  $2 \times 25 \mu\text{l H}_2\text{O}$ .

### **2.2.4 Schneiden mit Restriktionsendonukleasen**

Für Restriktionsanalysen und das Vorbereiten von DNA-Fragmenten auf die Ligation wurde die cDNA einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen unterzogen. Die Bedingungen wurden laut Angaben des Herstellers (Abschnitt 2.1.9) gewählt. Für die DNA-Verifizierung erfolgte ein 2-stündiger Restriktionsverdau; für die Ligationsvorbereitung wurde 16 h verdaut.

### **2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (Abschnitt 2.1.9) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl. Plasmid und Insert wurden im molaren Verhältnis 1:10 vorgelegt. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 16°C. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation eingesetzt.

### **2.2.6 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Zur Vorbereitung auf die Transformation (Abschnitt 2.2.7) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  (Abschnitt 2.1.7) nach der modifizierten CaCl<sub>2</sub>-Methode behandelt.

Für die Vermehrung wurden 100 ml LB-Medium mit einer 1 ml-Übernachtskultur des Stammes inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD (600 nm) von 0,5 schüttelinkubiert. Nach 10-minütigem Kühlen auf Eis wurden die Bakterien sedimentiert (3000 UpM, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in 50 ml eisgekühltem Puffer A resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien vorsichtig in 4 ml eiskaltem Puffer B resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots von 110  $\mu$ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei -80°C gelagert.

<b>Puffer A</b>	30 mM KAc/ 50 mM MnCl <sub>2</sub> / 100 mM RbCl/ 10 mM CaCl <sub>2</sub> / 15 % (v/v) Glycerin/ pH 5,8 mit Eisessig/ sterilfiltriert
<b>Puffer B</b>	10 mM MOPS, pH 7,0/ 10 mM RbCl/ 75 mM CaCl <sub>2</sub> / 15 % (v/v) Glycerin/ sterilfiltriert

### **2.2.7 Transformation in kompetente Zellen**

12,5  $\mu$ l Ligationsansatz (Abschnitt 2.2.5) wurden vorsichtig mit 40  $\mu$ l transformationskompetenten *E. coli* (Abschnitt 2.2.6) vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgten 90 s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Das anschließende Abkühlen auf Eis dauerte 2 min. Für die phänotypische Expression erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine 60-minütige Inkubation im Schüttelinkubator bei 200 UpM und 37°C. Anschließend wurden 300  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf LB-Agar ausplattiert. Als Selektionsmarker wurde Ampizillin eingesetzt. Die Inkubation fand ü.N. bei 37°C statt.

Die Lagerung der Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen bei -80 °C. Dazu wurden 800  $\mu$ l autoklaviertes Glycerin mit 800  $\mu$ l Bakterienkultur versetzt.

### **2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde nach Birnboim & Doly (1979) modifiziert. Die selektive alkalische Denaturierung hochmolekularer genomischer DNA erfolgt bei gleichzeitiger Erhaltung der Doppelsträngigkeit zirkulärer DNA. Sie ist für die Extraktion kleiner und großer DNA-Plasmide einsetzbar.

### 2.2.8.1 Mini-Präparation

Für die Überprüfung des Klonierungserfolges wurde DNA aus Bakterien nach Transformation (Abschnitt 2.2.7) präpariert.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde Material aus einer Einzelkolonie entnommen und in 2 ml Ampizillin-haltiges LB-Medium inokuliert. Die Inkubation fand ü.N. im Schüttelinkubator bei 200 UpM und 37°C statt. Nach Zentrifugation von 1,6 ml Bakterienkultur (5 min, 3000 UpM, 25°C) wurde das Pellet in 80 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 160 µl 0,2 M NaOH/ 1% (w/v) SDS folgte vorsichtiges Über-Kopf-Schwenken. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe von 120 µl 5 M Kaliumacetat, pH 4,8 (Sambrook & Russel, 2001) beendet und Proteine, SDS sowie genomische DNA ausgefällt. Es folgten eine 15-minütige Inkubation auf Eis und die Sedimentation der Fällungsprodukte: 10 min bei 14.000 UpM und 4°C. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit 360 µl 2-Propanol ausgefällt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM und 25°C. Die DNA wurde mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges schloss sich eine Restriktionsanalyse der Minipräparationen an.

**Resuspensionspuffer**     25 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 50 mM Glukose/ 10 mM EDTA, pH 8,0/ 100 µg/ ml RNase A

### 2.2.8.2 Maxi-Präparation

Die Plasmid-DNA für Transfektionen bzw. Präparation von Vektor-DNA wurde in größeren Mengen isoliert.

Bakterien aus Kulturen nach Transformation bzw. aus Stammkulturen wurden in 100 ml-Kulturen ü.N. vermehrt. Nach Sedimentation (5 min, 3000 UpM, 25°C) wurden die Bakterien in 5 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 10 ml 0,2 M NaOH/ 1% (w/v) SDS und vorsichtiges Über-Kopf-Schwenken. Anschließend wurden 7,5 ml 5 M Kaliumacetat zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Aus dem Überstand nach Zentrifugation (10 min, 14.000 UpM, 4°C) erfolgte Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 22,5 ml 2-Propanol. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM und 25°C. Die DNA wurde mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und Phenol-Chloroform extrahiert (Abschnitt 2.2.9).

### **2.2.9 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Beseitigung verunreinigender Proteine zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden DNA-Präparationen nach Sambrook & Russel (2001) Phenol-Chloroform extrahiert.

### **2.2.10 DNA-Fällung**

Dieses Verfahren wurde zur Konzentrierung und Entsalzung von DNA-Lösungen angewendet. Zur wässrigen DNA-Lösung wurde  $\frac{1}{10}$  Volumen 4 M LiCl und 2 Volumina eiskalter Ethanol gegeben. Die Fällung erfolgte für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 14.000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

### **2.2.11 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierreaktion nach Sanger erfolgte mittels *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* für ABI PRISM-Systeme (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA) nach Angaben des Herstellers. In Tab. 5 sind die für die Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide aufgelistet.

**Tab. 5: Oligonukleotide für die Sequenzierung** aus der Polylinker-Region von pCEP-Pu (P) bzw. aus der internen Sequenz von Ln $\alpha$ 1VI/V (L)

Bezeichnung	Richtung	5'-3'-Sequenz
S1 (P)	strangabwärts	GATCTTCTTTCTCCTTGC
S2 (P)	strangabwärts	TAGTGAACCGTCAGATC
S3 (L)	strangabwärts	GCAGGTCTTTCAAGTTGC
S4 (L)	strangaufwärts	GGTTTCACAGTTGATCCC
S5 (P)	strangaufwärts	CTGGATCCGGCCTTGCC

Die Auswertung der Sequenzen wurde mittels SeqLab-Software (Genetics Computer Group/ USA) vorgenommen.

### 2.2.12 $\alpha^{32}\text{P}$ -Markierung von cDNA

Zum Nachweis von mRNA rekombinanter N-terminaler Fragmente von L $\alpha$ 1 wurde eine cDNA-Sonde hergestellt, welche für L $\alpha$ 1VI (Abschnitt 3.1.2.1) codiert. Alle klonierten Fragmente von L $\alpha$ 1 beinhalten diese Domäne. Die radioaktive Markierung der cDNA mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP wurde mit dem *Prime-It II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene Europe, Holland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.13 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von RNA aus 293-EBNA-Zellen wurde mit TriZol (Gibco, Eggenstein) den Empfehlungen des Herstellers folgend durchgeführt. Hierfür wurden Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale des zu analysierenden Klones eingesetzt. Die isolierte RNA wurde nach Waschen mit 70 % eiskaltem Ethanol und Trocknen im Vakuum in 100  $\mu\text{l}$  H $_2\text{O}$  resuspendiert. Abschließend fand eine Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2) zur Überprüfung der RNA-Präparation statt. Hierfür wurden 5  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung auf 1xRNA-Auftragspuffer eingestellt.

Die Lagerung von RNA erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

**5xRNA-Auftragspuffer** 80 % (v/v) Formamid, deionisiert/ 0,01 % (w/v) Bromphenolblau/ 0,01 % (w/v) Xylencyanol

### 2.2.14 Northern-Analyse

Die Analyse isolierter RNA auf ihren Gehalt an spezifischer mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonde (Abschnitt 2.2.12). Der RNA-Transfer auf Nylon-Membran (Northern Blot) nach Denaturierung durch Glyoxal wurde in Anlehnung an Burnett (1997) durchgeführt. Hierfür wurden ca. 2,5  $\mu\text{g}$  RNA mit 15  $\mu\text{l}$  Glyoxal-Reagenz versetzt und 1 h bei  $50^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 % (w/v) Agarose-BTPE-Gel bei einer Spannung von 1 bis 2 V/cm und  $4^\circ\text{C}$ . Zuvor wurden die Proben mit Farbmaler (Bromphenolblau/ Xylencyanol) versetzt. Es folgte ein Kapillartransfer der RNA auf Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei RT. Als Transfermedium wurde 10xSSC benutzt, der Kapillarsog wurde mittels Papiervlies erzeugt. RNA und Membran wurden durch Exposition mit 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene, USA) quervernetzt.



Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurde die Membran für 30 min bei 68°C geschüttelt. Hierfür wurde sie mit Hybridisierungspuffer in Kunststoffolie eingeschweißt. Für die anschließende Hybridisierung ü.N. wurde die radioaktive Sonde zugegeben. Unspezifische Hybridisierungen wurden einmal mit Waschpuffer A und mindestens zweimal mit Waschpuffer B von der Membran gewaschen. Hierfür wurde die Membran je 30 min in 500 ml Waschpuffer bei 68°C geschüttelt.

Die Autoradiographie auf BIOMAX MS (Kodak, Stuttgart) erfolgte bei -80°C. Die Entwicklung wurde mit einer Filmentwicklungsmaschine durchgeführt.

<b>BTPE</b>	30 mM Bis-Tris/ 10 mM PIPES/ 1 mM EDTA/ autoklaviert
<b>Glyoxal-Reagenz</b>	BTPE/ 10 % (v/v) 6 M Glyoxal, deionisiert/ 75 % (v/v) DMSO/ 4 % (v/v) Glycerol/ autoklaviert
<b>10x SSC</b>	1,5 M NaCl/ 0,15 M tri-Natriumcitrat
<b>Hybridisierungspuffer</b>	0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2/ 1 mM EDTA/ 7 % (w/v) SDS/ 1 % (w/v) BSA
<b>Waschpuffer A</b>	0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2/ 1 mM EDTA/ 7 % (w/v) SDS
<b>Waschpuffer B</b>	40 mM Natriumphosphat, pH 7,2/ 1 mM EDTA/ 1 % (w/v) SDS

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Ultrafiltration von Protein

Zur Vorbereitung auf die Gelfiltration wurden Proteinlösungen durch Ultrafiltration konzentriert. Dazu wurden diese im Amicon Diaflo-System 8200 (Amicon, USA) bei 4 bar und RT ultrafiltriert. Die Ausschlussgröße der Ultrafiltrationsmembran (Filtron, Karlstein) betrug 10 kDa.

### 2.3.2 Chromatographische Verfahren

#### 2.3.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde DEAE-Cellulose DE52 (Whatman, England) in einer Säule von  $2,5 \times 20$  cm (100 ml) auf einer Niederdruckanlage eingesetzt. Die spektralphotometrische Detektion erfolgte bei 278 nm.

Gegen Laufpuffer (0,05 M Tris-HCl, pH 8,6) dialysiertes Kulturmedium (Abschnitt 2.5.3) wurde bei einer Flussrate von 2 bis 3 ml/ min und RT an die äquilibrierte Matrix gebunden. Die Elution erfolgte mittels linearem NaCl-Gradienten (0 bis 0,5 M in Laufpuffer/ 800 ml). Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug ca. 18 ml. Nach SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4) wurde der Hauptpeak vereint und mittels Ultrafiltration (Abschnitt 2.3.1) auf die Gelfiltration vorbereitet.

#### 2.3.2.2 Präparative Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose

Die präparative Affinitätschromatographie wurde an Heparin-Sepharose CL6B (Pharmacia, Schweden) auf einer Niederdruckanlage durchgeführt. Bei einer Geometrie von  $2,5 \times 8$  cm betrug das Säulenvolumen 40 ml. Die spektralphotometrische Detektion erfolgte bei 278 nm.

Gegen Laufpuffer (0,05 M Tris-HCl, pH 7,4/ 0,1 M NaCl) dialysiertes Kulturmedium (Abschnitt 2.5.3) wurde bei einer Flussrate von 2 bis 3 ml/ min und RT an die äquilibrierte Matrix gebunden. Die Elution erfolgte mittels linearem NaCl-Gradienten (0,1 bis 0,6 M in Laufpuffer/ 600 ml). Das Fraktionsvolumen betrug ca. 18 ml. Nach SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4) wurde der Hauptpeak vereint und mittels Ultrafiltration (Abschnitt 2.3.1) auf die Gelfiltration vorbereitet.

### 2.3.2.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superose 12 HR 10/30- bzw. 16/50-Säule (Pharmacia, Schweden) an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Als Laufpuffer diente 0,2 M Ammoniumacetat, pH 6,9 bei einer Flussrate von 1,0 ml/ min. Es wurden Fraktionen von 300 µl bzw. 500 µl gesammelt. Die spektralphotometrische Detektion von Proteinen erfolgte bei 226 und 280 nm.

### 2.3.2.4 Umkehrphasen-HPLC

Die Trennung proteolytischer Fragmente von Laminin  $\alpha$ 1VI/V nach Spaltung mit Pepsin erfolgte durch Umkehrphasen-HPLC mit einer Vydac C4-Säule (Butyl 214TP54, Partikelgröße 5 µ/ Hesperia, USA). Als Flüssigphase wurde 0,1 % (w/v) Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Die mit Ameisensäure angesäuerte Proteinlösung wurde bei einer Flussrate von 1 ml/ min auf die Säule injiziert und mittels linearem Acetonitril-Gradienten (0 bis 60 % in TFA) eluiert. Die spektralphotometrische Detektion erfolgte bei 226 nm.

### 2.3.3 Präzipitation von Protein

Für die Vorbereitung niederkonzentrierter Proteinlösungen auf die SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4) erfolgte eine Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA). Die Proteinlösung wurde auf 1 % (v/v) Triton X-100 und 10 % (w/v) TCA eingestellt und 10 min auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde 10 min bei 14.000 UpM und 4°C sedimentiert. Nach Waschen mit eiskaltem Aceton wurde es im Vakuum getrocknet und auf 1xSDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.4) eingestellt.

### **2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Analyse von Proteinlösungen erfolgte durch denaturierende, diskontinuierliche Elektrophorese (Laemmli, 1970). Es wurden Minigele (10 × 9 × 0,5 cm) mit Polyacrylamid-Gradient (7 bis 22 %) benutzt. Vor der Auftrennung wurden die Proben auf 1xSDS-Probenpuffer eingestellt und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert.

Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau, CBB (Sigma, Deisenhofen) angefärbt und das Gel anschließend mit 10 % (v/v) Ethanol/ 7 % (v/v) Eisessig entfärbt.

<b>Sammelgel</b>	5,5 % (w/v) Acrylamid/ 130 mM Tris-HCl, pH 6,8/ 0,1 % (w/v) SDS/ 2 mM EDTA/ 0,1 % (v/v) TEMED/ 0,5 % (w/v) APS
<b>Trenngel</b>	7 bis 22 % (w/v) Acrylamid/ 390 mM Tris-HCl, pH 8,8/ 0,1 % (w/v) SDS/ 2 mM EDTA/ 0,05 % (v/v) TEMED/ 0,5 % (w/v) APS
<b>Acrylamid</b>	30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Protogel/ National Diagnostics, USA)
<b>Elektrophoresepuffer</b>	25 mM Tris/ 190 mM Glyzin/ 0,1% (w/v) SDS
<b>5xSDS-Probenpuffer</b>	65 mM Tris-HCl pH 6,8/ 10 % (v/v) Glycerin/ 2,3 % (w/v) SDS/ 0,01 % (w/v) Bromphenolblau/ 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
<b>CBB-Färbelösung</b>	0,1 % (w/v) CBB R 250/ 50 % (v/v) Ethanol / 10 % (v/v) Eisessig

### **2.3.5 Aminosäure- und Hexosamin-Analyse**

Der Aminosäure- und Hexosamin-Gehalt von Proteinen wurde mittels Aminosäure-Analysator nach 16-stündiger Hydrolyse mit 6 M HCl (Aminosäure) bzw. 3 M HCl (Hexosamin) bei 110°C unter Stickstoff ermittelt.

### **2.3.6 Chemische Modifikationen**

Die Acetylierung von Lysinen (Fraenkel-Conrat, 1957) und die Phenylglyoxylierung von Argininen (Takahashi, 1968) folgte publizierten Protokollen.

### **2.3.7 Proteolytische Degradation**

Die proteolytischen Spaltungen der Laminin-Fragmente mit Proteasen erfolgten unter den in Tab. 6 zusammengefassten Bedingungen.

**Tab. 6: Reaktionsbedingungen proteolytischer Degradationen**

Endoprotease	Enzym : Substrat-Ratio	Puffer	Temperatur [°C]
Elastase	1:100	0,05 M Tris-HCl, pH 7,4	37°C
Chymotrypsin	1:100	0,05 M Tris-HCl, pH 7,4	37°C
Trypsin	1:100	0,05 M Tris-HCl, pH 7,4	37°C
Pepsin	1:100	0,1 M Glyzin, pH 1,9	25°C

Analytische Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.4) und thermischer Denaturierung (5 min, 95°C) gestoppt. Präparative Umsetzungen mit Pepsin wurden mit 1 M Tris, pH 7,4 neutralisiert.

### **2.3.8 N-Deglykosylierung**

*N*-Glykosidase F (Peptid-*N*<sup>4</sup>-(acetyl- $\beta$ -glukosamyl)-Asparagin-Amidase) hydrolysiert *N*-Glykan-Ketten von Glykopeptiden und -proteinen.

2,5  $\mu$ g lyophilisiertes Protein wurden in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4/ 1% (w/v) SDS resuspendiert und 15 min bei 95°C denaturiert. Danach wurde der Ansatz auf 0,5 % NP40 zu einem Endvolumen von 9  $\mu$ l eingestellt. NP40 diente hierbei dem Aufbrechen der SDS-Mizelle. Nach Zugabe von 1 U *N*-Glykosidase F (Abschnitt 2.1.9) wurde ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.4) und thermischer Denaturierung (5 min, 95°C) gestoppt.

### **2.3.9 Abspaltung N-terminaler Pyroglutamylreste**

*N*-terminale Glutamine liegen oft in ihrer Pyroform vor und blockieren in dieser zyklischen Form den Edman-Abbau. Zur Vorbereitung auf die Proteinsequenzierung wurde Ln $\alpha$ 1VI/V mit *Pfu*-Pyroglutamat-Aminopeptidase umgesetzt.

100 pmol lyophilisiertes Protein wurden in H<sub>2</sub>O resuspendiert und mittels 5xPuffer (TaKaRa, Japan) auf die Reaktionsbedingungen eingestellt. Für die Reaktion wurde 1 mU Enzym (Abschnitt 2.1.9) zugegeben. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20  $\mu$ l. Nach

2½ h Inkubation bei 75°C wurde der Umsatz durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.4) und thermischer Denaturierung (5 min, 95°C) gestoppt. Abschließend erfolgten die elektrophoretische Trennung und der Transfer auf PVDF-Membran (Abschnitt 2.3.10).

### **2.3.10 N-terminale Sequenzierung nach Edman-Abbau**

Die Sequenzierung von Proteinen wurde zur Identifizierung und zur Bestimmung der N-terminalen Enden bzw. der Spaltstellen von Proteinfragmenten eingesetzt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Gasphasen-Sequenzierapparat nach Angaben des Herstellers und wurde von Dr. K. Mann (Abteilung Proteinchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Gereinigte Präparate wurden direkt auf eine PVDF-Membran (Immobilon-PSQ/ Millipore, USA) aufgetragen. Heterogene Proteingemische wurden elektrophoretisch getrennt und mittels Nassblot auf eine PVDF-Membran übertragen (Abschnitt 2.4.2). Nach Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.3.4) wurden die zu sequenzierenden Proteinbanden aus der Membran geschnitten.

### **2.3.11 <sup>125</sup>I-Markierung von Proteinen**

Die radioaktive Markierung von Proteinen für den Radioimmuntest erfolgte durch Iodierung von Tyrosinen nach der ChloraminT-Methode (Hunter & Greenwood, 1962). Dazu wurden 25 µg/ 100 µl Protein mit 0,5 mCi <sup>125</sup>I und 60 µg/ 100 µl ChloraminT versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 72 µg/ 120 µl Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde ad 2,5 ml mit 0,8 % Tween/ PBS verdünnt und gegen 0,8 % Tween/ PBS dialysiert.

### **2.3.12 Elektronenmikroskopie nach Kegelbedampfung**

Die elektronenmikroskopische Analyse der Proteine nach Kegelbedampfung erfolgte nach Engel & Furthmayr (1987).

### **2.3.13 CD-Spektroskopie**

Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen wurden CD-Spektren mit einem automatischen Spektropolarimeter aufgenommen. Für die Messungen wurde eine auf 20°C thermostatisierte Quarzküvette (Hellma, Müllheim) mit 1 mm optischer Weglänge verwendet. Die Proben wurden auf 100 µg/ ml eingestellt und bei 4°C gegen 0,02 M Natriumphosphat, pH 7,4 dialysiert. Die exakte Konzentration wurde im Anschluss an die Messung durch Aminosäurehydrolyse (Abschnitt 2.3.5) bestimmt. Die Sekundärstrukturanteile wurden mittels Contin-Fit-Software (Provencher & Glöckner, 1981) abgeschätzt.

### **2.3.14 Analytische Affinitätschromatographie**

Die analytische Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose wurde für die Analyse der Bindung rekombinanter Proteine an Heparin eingesetzt. Die ermittelte Bindungsaktivität für Heparin gibt die NaCl-Konzentration wieder, welche für die Elution notwendig ist. Die Chromatographie wurde mit einer 1 ml-HiTrap-Heparin-Säule (Pharmacia, Schweden) an einer FPLC-Anlage durchgeführt.

Es wurden ca. 100 µg Protein in 1 ml Laufpuffer (0,05 M Tris-HCl, pH 7,4) mit einer Flussrate von 0,5 ml/ min auf die äquilibrierte Säule injiziert. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 bis 0,6 M/ 35 ml) eluiert und in Fraktionen von 500 µl gesammelt. Die spektralphotometrische Detektion erfolgte bei 226 nm. Über die halbmaximale Peakhöhe wurde die NaCl-Konzentration bestimmt, die für die Elution des Proteins notwendig ist. Abschließend wurde das Protein mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4) identifiziert.

### **2.3.15 Ligandenbindungstest**

Die Ligandenbindungstests wurden nach einem modifizierten ELISA-Protokoll (Aumailley *et al.*, 1989) in 96er-Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Pro Vertiefung wurden jeweils 50 µl Flüssigkeit vorgelegt. Die Inkubationsschritte erfolgten in Blockierpuffer für 1 h bei RT. Nach jeder Inkubation wurde dreimal mit TBST gewaschen.

Einer der Bindungspartner wurde zu 10 µg/ ml 50 mM Natriumcarbonat, pH 9,2 verdünnt und ü.N. bei 4°C immobilisiert. Nach 2-stündiger Sättigung unspezifischer Bindun-

gen mit Blockierpuffer wurde mit einer linearen Verdünnungsreihe des zweiten Bindungspartners inkubiert. Es folgten die Inkubationen mit primärem (Abschnitt 3.4.1) und sekundärem Antikörper (Abschnitt 2.1.12). Abschließend erfolgte die ELISA-Farbreaktion (Abschnitt 2.4.3).

In Abhängigkeit der Liganden werden die Testbedingungen in Tab. 7 zusammengefasst:

**Tab. 7: Bedingungen der Ligandenbindungstests.** Die Phase zeigt den löslichen (L) bzw. den immobilen (I) Einsatz des Liganden im Test an.

Ligand	Phase	Bedingungen	Referenz
Sulfatid	I	110 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , Immobilisierung bei RT nach Lösen in Methanol zu 0,2 mg/ml	(Andac <i>et al.</i> , 1999)
Perlecan Fragmente	L	150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub>	(Friedrich <i>et al.</i> , 1999)

Aus der Auftragung Absorption gegen logarithmierter Ligandenkonzentration resultierte die Bindungskurve. Die Bindungsaktivität ergab sich aus der molaren Konzentration, die der halbmaximalen Bindung entsprach.

### **2.3.16 Inhibition der Lamininpolymerisation**

Die Inhibition der Lamininpolymerisation durch die Laminin-Fragmente wurde am Laminin-1/Nidogen-1-Komplex durchgeführt. Die Laminine wurden in 0,05 M Tris-HCl/ 150 mM NaCl/ 1 mM CaCl<sub>2</sub> zu einem Endvolumen von 500 µl verdünnt. Die Endkonzentration von Laminin-1 betrug jeweils 0,32 µM. Die inhibierenden Fragmente wurden in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eingesetzt. An die 4-stündige Polymerisation bei 35°C schloss sich die 15-minütige Sedimentierung der entstandenen Aggregate bei 10.000 UpM und 20°C an. Die Überstände wurden abgenommen und die Präzipitate bei 4°C in TBS/ 1 mM EDTA resuspendiert. Die Laminin-Konzentration der Fraktionen wurde mittels Radioimmuntest (Abschnitt 2.4.5) spezifisch für die C-terminalen LG-Module von Laminin-1 (Lnα1LG4-5) bestimmt.



### **2.3.17 Oberflächen-Plasmonresonanz**

Die Detektion von Oberflächen-Plasmonresonanzen (OPR) dient der kinetischen Echtzeitanalyse der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) von Ligand-Ligand-Interaktionen. Für die OPR-Analyse wird einer der Reaktionspartner an der carboxymethylierten Dextranschicht des Sensorchips mittels Succinimidesterkopplung immobilisiert (Johnsson *et al.*, 1991; Jonsson *et al.*, 1991; Maurer *et al.*, 1995). Der lösliche Ligand wird mit konstanter Flussrate über den immobilen Bindungspartner geleitet. Assoziation bzw. Dissoziation von Ligandenkomplexen lassen sich durch die zeitaufgelöste Änderungsrate der Ligandenkonzentration an der Oberfläche des Sensorchips ermitteln, welche über die Änderung der optischen Dichte erfasst wird. Die Änderung der Ligandenkonzentration um  $1 \text{ ng/mm}^2$  entspricht einem ORP-Signal von  $0,1^\circ$  und wird als 1000 *response units* (RU) definiert.

Die Messungen wurden mit einem BIAcore Biosensor System an einem CM5-Sensorchip (Pharmacia Biosensor, Freiburg) von Dr. W. Göhring (Abteilung Proteinchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bindung der löslichen Liganden erfolgte bei einer Flussrate von  $20 \mu\text{l/min}$  und  $25^\circ\text{C}$ . Der Nullwert wurde jeweils durch Bindung der löslichen Liganden an den leeren Sensorchip bestimmt und subtrahiert. Die kinetischen Parameter wurden mittels nicht-linearer Anpassung der Assoziations- und Dissoziationskurven nach dem 1:1-Modell mit der BIAevaluation Software Version 3.0 nach Angaben des Herstellers ermittelt (Fägerstam *et al.*, 1992).

### **2.3.18 Kristallisation von Protein**

Die Kristallisation erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  mittels Dampfdiffusion. Der hängende Tropfen wurde durch Mischen von  $4 \text{ ml } 12,5 \text{ mg/ml}$  Proteinlösung mit  $1,8 \text{ M}$  Ammoniumsulfat/ $100 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 7,9 hergestellt. Um die Bildung von Zwillingskristallen zu reduzieren wurden verschiedene bivalente Kationen im nM-Bereich zugegeben. Die Aufnahme der Datensätze erfolgte in monochromer CuK $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,541 \text{ \AA}$ ) einer rotierenden Anode (GX-20/ Elliott Bros., England) mittels eines Röntgen-Plattendetektors. Hochoaufgelöste Datensammlung fand am Synchrotron (DESY, Hamburg) statt ( $\lambda = 0,9418 \text{ \AA}$ ). Die kristallographische Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. J. Stetefeld (Abteilung für Biophysikalische Chemie des Biozentrums der Universität Basel, Schweiz).

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Herstellung und Reinigung polyklonaler Antiseren

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen wurden nach etablierten Protokollen (Timpl, 1982) hergestellt. Für Immunfluoreszenz-Messungen wurden die Antikörper affinitätsgereinigt.

### 2.4.2 Immunmarkierung nach Western-Transfer

Die Immunfärbung mittels spezifischer Antiseren nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose (Western-Blot) wurde für die Identifizierung von Proteinen eingesetzt.

Im Anschluss an die Elektrophorese (Abschnitt 2.3.4) erfolgte ein Nassblot auf eine Nitrocellulosemembran (BA 85/ Schleicher & Schuell, Dassel) in 0,04 M di-Natriumtetraborat ü.N. bei 4°C. Die angelegte Stromstärke betrug 1 mA/ cm<sup>2</sup>. Zur Überprüfung der Transfereffizienz und zur Kennzeichnung der Markerproteine wurde eine reversible Schnellfärbung mit Ponceaurot S (Sigma, Deisenhofen) vorgenommen.

Die Immunmarkierung erfolgte nach Sättigung unspezifischer Bindungen mit 1 % (w/v) BSA/ TNT durch Zugabe des spezifischen Kaninchenserums. Nach anschließender Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (Abschnitt 2.1.12) wurde die Membran in TN äquilibriert und mit 4CN-Reagenz entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Transfer der Membran in 0,1 N NaOH gestoppt.

Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 h bei RT. Nach jedem Inkubationensschritt wurde dreimal mit TNT gewaschen.

**4CN-Reagenz**                      TN/ 2,8 mM 4-Chloro-1-naphtol/ 17 % (v/v) Methanol/ 0,05 %  
(v/v) Perhydrol

### **2.4.3 ELISA-Farbreaktion**

Die angewandte Farbreaktion basiert auf der Entstehung eines braunen Niederschla- ges nach Oxidation von 5-Aminosalicylat (5AS) durch Antikörper-gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Nach Inkubation mit Sekundär-Antikörper und Waschen mit TBS wurde die Farb- reaktion durch Vorlegen von 100 µl 5AS-Reagenz pro Vertiefung gestartet. Mit Erreichen einer ausreichenden Färbung (5 bis 10 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N NaOH gestoppt. Die Messung der Absorptionsraten wurde in einem ELISA-Lesegerät bei 490 nm vorgenommen.

**5AS-Reagenz**                      0,1 % (w/v) 5-Aminosalicylat/ 20 mM Natriumphosphat, pH 6,8/  
0,05 % (v/v) Perhydrol

### **2.4.4 ELISA-Titration zur Bestimmung von Antikörpertitern**

Die Quantifizierung der Antigen-Antikörper-Affinität wurde in 96er-Mikrotiter- platten (Greiner, Frickenhausen) vorgenommen. Pro Vertiefung wurden jeweils 100 µl Flüssigkeit vorgelegt. Die Inkubationen erfolgten in Blockierpuffer für 1 h bei RT. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal mit TBST gewaschen.

Das Antigen wurde zu 10 µg/ ml 50 mM Natriumcarbonat, pH 9,2 verdünnt und ü.N. bei 4°C immobilisiert. Nach 2-stündiger Sättigung unspezifischer Bindungen mit Blockier- puffer (1 % (w/v) BSA/ TBS) wurde mit einer linearen Verdünnungsreihe des polyklonalen Antikörpers (Abschnitt 2.1.12) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit sekundärem Anti- körper (Abschnitt 2.1.12) und die Farbreaktion (Abschnitt 2.4.3).

Aus der Auftragung Absorption gegen logarithmierter Verdünnung resultierte die Ti- trationskurve. Der Titer ergab sich aus der Antikörper-Verdünnung, welche der halbmaxi- malen Bindung entsprach.

### **2.4.5 Radioimmuntest**

Der Radioimmuntest zur Bestimmung von Laminin-Konzentrationen (Abschnitt 2.3.16) folgte Standardprotokollen (Timpl, 1982). Dabei wurden 1 ng <sup>125</sup>Iod-markiertes Laminin α1LG4-5 mit einer konstanten Antikörperverdünnung in 0,4 ml eingesetzt und die Inhibition durch Laminin-1 über einen Konzentrationsbereich von 18 bis 5400 ng/ ml

ermittelt. Die Konzentration von Laminin-1 in den gelösten Präzipitaten und Überständen der Lamininpolymerisation wurden dann bei verschiedenen Verdünnungen anhand von Kalibrierungskurven bestimmt.

#### **2.4.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die histologischen Präparate muriner Gewebe entstammten der Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried. Die 5 µm-Gefrierschnitte wurden mit einem Kryomikrotom angefertigt und auf Objektträger (Superfrost/ Menzel-Gläser, Braunschweig) übertragen. Die Fixierung und Präparation der Gewebe sowie die Immunfärbung der luftgetrockneten Gefrierschnitte folgte publizierten Protokollen (Sasaki *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1998). Die gefärbten Gewebeschnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert und mittels digitalem Kamerasystem dokumentiert.

## **2.5 Zellkultur-Methoden**

### **2.5.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Die adhäsiven 293-EBNA-Zellen (Abschnitt 2.1.8) wurden in 10 cm-Kulturschalen (Falcon/ Becton Dickinson, Heidelberg) oder 750 ml-Zellkulturflaschen (Falcon/ Becton Dickinson, Heidelberg bzw. Triple-Flask/ NUNC, Wiesbaden) in DMEM-Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Transfizierte Zellen wurden unter Selektionsdruck mit 0,5 mg/ l Puromyzin gehalten.

Die Passage konfluent bewachsener Schalen erfolgte nach Ablösen des Zellrasens mit PET. Die Zellen wurden darauf in DMEM-Medium resuspendiert und verdünnt ausgesät.

### **2.5.2 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion der 293-EBNA-Zellen wurde nach Chen & Okayama (1987) durchgeführt. Der Methode liegt die phagozytotische Aufnahme von DNA-Präzipitaten zugrunde. Die Bildung der Calciumphosphat-DNA-Komplexe wird durch CaCl<sub>2</sub> induziert. Nach Selektion mit Puromyzin wurden die Zellen FKS-frei kultiviert. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE bzw. Immunmarkierung nach Western-Transfer getestet.

### **2.5.3 Herstellung konditionierten Mediums**

Konfluent bewachsene Zellkulturflaschen (Abschnitt 2.5.1) wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit FKS-freiem DMEM-Medium (0,5 mg/ l Puromyzin) überschichtet. Alle 48 bis 72 h wurde das Medium abgenommen und mit Proteaseinhibitoren (1 mM NEM, 1 mM PMSF) versetzt. Nach der Sedimentation von Zelltrümmern (10 min bei 1000 UpM und 4°C) wurde es bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

### **2.5.4 Lagerung von Zellen**

Die Zellen einer nahezu konfluent bewachsenen 10 cm-Zellkultursschale wurden mit PET abgelöst, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Nalgene-Einfrier Röhrchen (NUNC, Wiesbaden) überführt. Nach langsamem Einfrieren bei -80°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3 Ergebnisse

Laminine sind zur Bildung von Netzwerken und Filamenten befähigt. Diese strukturgebende Funktion macht sie zu einem ubiquitären Bestandteil der ECM. Die Ausbildung extrazellulärer Strukturen wird durch ein komplexes Konzert regulatorischer Mechanismen innerhalb verschiedener Entwicklungsprozesse wie Embryogenese, Wachstum und Regeneration gesteuert.

Dem LN-Modul wird die Vermittlung der Lamininpolymerisation zugesprochen. Die Kenntnis der mit ihm interagierenden Liganden soll zur Ergründung des Polymerisationsprozesses und dessen Regulation beitragen. Rekombinante Methoden ermöglichen die Darstellung ausreichender Mengen stabiler Proteinfragmente, die eine Eingrenzung auf die untersuchte Region zulassen und die Voraussetzung für Mutationsstudien schaffen. Dadurch werden Polymerisationsstudien mit beliebigen Laminin-Ketten möglich.

Die ein LN-Modul enthaltenden Laminin-Ketten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf ihre Polymerisationskompetenz und die Interaktion mit potentiellen Modulatoren des Prozesses untersucht. Die murinen Isoformen wurden hinsichtlich ihrer vervollständigten Sequenzen und molekularen Eigenschaften wie Struktur, Glykosylierung und Proteasestabilität verglichen. Neben der Erforschung ihres Bindungs- und Polymerisationsverhaltens, ermöglichte eine eingehende Mutationsstudie die Lokalisierung der Bindungsepitope des LN-Moduls von Laminin  $\alpha 1$ . Durch eine immunologische Analyse muriner Gefrierschnitte wurde ferner die Gewebeverteilung der Ketten  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  untersucht.

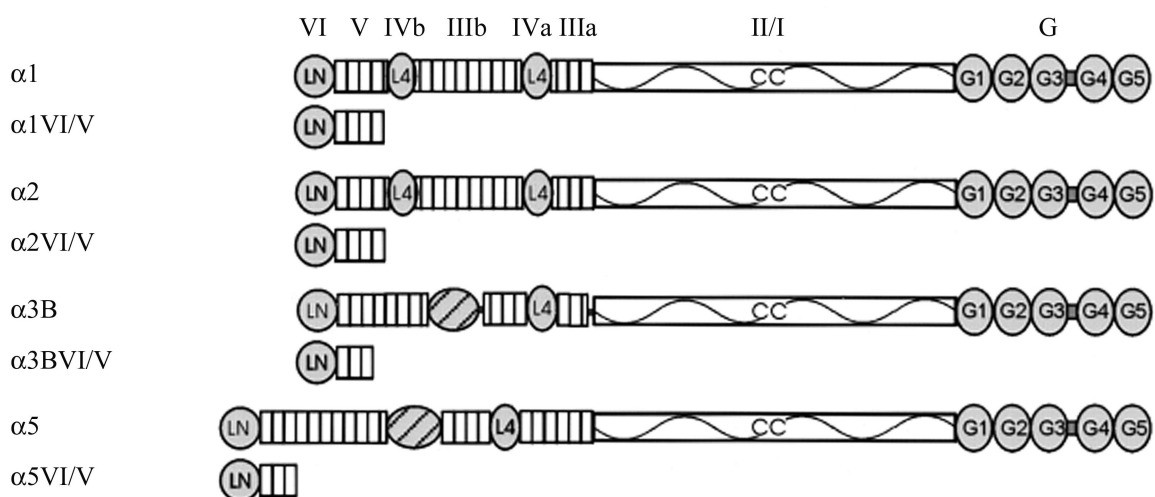
#### 3.1 Rekombinante Analyse der N-terminalen Regionen muriner Laminin $\alpha$ -Ketten

##### 3.1.1 Sequenzen: Herkunft und Komplettierung

Die Sequenzen der N-terminalen Regionen und der Signalpeptide der Laminin  $\alpha 3B$ - (GenBank U88353) und  $\alpha 5$ -Ketten (GenBank U37501) lagen zu Beginn dieser Arbeit nur unvollständig vor. Die Vervollständigung der Sequenzdaten wurde mittels RT-PCR vorgenommen. Als Vorlage diente mRNA aus murinen embryonalen Endothelzellen ( $\alpha 3B$ ) (Hatzopoulos *et al.*, 1998) sowie murinen epidermalen Pam-212-Zellen ( $\alpha 5$ ) (Utani *et al.*, 1997). Die kompletten Sequenzen der  $\alpha 1$ -Ketten (GenBank J04064) und  $\alpha 2$ -Ketten (GenBank U12147) waren bekannt.

Als cDNA-Vorlage für die Klonierung von  $\text{Ln}\alpha 1$ -Fragmenten diente ein 1,8 kb *XbaI/StuI*-Fragment, welches für die gesamte N-terminale Region codiert (Sasaki *et al.*, 1988). Als Vorlage für das Fragment VI/V von  $\text{Ln}\alpha 2$  diente mRNA aus adultem Herz. Für die cDNA der Laminine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  wurde am 5'-Ende der offene Leserahmen sowie die ATG-Sequenz für das Start-Methionin der Translation bestätigt.

Durch die Vervollständigung der Sequenzinformation wurde die Grundlage für die Fragmente VI/V von Laminin  $\alpha 1$  ( $\alpha 1\text{VI/V}$ ),  $\alpha 2$  ( $\alpha 2\text{VI/V}$ ),  $\alpha 3\text{B}$  ( $\alpha 3\text{BVI/V}$ ) und  $\alpha 5$  ( $\alpha 5\text{VI/V}$ ) geschaffen. Während die Fragmente VI/V der Ketten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  die vier LE-Module der gesamten Domäne V enthalten, wurden die der Ketten  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  mit drei LE-Modulen kloniert, welche für die Stabilisierung eines LN-Moduls notwendig sind (Abschnitt 3.1.2.1). Die Laminin  $\alpha$ -Ketten und die hergestellten N-terminalen Fragmente VI/V sind schematisch in Abb. 8 abgebildet. Deren Klonierung und Darstellung wird in folgendem Abschnitt 3.1.2 beschrieben.



**Abb. 8: Laminin  $\alpha$ -Ketten und deren N-terminalen Fragmente VI/V.** Die N-terminalen Domänen VI werden durch das LN-Modul (LN) gebildet. Es folgen die LE-Module ( $\square$ ) der Domänen V. Die Fragmente VI/V der Ketten  $\alpha 1$  ( $\alpha 1\text{VI/V}$ ) und  $\alpha 2$  ( $\alpha 2\text{VI/V}$ ) wurden mit vier LE-Modulen kloniert, die der Ketten  $\alpha 3\text{B}$  ( $\alpha 3\text{BVI/V}$ ) und  $\alpha 5$  ( $\alpha 5\text{VI/V}$ ) mit jeweils drei (Abschnitt 3.1.2.2). Modifiziert nach Colognato & Yurchenco (2000).

Durch Klonierung der Fragmente mit ihren authentischen Signalpeptiden und Sequenzierung der prozessierten Proteine konnten die N-terminalen Enden der Proteine bestimmt bzw. im Falle von  $\text{Ln}\alpha 1$  bestätigt werden. Das prozessierte  $\text{Ln}\alpha 2$  ist um 11 Aminosäuren länger, als bisher postuliert (Bernier *et al.*, 1995). Die Sequenzen der Laminine  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  sowie derer Signalpeptide konnten um 49 bzw. 83 Aminosäuren vervollständigt werden (GenBank AJ293592/ AJ293593). Der Vergleich in Abb. 9 stellt die komplettierten Sequenzen der erzeugten Fragmente gegenüber.

$\alpha 1$	1					MRGS	GTGAALLVLL	ASVLWTVTRS	24	
$\alpha 2$	1						MPAATAGIL	LLLLLGTLEG	19	
$\alpha 3B$	1				M	AVALGRAPRS	LPLLLLLLLL	LLLRMSPSWS	31	
$\alpha 5$	1				MAK	RGGLCA	GSAPGALGPR	SPAPRLLLL	LAGLALVGEA	40
$\alpha 1$	25	.....	.QQRGLFPAI	LNLATNAHIS	ANATCGEKGP	.....E	MFCKLV....	.EHVPGRPVR	69	
$\alpha 2$	20		SQTQRRQSQ	HQQRGLFPAV	LNLASNALIT	TNATCGEKGP	.....E	MYCKLV....	.EHVPGQPVR	75
$\alpha 3B$	32	..	VVGQDHP	MSSRSLHPPY	FNLAQAARIW	ATATCGERDP	..EVSRRPE	LFCKLVGGPA	AQGS.GHTIQ	95
$\alpha 5$	41	.....	RTPG	GDGFSLHPPY	FNLAEGARIT	ASATCGEEAP	TRSVSRPTED	LYCKLVGGPV	AGGDPNQTIQ	104
$\alpha 1$	70		HAQCRVCDGN	STNPRERHPI	SHAIIDGTNNW	WQSPSIQNGR	EYHWVTITLD	LRQVFQVAYI	IKAANAPRP	139
$\alpha 2$	76		NPQCRICNQN	SSNPYQRHPI	TNAIDGKNTW	WQSPSIKNGV	EYHYVTITLD	LQQVFQIAYV	IVKAANSRPP	145
$\alpha 3B$	96		GQFCDYC..N	SEDSRKAHPA	SHAIIDGSRW	WQSPPLSSGT	QYNQVNLTL	LGQLFHVAYI	LIKFANSRPP	163
$\alpha 5$	105		GQYCDIC..T	AANSNKAHPV	SNAIDGTERW	WQSPPLSRGL	EYNEVNVTL	LGQVFHVAVY	LIKFANSRPP	172
$\alpha 1$	140		GNWILERSVD	.GVKFKPWQY	YAVSDTECLT	RYKITPRRGP	PTYRADNEVI	CTSYYSKLVP	LEHGEIHTSL	208
$\alpha 2$	146		GNWILERSLD	.DVEYKPWQY	HAVTDECLT	LYNIYPRTGP	PSYAKDDEVI	CTSFYSKIHP	LENGEIHTSL	214
$\alpha 3B$	164		DLWILERSVD	FGSTYSPWQY	FAHSRRDCVE	QFG...QEAN	MAITQDDQML	CVTEYSRIVP	LENGEIVVSL	230
$\alpha 5$	173		DLWVLERSTD	FGHTYQPWQF	FASSKRDCLE	RFG...PRTL	ERITQDDVVI	CTTEYSRIVP	LENGEIVVSL	239
$\alpha 1$	209		INGRPSADD.	.PSPQLLEFT	SARYIRLRLO	RIRTLNADLM	TLSHRDLRDL	DPIVTRRRYY	SIKDISVGGM	276
$\alpha 2$	215		INGRPSADD.	.PSPQLLEFT	SARYIRLRLO	RIRTLNADLM	MFAHKDPREI	DPIVTRRRYY	SVKDISVGGM	282
$\alpha 3B$	231		INGRPGAKKF	AFSDTLREFT	KATNIRLRF	RTNTLLGHLI	SKAER....	DPTVTRRRYY	SIKDISVGGM	295
$\alpha 5$	240		VNGRPGALNF	SYSPLLRDFT	KATNIRLRF	RTNTLLGHLM	GKALR....	DPTVTRRRYY	SIKDISIGGR	304
			*					*		
$\alpha 1$	277		CICYGHASSC	PWDEEAK..Q	LQCCQEHNTC	GESCDRCCPG	YHQQPWRPGT	ISSGNECEEC	NCHNKAKDCY	344
$\alpha 2$	283		CICYGHARAC	PLDPATN..K	SRCECEHNTC	GESCDRCCPG	FHQKPWRAGT	FLTKSECEAC	NCHGKAECCY	350
$\alpha 13B$	296		CVCNGHAEAC	SADNPEKQFR	..CECQHHTC	GDTNCRCCAG	YNQRRWPAG	QEQHNECEAC	NCHGHAVDCY	363
$\alpha 5$	305		CVCHGHADVC	DAKDPLDPFR	LQCAQHHNTC	GGSCDRCCPG	FNQQPWKPAT	TDSANECQSC	NCHGHAYDCY	374
								*		
$\alpha 1$	345		YDSSVAKERR	SLNTAGQYSG	GGVCVNCSSQ	TTGINCETCI	DQYRPHKVS	PYDDHPCRPC	NCDPVGSLSS	414
$\alpha 2$	351		YDETVASRNL	SLNIHGKYIG	GGVCINCETH	TAGINCETCV	DGFFRPHKVS	PNYRPRCQPC	HCDPTGSLSE	420
$\alpha 3B$	364		YDPDVEHQQA	SLNSKGVYAG	GGVCINCQHN	TAGVNCCKCA	KGYFRPHGVP	VDALHGCI	SCDP..ERADD	427
$\alpha 5$	375		YDPEVDRRNA	SQNQDNVYQG	GGVCLDCQHH	TTGINCERCL	PGFFRAPDQP	LDSPHVCRPC	DQES..DFTDG	436
								*		
$\alpha 1$	415		VCIKDDRHAD	LANGKWPQC	PCRKGYAGDK	CDRCQFGYRG	FPNCIP...CD	CRTVGSLNED	PCIEPCLCKK	482
$\alpha 2$	421		VCVKDEKYAQ	..RGLKPGSC	HCKTGFGGVN	CDRCVRYGYP	YDCQP...CN	CSGLGSTNED	PCVGPSCSKE	486
$\alpha 3B$	428		.C.....	...DQGSCHC	HCKPNFSGDY	CETCADGYYN	FPFCLRIP..	.....	.....	468
$\alpha 5$	437		TC.....	...EDLTGRC	YCRPNFTGEL	CAACAEGYTD	FPHCYPLP..	.....	.....	480
$\alpha 1$	483		NVEGKNCDRC	KPGFYNLKER	NPEGQSE					509
$\alpha 2$	487		NVEGEDCSRC	KSGFFNLQED	NQKGCE.					512
$\alpha 3B$	468		.....	.....	.....					468
$\alpha 5$	480		.....	.....	.....					480

**Abb. 9: Sequenzvergleich der rekombinanten Laminin-Fragmente  $\alpha 1VI/V$ ,  $\alpha 2VI/V$ ,  $\alpha 3VI/V$  und  $\alpha 5VI/V$ .** Das Ende der Signalpeptide ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Domänen VI wurden um drei bzw. vier LE-Module verlängert. Der Beginn eines LE-Moduls ist durch einen Stern markiert. Cysteine sind grau unterlegt. Asparagine potentieller N-Glykosylierungsstellen (NXT/S-Sequenzen) sind fett dargestellt.

Die Größe der LN-Module variiert von 253 bis 264 -, die ihrer Signalpeptide von 19 bis 40 Aminosäuren. Die Signalpeptide besitzen den charakteristischen hydrophoben Kern sowie kleine ungeladene Reste auf den Positionen -3 und -1 (Martoglio & Dobberstein, 1998). Der Vergleich der LN-Module zeigt ein hochkonserviertes Verteilungsmuster der jeweils sechs Cysteine, welches durch einige Sequenzlücken unterbrochen wird. Die Verteilung beider potentieller N-Glykosylierungsstellen von  $\alpha 1VI/V$  und  $\alpha 2VI/V$  ist identisch.  $\alpha 3VI/V$  beinhaltet eine NXT/S-Sequenz, parallel zu einer der drei von  $\alpha 5VI/V$ .



Tab. 8 verifiziert die Ähnlichkeiten der Kettenpaare: Aus den Sequenzen der LN-Module wurden deren Identitäten mittels SeqLab-Software (Genetics Computer Group/USA) errechnet. Das Programm verwendet Algorithmen nach Needleman & Wunsch (1970).

**Tab. 8: Sequenz-Identitäten der LN-Module von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$**

Kette	Identität [%]
$\alpha 1$ vs. $\alpha 2$	77,4
$\alpha 3B$ vs. $\alpha 5$	72,4
$\alpha 1/2$ vs. $\alpha 3B/5$	52,5

Die Identität der LN-Module aller Ketten beträgt 60 %. Die Verwandtschaft zwischen den Kettenpaaren  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  ( $\alpha 1/2$ ) sowie zwischen  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  ( $\alpha 3B/5$ ) korreliert mit ihren evolutionären Beziehungen (Abschnitt 1.1.3.3).

Tab. 9 fasst die Anzahl der LN-Modul aufbauenden Aminosäuren der murinen Laminin  $\alpha$ -Ketten und die Herkunft der Sequenzdaten zusammen.

**Tab. 9: Murine Laminin  $\alpha$ -Isoformen: Größe der LN-Module und ihrer Signalpeptide**

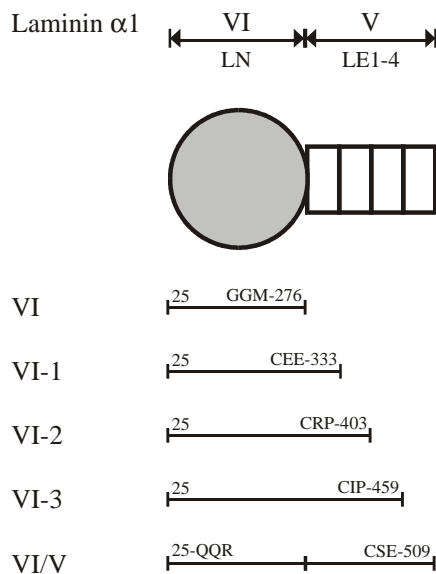
Kette	Total [AA]	Signalpeptid [AA]	LN-Modul [AA]	Referenzen
$\alpha 1$	276	24	252	GenBank J04064 (Sasaki <i>et al.</i> , 1988)
$\alpha 2$	282	19	263	GenBank U12147 (Xu <i>et al.</i> , 1994; Bernier <i>et al.</i> , 1995)
$\alpha 3B$	295	31	264	GenBank U88353 (Miner <i>et al.</i> , 1997) GenBank AJ293592 (Garbe <i>et al.</i> , 2001)
$\alpha 5$	304	40	264	GenBank U37501 (Miner <i>et al.</i> , 1995) GenBank AJ293593 (Garbe <i>et al.</i> , 2001)

### **3.1.2 Laminin-Fragmente VI/V: Rekombinante Produktion und Darstellung**

#### **3.1.2.1 Expressionsstudie zur Bestimmung der Mindestanzahl stabilisierender LE-Module**

Das LN-Modul der Laminine stellt keine autonome Faltungseinheit dar. Ettner *et al.* (1998) etablierten die rekombinante Produktion der Domänen VI/V mit vier LE-Modulen; die Expression des LN-Moduls allein gelang nicht. Mayer *et al.* (1993) brachten einzelne LE-Module von L $\alpha$ 1 (III3 & 4) zur stabilen Expression, was auf eine kompakte Struktur hindeutet, die stabilisierend auf die Faltung des LN-Moduls wirken kann.

Anhand einer Expressionsstudie sollte die Anzahl an LE-Modulen bestimmt werden, die für die Stabilisierung des LN-Moduls notwendig ist. Damit wurde die Grundlage für die Herstellung der Expressionsvektoren der Fragmente VI/V geschaffen. Durch Standard-PCR wurden N-terminale Expressionskonstrukte von  $\text{Ln}\alpha 1$  hergestellt, welche neben dem LN-Modul null bis vier LE-Module enthielten. Abb. 10 stellt die klonierten Fragmente vor.



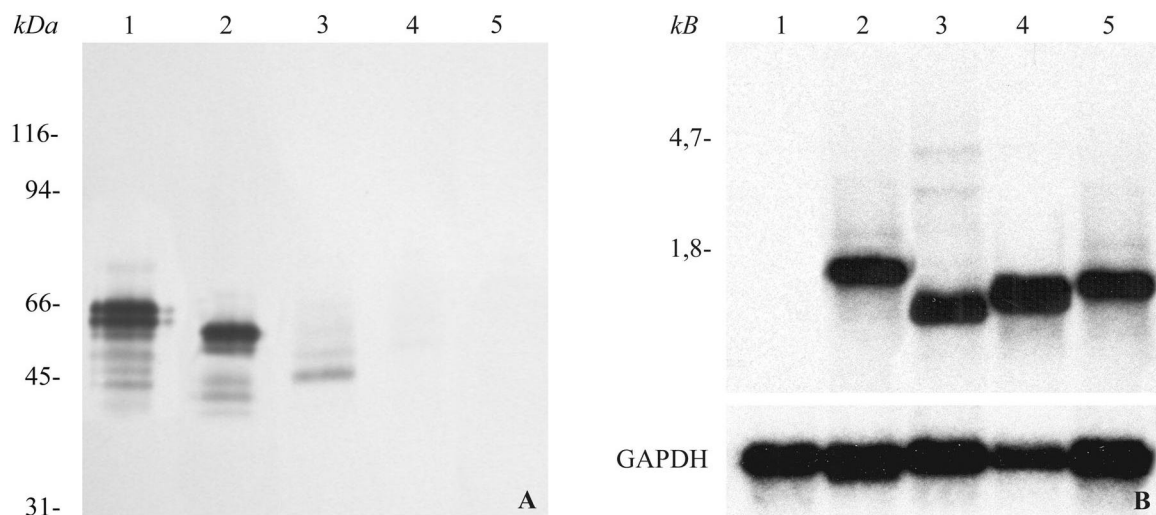
**Abb. 10: Fragmente von Laminin  $\alpha 1$  für Expressionsstudien in 293-EBNA-Zellen.** Das LN-Modul (Domäne VI) wurde um jeweils 1 LE-Modul erweitert. Der Index -1 bis -3 gibt die Anzahl der LE-Module an. Die gesamte Domäne V umfasst 4 LE-Module. Numerierung nach Sasaki *et al.* (1988).

Das für die N-terminale Region codierende 1,8 kb *XbaI/StuI*-Fragment (Abschnitt 3.1.1) diente als cDNA-Vorlage für die Klonierung aller hergestellten Fragmente von  $\text{Ln}\alpha 1$ . Für die Amplifikation mit Vent-Polymerase durch Standard-PCR wurden die Oligonukleotide O1 bis O6 eingesetzt (Tab. 10). Dadurch wurden Schnittstellen für *NheI* am 5'-Ende (O1) und *NotI* sowie ein Stopp-Kodon am 3'-Ende (O2 bis O6) eingeführt. Die Klonierung über *NheI* in den episomalen Expressionsvektor pCEP-Pu (Abschnitt 2.1.10) gestattet die Insertion der Proteine strangaufwärts des Signalpeptids von humanem Basalmembranprotein BM-40 (Kohfeldt *et al.*, 1997). Für die Erhaltung des Leserahmens wurde angrenzend an die Restriktionsschnittstelle ein T eingeführt. Diese Klonierungsstrategie führte zur N-terminalen Verlängerung jedes sekretierten Proteins um die vier Aminosäuren APLA. Das BM-40-Signalpeptid wurde eingesetzt, da hiermit eine effiziente Expression und Sekretion von ECM-Proteinen erzielt werden konnte (Mayer *et al.*, 1993; Kohfeldt *et al.*, 1998; Hopf *et al.*, 1999). Die entstandenen Fragmente wurden über Agarosegel gereinigt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit *NheI/NotI*. Nach erneuter Reinigung durch Agarose-Elektrophorese erfolgte Ligation mit T4-DNA-Ligase in den linearisierten Vektor. Die korrekte Sequenz der PCR-Produkte und deren Insertion im richtigen Leserahmen wurde durch Sequenzierung bestätigt.

**Tab. 10: Oligonukleotide für die Klonierung der Laminin-Fragmente  $\alpha$ 1VI (A),  $\alpha$ 1VI-1 (B),  $\alpha$ 1VI-2 (C),  $\alpha$ 1VI-3 (D) und  $\alpha$ 1VI/V-BM (E).**

Bez.	Fragment	Richtung	5'-3'-Sequenz
O1		strangabwärts	GCCCCGCTAGCACAGCAGAGAGGCTTGTTC
O2	A	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCACATGCCTCCAACGGAAATG
O3	B	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCATTCTCACACTCGTTGCCG
O4	C	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCAGGGACGGCAAGGGTGGTC
O5	D	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCAGGGGATGCAATTTGGGAAAC
O6	E	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCACTCGGAGCAGCCCTCGG

$\alpha$ 1VI/V-BM enthält die durch Expression via BM-40-Signalpeptid erzeugten Aminosäuren APLA, wodurch es sich vom Fragment  $\alpha$ 1VI/V unterscheidet, welches mit dem authentischen Signalpeptid kloniert wurde (Abschnitt 3.1.2). Die Expression der Fragmente  $\alpha$ 1VI/V-BM und  $\alpha$ 1VI-3 erfolgte in vergleichbar guter Ausbeute.  $\alpha$ 1VI-2 wurde in sehr geringen Mengen exprimiert und konnte nur durch Immunmarkierung detektiert werden (Abb. 11A).  $\alpha$ 1VI-1 und  $\alpha$ 1VI wurden überhaupt nicht exprimiert. Die mRNA-Transkription der nicht exprimierten Fragmente wurde durch Northern-Analyse bestätigt (Abb. 11B). Die Ergebnisse der Expressionsstudie sind in Abb. 11C zusammengefasst.



C

Fragment	Protein	mRNA
$\alpha$ 1VI	-	+
$\alpha$ 1VI-1	-	+
$\alpha$ 1VI-2	+/-	n.b.
$\alpha$ 1VI-3	+	n.b.
$\alpha$ 1VI/V	+	+

**Abb. 11A-C: Immunmarkierung und Northern-Analyse der Expressionsstudie.** Der Western-Blot (A) zeigt die Fragmente  $\alpha$ 1VI/V-BM (1),  $\alpha$ 1VI-3 (2),  $\alpha$ 1VI-2 (3),  $\alpha$ 1VI-1 (4), und  $\alpha$ 1VI (5). Jeweils 40  $\mu$ l Kulturmedium wurden in einer SDS-PAGE nicht-reduzierend aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulose mit Anti- $\alpha$ 1 (Abschnitt 3.4.1) immunmarkiert. Als Negativkontrolle im Northern-Blot (B) diente RNA aus nicht-transfizierten Zellen (1). Nachgewiesen wurde mRNA von  $\alpha$ 1VI/V-BM (2),  $\alpha$ 1VI (3),  $\alpha$ 1VI-1 (4) und  $\alpha$ 1VI-2 (5). Die Hybridisierung erfolgte mit  $\alpha$ 1VI- bzw. mit GAPDH-spezifischer cDNA-Sonde als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen. Zusammenfassend werden die Ergebnisse der Studie tabellarisch dargestellt (C). Nicht bestimmt (n.b.).

Nach den Ergebnissen der Expressionsstudie sind für die stabile Faltung eines LN-Moduls der Laminine mindestens drei flankierende LE-Module der Domäne V notwendig.

### 3.1.2.2 Herstellung der Expressionskonstrukte

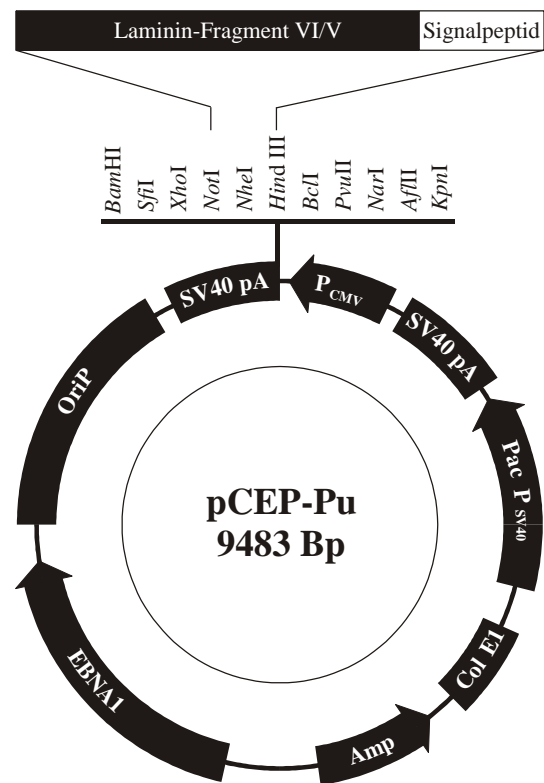
Für die Amplifikation von  $\alpha 1\text{VI/V}$  mit Vent-Polymerase durch Standard-PCR wurden die Oligonukleotide O7 und O8 eingesetzt (Tab. 11). Dadurch wurden Schnittstellen für *HindIII* am 5'-Ende (O7) und *NotI* sowie ein Stopp-Kodon am 3'-Ende (O8) eingeführt. Das entstandene Fragment wurde über Agarosegel gereinigt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit *HindIII/NotI*. Nach erneuter Reinigung durch Agarose-Elektrophorese erfolgte Ligation mit T4-DNA-Ligase in den episomalen Expressionsvektor pCEP-Pu.

**Tab. 11: Oligonukleotide für die Klonierung der Fragmente VI/V in pCEP-Pu**

Bezeichnung	Richtung	5'-3'-Sequenz
O7	strangabwärts	GGGAAGCTTATGCGCGGCAGCGGCAC
O8	strangaufwärts	TCAGTTAGCGGCCGCTCACTCGGAGCAGCCCTCGG
O9	strangabwärts	GTCATCTAGAGCCAGGATGCCTGCGGCCACC
O10	strangaufwärts	GTCACTCGAGCTACTCCTCACAGCCTTTCTG
O11	strangabwärts	GTCAGCTAGCGCCGCGGGATGGCG
O12	strangaufwärts	GTCACTCGAGCTATGGAATTCTCAAGCAAAATGG
O13	strangabwärts	GTCAGCTAGCCCAGCAGGAAAATGGCGAAGC
O14	strangaufwärts	GTCACTCGAGCTAAGGCAGAGGGTAGCAGTG

Die Klonierung der Fragmente VI/V der Laminin-Ketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  wurde durchgeführt von Dr. T. Sasaki, Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried. Die durch RT-PCR erzeugte cDNA der N-terminalen Regionen von  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  (Abschnitt 3.1.1) codiert für deren Signalpeptide und die Fragmente VI/V. Die entstandenen Fragmente wurden über *NheI/XhoI* wie beschrieben in pCEP-Pu kloniert. Hierfür wurden folgende Oligonukleotid-Paare eingesetzt: O9/10 für  $\alpha 2\text{VI/V}$ , O11/12 für  $\alpha 3\text{BVI/V}$  und O13/14 für  $\alpha 5\text{VI/V}$ . Die korrekte Sequenz aller PCR-Produkte und deren Insertion im richtigen Leserahmen wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Eine Karte des resultierenden Expressionsvektors ist in Abb. 12 dargestellt.



**Abb. 12: Kodierender Expressionsvektor pCEP-Pu für die Laminin-Fragmente VI/V.** Der Vektor beinhaltet den Promotor des Cytomegalie-Virus ( $P_{CMV}$ ), das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus-40 (SV40 pA), ein Puromycinresistenzgen (Pac), den Promotor des Simian-Virus-40 ( $P_{SV40}$ ), den Replikationsursprung aus *E. coli* (Col E1), ein Ampizillinresistenzgen (Amp) und das Replikationssystem des Epstein-Barr-Virus aus Eukaryoten (OriP/ EBNA1).

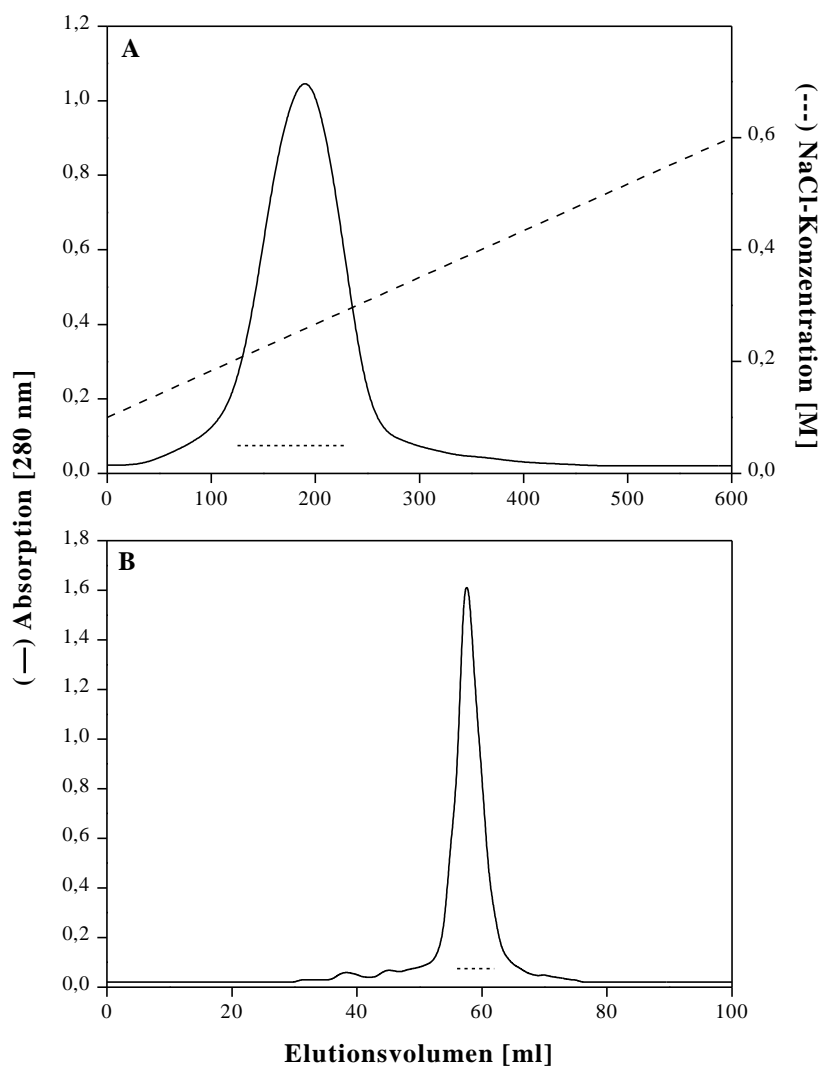
### 3.1.2.3 Transfektion und Expression

Die Transfektion in 293-EBNA-Zellen erfolgte nach Chen & Okayama (1987). Nach Selektion mit Puromycin wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. Die Abnahme des Kulturmediums fand unter Zusatz von Protease-Inhibitoren statt; dessen Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Expressionsraten wurden mittels Radioimmuntest aus dem Kulturüberstand bestimmt. Alle Fragmente konnten in vergleichbaren Ausbeuten effizient exprimiert werden (5 bis  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}/\text{Tag}$ ).

### 3.1.2.4 Reinigung

Die Darstellung von  $\alpha 1\text{VI/V}$  und  $\alpha 2\text{VI/V}$  erfolgte ausgehend von 1 l bzw. 0,6 l serumfrei konditioniertem Kulturmedium. Beide Proteine zeigten in Vorversuchen (analytische Affinitätschromatographie von dialysiertem Medium) Bindung an Heparin: eine Ionenstärke von 0,27 M NaCl war für die Elution von  $\alpha 1\text{VI/V}$  notwendig und eine Ionenstärke von 0,24 M NaCl für  $\alpha 2\text{VI/V}$ . Daher wurde als erster Reinigungsschritt eine Heparin-Affinitätschromatographie eingesetzt.  $\alpha 1\text{VI/V}$  wurde gegen 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4/ 0,1 M NaCl dialysiert, für  $\alpha 2\text{VI/V}$  wurde 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4 gewählt. Es wurde an Heparin-Sepharose im selben Puffer chromatographiert. Zur Vorbereitung auf die Gelfiltration mit einer Superose 12 HR 16/50-Säule wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration eingengt.

Die Elutionsprofile beider Aufreinigungen entsprachen einander und werden exemplarisch für die Reinigung von  $\alpha 1\text{VI/V}$  in Abb. 13 gezeigt.



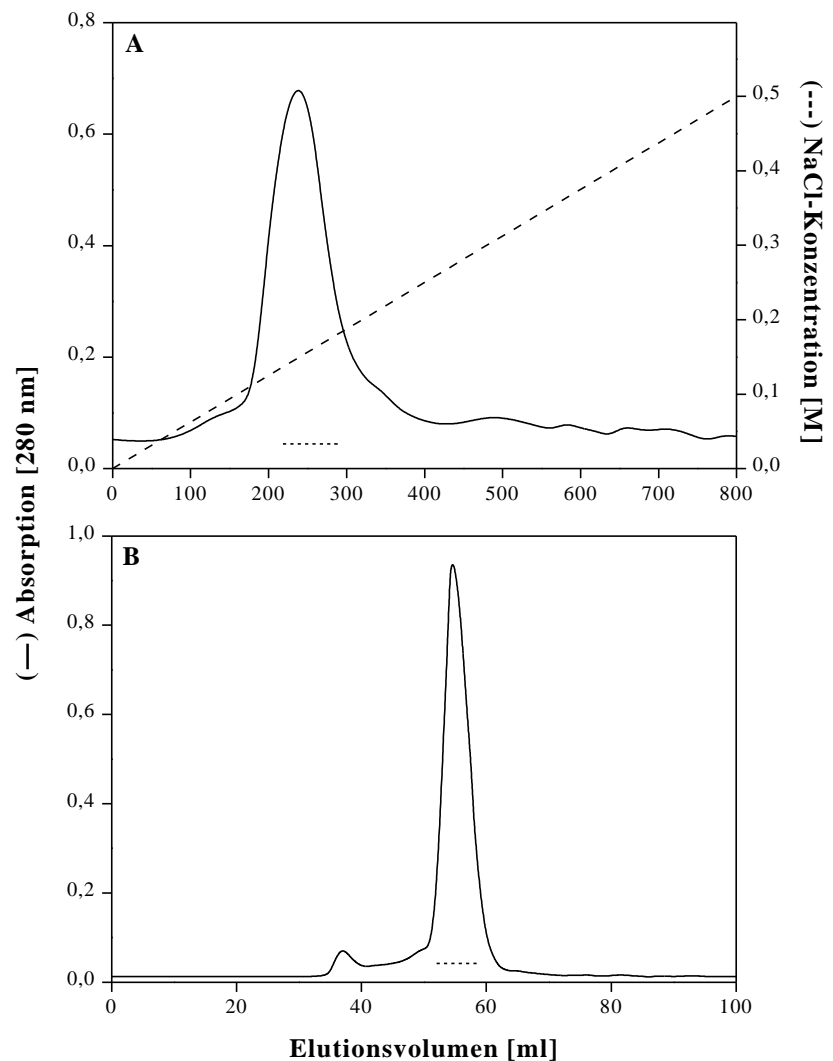
**Abb. 13A-B: Aufreinigung von  $\alpha 1\text{VI/V}$ .** Die Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose (A) wird durch die Absorption bei 280 nm (—) und die NaCl-Konzentration (---) beschrieben. Die vereinigten Fraktionen (----) wurden mittels Ultrafiltration 70:1 konzentriert und in die Gelfiltration (B) eingesetzt. deren Profil zeigt die Absorption bei 280 nm (—) sowie die zum Endprodukt vereinigten Fraktionen (----).

Die Fragmente VI/V von Laminin  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  zeigten nur schwache bzw. keine Bindung an Heparin (Abschnitt 3.3.1). Als erster Reinigungsschritt wurde für diese Proteine eine Anionenaustausch-Chromatographie gewählt.

Die Isolierung erfolgte ausgehend von 0,6 l ( $\alpha 3$ BVI/V) bzw. 0,4 l ( $\alpha 5$ VI/V) serumfrei konditioniertem Kulturmedium. Die Medien wurden gegen 0,02 M Tris-HCl, pH 8,6 dialysiert und im selben Puffer an DEAE-Sepharose chromatographiert, wobei  $\alpha 3$ BVI/V bei einer Ionenstärke von 0,12 bis 0,2 M NaCl und  $\alpha 5$ VI/V von 0,2 bis 0,3 M NaCl eluierte. Nach Ultrafiltration folgte die Gelfiltration mit einer Superose 12 HR 16/50-Säule.

Abb. 14 zeigt die Aufreinigung von  $\alpha 3$ BVI/V.

**Abb. 14A-B: Aufreinigung von  $\alpha 3$ BVI/V.** Das Profil der Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose (A) gibt die Absorption bei 280 nm (—) und den NaCl-Gradienten (---) wieder. Die vereinigten Fraktionen (----) wurden mittels Ultrafiltration 35:1 konzentriert und in die Gelfiltration (B) eingesetzt.



### 3.1.2.5 Identifizierung durch N-terminale Sequenzierung

Die gereinigten Fragmente VI/V von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  wurden zur Bestimmung der Spaltstelle des Signalpeptids sowie zur Identifizierung mittels Edman-Abbau ansequenziert. Pro Präparation wurde nur eine Sequenz nachgewiesen. Diese lauteten:

$\alpha 2VI/V$	SQTXRRQS,
$\alpha 3BVI/V$	VVGQDHPM,
$\alpha 5VI/V$	RTPGGDGFSL.

Eine Sequenzierung von  $\alpha 1VI/V$  gelang nicht, was eine posttranslatorische Spaltung innerhalb einer Q-Q-Sequenz nahelegte. Die Pyroform von Glutamin führt zur Blockierung des Edman-Abbaus. Daher wurde  $\alpha 1VI/V$  mit *Pfu*-Pyroglutamat-Aminopeptidase umgesetzt, welche die Abspaltung N-terminaler Pyroglutamylreste von Proteinen katalysiert. Anschließend konnte die N-terminale Sequenz zu RGLFPA bestimmt werden. Die Abspaltung des Signalpeptids erfolgte somit vor  $^{24}Q$  oder  $^{25}Q$  (vgl. Sequenzvergleich in Abb. 9, Seite 46).

## **3.2 Strukturelle Charakterisierung der Fragmente VI/V**

### 3.2.1 Vergleich von wichtigen Struktureigenschaften

Für die Charakterisierung struktureller Eigenschaften der Fragmente VI/V wurden neben der elektrophoretischen Mobilität die Sekundär- und Tertiärstrukturen analysiert.

#### 3.2.1.1 Elektrophoretische Mobilität

Die Ermittlung der Molekularmasse der dargestellten Fragmente VI/V durch Vergleich mit Markerproteinen sowie die Überprüfung der Reinheit wurde elektrophoretisch durchgeführt. Die Elektrophoresen werden in Abb. 15 gezeigt. In Tab. 12 werden die errechneten und gefundenen Molekularmassen der nicht-reduzierten Proteine gegenübergestellt.



**Abb. 15: SDS-PAGE der Fragmente VI/V der Laminin  $\alpha$ -Isoformen.** Dargestellt sind die gereinigten Fragmente  $\alpha 1$ VI/V (1),  $\alpha 2$ VI/V (2),  $\alpha 3$ BVI/V (3) sowie  $\alpha 5$ VI/V (4). Gezeigt werden Elektrophoresen unter reduzierenden (+) und nicht-reduzierenden Bedingungen (-) nach Coomassie-Färbung.



Die Reinheit der dargestellten Proteine betrug > 95%. Die Fragmente VI/V erschienen als Einzel- oder Doppelbanden und zeigten unter reduzierenden Bedingungen eine leicht verminderte Wanderungsgeschwindigkeit.

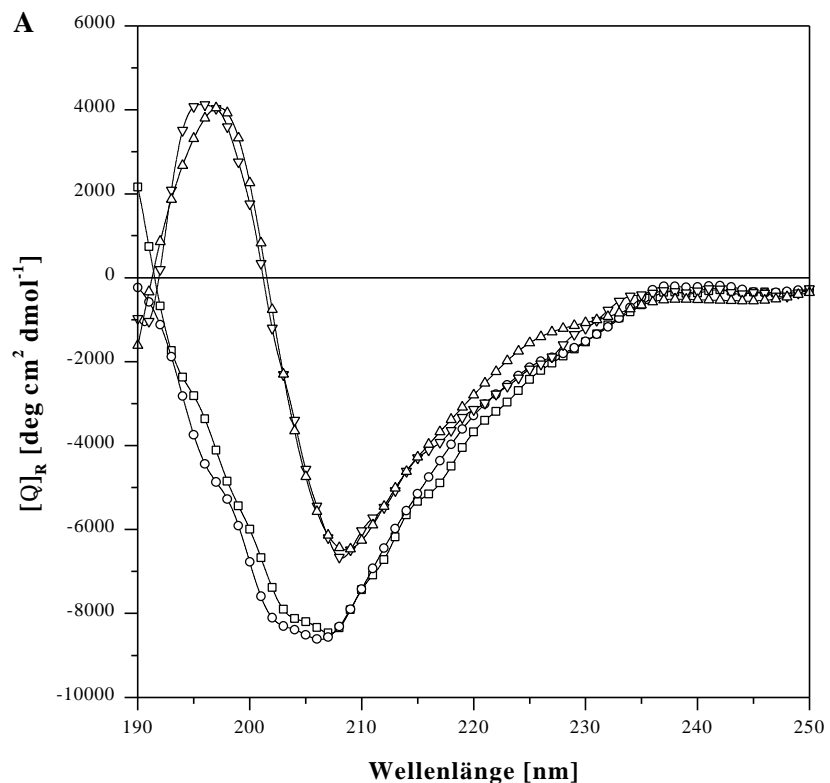
**Tab. 12: Größen exprimierter Proteine und Relation ihrer Domänen.** Neben der gefundenen ( $M_{gef.}$ ) und der theoretischen ( $M_{theor.}$ ) Molekularmasse in kDa werden die Anzahl an Aminosäuren (AA) sowie LE-Modulen ( $n$ ) verglichen.

Kette	$M_{gef.}$	Total $M_{theor.}$	[AA]	LE-Module	
				LN-Modul [AA]	[AA] [n]
$\alpha 1$	62	55	485	252	233 4
$\alpha 2$	65	54	493	263	230 4
$\alpha 3$ B	52	49	437	264	173 3
$\alpha 5$	60	49	440	264	176 3

### 3.2.1.2 Sekundärstruktur

Wie in Abschnitt 3.1.2.1 gezeigt wurde, stellt das LN-Modul keine autonome Faltungseinheit dar. Ein zu geringer Gehalt an strukturegebenden Motiven kann hierfür mitverantwortlich sein. Zur Bestimmung des Gehalts an Sekundärstrukturen erfolgte die CD-spektroskopische Analyse der Fragmente VI/V von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$ . Abb. 16 zeigt die aufgenommenen Spektren und fasst die abgeleiteten Strukturanteile der Fragmente zusammen.

**Abb. 16A-B: Circular-Dichroismus und abgeleitete Sekundärstrukturen.** Die CD-Spektren (A) der Fragmente  $\alpha 1VI/V$  ( $\square$ ),  $\alpha 2VI/V$  ( $\circ$ ),  $\alpha 3BVI/V$  ( $\triangle$ ) und  $\alpha 5VI/V$  ( $\nabla$ ) repräsentieren das Mittel aus zehn Einzelmessungen. Der Gehalt an Sekundärstruktur (B) ist in Prozent angegeben.

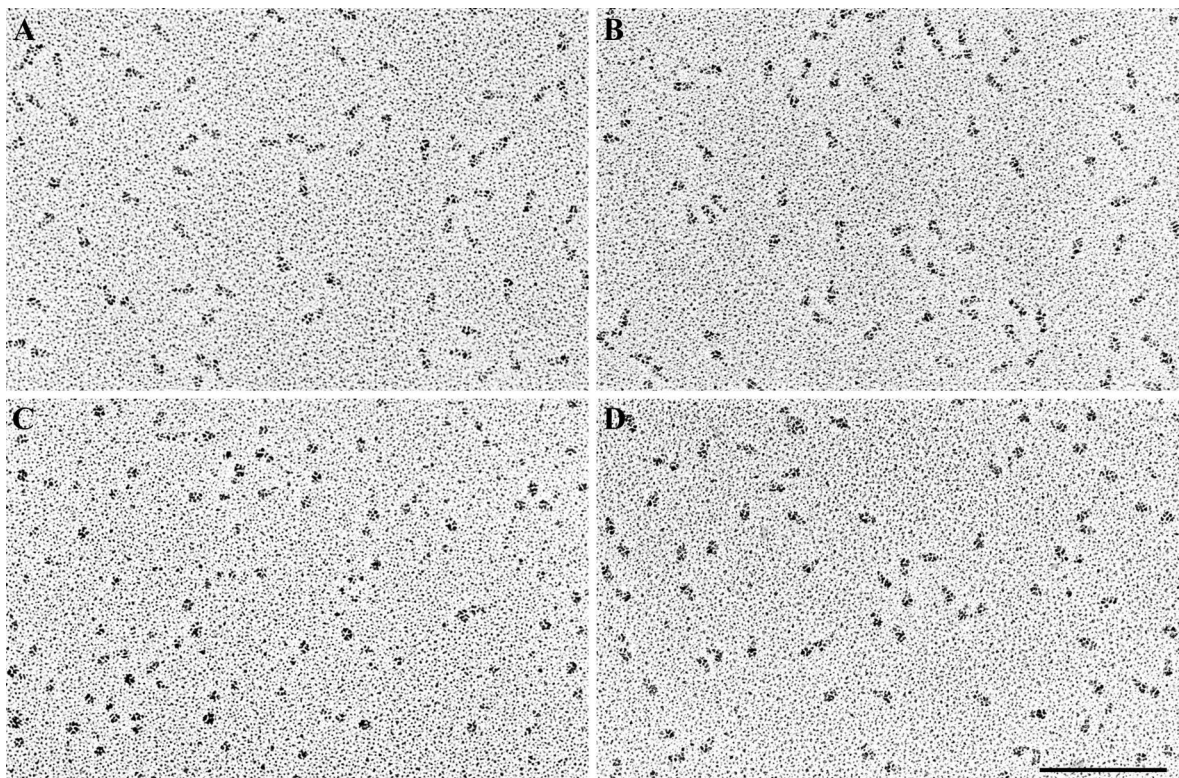


#### B

Strukturtyp	$\alpha 1VI/V$	$\alpha 2VI/V$	$\alpha 3BVI/V$	$\alpha 5VI/V$
$\alpha$ -Helix	3	2	6	7
$\beta$ -Struktur	27	24	49	49

Die Spektren aller Fragmente VI/V weisen ein deutliches Minimum um 208 nm auf. Während die Spektren von  $\alpha 1/2$  bei 196 nm ein schulterförmiges, negatives Minimum durchlaufen, zeigen die Spektren von  $\alpha 3B/5$  deutliche Maxima im Bereich positiver Elliptizität. Das Spektrum von  $\alpha 5VI/V$  zeigt ein zusätzliches schulterförmiges, negatives Minimum um 220 nm, was auf  $\alpha$ -helikale Struktur hindeutet. Das Verhalten im kurzwelligen Bereich lässt einen höheren Gehalt an ungeordneter Struktur für  $\alpha 1VI/V$  und  $\alpha 2VI/V$  vermuten. Die Spektren von  $\alpha 3BVI/V$  und  $\alpha 5VI/V$  deuten hier auf  $\beta$ -Struktur hin.

### 3.2.1.3 Elektronenmikroskopische Struktur



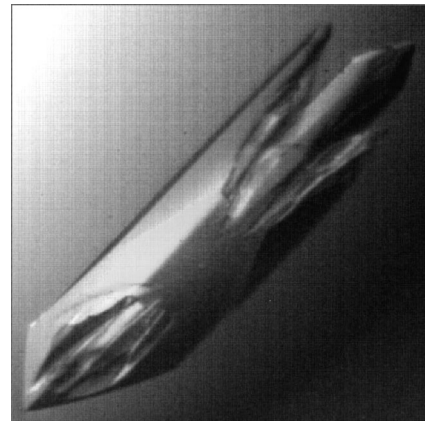
**Abb. 17A-D: Elektronenmikroskopie nach Kegelbedampfung** der Fragmente  $\alpha 1\text{VI/V}$  (A),  $\alpha 2\text{VI/V}$  (B),  $\alpha 3\text{BVI/V}$  (C) sowie  $\alpha 5\text{VI/V}$  (D). Für die Kegelbedampfung wurden die Proteine bei 4°C gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,1 dialysiert und auf eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt. Die Länge des Balkens entspricht 100 nm.

Die elektronenoptischen Aufnahmen von  $\alpha 1\text{VI/V}$ ,  $\alpha 2\text{VI/V}$  und  $\alpha 5\text{VI/V}$  zeigen deutliche Ausprägungen des stabförmigen LE-Tandems und des globulären LN-Moduls (vgl. Abb. 8, Seite 45). Die LN-Module aller drei Ketten stimmen in Form und Größe (Durchmesser ca. 7 nm) überein. Mit ca. 9 nm sind die LE-Module von  $\alpha 1\text{VI/V}$  und  $\alpha 2\text{VI/V}$  gleich groß. Das um ein Modul reduzierte LE-Tandem in  $\alpha 5\text{VI/V}$  erscheint kürzer: Die ermittelte Länge von ca. 7 nm entspricht der durch Röntgenstrukturanalyse gemessenen Länge von drei LE-Modulen aus *Ln $\gamma$ 1* (Stetefeld *et al.*, 1996).

Einige wenige Moleküle von  $\alpha 3\text{BVI/V}$  haben dieselbe charakteristische Dimension. Die Vielzahl aller Moleküle zeigt jedoch ausschließlich globuläre Struktur, die im Vergleich zum LN-Modul der übrigen Ketten leicht vergrößert erscheint (9 bis 10 nm Durchmesser) und optisch nicht in die aufbauenden Domänen unterteilt werden kann.

### 3.2.2 Kristallographische Untersuchung von Laminin $\alpha$ 1VI/V

In Zusammenarbeit mit Dr. J. Stetefeld (Abteilung für Biophysikalische Chemie des Biozentrums der Universität Basel, Schweiz) gelang die Kristallisation von Laminin  $\alpha$ 1VI/V (Abb. 18) und die Aufnahme eines Datensatzes mit einer Auflösung von 2,8 Å. Die Kristalle gehören zur Raumgruppe P6(2,4)22 mit den Dimensionen  $a = b = 184,4$  Å und  $c = 101,5$  Å. Zur Lösung des Phasenproblems wird die Methode der isomorphen Substitution angewandt. Hierfür werden die Kristalle in Lösungen verschiedener Schwermetallsalze getränkt, bzw. die Proteinlösung mit dem Schweratomderivat kokristallisiert. Die Phasenbestimmung ist noch nicht abgeschlossen.

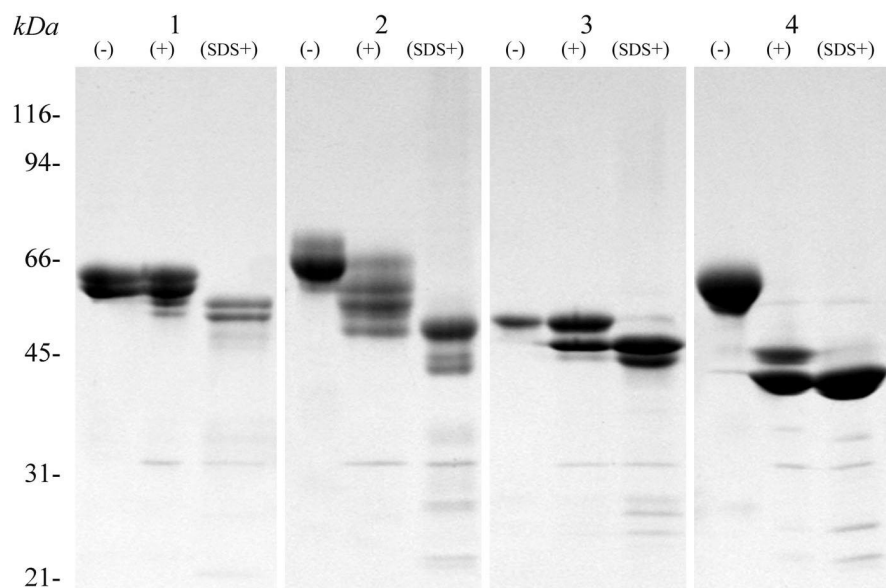


**Abb. 18: Kristall von  $\alpha$ 1VI/V.** Die hexagonale Kristallform besitzt eine maximale Länge von 0,8 mm.

### 3.2.3 Modifizierung durch Oligosaccharide

Neben der korrekten Faltung der Fragmente VI/V sollte deren native Glykosylierung bestätigt werden. Laminin-1 ist ausschließlich durch *N*-gebundene Oligosaccharide substituiert (Dean *et al.*, 1990; Timpl, 1996a). Für weitere Laminine liegen dato keine Daten vor.

Zum Nachweis *N*-gebundener Kohlenhydratseitenketten wurden die Fragmente einer Deglykosylierung mittels *N*-Glykosidase F unterzogen. Die resultierenden Veränderungen in der elektrophoretischen Mobilität werden in Abb. 19 gezeigt.



**Abb. 19: *N*-Glykosidase F-Degradation der Fragmente VI/V der Laminin  $\alpha$ -Ketten.** Dargestellt sind die Umsätze von  $\alpha$ 1VI/V (1),  $\alpha$ 2VI/V (2),  $\alpha$ 3BVI/V (3) sowie  $\alpha$ 5VI/V (4). Gezeigt werden SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurde jeweils unbehandeltes Protein (-), Abbau (+) und Abbau in SDS (SDS+).

Die Fragmente VI/V zeigen zum Teil deutlich erhöhte Beweglichkeit nach *N*-Deglykosylierung. Desweiteren wurde der Gehalt an Glukosamin (GlcN) und Galaktosamin (GalN) der Fragmente nach Hydrolyse bestimmt. Die Abnahme der Masse durch *N*-Glykosidase F-Abbau wird in Tab. 13 mit dem ermittelten Gesamtgehalt an Hexosamin korreliert.

**Tab. 13: Hexosamingehalt und Abnahme der apparenten Masse durch *N*-Deglykosylierung.** Gezeigt wird die Anzahl der potentiellen Glykosylierungsstellen (NXT/S) und die ermittelten Reste Glukosamin und Galaktosamin pro Molekül. Die Summe der Hexosaminreste pro Molekül ( $S_n$ ) und die reduzierte Masse ( $\Delta$ ), die sich aus der Masse der Proteine vor (-) und nach (+) *N*-Glykosidase F-Degradation ergibt, führen zu dem Quotienten  $\Delta/S_n$ .

Kette	NXT/S	Reste/ Molekül			Masse in SDS-PAGE [kDa]			Reduzierte Masse pro Molekül Hexosamin $\Delta/S_n$
		GlcN $n$	GalN $n$	Hexosamin $S_n$	-	+	$\Delta$	
$\alpha 1$	2	8	2	10	62	55	7	0,7
$\alpha 2$	2	11	1	12	65	50	15	1,25
$\alpha 3B$	1	3	0	3	52	43	9	3
$\alpha 5$	3	6	0	6	60	45	21	3,5

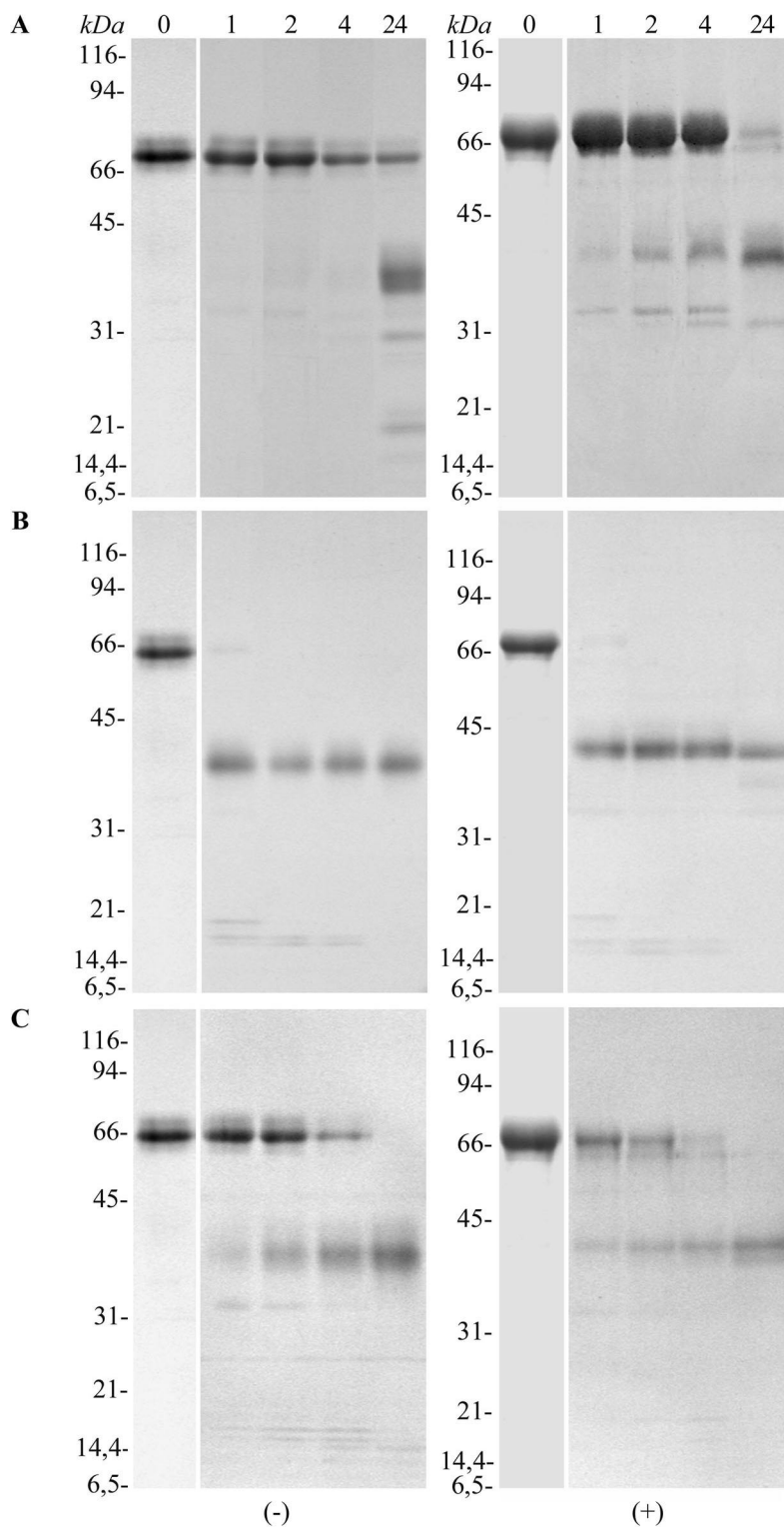
Für alle Fragmente konnten *N*-glykosylierte Oligosaccharide nachgewiesen werden. Obwohl  $\alpha 3B/5$  zwei- bis viermal weniger *N*-Hexosamin enthalten als  $\alpha 1/2$ , weist der *N*-Glykosidase F-Abbau einen um Faktor 2,5 bis 5 größeren Quotienten  $\Delta/S_n$  aus. Dieser Befund deutet auf einen hohen Mannose-Anteil hin, ist jedoch auch durch einen höheren Verzweigungsgrad erklärbar.

### 3.2.4 Proteasestabilität

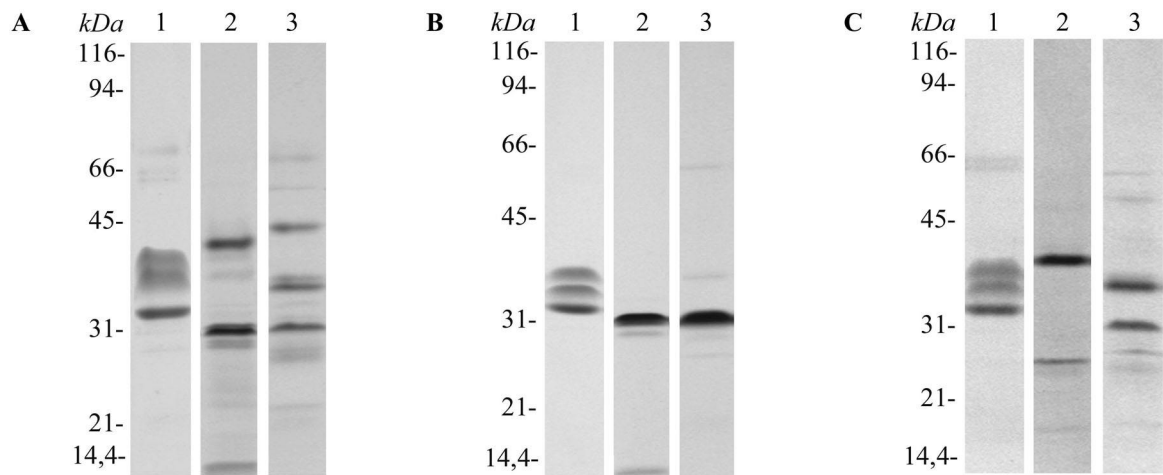
Zur weiteren Charakterisierung sollten die Fragmente VI/V der einzelnen  $\alpha$ -Ketten hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber Proteasen verglichen werden. Die Proteaseresistenz gibt Hinweise auf eine korrekte Faltung von Proteinen. Aus der Sequenzierung resultierender Banden können sich Hinweise auf konservierte Struktur motive bzw. Oberflächen-exponierte Regionen ergeben. Ebenso wird die Grundlage für die gezielte Herstellung von Fragmenten geschaffen. Verkürzte Fragmente vereinfachen die Zuordnung und Lokalisierung von Bindungsaktivitäten auf einem Protein. LE-Module gelten als pepsinresistent (Timpl *et al.*, 1987).

Die Fragmente VI/V wurden proteolytischen Degradationen mit Elastase, Chymotrypsin, Trypsin und Pepsin unterzogen. Alle Fragmente VI/V zeigten vergleichbare Resistenzen gegenüber diesen Proteasen. Exemplarisch werden in Abb. 20 die Zeitkinetiken

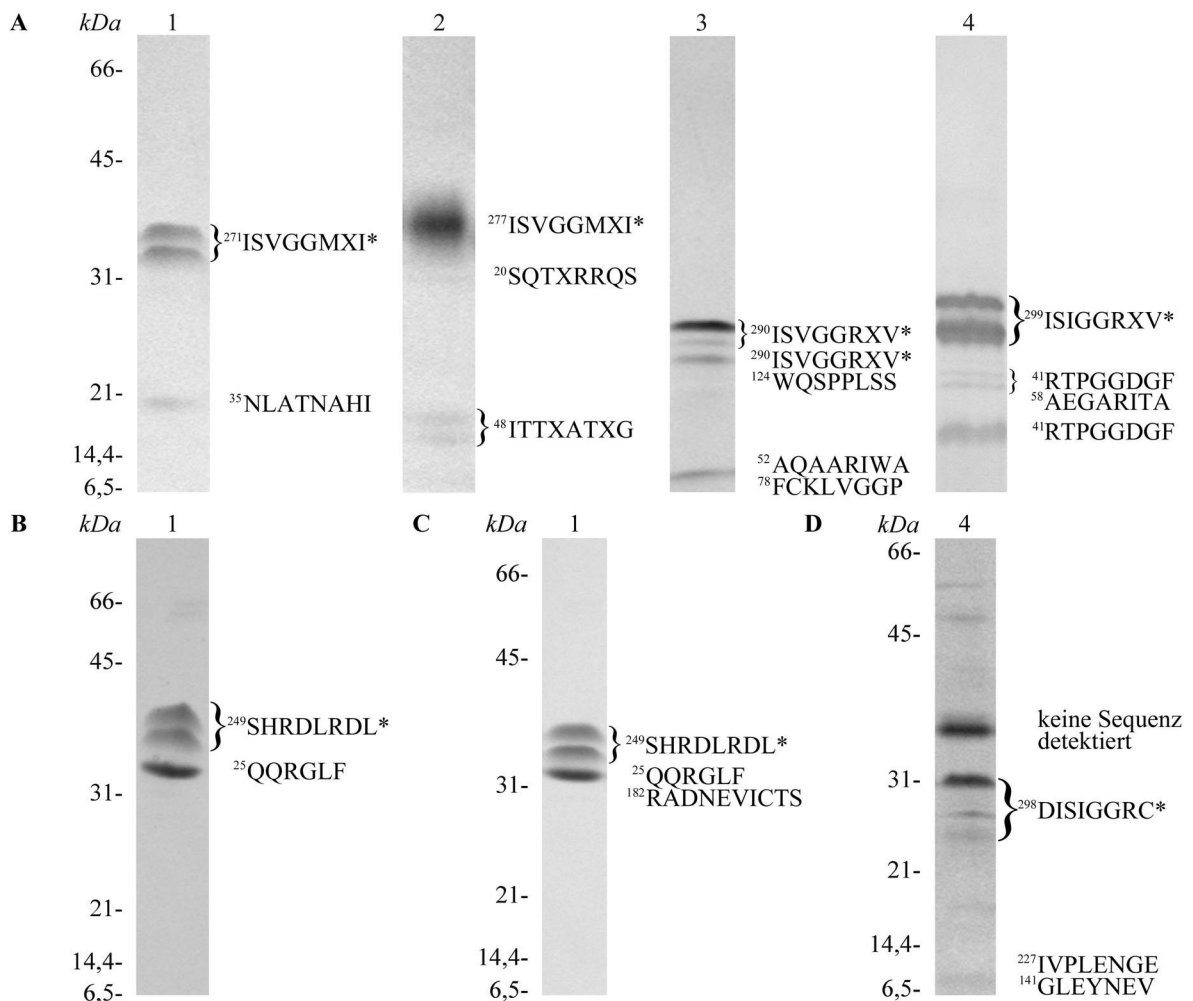
der Spaltungen von  $\alpha 2\text{VI/V}$  mit den neutralen Endopeptidasen gezeigt. Die Endprodukte entsprechender Umsetzungen der übrigen  $\alpha$ -Ketten sind in Abb. 21 dargestellt. Es schließt sich die Darstellung der Sequenzen prägnanter Abbaumuster an (Abb. 22). Ergänzend werden in Abschnitt 3.2.6 die N-terminalen Sequenzen der Spaltprodukte von  $\alpha 1\text{VI/V}$  nach Pepsinabbau gezeigt.



**Abb. 20A-C: Zeitkinetik der proteolytischen Degradationen von  $\alpha 2\text{VI/V}$ .** Das Protein wurde mit den Proteasen Elastase (A), Chymotrypsin (B) und Trypsin (C) gespalten. Gezeigt werden SDS-PAGE nach nicht-reduzierender (-) und reduzierender (+) Auftrennung und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 1,25  $\mu\text{g}$  des Proteaseabbaus nach 0, 1, 2, 4 und 24 h (0 - 24).



**Abb. 21A-C: Endprodukte der proteolytischen Degradationen** von  $\alpha 1\text{VI/V}$  (1),  $\alpha 3\text{VI/V}$  (2) und  $\alpha 5\text{VI/V}$  (3). Die Proteine wurden mit den Proteasen Elastase (A), Chymotrypsin (B) und Trypsin (C) gespalten. Gezeigt werden SDS-PAGE nach nicht-reduzierender Auftrennung und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 1,25  $\mu\text{g}$  des Proteaseabbaus nach 24 h.



**Abb. 22A-D: Sequenzen dominanter proteolytischer Fragmente** von  $\alpha 1\text{VI/V}$  (1),  $\alpha 2\text{VI/V}$  (2),  $\alpha 3\text{VI/V}$  (3) und  $\alpha 5\text{VI/V}$  (4) nach Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Coomassie-Färbung. Die Sequenzierung erfolgte nach Transfer auf PVDF-Membran. Den Abbaumustern werden die Sequenzen nach 2 h Pepsinabbau (A) 1 h Elastaseabbau (B), 1 h Chymotrypsinabbau (C) sowie 2 h Trypsinabbau (D) zugeordnet. Banden, welche ein LE-Tandem repräsentieren, sind mit einem Stern markiert.

Die Studie veranschaulichte die hohe Proteasestabilität des LE-Tandems der Laminin  $\alpha$ -Ketten. Die elektrophoretischen Banden der LE-Module zeigten sich nach allen Spaltungen mit den neutralen Proteasen konstant (vgl. Abschnitt 3.3.5). Das LE4-Tandem von  $\alpha 1/2$  erschien bei 38 kDa ( $M_{theor.} \sim 26,5$  kDa), das LE3-Tandem von  $\alpha 3B/5$  bei 31 kDa ( $M_{theor.} \sim 20$  kDa). Eine Ausnahme machte die Degradation von  $\alpha 3BVI/V$  mit Trypsin (Abb. 21C.2), die eine Bande um 25 kDa hervorbrachte. Pepsin spaltete alle Fragmente VI/V exakt kurz vor den LE-Modulen (vgl. Abschnitt 3.2.5), welche als 25 bis 35 kDa große Banden sichtbar wurden (Abb. 22A).

Die neben dem LE-Tandem dominierenden Banden variabler Größe (33 bis 38 kDa) konnten den N-terminalen Regionen zugeordnet werden, was eine korrekte Faltung der globulären LN-Module indiziert. Dieses zeigte sich insgesamt weniger proteasestabil und wurde unregelmäßig in mehrere Fragmente gespalten: Durch Spaltung von  $\alpha 1VI/V$  mit den neutralen Proteasen (Abb. 21A.1-C.1) entstand ein 34 kDa-Fragment ( $^{25}QQR$ ). Pepsin erzeugte ein 20 kDa-Fragment mit der N-terminalen Sequenz  $^{35}NLA$  (Abb. 22A.1). Analog zu  $\alpha 1VI/V$  erzeugten die Spaltungen von  $\alpha 2VI/V$  mit neutralen Proteasen ein 33 kDa großes N-terminales Fragment. Ein weiteres Fragment aus der N-terminalen Region von  $\alpha 2VI/V$  ( $^{48}ITT$ ) erschien nach allen Spaltungen um 17 kDa (Abb. 20A-C). Auch die Degradationen von  $\alpha 3BVI/V$  mit den neutralen Proteasen erzeugten Banden um 34 kDa. Nach Degradation mit Elastase und Chymotrypsin (Abb. 21A.2-B.2) erschien ein 10 kDa großes Fragment ( $^{52}AQA$ ,  $^{78}FCK$ ), welches auch nach Spaltung mit Pepsin (Abb. 22A.3) zu finden war. Der N-Terminus von  $\alpha 5VI/V$  erschien nach Degradation mit den neutralen Proteasen in einer 37 kDa-Bande (Abb. 21A.3-C.3), die aufgrund einer Blockierung nicht sequenziert werden konnte.

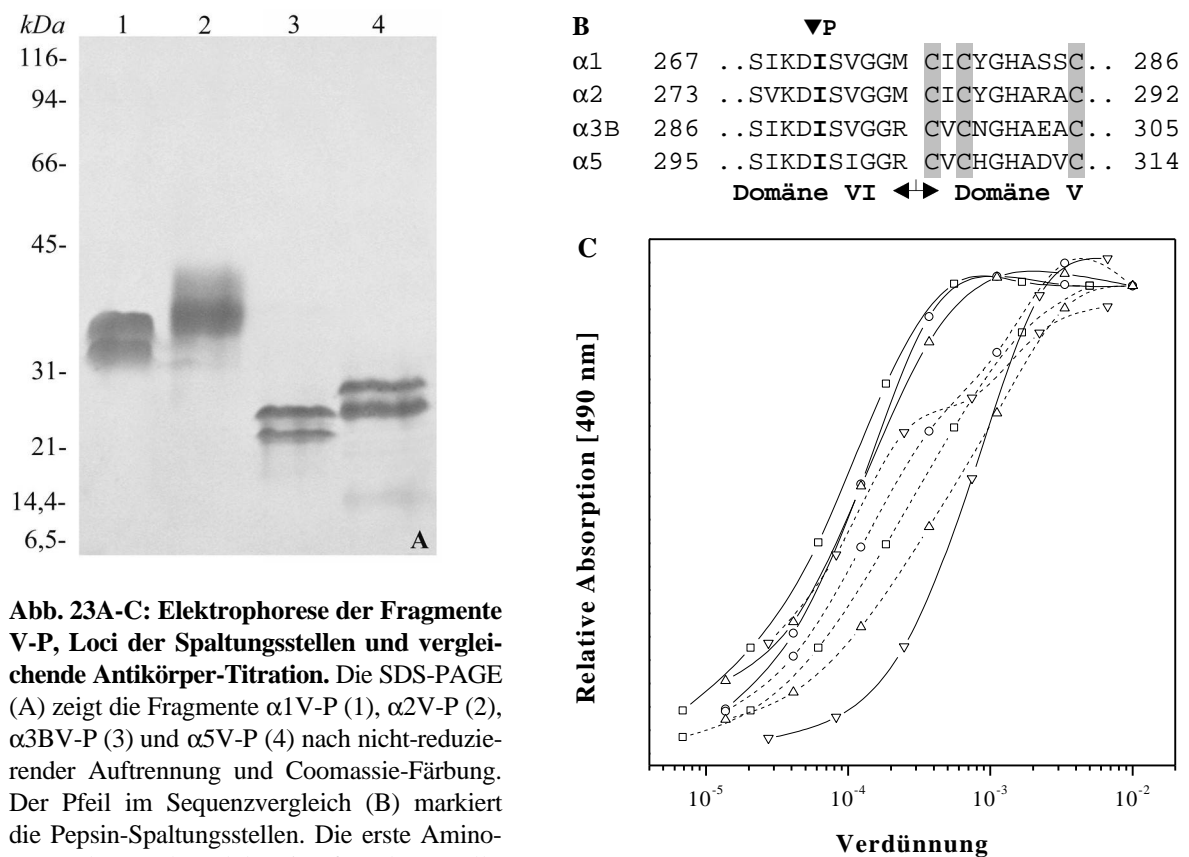
Die proteolytische Degradation der Fragmente VI/V lässt sich für die Abspaltung des LN-Moduls von dem LE-Tandem einsetzen.



### 3.2.5 Herstellung der Domäne V durch Pepsinabbau

Das LN-Modul ist nicht durch proteolytische Spaltung darstellbar. In vorhergehendem Abschnitt wurde die hohe Proteaseresistenz der LE-Module beschrieben. Diese Eigenschaft wurde für die Herstellung der Domänen V genutzt, indem ihre Isolierung durch Pepsin-Spaltung der Fragmente VI/V und die anschließende chromatographische Abtrennung erfolgte. Die resultierenden Fragmente V-P sollten für die Lokalisierung der Bindungsaktivitäten der Fragmente VI/V eingesetzt werden (Abschnitt 3.3.5).

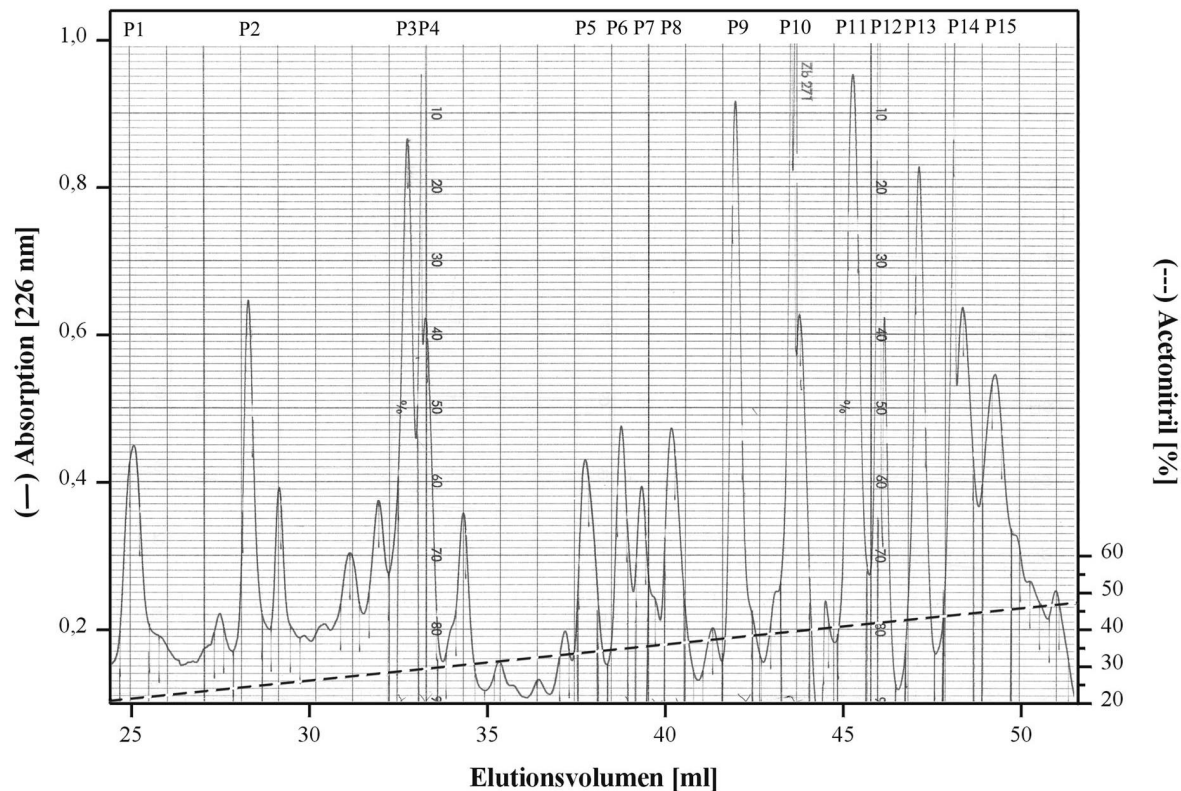
Jeweils 1 mg der Fragmente VI/V wurde für 2 h mit Pepsin umgesetzt und nach Neutralisierung gegen 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4 dialysiert. Die Reinigung der LE-Module erfolgte durch Gelfiltration mit einer Superose 12 HR 10/30-Säule und führte zur Darstellung der Fragmente V-P (Abb. 23A). Zur Verifizierung wurden die Proteine N-terminal ansequenziert. Der Locus der Spaltungsstelle ist über alle Ketten konserviert und befindet sich 6 Reste vor Beginn der LE-Module (Abb. 23B). Die Erhaltung der nativen Struktur der Fragmente V-P wurde durch Antikörper-Titration verifiziert (Abb. 23C). Dazu wurden polyklonale Antiseren gegen die Fragmente VI/V eingesetzt (Abschnitt 3.4.1). Alle Fragmente V-P wurden deutlich als Epitope der Antikörper erkannt.



**Abb. 23A-C: Elektrophorese der Fragmente V-P, Loci der Spaltungsstellen und vergleichende Antikörper-Titration.** Die SDS-PAGE (A) zeigt die Fragmente  $\alpha 1V-P$  (1),  $\alpha 2V-P$  (2),  $\alpha 3BV-P$  (3) und  $\alpha 5V-P$  (4) nach nicht-reduzierender Auftrennung und Coomassie-Färbung. Der Pfeil im Sequenzvergleich (B) markiert die Pepsin-Spaltungsstellen. Die erste Aminosäure der Spaltprodukte ist fett dargestellt. Die Titrationskurven (C) der Fragmente VI/V (—) und V-P (---) zeigen Anti- $\alpha 1$  vs.  $\alpha 1$  ( $\square$ ), Anti- $\alpha 2$  vs.  $\alpha 2$  ( $\circ$ ), Anti- $\alpha 3B$  vs.  $\alpha 3B$  ( $\triangle$ ) und Anti- $\alpha 5$  vs.  $\alpha 5$  ( $\nabla$ ). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Absorptionen skaliert.

### 3.2.6 Charakterisierung des LN-Moduls von Laminin a1 durch Sequenzanalyse von Pepsin-Fragmenten

Eine weitere Anwendung sollte die proteolytische Degradation in der Aufklärung der bislang ungeklärten Cysteinverbrückung innerhalb des LN-Moduls finden. Hierzu wurde eine 30-minütige Pepsinspaltung von 1 mg  $\alpha 1VI/V$  durchgeführt. Der Abbau wurde mittels Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt.



**Abb. 24: Umkehrphasen-HPLC des Pepsinabbaus von  $\alpha 1VI/V$ .** Das Chromatogramm gibt die Absorption bei 226 nm (—) und den Acetonitril-Gradienten (---) wieder. Die Fraktionenpools (P1 bis P15) wurden lyophilisiert und die enthaltenden Proteine sequenziert.

Die Fraktionen der Hauptpeaks der Umkehrphasen-Chromatographie wurden nach Abb. 24 zu 15 Pools zusammengefasst. Nach deren Lyophilisation erfolgte die N-terminale Sequenzierung. Die Pools P10, P14 und P15 konnten durch Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Sie entsprachen den dominierenden Proteinbanden nach Pepsinabbau (Abb. 22A.1) und wurden nach Transfer auf PVDF-Membran ebenfalls sequenziert. P14 und P15 (ca. 35 kDa) entsprachen dem Fragment V-P (Abschnitt 3.2.5), P10 war kleiner (17 kDa) und enthielt eine Mischung aus Sequenzen des LN-Moduls.

Tab. 14 fasst die Ergebnisse der Sequenzierungen nach chromatographischer bzw. elektrophoretischer Trennung und Blot zusammen.

**Tab. 14: N-terminale Sequenzen der Spaltprodukte von  $\alpha 1\text{VI}/\text{V}$  nach Pepsinabbau.** Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit Markerproteinen mittels SDS-PAGE bestimmt.

Fragmente nach Chromatographie		Fragmente nach Elektropherese	
Pool #	Sequenz	Größe [kDa]	Sequenz
P1	<sup>266</sup> YSIKD		
	<sup>114</sup> VTV		
	<sup>121</sup> RQVFQ		
P2	<sup>225</sup> FTSARY		
	<sup>217</sup> DPSPQ		
P3	<sup>223</sup> LEFTSA		
	<sup>100</sup> WQSPSIQNGR		
P4	<sup>209</sup> INGRPSADDPSPQL		
	<sup>223</sup> LEFTSA		
P5	<sup>197</sup> VPLEHGEIHTSL		
	<sup>209</sup> INGRPSADDPSPQL		
	<sup>119</sup> DLRQVF		
P6	<sup>223</sup> LEFTSAA Y		
	<sup>111</sup> YHWVTV		
	<sup>209</sup> INGRPSADD		
	<sup>121</sup> RQVFQ		
P7	<sup>116</sup> (VTLDL)RQVFQVAY		
P8	<sup>25</sup> QQRGLF		
P9	<sup>129</sup> IIIKAANAPRPGNW		
P10	<sup>31</sup> PAILNL	17	<sup>37</sup> ATNAHISAXA
	<sup>193</sup> YSKLVPLEHGEIGHT		<sup>35</sup> NLATNXXISA
	<sup>100</sup> WQSPSIQNGR		
	<sup>197</sup> VPLEHGEIHTSLING		
	<sup>145</sup> ERSVDGVKFK		
P11	<sup>246</sup> MTLSHRDLRDLDP		
P12	<sup>100</sup> WQSPSIQNGR		
	<sup>118</sup> LDLRQVFQ		
P13	<sup>143</sup> ILERSVDGVK		
	<sup>246</sup> MXLSHRDLRDLDP		
	<sup>193</sup> YSKLVPLEHG		
P14	<sup>271</sup> ISVGGMXIXY	34	<sup>271</sup> ISVGGMXIXY
P15	<sup>271</sup> ISVGGMXIXY	36	<sup>271</sup> ISVGGMXIXY

Durch Projektion der Spaltungsstellen auf die Sequenz von  $\alpha 1\text{VI/V}$  (Abb. 25) kann auf potentielle Cystein-Verbrückungen sowie die Pepsinstabilität der Module geschlossen werden.

25	▼P8	▼P10	QQRGLFPAIL	NLATNAHISA	NATC	GKEKGPE	MF	CKLVEHV	GRPVRHAQ	CR	VCDGNSTNPR	84
				▼P3/10/12		▼P6	▼P1	▼P12	▼P1/6	▼P9	▼P13	
85			ERHPISHAID	GTNNWQSPS	IQNGREYHWV	TVTLDLRQVF	QVAYIIKAA	NAPRPGNWIL				144
	▼P10					▲P7	▲P5		▼P10/13	▼P5/10		
145			ERSVDGVKFK	PWQYYAVSDT	ECLTRYKITP	RRGPPTYRAD	NEVIC	TSYYS	KLVPLEHGEI			204
			▼P4/5/6	▼P2	▼P3/4/6			▼P11/13				
205			HTSLINGRPS	ADDPSPQLE	FTSARYIRLR	LQRIRTLNAD	LMTLSHRDLR	DLDPIVTRRY				264
	▼P1	▼P14/15			▲P2							
265			YYSIKDISVG	GMCICYGHAS	SCPWDEEAKQ	LQCQCEHNTC	GESCDRCCPG	YHQQPWRPGT				324
			Domäne VI ← Domäne V									
325			ISSGNECEEC	NCHNKAKDCY	YDSSVAKERR	SLNTAGQYSG	GGVCVNCSQN	TTGINCETCI				384
385			DQYYRPHKVS	PYDDHPCRPC	NCDPVGSLSS	VCIKDDRHAD	LANGKWPQC	PCRKGYAGDK				444
445			CDRCQFGYRG	FPNCIPCDR	TVGSLNEDPC	IEPCLCKKNV	EGKNCDRCKP	GFYNLKERNP				504
505			EGCSE									509

**Abb. 25: Sequenz und Pepsin-Spaltmuster von  $\alpha 1\text{VI/V}$ .** Domäne VI wird von den Aminosäuren 25-276 gebildet, Domäne V von den Aminosäuren 277-509. Die Pfeile repräsentieren die Pepsin-Spaltungsstellen mit den zugehörigen Fraktionenpools. Die erste Aminosäure der gefundenen Spaltprodukte ist fett dargestellt.

Die Sequenzen verdeutlichen die Ergebnisse der Protease-Degradationen der vorangegangenen Abschnitte: Das LN-Modul ist proteaselabil, die LE-Module dagegen -stabil. Besonders prägnant stellt sich der Bereich zwischen <sup>100</sup>W und <sup>225</sup>F des LN-Moduls dar: Nahezu 80 % aller Spaltungen finden hier statt. Eine Exponierung dieses Segmentes an der Oberfläche des Moduls lässt sich aus den Daten der Mutationsstudie (Abschnitt 3.3.6.2) jedoch nur bedingt ableiten. Die LE-Module der Domäne V von Laminin  $\alpha 1$  sind gänzlich resistent gegen Pepsin.

Die kompakte Struktur der LE-Module infolge der hohen Cysteinverbrückung (je 8 C) führt zur gezeigten Stabilität gegenüber Proteasen. Analog dazu sind ausschließlich beide Cystein-enthaltenden Sequenzabschnitte des LN-Moduls (AA 35-85/ AA 155-190) pepsin-resistent. Da sich beide Sequenzen in verschiedenen Fragmenten finden lassen, lässt sich die Verbrückung der Cysteine 1 bis 4 sowie der Cysteine 5-6 ableiten. Eine genaue Zuordnung beider Disulfidbrücken innerhalb der Gruppe C1 bis C4 ist aus den Ergebnissen nicht möglich.

### 3.3 Bindungseigenschaften der Fragmente VI/V

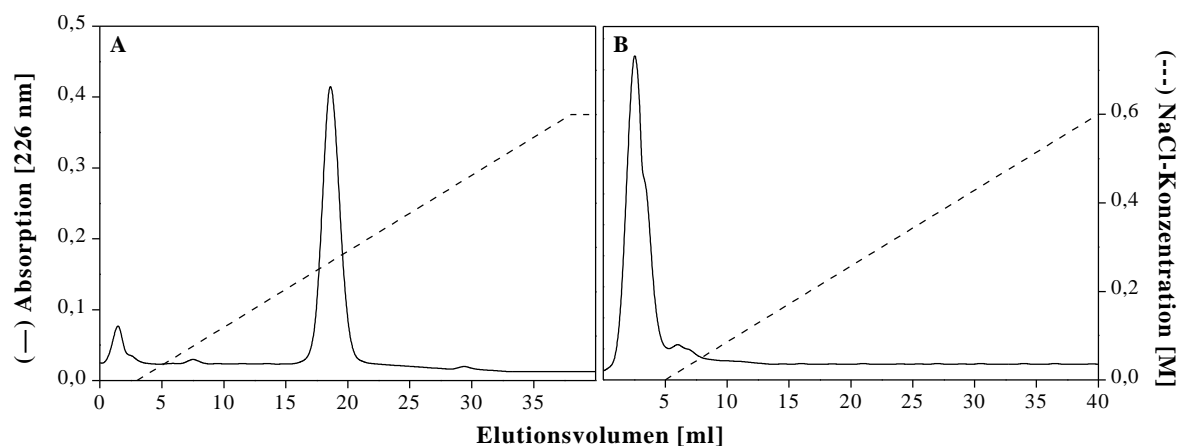
Dieser Abschnitt behandelt die Untersuchung der Bindungsaktivitäten der Fragmente VI/V einschließlich der Polymerisation. Die N-Termini der Laminin-Ketten vermitteln deren Selbstaggregation, welche *in vitro* durch sulfatierte Liganden initiiert bzw. moduliert wird. Daher wurden Bindungsstudien mit Heparin, Heparansulfat von Perlecan und Sulfatid durchgeführt, an die sich eingehende Polymerisationsstudien mit Laminin-1 anschlossen.

Die Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Fragmente VI/V erfolgte mittels Affinitätschromatographie, Plasmonresonanz-Analyse, Ligandenbindungstest und Polymerisationsinhibition. Mit Ausnahme der Affinitätschromatographie wurden alle Bindungsanalysen bei physiologischer Salzkonzentration durchgeführt.

#### 3.3.1 Bindung an Heparin

Die Interaktion zwischen Laminin-Fragmenten und Heparin sollte zunächst mittels analytischer Affinitätschromatographie evaluiert werden. Zur Ermittlung der Bindungsstärke wurden die gereinigten Proteine an Heparin-Sepharose chromatographiert. Die in einer Affinitätschromatographie ermittelte Bindungsaktivität ist proportional der NaCl-Konzentration, welche für die Elution notwendig ist.

Die Elution von  $\alpha 1\text{VI/V}$  erfolgte bei einer Ionenstärke von 0,27 M NaCl.  $\alpha 2\text{VI/V}$  eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,24 M und  $\alpha 3\text{BVI/V}$  bei 0,14 M.  $\alpha 5\text{VI/V}$  zeigte keine Bindung an Heparin-Sepharose. Abb. 26 stellt die Affinitätschromatographien von  $\alpha 1\text{VI/V}$  und  $\alpha 5\text{VI/V}$  dar.



**Abb. 26A-B: Analytische Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose zur Bestimmung der Bindungsstärken von  $\alpha 1\text{VI/V}$  (A) und  $\alpha 5\text{VI/V}$  (B). Die Bindungsaktivität für Heparin entspricht der für die Elution notwendigen NaCl-Konzentration.**

Eine weiterführende kinetische Analyse der ermittelten Bindung zwischen Heparin und den Fragmenten VI/V fand durch Messung der Oberflächen-Plasmonresonanz statt. Hierfür erfolgte die Immobilisierung biotinylierten Heparins mittels Streptavidin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), welches zu 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0 gelöst und mittels Succinimidesterkopplung bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 10.000 RU an einen CM5-Sensorchip (Pharmacia Biosensor, Freiburg) immobilisiert wurde. Die Biotinylierung von Heparin mit Sulfosuccinimido-Biotin folgte den Angaben des Herstellers (Pierce, Bonn). Das resultierende Heparin-Biotin wurde bei einer Flussrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  und etwa 300 RU an den avidierten Sensorchip gebunden. Die Laminin-Fragmente wurden 0,2 bis 8  $\mu\text{M}$  in TBS, pH 7,4 eingesetzt und erreichten 30 bis 11.000 RU. Der Nullwert (4 bis 80 RU) ergab sich aus der Interaktion der löslichen Liganden mit dem avidierten Sensorchip ohne Heparin-Biotin.

**Tab. 15: Kinetische Parameter der Interaktion zwischen Heparin und den Fragmenten VI/V bzw.  $\alpha\text{1LG4-5}$  aus Plasmonresonanz-Messungen.** Biotinyliertes Heparin wurde an immobilisiertes Streptavidin gebunden. Die Dissoziationskonstanten  $K_d$  für die Heparinbindung wurden als Durchschnittswerte aus drei bis vier Einzelmessungen mit der Standardabweichung (SD) ermittelt.

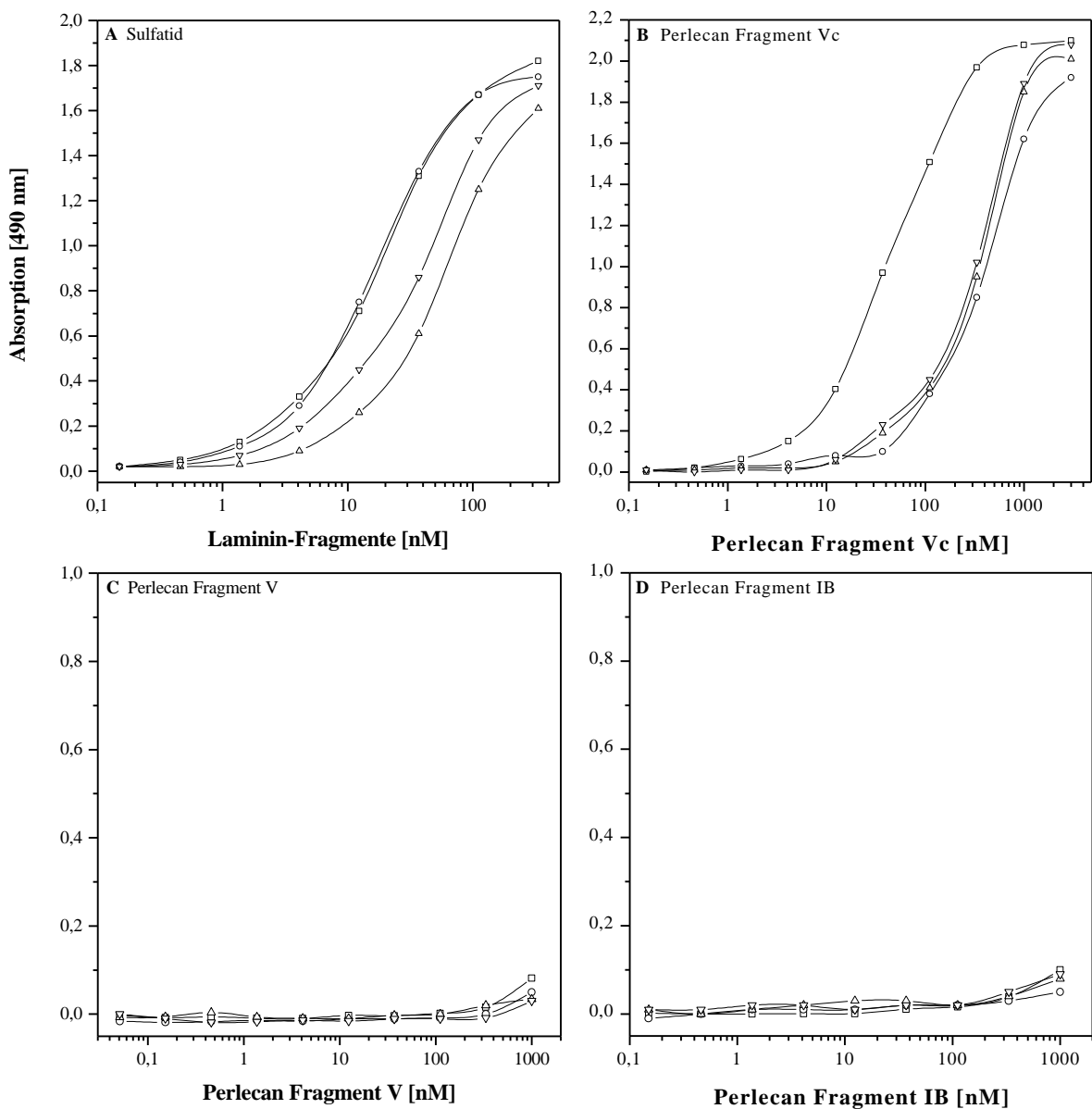
Löslicher Ligand	$k_{\text{diss}} \times 10^4$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{ass}} \times 10^{-4}$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_d$ [nM $\pm$ SD]
$\alpha\text{1VI/V}$	2,9	2,3	12,2 $\pm$ 1,0
$\alpha\text{2VI/V}$	1,9	0,38	53,3 $\pm$ 6,1
$\alpha\text{3BVI/V}$	9,0	0,49	185 $\pm$ 45
$\alpha\text{5VI/V}$	19,3	0,22	904 $\pm$ 107
$\alpha\text{1LG4-5}$	2,2	10,9	2,2 $\pm$ 0,9

Durch Analyse der Plasmonresonanzen wurde für die Bindung von  $\alpha\text{1VI/V}$  an Heparin eine niedrige Dissoziationskonstante ( $K_d = 12$  nM) ermittelt. Die Bindung von  $\alpha\text{2VI/V}$  war etwa viermal schwächer ( $K_d = 53$  nM).  $\alpha\text{3BVI/V}$  zeigte auch in dieser Analyse sehr moderate Bindung an Heparin ( $K_d = 185$  nM).  $\alpha\text{5VI/V}$  besaß eher unspezifische Bindungsaktivität für Heparin ( $K_d = 904$  nM). Die Kontrolle reproduzierte die publizierte Bindung zwischen Heparin und  $\text{Ln}\alpha\text{1LG4-5}$  (Andac *et al.*, 1999).

### 3.3.2 Bindung an Sulfatid und Heparansulfat

Das Bindungsverhalten der Fragmente VI/V gegenüber sulfatierten Liganden wurde durch weitere Bindungsstudien im Ligandenbindungstest ausführlich analysiert. Die Bindung an die Perlecan Fragmente V, Vc und IB sowie an Sulfatid wurde überprüft und deren Stärke quantifiziert. Perlecan Fragment Vc ist mit einer einzelnen Heparansulfatkette substituiert (Friedrich *et al.*, 1999). Sein Proteinkern wird durch Fragment V gebildet. Die Substitution von Perlecan Fragment IB besteht aus Chondroitin-/Dermatansulfat (Costell *et al.*, 1997).

Abb. 27A-D zeigt die korrespondierenden Bindungskurven.



**Abb. 27A-D: Ligandenbindungstests** der Fragmente  $\alpha 1\text{VI/V}$  (□),  $\alpha 2\text{VI/V}$  (○),  $\alpha 3\text{VI/V}$  (△) und  $\alpha 5\text{VI/V}$  (▽). Ermittelt wurde das Bindungsverhalten gegenüber Sulfatid (A) und den Perlecan Fragmenten Vc (B), V (C) sowie IB (D). Als immobile Liganden wurden Sulfatid (A) bzw. Laminin-Fragmente (B bis D) eingesetzt.

Tab. 16 fasst die Ergebnisse der Ligandenbindungstests mit den Fragmenten VI/V zusammen. Die im Bindungstest bestimmte Aktivität entspricht der Liganden-Konzentration bei halbmaximaler Bindung.

**Tab. 16: Bindungsaktivitäten der Fragmente VI/V in mM**

Bindungspartner	$\alpha 1\text{VI/V}$	$\alpha 2\text{VI/V}$	$\alpha 3\text{BVI/V}$	$\alpha 5\text{VI/V}$	Abb. 27
Sulfatid	20	20	50	35	A
Perlecan Fragment Vc	45	200	250	250	B
Perlecan Fragment V		keine Bindung			C
Perlecan Fragment IB		keine Bindung			D

Für die Interaktion mit Sulfatid wurden vergleichbare Bindungsaktivitäten für alle Isoformen ermittelt ( $K_d = 20$  bis  $50$  nM).  $\alpha 1\text{VI/V}$  zeigte mit einer Bindungsstärke von  $45$  nM stärkere Wechselwirkung mit dem Heparansulfat von Perlecan Fragment Vc als die übrigen  $\alpha$ -Ketten ( $K_d = 200$  bis  $250$  nM). Der Proteinanteil von Fragment Vc wird durch Fragment V repräsentiert. Da keine Bindungsaktivität für dieses nicht-substituierte Protein gefunden wurde, kann die Wechselwirkung der Heparansulfatkette zugeschrieben werden. Das Chondroitin-/Dermatansulfat-substituierte Perlecan Fragment IB zeigte keine Bindung an die Fragmente VI/V.

### **3.3.3 Bindung an Laminin & Inhibition der Polymerisation**

Die Polymerisationsfähigkeit der Fragmente VI/V aller Ketten wurde mittels Inhibitionstest gezeigt und durch Plasmonresonanz-Messungen weiter analysiert.

Es konnte ein Inhibitionstest etabliert werden, der auf der Quantifizierung mittels Radioimmuntest basiert. Als Bindungspartner wurde der Laminin-1/Nidogen-1-Komplex (Ln/Nd) verwendet. Die Fragmente VI/V wurden im gleichen molaren Verhältnis (1:1) bzw. im vierfachen Überschuss (1:5) eingesetzt. Die Pepsin-generierten Fragmente V-P wurden nur im Verhältnis 1:5 vorgelegt, da keine bzw. nur schwache Bindung erwartet werden konnte. Als Positivkontrolle wurde das Laminin-Fragment E4 eingesetzt, welches Ln $\beta$ 1VI/V entspricht und bereits in früheren Studien verwendet worden ist (Yurchenco & Cheng, 1993). Der Polymerisationsprozess ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die Komplexbildung zweiwertiger Kationen durch EDTA wurde als vollständige Inhibition der Polymerisation betrachtet.



In Tab. 17 werden die Ergebnisse der Studie wiedergegeben.

**Tab. 17: Polymerisationsstudie: Inhibition der Lamininpolymerisation durch die Fragmente VI/V und V-P.** Die Werte für die Inhibitionen wurden als Durchschnittswerte aus 3 bis 4 Einzelmessungen mit der Standardabweichung (SD) ermittelt.

Kette	Fragment	Modul	Inhibition [% $\pm$ SD]	
			1:1	Ln/Nd : Fragment 1:5
$\alpha$ 1	VI/V	LN-LE4	13 $\pm$ 7	48 $\pm$ 17
	V-P	LE4		13 $\pm$ 3
$\alpha$ 2	VI/V	LN-LE4	6 $\pm$ 2	47 $\pm$ 20
	V-P	LE4		28 $\pm$ 9
$\alpha$ 3B	VI/V	LN-LE3	69 $\pm$ 14	82 $\pm$ 12
	V-P	LE3		57 $\pm$ 6
$\alpha$ 5	VI/V	LN-LE3	48 $\pm$ 13	80 $\pm$ 16
	V-P	LE3		7 $\pm$ 2
$\beta$ 1	VI/V	LN-LE4	16 $\pm$ 5	54 $\pm$ 8
EDTA				88 $\pm$ 14

Im Inhibitionstest zeigten die Fragmente VI/V von  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 bei 0,32  $\mu$ M geringe Aktivität (13 bzw. 6 %), erreichten im 4-fachen Überschuss jedoch knapp 50 %. Die Fragmente  $\alpha$ 3BVI/V und  $\alpha$ 5VI/V zeigten bei 0,32  $\mu$ M deutliche Inhibition (69 bzw. 48 %) und erzielten 1,6  $\mu$ M eingesetzt annähernd die Wirkung von EDTA (82 bzw. 80 %). Die Inhibition der Positivkontrolle Ln $\beta$ 1VI/V war vergleichbar mit der von  $\alpha$ 1VI/V.

Die Fragmente V-P der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 5-Kette zeigten im vierfachen Überschuss geringen inhibitorischen Effekt (13 bzw. 7 %), wohingegen die Fragmente  $\alpha$ 2V-P und  $\alpha$ 3BV-P deutliche Inhibition verursachten (28 bzw. 57 %).

Für die genaue Quantifizierung der Polymerisation sollte die Wechselwirkung der Laminin  $\alpha$ -Ketten mit Laminin-1 bzw. einzelnen Ketten untersucht werden. Hierfür wurden Plasmonresonanz-Analysen durchgeführt. Aus den kinetischen Parametern der betrachteten Interaktionen wurden deren Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_d$  errechnet. Die Messungen wurden an einem CM5-Sensorchip (Pharmacia Biosensor, Freiburg) durchgeführt. Die löslichen Liganden wurden in TBS/ 1 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0,05 % (w/v) P20 zu 0,1 bis 5  $\mu$ M verdünnt. Die Bindung an den immobilisierten Liganden erfolgte bei einer Flussrate von 20  $\mu$ l/ min und 25°C. Tab. 18 gibt den Einsatz der Liganden und die kinetischen Daten wieder.

**Tab. 18: Plasmonresonanz-Analysen der Bindung der Fragmente VI/V an Laminin-1 und sich selbst**

immobil	Liganden		$k_{\text{diss}} \times 10^3$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{ass}} \times 10^{-3}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [μM]
		löslich			
Laminin-1		α1VI/V	0,5	2,4	0,21
		α2VI/V	keine Bindung		>10
		α3BVI/V	0,18	7,5	0,024
		α5VI/V	0,32	4,6	0,069
α3BVI/V		α1VI/V	1,1	2	0,55
		α3BVI/V	12,5	4,2	3
		α5VI/V	9	3,6	2,5
γ1VI/V		α1VI/V	13	2,1	6,2
		α3BVI/V	2,3	8	0,29
		α3BV-P	keine Bindung		>10
		α5VI/V	2,7	0,6	4,5

Das Fragment α3BVI/V zeigte starke Bindung an Laminin-1 ( $K_d = 0,024 \mu\text{M}$ ). α1VI/V hat zehnmal ( $K_d = 0,21 \mu\text{M}$ ) und α5VI/V um Faktor 3 schlechter ( $K_d = 0,069 \mu\text{M}$ ) gebunden. α2VI/V wurde in höchster Konzentration zu 4 μM in die Analyse eingesetzt, eine Wechselwirkung mit Laminin konnte jedoch nicht gemessen werden, was nicht kongruent zu den Daten der Inhibitionsstudie ist. Immobilisiertes α3BVI/V zeigte moderate Bindung an α1VI/V ( $K_d = 0,55 \mu\text{M}$ ) und geringe Bindung an sich selbst ( $K_d = 3 \mu\text{M}$ ) bzw. α5VI/V ( $K_d = 2,5 \mu\text{M}$ ). Hohe Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich wurden für die Interaktion der Fragmente α1VI/V ( $K_d = 6,2 \mu\text{M}$ ) und α5VI/V ( $K_d = 4,5 \mu\text{M}$ ) an immobilisiertes Lnγ1VI/V ermittelt. Dagegen zeigte das lösliche Fragment α3BVI/V deutliche Bindung ( $K_d = 0,29 \mu\text{M}$ ), das Fragment α3BV-P wurde nicht gebunden. Demnach leistet das LN-Modul von Lnα3B den Hauptbeitrag zur Polymerisation, trotz des beobachteten Inhibitionseffektes von Fragment V-P.

### 3.3.4 Übersicht der Bindungsaktivitäten

Das Bindungsverhalten der Fragmente VI/V gegenüber Heparin, Sulfatid, Heparansulfat und Laminin wurde mittels unterschiedlicher Verfahren analysiert und soll in folgender Tabelle resümiert werden.

**Tab. 19: Zusammenfassung aller ermittelten Bindungsaktivitäten der Fragmente VI/V** und der eingesetzten Methoden. Diese waren Affinitätschromatographie (AC), Oberflächen-Plasmonresonanz (OPR), Ligandenbindungstest (LBT) sowie Inhibition der Polymerisation (INH). Keine Bindung (k.B.).

Kette	Bindungsaktivitäten für						
	Heparin		Sulfatid	Perlecan Fragment Vc		Laminin	
	AC [M NaCl]	OPR $K_d$ [nM]	LBT [nM]	LBT [nM]		INH 1:1 [%]	OPR $K_d$ [ $\mu$ M]
$\alpha$ 1	0,27	12,2	20	45		13	0,21
$\alpha$ 2	0,24	53,3	20	200		6	>10
$\alpha$ 3B	0,14	185	50	250		69	0,024
$\alpha$ 5	k.B.	904	35	250		48	0,069

Durch Affinitätschromatographie und Plasmonresonanz-Analysen konnte starke Bindung von  $\alpha$ 1VI/V und  $\alpha$ 2VI/V an Heparin gemessen werden.  $\alpha$ 3BVI/V zeigte noch moderate Bindung. Der durch Affinitätschromatographie ermittelte Wert lag mit einer Ionenstärke von 0,14 M NaCl knapp unter dem physiologischen Wert.  $\alpha$ 5VI/V besaß keine Bindungsaktivität für Heparin. Beide Messmethoden lieferten vergleichbare Daten.

Für die Interaktion mit Sulfatid wurden für alle Isoformen äquivalente Bindungsaktivitäten im Ligandenbindungstest ermittelt.

$\alpha$ 1VI/V zeigte im Vergleich zu den übrigen  $\alpha$ -Ketten fünffach stärkere Bindung an die Heparansulfatketten von Perlecan Fragment Vc. Dessen Proteinanteil Fragment V sowie das Chondroitin-/Dermatansulfat-substituierte Perlecan Fragment IB zeigte keine Bindung an die Fragmente VI/V.

Die Polymerisationsstudien bestätigen allen untersuchten  $\alpha$ -Ketten die Beteiligung an der Ausbildung quasi-hexagonaler Netzwerke. Alle Fragmente polymerisierten mit Laminin-1 bzw. einzelnen Laminin-Ketten.  $\alpha$ 3BVI/V zeigte Bindung an sich selbst. Die Ergebnisse legen die Hauptbeteiligung der LN-Module an der Lamininpolymerisation nahe. Die LE-Module der Laminine  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3B leisten einen scheinbar höheren, wenn auch geringen, Beitrag zur Polymerisation als die der Ketten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 5.

### **3.3.5 Modulare Lokalisierung gefundener Interaktionen**

Die Bindungsaktivitäten für Heparin, Sulfatid, Heparansulfat und Laminin wurden mittels der rekombinanten Fragmente VI/V bestimmt und konnten somit nicht explizit den LN-Modulen zugeordnet werden. Aufgrund ihrer Instabilität ist die Produktion der LN-Module weder rekombinant (Abschnitt 3.1.2) noch durch gezielte proteolytische Degradation (Abschnitt 3.2.4) möglich. Um die Interaktion zwischen den Liganden und den LN-Modulen nachzuweisen, sollte daher die Bindung an die LE-Module ausgeschlossen werden.

Das Bindungsverhalten der Fragmente V-P (Abschnitt 3.2.5) wurde mittels analytischer Affinitätschromatographie sowie Plasmonresonanz-Messungen (Heparin), Ligan- denbindungstest (Sulfatid, Perlecan Fragment Vc), Plasmonresonanz-Messungen sowie Polymerisationsinhibition (Laminin, Abschnitt 3.3.3) charakterisiert. Keine der Bindungs- aktivitäten der Fragmente VI/V konnte mittels ihrer LE-Module reproduziert werden. Somit ist die Lokalisierung der Epitope für die beschriebenen Bindungen auf den LN-Modulen der Laminin  $\alpha$ -Ketten wahrscheinlich. Eine Ausnahme bilden die Fragmente V-P von L $\alpha$ 2 und L $\alpha$ 3B, die einen gewissen Beitrag zur Polymerisation leisten.

### **3.3.6 Kartierung von Bindungsstellen auf Laminin $\alpha$ 1VI/V**

Sulfatid und Heparin sowie die HS-Seitenketten von Perlecan wurden als Bindungs- partner für die LN-Module der Laminin-Ketten  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 ermittelt. Um die Bin- dungsepitope für die gezeigten Interaktionen zu lokalisieren, wurde am Beispiel von  $\alpha$ 1VI/V eine Mutationsstudie durchgeführt.

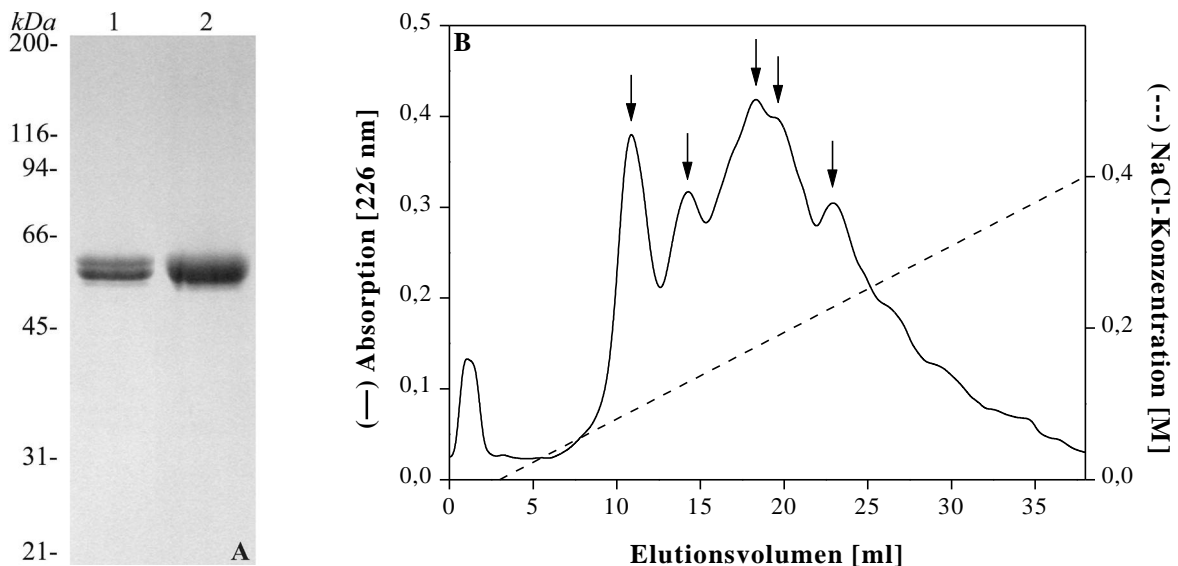
Die Heparin-Protein-Interaktion beruht zu einem großen Teil auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Sulfatgruppen des Heparins und positiv geladenen, basischen Aminosäuren, besonders Arginin und Lysin. Für Histidin, welches ebenfalls basischen Charakter besitzt, wurde kein Effekt nachgewiesen. (Sun & Chang, 1990; Busby *et al.*, 1995; Faham *et al.*, 1996). Der Austausch basischer Aminosäuren gegen unpolares Alanin kann zu einer Verminderung oder Eliminierung der Bindung zu einem der Bindungspartner führen (Andac *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999; Hopf *et al.*, 2001). Für die Planung der Mutationsstudie wurde zunächst die Beteiligung von Arginin und Lysin an den betrachteten Bindungen mittels chemischer Modifikation der Reste evaluiert.

### 3.3.6.1 Chemische Modifikationen

Für die Analyse der elektrostatisch vermittelten Bindungen an sulfatierte Liganden wurde  $\alpha 1\text{VI/V}$  Lysin- bzw. Arginin-modifiziert und der Einfluss dieser Reste durch Affinitätschromatographie bestimmt.

#### 3.3.6.1.1 Lysin-Modifikation

Die Acetylierung von Lysinen mit Acetanhydrid nach Fraenkel-Conrat (1957) wurde mit 500  $\mu\text{g}$   $\alpha 1\text{VI/V}$  durchgeführt. Die Modifikation induzierte geringe Präzipitatbildung. Die sich anschließende analytische Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose führte zur Trennung von 5 Spezies, die sich in ihrem Elutionsverhalten unterschieden: 0,08/ 0,12/ 0,17/ 0,19/ 0,24 M NaCl.

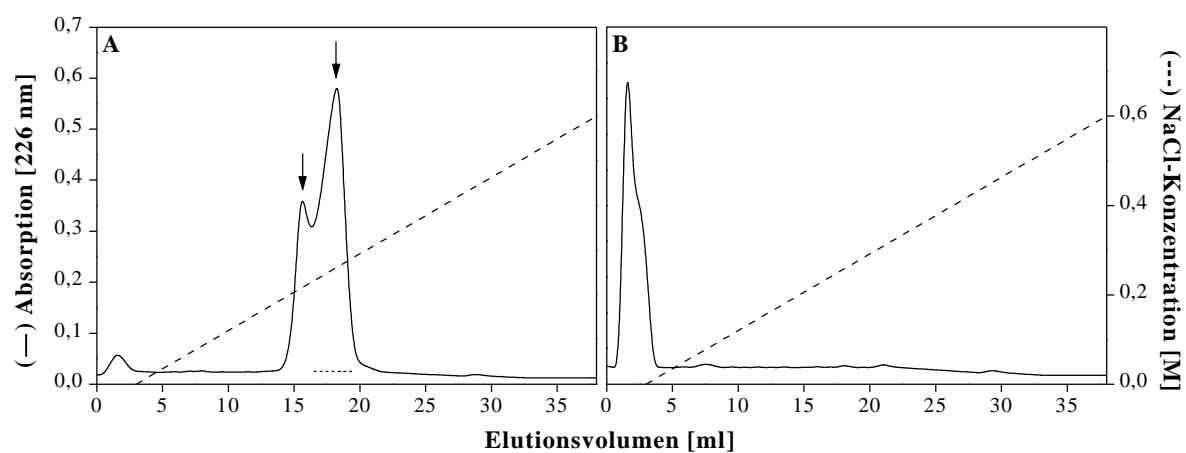


**Abb. 28A-B: Elektrophorese und Affinitätschromatographie von  $\alpha 1\text{VI/V}$  nach Lysin-Modifikation.** SDS-PAGE (A) von  $\alpha 1\text{VI/V}$  vor (1) und nach (2) Lysin-Modifikation. Gezeigt werden Elektrophoresen unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Coomassie-Färbung. Das Profil der Chromatographie an Heparin-Sepharose (B) gibt die Absorption bei 226 nm (—) sowie den Verlauf des NaCl-Gradienten (---) wieder. Die Pfeile markieren die Peaks der unterschiedlichen Proteinspezies. Das Profil von nicht-modifiziertem  $\alpha 1\text{VI/V}$  ist in Abb. 26A (Seite 67) dargestellt.

#### 3.3.6.1.2 Arginin-Modifikation

Die Phenylglyoxylierung von Argininen nach Takahashi (1968) sieht eine 3-stündige Reaktion mit 1 % Phenylglyoxal vor. Hierfür wurden 2 mg  $\alpha 1\text{VI/V}$  eingesetzt. Die Behandlung (ArgI) führte zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Durch die Modifikation ionischer Seitenketten kann die Löslichkeit von Proteinen beeinträchtigt werden. Bei der Arginin-Modifikation von  $\alpha 1\text{VI/V}$  erscheint dieser Effekt sehr deutlich.

Um die Modifikation ohne Ausfallen des Proteins zu ermöglichen, erfolgte eine weitere Reaktion unter sehr milden Bedingungen: 1 h 0,05 % Phenylglyoxal (ArgII). Diese Variante der Phenylglyoxylierung führte zu geringer Präzipitatbildung. Das modifizierte Protein konnte einer analytischen Affinitätschromatographie unterzogen werden. Das Profil zeigte zwei Proteinspezies, deren Elution bei einer Ionenstärke von 0,22 M bzw. 0,27 M NaCl erfolgte. Die Hauptfraktionen der Chromatographie wurden vereint und nach Konzentrations-Bestimmung einer weiteren Modifikation unterzogen: 1 h 0,5 % Phenylglyoxal (ArgIII). Diese Reaktion zeigte wieder deutlich mehr Präzipitatbildung und führte zur Inaktivierung der Bindung von  $\alpha$ 1VI/V an Heparin.



**Abb. 29A-C: Affinitätschromatographien und Elektrophoresen von  $\alpha$ 1VI/V nach Arginin-Modifikation.** Die Profile der Chromatogramme von ArgII (A) und ArgIII (B) an Heparin-Sepharose geben die Absorption bei 226 nm (—), den NaCl-Gradienten (---) und die für ArgIII vereinigten Fraktionen (----) wieder. Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Proteinspezies von ArgII. Das Profil von nicht-modifiziertem  $\alpha$ 1VI/V ist in Abb. 26A (Seite 67) dargestellt. Die SDS-PAGE (C) zeigt  $\alpha$ 1VI/V (1) ArgI (2) ArgII (3) und ArgIII (4) nach nicht-reduzierender Auftrennung und Coomassie-Färbung.

Die Ergebnisse lassen auf die Beteiligung sowohl von Lysin als auch Arginin an der Heparinbindung von  $\alpha$ 1VI/V schließen. Die vollständige Modifikation der Arginine führte zur Unlöslichkeit des Proteins. Die schonende Variante der Phenylglyoxylierung macht eine unvollständige Modifikation möglich, worauf auch das Entstehen von nur zwei Spezies hindeutet.



**Tab. 20: Oligonukleotide für die Klonierung der Mutanten von a1VI/V-BM.** Den Bezeichnungen der Oligonukleotide (Bez.) werden die resultierenden Mutanten, die Position der Mutation (Pos.), die Richtung (5'-3', strangabwärts/ 3'-5', strangaufwärts) und die Sequenz der Oligonukleotide zugeordnet. Die mutierten Basen sind fett dargestellt.

Bez.	Mutante	Pos.	Richtung	5'-3'-Sequenz
O1			5'-3'	GCCCCGCTAGCACAGCAGAGAGGCTTGTTC
O6			3'-5'	TCAGTTAGCGGCCGCTCACTCGGAGCAGCCCTCGG
O15	K1	51	5'-3'	CCTGTGGAGAGG <b>CGGGGCCT</b> GAGATGTTCTGC
O16			3'-5'	CTCAGGCC <b>CCCGCCT</b> TCCACAGGTAGCATTGG
O17	K2	58	5'-3'	GATGTTCTG <b>CGCACT</b> CGTGGAGCACGTGCC
O18			3'-5'	GCTCCACGAGT <b>GCGC</b> AGAACATCTCAGGCC
O19	K3	132	5'-3'	CATCATCATT <b>G</b> CAGCTGCCAATGCCCTCG
O20			3'-5'	GCATTGGCAGCT <b>G</b> CAATGATGATGTATGCAACTTGAA
O21	K4	152	5'-3'	GGATGGCGT <b>CGCG</b> TTCAAACCCTGGCAGTAC
O22			3'-5'	GGGTTTGAAC <b>GCG</b> ACGCCATCCACGGAGC
O23	K5	154	5'-3'	GGCGTCAAGT <b>TCGC</b> ACCCTGGCAGTACTATGCC
O24			3'-5'	GCCAGGGT <b>GCG</b> AACTTGACGCCATCCACG
O25	K6	171	5'-3'	CCCCTAC <b>GCA</b> ATAACTCCACGGCGGGG
O26			3'-5'	CCGTGGAGTTATT <b>GCG</b> TAGCGGGTCAAACACTCTG
O27	K7	195	5'-3'	CGTATTAT <b>TCAGCG</b> CTGGTGCCACTTGAACATG
O28			3'-5'	GGCACCAG <b>CGCT</b> GAATAATACGAGGTGCAGATG
O29	K8	269	5'-3'	CTATTCGAT <b>AGC</b> AGACATTTCCGTTGGAGGC
O30			3'-5'	CGGAAATGTCT <b>GCT</b> ATCGAATAGTAATAACGTCTTG
O31	R1	27	5'-3'	GCCCCGCTAGCACAGCAG <b>G</b> CAGGCTTGTTCCTGCCATTC
O32	R2/3	66/69	5'-3'	GGG <b>CGCGC</b> CTGTT <b>G</b> CACACGCCAATGCCGGG
O33			3'-5'	GGGCGTGT <b>GCA</b> ACAGG <b>CGCG</b> CCCGGCACGTGCTCC
O34	R2	66	5'-3'	GCACGTGCCGGG <b>CGCG</b> CCTGTTTCGACACGCC
O35			3'-5'	CGAACAGG <b>CGCG</b> CCCGGCACGTGCTCC
O36	R3	69	5'-3'	CGGGCCGGCCTGTT <b>G</b> CACACGCCCAATGCCGGG
O37			3'-5'	GGGCGTGT <b>GCA</b> ACAGGCCCGGCCCGG
O38	R4	74	5'-3'	CGCCCAAT <b>GCG</b> CGGTCTGTGACGGTAACAGT
O39			3'-5'	CCGTACAGACC <b>CGCG</b> CATTGGGCGTGTGCAAC
O40	R5/6	84/86	5'-3'	CGAATCCT <b>G</b> CAGAG <b>GCCC</b> ATCCGATATCACACGC
O41			3'-5'	CGGATGGG <b>CCT</b> CT <b>G</b> CAGGATTCTGACTGTTACCG
O42	R7	109	5'-3'	CAGAATGGGG <b>C</b> AGAGTACTACTGGGTCAGT
O43			3'-5'	CCAGTGATACTCT <b>G</b> CCCCATTCTGAATACTGGGG
O44	R8	121	5'-3'	CCCTGGACTT <b>AGCG</b> CAGGTCTTTCAAGTTGCAT
O45			3'-5'	GAAAGACCT <b>GCG</b> CTAAGTCCAGGGTGACAGTG
O46	R9	169	5'-3'	GTTTGACC <b>G</b> CCTACAAAATAACTCCACGGC
O47			3'-5'	GGAGTTATTTTGTAG <b>GCG</b> GTCAAACACTCTGTATCGC
O48	R10/11	175/176	5'-3'	GCTACAAAATAACTCC <b>AGCGG</b> CGGGACCTCCCCTTACAG
O49			3'-5'	GGTCCC <b>GCG</b> CTGGAGTTATTTTGTAGCGGG
O50	R12	182	5'-3'	CCCCTTACGCAGCAGACAACGAAGTCATCTG
O51			3'-5'	CGTTGTCTGCTGCGTAAGTGGGAGGTCCCCG
O52	R13	212	5'-3'	CTCATCAATGG <b>CG</b> CACCCAGCGCTGACGACCC
O53			3'-5'	GCGCTGGGT <b>GCG</b> CCATTGATGAGTGATGTGTG
O54	R14	229	5'-3'	CCTCAGCAG <b>CGT</b> ACATTTCGCCTTCGTCTGC
O55			3'-5'	GGCGAATGTACGCTGCTGAGGTGAATTCCAGC
O56	R15/16	232/234	5'-3'	GCGTACATT <b>GCC</b> CTT <b>GCT</b> CGTCAGCGCATCAGAACAC
O57			3'-5'	GACGAG <b>CAAGGG</b> CAATGTACGCTGCTGAGGTG
O58	R15	232	5'-3'	CGGTACATT <b>GCC</b> CTTCGTCGTCAGCGCATC
O59			3'-5'	GACGACGAAGGG <b>CA</b> ATGTACCGTCTGAGGTG
O60	R16	234	5'-3'	CATTCGCCTT <b>GCT</b> CGTCAGCGCATCAGAACAC
O61			3'-5'	GCGCTGACGAG <b>CA</b> AGGCGAATGTACCGTCTG
O62	R17	239	5'-3'	GCAGCGCAT <b>CG</b> CAACTCAACGCAGACCTC
O63			3'-5'	GCGTTGAGTGTT <b>GCG</b> ATGCGCTGCAGACGAAGG
O64	R18	251	5'-3'	CCCTTAGCCAT <b>GCG</b> GACCTCAGAGACCTTGAC
O65			3'-5'	CTGAGGTCC <b>G</b> CATGGCTAAGGGTCATGAGG



Im ersten Schritt der zweistufigen Fusions-PCR wurden das 5'- und das 3'-Fragment der jeweiligen Mutante in separaten Reaktionen erzeugt. Das 5'-Fragment ergab sich aus dem Einsatz von O1 und dem strangaufwärts-gerichteten Oligonukleotid der Mutante; das 3'-Fragment aus O6 und dem strangabwärts-gerichteten Oligonukleotid. Im zweiten Schritt wurden die Fragmente miteinander fusioniert und anschließend durch Zugabe beider terminalen Oligonukleotide (O1 und O6) amplifiziert. Eine Ausnahme machte die Klonierung der Mutante R1: Die Einführung der Mutation an Position 27 war mittels 5'-überhängendem Oligonukleotid (O31) möglich, welches zusätzlich die *NheI*-Schnittstelle enthielt. Die Polymerisation erfolgte direkt durch Standard-PCR mit O6 und O31. Die Klonierung der mutierten Fragmente erfolgte über *NheI/NotI* in den Expressionsvektor pCEP-Pu wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Die korrekte Sequenz der PCR-Produkte und deren Insertion im richtigen Leserahmen wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Die Mutanten K2, R15/16, R15 und R16 konnten nicht zur stabilen Expression gebracht werden. Durch Hybridisierung mit  $\alpha 1VI$ -spezifischer cDNA-Sonde nach Northern-Blot wurde die Transkription der mRNA dieser Fragmente bestätigt. Daher ist ein negativer Einfluss der Substitution auf die Struktur dieser vier Proteine denkbar. Alle übrigen 22 Mutanten konnten in vergleichbarer Effizienz wie  $\alpha 1VI/V$ -BM exprimiert und gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte analog der des Wildtyps über Affinitätschromatographie und Gelfiltration (Abschnitt 3.1.2.4). Die aufgereinigten Proteine eluierten in der Gelfiltration nach dem gleichen Volumen wie der Wildtyp. Die SDS-Elektrophorese zeigte für alle Mutanten eine molekulare Masse von 62 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Antikörper-Titrations ergaben gleiche Titer verglichen mit dem Wildtyp. Diese Parameter deuten auf monomere Proteine ohne Fehlfaltung hin.

Zur Lokalisierung von Bindungsstellen wurden die gereinigten 22 Mutanten auf ihre Bindungsaktivitäten im Vergleich mit dem Wildtyp getestet. Hierfür wurden folgende Methoden eingesetzt: analytische Affinitätschromatographie (Heparin) und Ligandenbindungstest (Sulfatid, Perlecan Fragment Vc). Die Ergebnisse sind in Tab. 21 zusammengefasst.

**Tab. 21: Effekt der Alanin-Mutagenese in Laminin  $\alpha$ 1VI/V-BM auf die Bindungseigenschaften.** Mutierte Reste sind fett dargestellt. Keine Bindung (k.B.).

Mutante	Mutierte Sequenz	Position der mutierten Sequenz	Bindungsaktivitäten für		
			Heparin [M NaCl]	Sulfatid [nM]	Perlecan Fragment Vc [nM]
WT		-	0,27	20	40
K1	CGEK <b>K</b> GP	51	0,27	35	35
K2	MF <b>C</b> KL <b>V</b>	58		keine stabile Expression	
K3	III <b>K</b> AA	132	0,27	70	100
K4	GV <b>K</b> FK <b>P</b>	152	0,27	30	40
K5	GV <b>K</b> FK <b>P</b>	154	0,27	20	85
K6	TRY <b>K</b> IT	171	0,27	15	45
K7	Y <b>S</b> KL <b>V</b>	195	0,25	200	40
K8	Y <b>S</b> IK <b>D</b> I	269	0,26	50	100
R1	Q <b>Q</b> RGLF	27	0,27	40	45
R2/3	GR <b>P</b> V <b>R</b> H	66/69	0,21	600	40
R2	GR <b>P</b> V <b>R</b> H	66	0,24	200	50
R3	GR <b>P</b> V <b>R</b> H	69	0,24	200	45
R4	Q <b>C</b> R <b>V</b> C <b>D</b>	74	0,24	80	60
R5/6	N <b>P</b> R <b>E</b> R <b>H</b>	84/86	0,24	350	k.B.
R7	Q <b>N</b> G <b>R</b> E <b>Y</b>	109	0,27	40	40
R8	LD <b>L</b> R <b>Q</b> V	121	0,27	40	80
R9	CL <b>T</b> R <b>Y</b> K	169	0,27	70	75
R10/11	TP <b>R</b> R <b>G</b> P	175/176	0,24	250	k.B.
R12	PT <b>Y</b> R <b>A</b> D	182	0,25	40	50
R13	IN <b>G</b> R <b>P</b> S	212	0,27	80	40
R14	S <b>A</b> R <b>Y</b> I <b>R</b>	229	0,27	20	125
R15/16	Y <b>I</b> R <b>L</b> R <b>L</b>	232/234		keine stabile Expression	
R15	Y <b>I</b> R <b>L</b> R <b>L</b>	232		keine stabile Expression	
R16	IR <b>L</b> R <b>L</b> Q	234		keine stabile Expression	
R17	Q <b>R</b> I <b>R</b> T <b>L</b>	239	0,25	60	125
R18	SH <b>R</b> D <b>L</b> R	251	0,27	70	80

Zur Vereinfachung der Ergebnisse der Studie folgt in Tab. 22 eine Gewichtung der Effekte abhängig von den untersuchten Liganden.

**Tab. 22: Gruppierung der Mutanten nach Stärke ihrer Effekte.** Die Zahlen in Klammern geben die Sequenzposition mutierter Reste an (vgl. Abb. 31, Seite 81).

Ligand	Effekt der Mutation		
	gering	moderat	stark
Heparin	K7 (195) K8 (269)	R2 (66) R3 (69) R4 (74) R5/6 (84/86) R10/11 (175/176)	R2/3 (66/69)
Sulfatid	R4 (74) R9 (169)	K7 (195) R2 (66) R3 (69)	R2/3 (66/69) R5/6 (84/86) R10/11 (175/176)
Perlecan Fragment Vc	K5 (154) R9 (169) R18 (251)	K3 (132) K8 (269) R14 (229) R17 (239)	R5/6 (84/86) R10/11 (175/176)

8 der insgesamt 22 Mutanten hatten keinen Effekt auf die Bindungseigenschaften. 6 zeigten geringen Effekt, 10 moderaten Effekt und 3 Mutanten zeigten starken Effekt auf mindestens eine der untersuchten Bindungen. Die Projektion der Ergebnisse auf die Sequenz des LN-Moduls von Laminin  $\alpha 1$  (Abb. 31) zeigt die eindimensionale Anordnung der Epitope mit starkem Effekt im Vergleich zu den übrigen  $\alpha$ -Ketten.

$\alpha 1$	25	.....	..QQRGLFP	AI LN	LATNAHIS	ANATCGEK	GP .....	E MFCKLV....	.EHVPGRPV*	69				
$\alpha 2$	20	SQTQRRQ	SQA HQQRGL	FP	AV LN	LASNALIT	TNATCGEK	GP .....	E MYCKLV....	.EHVPGQP	75			
$\alpha 3B$	32	...VVGQD	HDP MSSRSL	HPPY FN	LAQAARIW	ATATCGER	DP ..EVS	RRPE LFCKLV	GPGA AQGS	.GHTIQ	95			
$\alpha 5$	41	.....RTPG	GDGFSL	HPPY FN	LAEGARIT	ASATCGEE	AP TRSVSR	PTE	LYCKLV	GPGV	AGGDPNQT	104		
$\alpha 1$	70	HAQCRV	CDGN STNPR	ERHPI	SHAIDGT	TNNW WQSP	SIQNGR	EYHWVT	TLD LRQV	FQVAYI	IIKAA	NAPRP	139	
$\alpha 2$	76	NPQCRIC	NQN SSNPY	QRHPI	TNAIDG	KNTW WQSP	SIKNGV	EYHYVT	TLD LQQV	FQIAYV	IVKAAN	SPRP	145	
$\alpha 3B$	96	GQPCDYC	.N SEDSR	KAHPA	SHAIDG	SERW WQSP	PSSGT QYNQ	VNLTLD	LGQLF	HVAYI	LIKFA	NSPRP	163	
$\alpha 5$	105	GQYCDIC	.T AANSN	KAHPV	SNAIDG	TERW WQSP	PLSRGL	EYNEVN	TLD LGQV	FHVAYV	LIKFA	NSPRP	172	
$\alpha 1$	140	GNWILERS	VSD .GVK	KPWQY	YAVSD	TECLT RYKIT	PRRGP	PTYRAD	NEVI CTSY	YSKLVP	LEHGEI	HTSL	208	
$\alpha 2$	146	GNWILERS	LD .DVEY	KPWQY	HAVTD	TECLT LYNI	YPRTGP	PSYAKD	DEVI CTSF	YSKIHP	LENGEI	HIHSL	214	
$\alpha 3B$	164	DLWILERS	VSD FGSTY	SPWQY	FAHSRR	DCEV QFG...Q	EAN MAIT	QDDQML	CVTEY	SRIVP	LENGEI	VVSL	230	
$\alpha 5$	173	DLWVLER	STD FGHTY	QPWQF	FASSKR	DCLE RFG...P	RTL ERIT	QDDVVI	CTTEY	SRIVP	LENGEI	VVSL	239	
$\alpha 1$	209	INGRPS	ADD. .PSP	QLEFT	SARYI	RLRLO RIR	TLNADLM	TLSHR	DLRDL	DPVITR	RRYYY	SIKDIS	VGGM	276
$\alpha 2$	215	INGRPS	ADD. .PSP	ELLEFT	SARYI	RLRFQ RIR	TLNADLM	MFAHKD	PREI DPVIT	RRYYY	SVKDIS	VGGM	282	
$\alpha 3B$	231	INGRPG	AKKF AFS	DTLLEFT	KATNIR	LRFL RTNT	LLGHLI	SKAER....	DPTVTR	RRYYY	SIKDIS	VGGR	295	
$\alpha 5$	240	VNGRPG	ALNF SYSP	LLRDFT	KATNIR	LRFL RTNT	LLGHLM	GKALR....	DPTVTR	RRYYY	SIKDIS	IGGR	304	

**Abb. 31: Bindungsepitope auf dem LN-Modul von Laminin  $\alpha 1$  und Sequenzvergleich mit den Laminen  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$ .** Die Mutanten ohne, mit geringem oder moderatem Effekt sind grau unterlegt. Epitope mit starkem Effekt auf eine Bindung sind mit einem Stern (Heparin) bzw. einem Dreieck (PgVc) gekennzeichnet oder schwarz unterlegt (Sulfatid). Mutanten, die nur instabil produziert werden konnten, sind fett ohne Unterlegung dargestellt. Basische Reste der Ketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$ , die parallel zu den lokalisierten Bindungsepitopen liegen, sind unterstrichen.

Es wurden drei nicht-zusammenhängende Bindungsepitope lokalisiert, die starken Einfluss auf die Bindung sulfatierter Liganden zeigten (R2/3, R5/6, R10/11). Alle drei Mutationen führten zur Beeinträchtigung der Sulfatidbindung um Faktor 12,5 bis 30. Nur die Mutation R2/3 führte zu einer Verschlechterung der Bindung des Fragmentes an Heparin um ca. 25 %. Die beiden Mutationen R5/6 und R10/11 führten zur Eliminierung der Bindung an das Heparansulfat von Perlecan Fragment Vc.

Bei der Bindung für Heparin und Sulfatid lässt sich ein additiver Effekt mehrerer Reste moderaten bzw. starken Effektes vermuten. Daher erscheinen Folgerungen aus dem Sequenzvergleich wenig sinnvoll. Der Vergleich der  $\alpha$ -Ketten lässt keine Konservierung basischer Reste (R oder K) innerhalb des Bindungsepitops R2/3 erkennen. Die Sequenzen parallel zur Mutation enthalten ein Arginin in  $\alpha 2$ , aber keine basische Aminosäure in  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$ . Die Bindung an die Heparansulfate von Perlecan Fragment Vc wird durch die Mutationen R5/6 und R10/11 inaktiviert. In der Sequenz von  $\alpha 2$  ist jeweils ein Arginin der

Epitope konserviert.  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  enthalten nur parallel zu jeweils einem Epitop ein Arginin. Diese Verteilung basischer Aminosäuren in den Isoformen korreliert mit deren unterschiedlichen Bindungsaktivitäten gegenüber den Heparansulfaten. In  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  befindet sich in Nachbarschaft zu R10/11 je ein Tyrosin in Position  $\pm 5$  relativ zum Epitop.

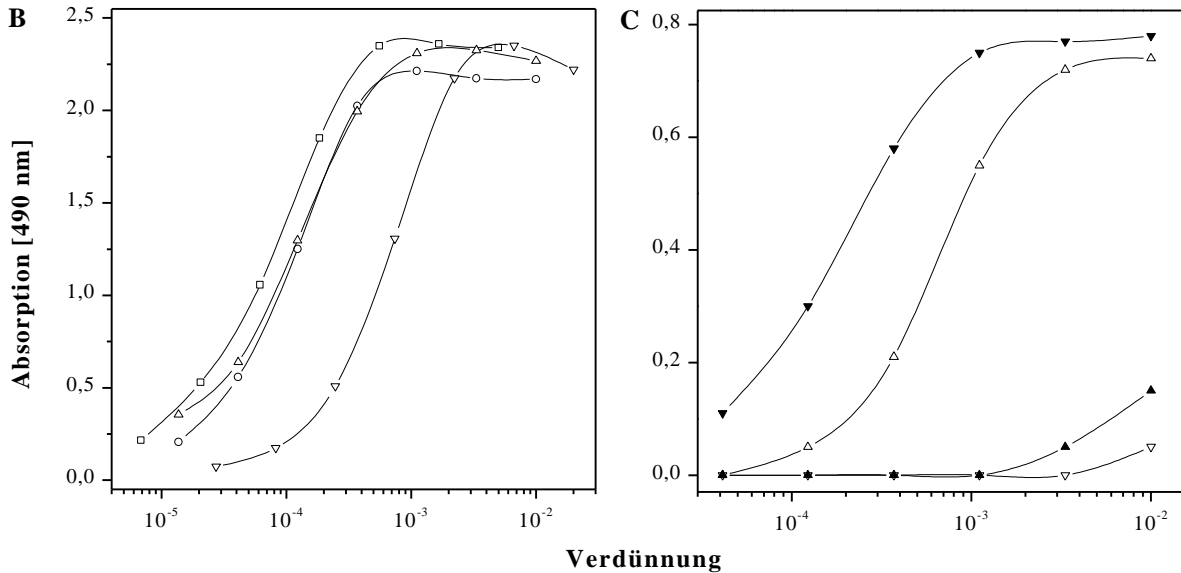
Die Substitution einzelner Aminosäuren kann zur Konformationsänderung des Proteins führen und sich somit negativ auf das Bindungsverhalten auswirken. Daher wurde eine CD-spektroskopische Analyse der drei Mutanten mit starkem Effekt vorgenommen. Im Vergleich mit dem Spektrum von  $\alpha 1VI/V$ -BM zeigten sich keinerlei Unterschiede. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Antikörper-Titrationsen kann ein Einfluss der Substitution auf die Struktur der Mutanten weitgehend ausgeschlossen werden.

### **3.4 Immunologische Untersuchungen**

#### **3.4.1 Herstellung und Charakterisierung von Antiseren**

Die rekombinanten Fragmente VI/V der murinen Laminin  $\alpha$ -Ketten dienen der Herstellung der in Abb. 32A beschriebenen polyklonalen Kaninchen-Antiseren. Das Antiserum Anti- $\alpha 1$  lag bereits vor (Ettner *et al.*, 1998). Die Titer der Seren wurden durch ELISA-Titration bestimmt (Abb. 32B). Die Antiseren wurden für die Identifizierung der Proteine in Immunmarkierungen und die Evaluierung im Ligandenbindungstest sowie im Radioimmuntest eingesetzt. Für immunologische Untersuchungen von Geweben wurden die Seren Anti- $\alpha 3B$  und Anti- $\alpha 5$  affinitätsgereinigt. Titer und Kreuz-Reaktivität der gereinigten Seren (Anti- $\alpha 3B^*$ , Anti- $\alpha 5^*$ ) wurden in einer weiteren ELISA-Titration ermittelt (Abb. 32C).

A	Bezeichnung	Beschreibung	Titer
	Anti- $\alpha$ 1	Anti-Ln $\alpha$ 1VI/V	1 : 10.000
	Anti- $\alpha$ 2	Anti-Ln $\alpha$ 2VI/V	1 : 10.000
	Anti- $\alpha$ 3B	Anti-Ln $\alpha$ 3BVI/V	1 : 10.000
	Anti- $\alpha$ 5	Anti-Ln $\alpha$ 5VI/V	1 : 1.000



**Abb. 32A-C: Antiseren gegen die Fragmente VI/V (A) und ELISA-Titrations zur Bestimmung der (Kreuz-) Reaktivitäten.** Die Titrations in (B) zeigen Anti- $\alpha$ 1 vs.  $\alpha$ 1VI/V ( $\square$ ), Anti- $\alpha$ 2 vs.  $\alpha$ 2VI/V ( $\circ$ ), Anti- $\alpha$ 3B vs.  $\alpha$ 3BVI/V ( $\Delta$ ), Anti- $\alpha$ 5 vs.  $\alpha$ 5VI/V ( $\nabla$ ). Der Titer ergab sich aus der Antikörper-Verdünnung, welche der halbmaximalen Bindung zugeordnet werden konnte. Die (Kreuz-) Reaktivitäten der gereinigten Antiseren Anti- $\alpha$ 3B\* und Anti- $\alpha$ 5\* (C) wurden ermittelt durch: Anti- $\alpha$ 3B\* vs.  $\alpha$ 3BVI/V ( $\Delta$ ), Anti- $\alpha$ 3B\* vs.  $\alpha$ 5VI/V ( $\nabla$ ), Anti- $\alpha$ 5\* vs.  $\alpha$ 5VI/V ( $\blacktriangledown$ ), Anti- $\alpha$ 5\* vs.  $\alpha$ 3BVI/V ( $\blacktriangle$ ). Beide Antiseren zeigten bei halbmaximaler Bindung ihrer Antigene keine Kreuzreaktion.

### **3.4.2 Lokalisierung der Laminin-Ketten $\alpha$ 3B und $\alpha$ 5 in Geweben**

Antiseren gegen rekombinante N-terminale Fragmente von  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 waren bisher nicht zugänglich. Mit Anti- $\alpha$ 3B stand erstmals ein Antiserum zur Verfügung, welches allein gegen die  $\alpha$ 3B-Isoform gerichtet ist und eine Differenzierung zur  $\alpha$ 3A-Kette zulässt. Die gereinigten Antiseren Anti- $\alpha$ 3B\* und Anti- $\alpha$ 5\* ermöglichten die Durchführung immunologischer Studien zur Verteilung dieser Isoformen in murinen Geweben. Hierfür wurden Gewebeschnitte unterschiedlicher Entwicklungsstadien mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

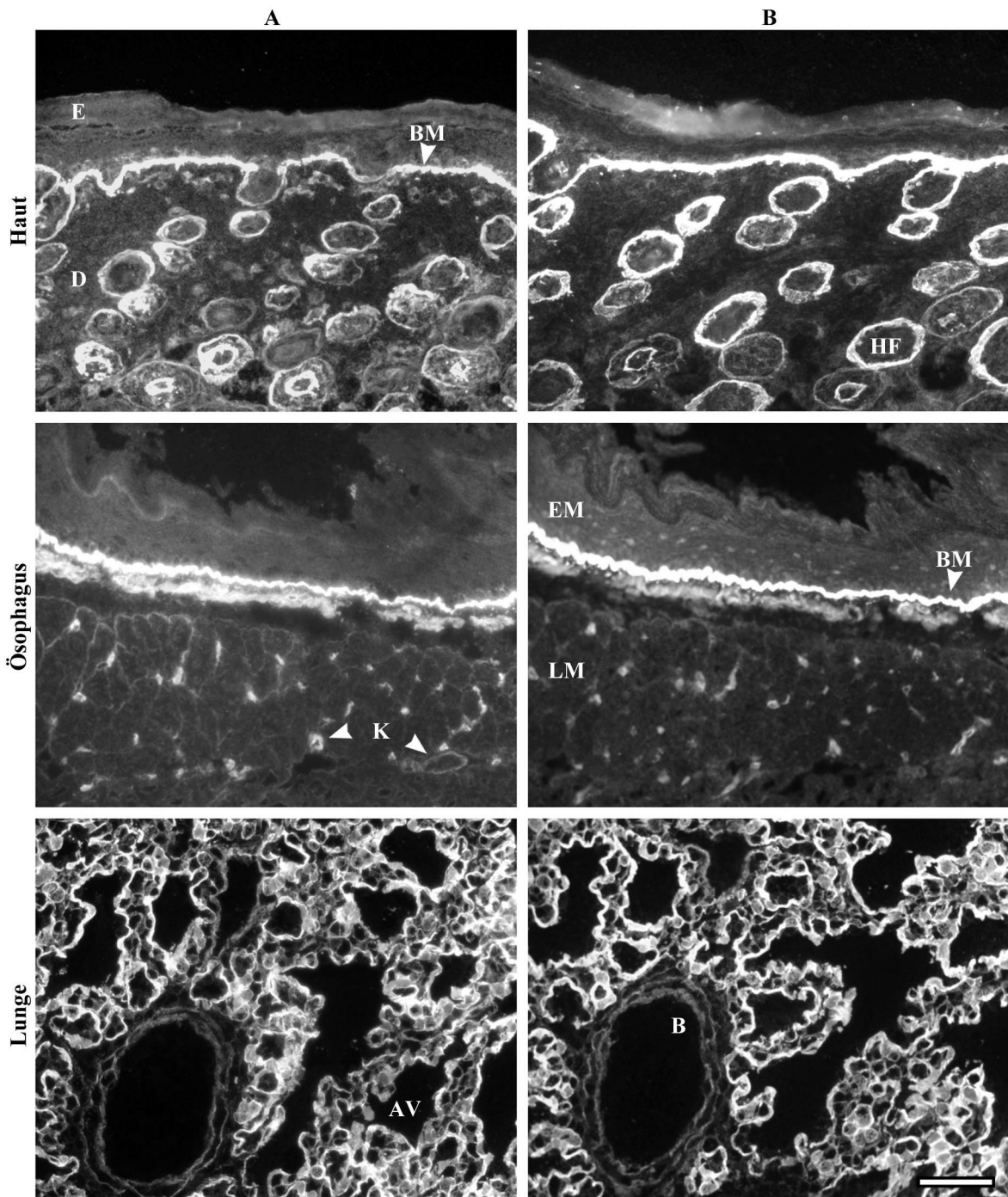
Die Expressionsmuster von  $\alpha 3$ -Ketten wurden mittels der Antiseren Anti- $\alpha 3B^*$  und Anti-Ln $\alpha 3AIIIa$  (Anti- $\alpha 3^*$ ) untersucht (Abb. 33). Während sich Anti- $\alpha 3B^*$  nur gegen den N-Terminus von  $\alpha 3B$  richtet, erkennt Anti- $\alpha 3^*$  (Sasaki *et al.*, 2001) die Domäne IIIA beider Laminin  $\alpha 3$ -Ketten (vgl. Abb. 4, Seite 5).

Beide Antikörper erzeugten in der Haut eine deutliche Anfärbung der BM-Zonen, die der Epidermis unterliegen und Haarfollikel umschließen. Die BM des schuppenartig geschichteten Epitheliums mucosae der Speiseröhre wurden ebenso angefärbt, wie die der unterliegenden glatten Muskulatur der Lamina muscularis mucosae und der vieler Kapillaren. In der Lunge wurde eine deutliche Anfärbung für alveolare, broncheale sowie kapillare BM beobachtet.

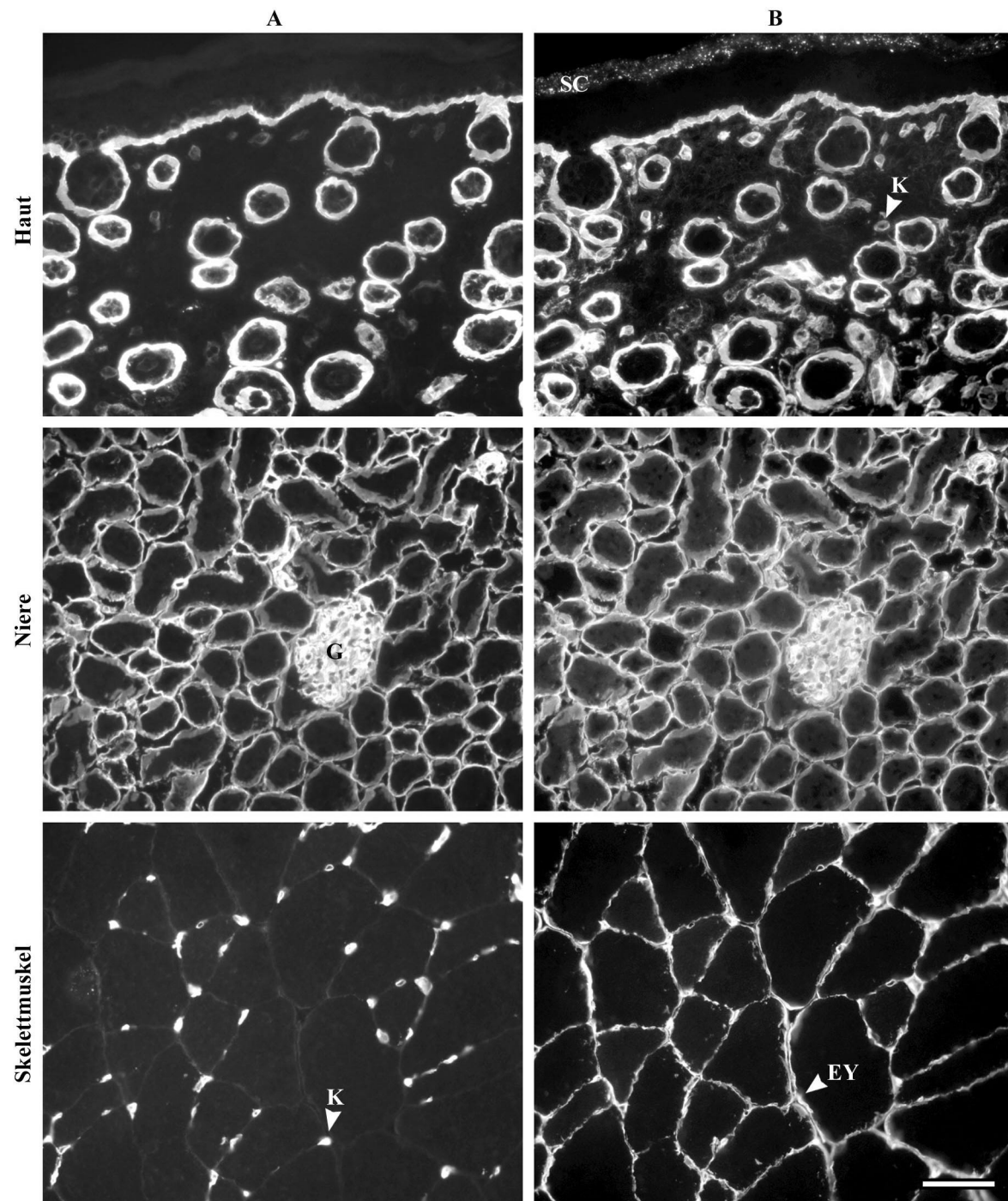
Insgesamt lässt sich aus der Studie eine breite Verteilung der Laminin  $\alpha 3$ -Ketten innerhalb verschiedener Entwicklungsstadien muriner Gewebe ableiten. Die Ergebnisse weisen keine deutlichen Unterschiede in den Expressionsmustern beider  $\alpha 3$ -Ketten aus.

Abb. 34 zeigt die Gewebeverteilung von  $\alpha 5VI/V$  in Haut, Niere und Skelettmuskel. Zusätzlich wurden Doppelfärbungen mit monoklonalem Anti-mNd1 angefertigt. Dieser Antikörper richtet sich gegen murines Nidogen-1. Die Kolokalisation einer Laminin-Kette mit Nidogen, lässt auf das Vorliegen ternärer Komplexe mit Kollagen IV schließen.

In der Haut liegen  $\alpha 5VI/V$  und Nidogen-1 kolokalisiert in den BM der epidermal-dermalen Verbindungszonen und der Haarfollikel vor. Nidogen-1 wurde zusätzlich in Stratum-schichten der äußeren Epidermis und um Kapillaren angefärbt. Auch in Nierenrinde wurde eine deutliche Kolokalisation beider Proteine in glomulären und tubulären BM sowie der von Kapillaren beobachtet. Im Skelettmuskel wurde  $\alpha 5VI/V$  nur in Kapillarwänden und einigen Synapsen gefunden. Dort lag es kolokalisiert mit Nidogen-1 vor, welches zusätzlich starke Färbung im muskulären Endomysium zeigte.



**Abb. 33: Immunfluoreszenz-Lokalisation von  $\alpha 3$ -Ketten in murinen Geweben** mittels Anti- $\alpha 3B^*$  (A) und Anti- $\alpha 3^*$  (B). Es wurden Gefrierschnitte von Haut (neonatal), Ösophagus (adult) sowie Lunge (Embryo, 18,5 Tage) gefärbt. Epidermis (E), Dermis (D), Basalmembran-Zone (BM), Haarfollikel (HF), Epithelium mucosae (EM), Lamina muscularis mucosae (LM), Kapillare (K), Alveole (AV) und Bronchus (B). Die Länge des Balkens entspricht 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 34: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Laminin  $\alpha 5$  und Nidogen-1.** Mittels Anti- $\alpha 5^*$  (A) und Anti-mNd1 (B) wurden murine Gefrierschnitte von Haut (neonatal), Niere (adult) und Skelettmuskel (adult) gefärbt. Stratum corneum (SC), Kapillare (K), Glomerulus (G) und Endomysium (EY). Die Länge des Balkens entspricht 50  $\mu\text{m}$ .



## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Polymerisationsfähigkeit aller nicht-verkürzten Laminin  $\alpha$ -Ketten gezeigt. Die maßgebliche Vermittlung dieser Aggregation wurde dem LN-Modul zugeordnet. Für die Analyse der Polymerisation konnten erstmals stabile rekombinante Fragmente der N-Termini bekannter  $\alpha$ -Ketten dargestellt werden, die ein LN-Modul enthalten. Die Grundlage hierfür wurde durch die Komplettierung der Sequenzen bzw. die Ermittlung der N-terminalen Grenzen der Proteine geschaffen. Ein weiteres Bestreben lag in der Analyse der Interaktion mit den potentiellen Modulatoren der Selbstaggregation. Das Bindungsverhalten der LN-Module gegenüber sulfatierten Liganden konnte quantifiziert und die korrespondierenden Bindungsepitope auf  $\alpha$ 1VI/V lokalisiert werden. Wichtige molekulare Eigenschaften der Proteine wurden mittels biophysikalisch-chemischer Methoden analysiert und die Gewebeverteilung der Laminin-Ketten  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 immunologisch untersucht.

### 4.1 Molekulare Eigenschaften der N-terminalen Regionen muriner Laminin $\alpha$ -Ketten

Die Sequenzen der N-terminalen Regionen und der Signalpeptide von Ln $\alpha$ 3B und Ln $\alpha$ 5 wurden durch RT-PCR um 49 bzw. 83 Aminosäuren vervollständigt. Durch Klonierung der Fragmente VI/V mit ihren authentischen Signalpeptiden und Sequenzierung der prozessierten Proteine konnten deren N-terminalen Grenzen bestimmt bzw. im Falle von Ln $\alpha$ 1 bestätigt werden (Sasaki *et al.*, 1988). Ln $\alpha$ 2 ist nach Prozessierung um 11 Aminosäuren länger, als bisher postuliert (Bernier *et al.*, 1995).

Die Größe der LN-Module variiert von 253 bis 264 Aminosäuren, die ihrer Signalpeptide von 19 bis 40. Der Vergleich der LN-Module zeigt ein hochkonserviertes Cystein-Verteilungsmuster, welches durch einige Sequenzlücken unterbrochen wird.  $\alpha$ 1VI/V und  $\alpha$ 2VI/V besitzen zwei,  $\alpha$ 3BVI/V eine und  $\alpha$ 5VI/V drei potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die Verwandtschaft zwischen den Kettenpaaren  $\alpha$ 1/2 bzw.  $\alpha$ 3B/5 drückt sich im Sequenzvergleich sowie deren Identitäten aus und korreliert mit ihren evolutionären Beziehungen (Marinkovich *et al.*, 1992a; Miner *et al.*, 1995). Die Unterschiede in der Oligosaccharid-Substitution und der Sekundärstruktur stützen diesen Befund.

Die Expression von Einzeldomänen modularer Proteine ist nicht immer möglich (Talts *et al.*, 1998; Andac *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 1999) und gelingt nur, wenn diese eigene Faltungseinheiten darstellen. Anhand der Expressionsstudie mit N-terminalen Konstrukten unterschiedlicher Länge wurde die notwendige Stabilisierung des LN-Moduls von Ln $\alpha$ 1 durch drei LE-Module gezeigt. Die hergestellten Fragmente VI/V der Ketten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 enthalten die vier LE-Module der gesamten Domäne V, die der Ketten  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 wurden mit drei LE-Modulen kloniert.

Alle Fragmente VI/V wurden in vergleichbarer Ausbeute effizient exprimiert und gereinigt. In der SDS-PAGE wanderten die gereinigten Proteine als Einzel- oder Doppelbanden. Da durch N-terminale Sequenzierung nur eine Sequenz detektiert wurde, ist das Auftreten von Doppelbanden infolge unterschiedlicher Glykosylierung wahrscheinlich. Alle Fragmente VI/V zeigten unter reduzierenden Bedingungen eine leicht verminderte Wanderungsgeschwindigkeit. Die Öffnung interner Disulfidbrücken deutet auf korrekte Cysteinverbrückung hin und wurde für  $\alpha$ 1VI/V bereits beschrieben (Ettner *et al.*, 1998). Elektronenoptische Aufnahmen der Fragmente VI/V zeigten stabförmig angeordnete LE-Tandems und globuläre LN-Module, wie bereits für Fragment E4 bzw.  $\alpha$ 1VI/V gezeigt wurde (Beck *et al.*, 1990; Yurchenco & Cheng, 1993; Ettner *et al.*, 1998).  $\alpha$ 3BVI/V erschien als vergrößerte globuläre Struktur ohne sichtbare Unterteilung in die Domänen. Möglicherweise sind hierfür unspezifische Bindungswerten zwischen dem LN- und den LE-Modulen ursächlich, die ein Anliegen des LE-Tandems an den LN-Globulus bewirken. Die korrekte Faltung aller Fragmente VI/V wurde durch Circular-Dichroismus und Proteaseresistenz bestätigt. Die Elutionen in den Gelfiltrationen deuten auf monomere Proteine hin.

Die gezeigten Proteaseresistenzen bestätigten außerdem die korrekte Cysteinverbrückung der einzelnen Module. Die proteolytische Degradation der Fragmente lässt sich für die Abspaltung des LN-Moduls vom LE-Tandem einsetzen, was für die Herstellung der Fragmente V-P ausgenutzt wurde. Die Sequenzanalyse der Pepsin-generierten Fragmente von  $\alpha$ 1VI/V veranschaulicht die eingeschränkte Proteaseresistenz des LN-Moduls und die Proteasestabilität der LE-Module. Ferner ergaben sich Hinweise auf das Verbrückungsmuster der sechs Cysteine des LN-Moduls. Demnach ist die Verbrückung der Cysteine 1 bis 4 sowie die der Cysteine 5/6 wahrscheinlich. Eine genaue Zuordnung beider Disulfidbrücken innerhalb der Gruppe C1 bis C4 war nicht möglich. Innerhalb der LE-Module sind die Cysteine wie folgt verbrückt: C1-C3, C2-4, C5-C6 und C7-C8 (Stetefeld *et al.*, 1996).

Laut CD-Analyse enthalten die Proteine 24 bis 49 %  $\beta$ -Struktur und einen geringen  $\alpha$ -helikalen Anteil.  $\alpha$ 3BVI/V und  $\alpha$ 5VI/V enthalten deutlich mehr  $\beta$ -Strukturen. Eine Beeinflussung der Sekundärstruktur des gesamten Laminin-1-Moleküls durch die substituierten Oligosaccharide wurde nicht gezeigt (Dean *et al.*, 1990), ist für kleine Fragmente jedoch nicht auszuschließen.

Die Fragmente VI/V sind mit 3 bis 11 Glukosamin (GlcN)-Ketten substituiert,  $\alpha$ 1/2 enthalten außerdem 1 bis 2 Moleküle Galaktosamin (GalN), was vorhergehende Studien mit  $\alpha$ 1VI/V bestätigt (Ettner *et al.*, 1998). Das Hexosamin-Verhältnis von  $\alpha$ 1/2 macht den komplexen Oligosaccharidtyp wahrscheinlich, da dieser vornehmlich GlcN sowie einige GalN-Reste enthalten kann (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Das Fehlen von Galaktosamin in  $\alpha$ 3B/5 deutet auf den mannosereichen Oligosaccharidtyp hin, der neben Mannose ausschließlich GlcN enthält.  $\alpha$ 5VI/V (drei NXT/S-Sequenzen) ist mit zweifach soviel Glukosamin substituiert wie  $\alpha$ 3BVI/V (eine NXT/S-Sequenz), was auf eine nicht-besetzte Glykosylierungsstelle hindeutet. Eine eingehende Analyse der substituierten Kohlenhydrate und deren Struktur existiert nur für Laminin-1, welches vorwiegend durch heterogene *N*-gebundene Oligosaccharide des komplexen Typs substituiert ist (Fujiwara *et al.*, 1988; Dean *et al.*, 1990). Die Literaturangaben stimmen mit den gefundenen Daten überein und deuten auf native Glykosylierung hin. Auch die Studien zur Glykosylierung unterstreichen die Ähnlichkeit zwischen den Kettenpaaren  $\alpha$ 1/2 und  $\alpha$ 3B/5. Die Oligosaccharide beeinflussen die Eigenschaften substituiertes Moleküle entscheidend und wirken sich besonders auf deren Bindungsverhalten aus (Dean *et al.*, 1990; Tanzer *et al.*, 1993). Die unterschiedliche Interaktion der Ketten  $\alpha$ 3B und  $\alpha$ 5 mit Heparin ist möglicherweise Folge des höheren Substitutionsgrades von  $\alpha$ 5VI/V, der die ionischen und sterischen Verhältnisse des Fragmentes verändert. Der Anteil der Substitution an den Interaktionen könnte durch Bindungsstudien mit deglykosyliertem Protein untersucht werden. Die Heparinbindung der G-Domäne von Laminin  $\alpha$ 1 ist unabhängig von den substituierten Kohlenhydraten (Yamaguchi *et al.*, 2000). Die Heparinbindungsstelle auf Ln $\alpha$ 1LG4 ist abhängig von der GAG-Komposition der Zellen und wird somit entscheidend von ionischen Nachbarschaftseffekten beeinflusst (Hoffman *et al.*, 2001).

#### 4.2 Nicht-verkürzte Laminin $\alpha$ -Ketten können aggregieren

Die supramolekulare Organisation der Basalmembran konstituiert sich aus den unabhängigen Netzwerken von Laminin und Kollagen IV, die via Nidogen verbunden und durch weitere Komponenten der BM stabilisiert werden (Yurchenco & O'Rear, 1994; Timpl & Brown, 1996). Durch die steuernde Funktion in der Sekretion und der Interaktion ihrer G-Domänen mit Heparin und Zellrezeptoren, wird den Laminin  $\alpha$ -Ketten eine besondere Rolle in der Formierung des Laminin-Netzwerkes zugesprochen (Yurchenco *et al.*, 1990; Yurchenco *et al.*, 1997). Bis heute wurde die Polymerisationskompetenz der Ketten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  in Lamininen beschrieben, die aus Gewebe isoliert wurden. Die interagierenden Module konnten jedoch nicht exakt identifizieren werden (Yurchenco *et al.*, 1985; Yurchenco *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit zur Aggregation der Laminine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Inhibition der Laminin-1-Polymerisation bestätigt und analysiert. Die Fragmente  $\alpha 3BVI/V$  und  $\alpha 5VI/V$  bewirkten bei äquimolaren Konzentrationen eine 48 bis 69 %-ige Inhibition der Laminin-1-Polymerisation. Der Inhibitionseffekt von  $\alpha 1VI/V$  und  $\alpha 2VI/V$  lag mit 6 bis 13 % deutlich niedriger. Erst im vierfachen Überschuss konnte eine deutliche Inhibition erzielt werden, was mit publizierten Daten für die Fragmente E1 und E4 von Laminin-1 korreliert (Schittny & Yurchenco, 1990; Yurchenco *et al.*, 1992; Yurchenco & Cheng, 1993).

Thermodynamische Parameter waren bisher nur für die Affinität zwischen N-terminalen Fragmenten von  $Ln\alpha 1$  und  $Ln\gamma 1$  (E1 und E4) zugänglich. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  der Interaktion wurde mittels Gleichgewichts-Gelfiltration zu  $1,4 \mu M$  bestimmt (Yurchenco & Cheng, 1993).

Die Interaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch durch kinetische Analysen untersucht. Durch Plasmonresonanz-Messungen mit den rekombinanten Fragmenten VI/V wurden die postulierten homo- und heterotypischen Interaktionen zwischen LN-Modulen bestätigt. Die Dissoziationskonstanten der Interaktion zwischen Laminin-1 und  $\alpha 1VI/V$ ,  $\alpha 3BVI/V$  sowie  $\alpha 5VI/V$  ( $K_d = 0,02$  bis  $0,2 \mu M$ ) bekräftigten die Ergebnisse der Inhibitionsstudien. Eine Interaktion zwischen  $\alpha 2VI/V$  und Laminin-1 konnte durch Plasmonresonanz nicht gezeigt werden. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen des Inhibitionstests, in dem  $\alpha 1VI/V$  und  $\alpha 2VI/V$  vergleichbare Effekte zeigten. Im Inhibitionstest reagieren zwei lösliche Liganden bei  $35^\circ C$  miteinander. Während der Messung der Plasmonresonanz bei RT liegt Laminin-1 Chip-gebunden vor, was die Bindung zu  $\alpha 2VI/V$

möglicherweise beeinflusst hat. Ebenso kann eine Modifikation der Assoziationsbedingungen hinsichtlich Dauer und Temperatur während der Plasmonresonanz-Messung notwendig sein.

Weiterhin wurden Interaktionen zwischen einzelnen Fragmenten VI/V gleicher und unterschiedlicher Isoformen bzw. Ketten analysiert.  $\alpha 3\text{BVI/V}$  zeigte eine um Faktor 12 schwächere Affinität zu  $\text{Ln}\gamma 1\text{VI/V}$  ( $K_d = 0,3 \mu\text{M}$ ) als zum gesamten Laminin ( $K_d = 0,024 \mu\text{M}$ ). Die Bindung an sich selbst war wiederum zehnmal schwächer ( $K_d = 3 \mu\text{M}$ ). Diese unterschiedlichen Affinitäten korrelieren mit dem postulierten 3-Arm-Interaktionsmodell (Abb. 6, Seite 7), welches die Bindung zwischen den N-Termini einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Kette zu einer trimeren Einheit postuliert, die ein zentrales Grundelement zur weiteren Polymerisation darstellt (Yurchenco *et al.*, 1993). Die isoforme Aggregation ist stark beungünstigt und führt nicht zum Aufbau der gewünschten Struktur. Die kooperative Bindung an das gesamte Laminin begünstigt die Bildung eines Netzwerkes, da Einheiten aus drei verschiedenen LN-Modulen entstehen.

Ausgehend von EM-Aufnahmen und Bindungsstudien mit N-terminalen Fragmenten von Laminin-1 wurde das LN-Modul als Polymerisations-vermittelnde Domäne der Laminine postuliert, eine Beteiligung der LE-Module der benachbarten Domäne V konnte indes nicht ausgeschlossen werden (Bruch *et al.*, 1989; Yurchenco *et al.*, 1992; Yurchenco & Cheng, 1993).

Die Fragmente V-P der Ketten  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten in den Inhibitionsstudien dieser Arbeit nahezu keine Bindung an Laminin-1. Dagegen führten die Fragmente  $\alpha 2\text{V-P}$  und  $\alpha 3\text{BV-P}$  im vierfachen Überschuss zu moderater (28 %) bzw. deutlicher (57 %) Inhibition der Polymerisation von Laminin-1. Der Inhibitionseffekt von  $\alpha 3\text{BV-P}$  sollte im äquimolarem Verhältnis zu Laminin-1 wiederholt werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist dies nicht erfolgt, da zur statistischen Absicherung des aufwendigen Tests mindestens drei Werte aufgenommen werden müssen. Durch Plasmonresonanz konnte jedoch keine Interaktion zwischen  $\alpha 3\text{BV-P}$  und Laminin-1 gezeigt werden. Insgesamt machen diese Ergebnisse die Hauptbeteiligung der LN-Module aller Laminin  $\alpha$ -Ketten an der Polymerisation wahrscheinlich. Der Beitrag der LE-Module von  $\alpha 2$  und  $\alpha 3\text{B}$  zur Polymerisation wirft die Frage auf, ob die N-terminal verkürzten Laminin-Ketten ( $\alpha 3\text{A}$ ,  $\alpha 4$  und  $\gamma 2$ ) - die kein LN-Modul, jedoch LE-Module beinhalten - ebenfalls zu einer moderaten Polymerisation befähigt sind.

Die Aggregation von  $\alpha 3\text{BVI/V}$  und  $\alpha 5\text{VI/V}$  mit Laminin-1 sowie die Interaktion von  $\alpha 3\text{BVI/V}$  mit sich selbst wurde gezeigt. Dies macht die Selbstaggregation von  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  enthaltenden Lamininen wahrscheinlich, wenn sie durch weitere nicht-verkürzte Ketten

( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$ ) aufgebaut werden, was für  $\text{Ln}\alpha 1$  und  $\text{Ln}\alpha 2$  bereits bestätigt werden konnte (Cheng *et al.*, 1997). Die Fähigkeit zur Kopolymerisation mit anderen Lamininisoformen, konnte bisher nur für Laminine gezeigt werden, die eine  $\alpha 1$ - oder  $\alpha 2$ -Kette enthalten (Cheng *et al.*, 1997; Kikkawa *et al.*, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit bezeigen nun auch die Fähigkeit von  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  mit Laminin-1 kopolymerisieren, was ebenso eine Kopolymerisation mit  $\alpha 2$ -enthaltenden Lamininen vermuten lässt. Durch diese Eigenschaft könnten Laminine auch *in situ* gemischte Netzwerke bilden, wodurch die wichtige supra-molekulare Organisation weitgehend unabhängig von der Expression spezieller Lamininisoformen wäre.

### 4.3 Die Interaktion mit Modulatoren der Polymerisation

Sulfatierte Liganden, wie Heparin oder Sulfatid, werden als Modulatoren der Polymerisation von Laminin angesehen. *In vitro* wird die Bildungsrate und die Dichte von Laminin-Netzwerken durch Heparin erhöht, nicht jedoch von Heparansulfaten oder anderen GAG-Ketten (Yurchenco *et al.*, 1990), die ebenfalls an Laminin binden (Del Rosso *et al.*, 1981; Fujiwara *et al.*, 1984). Sulfatid induziert die Lamininaggregation auf doppelschichtigen Phospholipiden vermutlich durch Akkumulation der lokalen Konzentration und orientierte Ausrichtung der Laminin-Moleküle (Kalb & Engel, 1991). Freire & Coelho-Sampaio (2000) zeigten die Induktion der Selbstaggregation durch sauren pH. *In vivo* sind lokale Erhöhungen der negativen Ladungsdichte innerhalb der Zellmembran durch polyanionische Gruppen assoziierter Moleküle möglich.

1989 identifizierten Kouzi-Koliakos *et al.* die N-Termini der Ketten von Laminin-1 als Heparin-bindende Domänen mittels elektronenoptischer Aufnahmen. Durch Studien mit proteolytisch generierten Fragmenten von Laminin-1 wurde die Vermittlung der Heparinbindung durch das LN-Modul gezeigt (Yurchenco *et al.*, 1990; Colognato-Pyke *et al.*, 1995). Ettner *et al.* (1998) bestätigten durch Bindungsstudien mit rekombinanten Fragmenten Heparin und Heparansulfat des Perlecan-Fragmentes Vc als Bindungspartner des LN-Moduls. Roberts *et al.* (1985) fanden die Bindung von Sulfatid an die globulären Regionen der N-Termini aller kurzen Arme von Laminin-1.

Durch die Bindungsstudien dieser Arbeit wurde die Interaktion aller untersuchter  $\alpha$ -Ketten mit Heparin, Heparansulfat und Sulfatid gezeigt und quantifiziert. Eine Ausnah-

me macht  $\alpha 5\text{VI/V}$ , welches keine Bindungsaktivität für Heparin besitzt. Die affinitätschromatographisch bestimmten Bindungsaktivitäten von  $\alpha 1\text{VI/V}$  und  $\alpha 2\text{VI/V}$  an Heparin liegen mit einer Ionenstärke von 0,27 und 0,24 M NaCl deutlich über der physiologischen Salzkonzentration und korrelieren mit publizierten Daten (Colognato-Pyke *et al.*, 1995; Colognato *et al.*, 1997; Ettner *et al.*, 1998).  $\alpha 3\text{VI/V}$  zeigte mit einer Ionenstärke von 0,14 M NaCl moderate Bindung knapp unterhalb des physiologischen Wertes.

Für die weitere Charakterisierung der Bindungsaktivitäten für Heparin wurden deren kinetische Parameter analysiert. Die durch Plasmonresonanz ermittelten Dissoziationskonstanten für die Laminin-Heparin-Interaktion bestätigen die Daten der Affinitätschromatographie. Die Dissoziationskonstante für  $\alpha 1\text{VI/V}$  liegt mit 12 nM um Faktor 4 niedriger als bisher beschrieben ( $K_d = 45$  nM) (Nielsen & Yamada, 2001). Ebenfalls Nielsen & Yamada fanden für  $\alpha 5\text{VI/V}$  mit vier LE-Modulen starke Bindung an Heparin ( $K_d = 9$  nM), wobei kommerzielle avidierte Sensorchips (Pharmacia Biosensor, Schweden) eingesetzt wurden. Dieser Befund steht mit den Ergebnissen der Affinitätschromatographie und der Plasmonresonanz-Analyse dieser Arbeit im Widerspruch. In Testmessungen im Rahmen dieser Arbeit führten die avidierten Sensorchips der Fa. Pharmacia Biosensor zu unspezifischer Bindung der Laminin-Fragmente.

Das unterschiedliche Bindungsverhalten der Ketten kann auf unterschiedliche Modulationsmechanismen bezüglich ihrer Polymerisation hindeuten. Laminin-2/4 ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1/\beta 2$ ) kopolymerisiert mit Laminin-1 unterhalb der kritischen Konzentration seiner Selbstaggregation (Cheng *et al.*, 1997). Laminin-1 steuert somit seine Aggregation, was eine geringere Affinität zum vorgeschalteten Modulator voraussetzt bzw. die Interaktion mit ihm überflüssig macht.

Die Bindung von Heparin geht häufig einher mit der Interaktion mit zellständigen HSPG sowie Zelloberflächenrezeptoren, wie Integrinen und  $\alpha$ -Dystroglykan (Battaglia *et al.*, 1992; Andac *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit gilt dies auch für das LN-Modul der Laminin  $\alpha$ -Ketten, deren Interaktion mit Sulfatid und den Heparansulfatketten von Perlecan nachgewiesen wurde. Für alle Isoformen wurden vergleichbare Bindungsaktivitäten im Ligandenbindungstest gefunden. Nur  $\alpha 1\text{VI/V}$  zeigte im Vergleich zu den übrigen Fragmenten VI/V fünffach stärkere Bindung an die Heparansulfate von Perlecan Fragment Vc, was durch die Kartierung der Bindungsepitope bestätigt werden konnte. Die ermittelte Bindungsstärke (45 nM) entspricht bestehenden Daten von Ettner *et al.* (1998). Das Chondroitin-/Dermatansulfat-substituierte Perlecan Fragment IB zeigte keine Bindung an die Fragmente VI/V.

Heparansulfate sind Bestandteile vieler Proteoglykane der BM und der Zelloberfläche. HSPG können als Korezeptoren der Integrine fungieren (Porter & Hogg, 1998). Die Interaktion zwischen Heparansulfaten von Perlecan und dem LN-Modul deutet auf seine Fähigkeit hin, das Proteoglykan in die BM zu integrieren und die extrazelluläre Organisation zu stabilisieren. Eine derartige Struktur ist bereits für die G-Domäne der Laminin  $\alpha$ -Ketten bekannt, welche an die Heparansulfate von Perlecan bindet. Durch die gleichzeitige Verbrückung der Moleküle via Nidogen-1 entsteht ein stabiler ternärer Komplex, der an das Kollagen IV-Netzwerk assoziiert vorliegt (Battaglia *et al.*, 1992; Aumailley *et al.*, 1993). Die Heparansulfat-Seitenketten können die Remodellierung des Laminin-Netzwerkes beeinflussen, indem sie Schutz vor Proteasen bieten.

Erstmals konnte die Bindung von Sulfatid an die LN-Module der Laminine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  gezeigt werden, welche bisher nur für die G-Domäne von  $Ln\alpha 1$  und  $Ln\alpha 2$  bekannt war (Taraboletti *et al.*, 1990; Andac *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999). Sulfatid dient möglicherweise der Akkumulation von Lamininen an der Zelloberfläche über den Polymerisationsprozess hinaus, um die effiziente Wechselwirkung mit Integrinen und  $\alpha$ -Dystroglykan benachbarter Zellen zu unterstützen.

Die Interaktionen mit sulfatierten Bestandteilen der ECM verdeutlichen die wichtige Rolle des LN-Moduls in der Organisation der BM und der Kommunikation mit Zellen. Durch die Fragmente VI/V wurde die Grundlage geschaffen, die bestehenden Kenntnisse der Wechselwirkungen mit  $\alpha$ -Dystroglykan und Integrinen auszuweiten (Hall *et al.*, 1990; Tomaselli *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1991; Pfaff *et al.*, 1994; Colognato-Pyke *et al.*, 1995; Aumailley *et al.*, 1996; Ettner *et al.*, 1998; Talts *et al.*, 1999). Vor diesem Hintergrund wird auch die Frage aufgeworfen, ob die Bindung von Rezeptoren an den N-Terminus von Laminin Einfluss auf die Selbstaggregation hat, wie es für C-terminal assoziierte Rezeptoren beschrieben wurde (Colognato *et al.*, 1999). Auch die Aggregation von Fibronektin ist Rezeptor-vermittelt (Schwarzbauer & Sechler, 1999).

#### **4.4 Die beteiligten Bindungsepitope**

Die Sulfat-Protein-Interaktion beruht zu einem überwiegenden Teil auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Sulfatgruppen und positiv geladenen, basischen Aminosäuren des Proteins. Die chemische Modifikation von Arginin



und Lysin in  $\alpha 1\text{VI/V}$  bestätigte die Beteiligung dieser Reste an der Bindung sulfatierter Liganden. Für die Mutationsstudie wurde die best-charakterisierte Isoform Laminin  $\alpha 1$  verwendet. Insgesamt wurden 8 Lysine und 18 Arginine in  $\alpha 1\text{VI/V}$  gegen Alanin ausgetauscht. Vier der Mutanten konnten nicht zur stabilen Expression gebracht werden. Die substituierten Aminosäuren sind hier über alle Ketten konserviert, was auf ihre strukturgebende Funktion hindeutet. Alle übrigen 22 Mutanten wurden vergleichbar effizient wie  $\alpha 1\text{VI/V}$  produziert. Ihre korrekte monomere Struktur wurde durch Gelfiltration, Elektrophorese und Antikörper-Titration gezeigt. Mutanten mit starkem Effekt auf das Bindungsverhalten wurden zusätzlich CD-spektroskopisch analysiert.

8 der insgesamt 22 Mutanten hatten keinen Effekt auf die Bindungseigenschaften. 6 zeigten geringen Effekt, 10 moderaten Effekt und 3 Mutanten zeigten starken Effekt auf mindestens eine der untersuchten Bindungen. Die drei lokalisierten Bindungsepitope R2/3, R5/6, R10/11 sind nicht-zusammenhängend über einen Bereich von 110 Resten auf dem LN-Modul verteilt (Abb. 31, Seite 81). Die räumliche Nachbarschaft der Epitope auf der Oberfläche des Proteins ist wahrscheinlich, wie andere Studien gezeigt haben (Lander, 1994; Hohenester *et al.*, 1999; Timpl *et al.*, 2000). Busby *et al.* (1995) identifizierten ein Heparin-bindendes Epitop auf dem Fibronectin Modul III-13 als kationische Grube, die ein Heparinmolekül aufnimmt. Die Mutanten R2/3 und R5/6 liegen innerhalb der genetischen  $dy^{2J}$ -Deletion in  $\text{Ln}\alpha 2$  (AA 34 bis 90), die in Laminin-2/4 verminderte Heparinbindung hervorruft (Colognato & Yurchenco, 1999). Das kann nunmehr durch die Mutationsanalyse dieser Arbeit erklärt werden.

Alle drei Mutanten führten zur Beeinträchtigung der Sulfatidbindung. Die Mutante R2/3 bewirkte eine deutliche Verschlechterung der Bindung des Fragmentes VI/V an Heparin. Die Mutanten R5/6 und R10/11 verursachten die Eliminierung der Bindung an das Heparansulfat von Perlecan Fragment Vc.

Die unterschiedlichen Affinitäten der gefundenen Epitope (R2/3, R5/6, R10/11) für Sulfatid, Heparin und Heparansulfat sind Ausdruck der molekularen Varianzen zwischen den untersuchten Liganden. Diese unterscheiden sich in ihren Sulfatierungsmustern und ihrer Oligosaccharid-Zusammensetzung, was sich auf ihre elektrostatischen Eigenschaften und ihre sterische Ausdehnung auswirkt.

Die Verteilung basischer Aminosäuren in den Ketten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3\text{B}$  und  $\alpha 5$  korrelieren mit den unterschiedlichen Bindungsaktivitäten gegenüber Heparansulfat. Bei der Bindung für Heparin und Sulfatid lässt sich ein additiver Effekt mehrerer Reste vermuten, was eine diskrete Eingrenzung der Interaktionen auf isolierte Epitope erschwert. In anderen Protein-

isoformen wurden ebenfalls nicht-konservierte Bindungsepitope lokalisiert. Die LG-Module  $\text{Ln}\alpha 1\text{LG4}$  und  $\text{Ln}\alpha 2\text{LG5}$  beherbergen je zwei Epitope für Heparinbindung, wovon nur ein Paar konserviert ist (Hohenester *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999). Auch die Hauptbindungsepitope für Heparin auf den LG4-Modulen von  $\text{Ln}\alpha 1$  und  $\text{Ln}\alpha 5$  sind nicht konserviert (Andac *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000). Eine Beschreibung von GAG-Bindungsepitopen über die Primärsequenz der bindenden Proteine - wie sie von Cardin & Weintraub (1989) vorgeschlagen wurde - erscheint unzureichend, wie schon andere Studien ergeben haben (Wong & Burgess, 1998). Auch hier zeigt sich die strukturelle Variabilität der GAG-Interaktionen.

Die Bindungsepitope der untersuchten sulfatierten Liganden werden ausschließlich durch Arginine repräsentiert, was im Vergleich zu anderen Bindungsepitopen für GAG einmalig ist (Busby *et al.*, 1995; Faham *et al.*, 1996; Andac *et al.*, 1999; Pellegrini *et al.*, 2000; Utani *et al.*, 2001). In  $\text{Ln}\alpha 1$  und  $\text{Ln}\alpha 2$  befindet sich in Nachbarschaft zu R10/11 je ein Tyrosin in Position  $\pm 5$  relativ zum Epitop. Analog enthalten Heparin- und Sulfatidbindende Sequenzen in  $\text{Ln}\alpha 1\text{LG4}$  benachbarte Tyrosine, ein Einfluss auf die Bindungseigenschaften konnte jedoch nicht gezeigt werden (Andac *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals die Kristallisation eines LN-Moduls. Durch die Lösung der Struktur von  $\alpha 1\text{VI/V}$  liessen sich in Kenntnis der lokalisierten Bindungsepitope Struktur/Funktions-Korrelationen vornehmen, wie es im Fall der LG-Module gelungen ist (Andac *et al.*, 1999; Hohenester *et al.*, 1999; Talts *et al.*, 1999; Tisi *et al.*, 2000). Damit könnte die Grundlage für die übergreifende Erforschung von Proteinmodulen geschaffen werden, die in unterschiedlichen Proteinen auftreten, aber gleiche Eigenschaften besitzen (Timpl *et al.*, 2000; Rudenko *et al.*, 2001).

#### **4.5 Gewebeverteilung der Laminin-Ketten $\alpha 3\text{B}$ und $\alpha 5$**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Antiseren gegen die N-terminalen Domänen der Laminin-Ketten  $\alpha 3\text{B}$  und Laminin  $\alpha 5$  hergestellt. Anti- $\alpha 3\text{B}$  richtet sich ausschließlich gegen die B-Isoform der  $\alpha 3$ -Ketten.

Die immunologischen Untersuchungen zur Gewebeverteilung der Laminin  $\alpha 3$ -Ketten verdeutlichte deren starke Expression in den Basalmembran-Zonen, die verschiedenen Epidermis- und Epithel-Schichten unterliegen und Haarfollikel umschließen. Ebenso wurden

BM vieler Kapillaren sowie die von Bronchen und Alveolen angefärbt. Die Expressionsmuster beider  $\alpha 3$ -Isoformen wiesen keine deutlichen Unterschiede auf und zeigten eine breite Verteilung der Ketten in murinen Geweben. Diese Ergebnisse bestätigen bestehende Daten: Doliana *et al.* (1997) untersuchten die Verteilung der mRNA für  $\alpha 3A$  und  $\alpha 3B$  in verschiedenen humanen Geweben. Abhängig vom Gewebetyp fanden sie eine leicht breitere bzw. ähnliche Expression für  $\alpha 3B$ -Transkripte verglichen mit denen von  $\alpha 3A$ . Galliano *et al.* (1995) fanden vergleichbare mRNA-Expression beider  $\alpha 3$ -Ketten in murinen Geweben, außer in Regionen des ZNS. Hier wurden hauptsächlich  $\alpha 3B$ -Transkripte nachgewiesen. Auch Miner *et al.* (1997; 1998) fanden eine breite Verteilung der  $\alpha 3$ -Ketten, konnten jedoch nicht zwischen den Isoformen differenzieren. Die Ergebnisse der Verteilung in Haut bestätigen immunologische Studien von Ryan *et al.* (1999), deren Antikörper beide Isoformen von  $L\alpha 3$  erkannte.

Auch für Laminin  $\alpha 5$  wurde ein breites Vorkommen in verschiedenen BM und Kapillaren gezeigt, was kongruent mit früheren Ergebnissen immunologischer Analysen ist (Miner *et al.*, 1997; Miner *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1999). Die Anfärbung renaler (Sorokin *et al.*, 1997) und muskulärer (Patton *et al.*, 1997) Strukturen durch Antikörper gegen  $L\alpha 5$  wurde ebenfalls bereits beobachtet.

Nidogen-1 ist ein ubiquitäres Protein der BM (Dziadek *et al.*, 1988). Die Kolokalisation von Laminin  $\alpha 5$  mit Nidogen-1 lässt auf das Vorliegen ternärer Komplexe mit Kollagen IV schließen, die Bestandteil intakter Basalmembranen sind (Aumailley *et al.*, 1993; Timpl & Brown, 1996) und durch die Laminin  $\gamma 1$ -Kette vermittelt werden (Mayer *et al.*, 1993).

#### 4.6 Ausblick

Die Selbstaggregation von Laminin zu Netzwerken und Filamenten spielt eine zentrale Rolle in der supramolekularen Architektur von BM. Die Kenntnis der beteiligten Modulatoren wird zur Ergründung der konzertierten Prozesse beitragen, welche in die (Re-) Konstitution der BM eingreifen. Durch neue Techniken können in der Erforschung extrazellulärer Strukturen und ihrer Organisation neue Wege beschritten werden. Die Analyse dreidimensionaler Strukturen, ihrer Interaktionen sowie ihrer Kommunikation ist möglich geworden. Das Verständnis der Wechselwirkungen kann durch die Strukturaufklärung von Bindungsepitopen erhöht werden. Rekombinante Techniken ermöglichen die

Untersuchung biologischer Aktivitäten mittels Mutationsstudien sowie in embryonalen und transgenen Modellen. Das Verständnis der einzelnen Konstitutionsprozesse und ihrer Koordination ist von großer Bedeutung, um assoziierte Krankheiten, wie Krebs, Muskeldystrophien, Neuropathien oder Wundkontraktionen, therapieren bzw. prophylaktisch diagnostizieren zu können.

Die vorliegende Arbeit hat die Grundlage für die weitere Erforschung der LN-Module von Laminin-Ketten geschaffen. Dieser Abschnitt greift Fragestellungen auf, die sich direkt aus den vorgestellten Ergebnissen ergeben und Ausgangspunkt für zukünftige Studien sein können.

In den Proteasestudien dieser Arbeit wurde die Proteasesensitivität des LN-Moduls gezeigt. Bestünde diese auch gegenüber Matrix-Metalloproteasen (MMP), wäre die physiologische Relevanz mit seiner Rolle in Remodellierungsprozessen zu erklären, wie es auch für andere Moleküle der ECM beschrieben ist (Werb, 1997; Mauch, 1998; Herouy *et al.*, 1999). Proteolytische Studien mit MMP könnten Aufschluss geben.

Bisher sind 4  $\alpha$ -, 3  $\beta$ - und 2  $\gamma$ -Ketten bekannt, die ein LN-Modul enthalten (Abb. 4, Seite 5). Die Ergebnisse der Plasmonresonanz-Analyse lassen die eingehende rekombinante Untersuchung der Polymerisationseigenschaften aller 9 LN-Module möglich erscheinen und eröffnen somit neue Perspektiven in der Erforschung von Laminin-Interaktionen und deren Regulation. Der Einfluss der sulfatierten Liganden auf die Aggregation kann hierdurch weiter analysiert werden.

Die gezeigten Interaktionen mit sulfatierten Bestandteilen der ECM unterstreichen die wichtige Rolle des LN-Moduls in der Regulation des Matrix-Aufbaus und der Kommunikation mit Zellen. Die bestehenden Kenntnisse über Interaktionen der N-terminalen Region von Lamininen mit  $\alpha$ -Dystroglykan und Integrinen können durch Bindungs- und Zelladhäsionsstudien mit den Fragmenten VI/V erweitert werden.

Neben einer Struktur/Funktions-Analyse ist durch die Lokalisierung der Bindungsepitope eine spezifische Untersuchung der biologischen Relevanz der Interaktionen des LN-Moduls mit den sulfatierten Liganden möglich geworden. Durch Einsatz der Mutanten eingeschränkter oder eliminiertes Bindungsaktivitäten im Zelladhäsionstest, könnten einem Bindungsepitop mögliche biologische Wirkungen zugeordnet werden. Sich überlappende Epitope können auf zeitlich gestaffelte Interaktionen, z.B. innerhalb unterschiedlicher Entwicklungsstadien oder regulatorische Kompetitionsmechanismen hindeuten. Im Mausmodell können einzelne Wechselwirkungen durch Mutationen der betreffenden Epitope gezielt untersucht werden. Der funktionelle Knockout erzeugt nur den Phänotyp, der aus

der Deletion einer definierten Funktion resultiert und ermöglicht deren spezifische Analyse. Diese kann zur Entschlüsselung molekularer Grundlagen bekannter Krankheiten führen. Durch Mausmodelle wurde die Rolle verschiedener Laminin-Ketten sowie von Nidogen in der Entstehung kongenitaler Muskeldystrophien oder der Epidermolysis bullosa entdeckt (Xu *et al.*, 1994; Wewer & Engvall, 1996; Kadoya *et al.*, 1997; Kuang *et al.*, 1998; Gullberg *et al.*, 1999) und die Möglichkeit pränataler Diagnostik eröffnet (Guicheney *et al.*, 1997). Bei diesen Modellen wurden ganze Gene ausgeschaltet, was zu deutlich komplexeren Phänotypen führt, als die Elimination einer Funktion. Durch die gezielte Deletion eines LE-Moduls in Laminin-1 (Ln $\gamma$ 1III4), welches die Interaktion zu Nidogen-1 vermittelt, konnten Mayer *et al.* (1998) die wichtige Rolle des Proteins in der supramolekularen Struktur der BM unterstreichen. Der Knockout führte zu ungeordneten Ablagerungen der Nidogen-Moleküle und zu fehlerhaft strukturierten BM.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper hergestellt werden, der nur gegen  $\alpha$ 3B gerichtet ist und eine Differenzierung der  $\alpha$ 3-Isoformen erlaubt. Damit eröffnet sich die Möglichkeit der immunologischen Erforschung von Spleißaktivitäten und der Kettenzusammensetzung von Lamininen, die die  $\alpha$ 3-Kette enthalten. Erste Analysen von Extrakten der Lunge zeigen eine Isoform  $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$ 2, welche als neues Laminin-5B bezeichnet wurde (Garbe *et al.*, 2001).

## 5 Zusammenfassung

Die Formierung des extrazellulären Laminin-Netzwerkes wird durch die Selbstaggregation der N-terminalen Region der Laminin-Ketten erzeugt. Durch die steuernde Funktion in der Sekretion und der Interaktion ihrer G-Domänen mit Modulatoren der Aggregation sowie Zellrezeptoren sind die  $\alpha$ -Ketten von besonderer Bedeutung für die Polymerisation. Die Induktion und Modulation dieses Vorganges ist unvollständig geklärt. Die Übertragung der durch Laminin-1 gewonnenen Kenntnisse in ein allgemein gültiges Modell war bisher nicht möglich.

Diese Arbeit führte zur Vervollständigung der N-terminalen Sequenz-Information der murinen Laminin-Ketten  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$ . Durch die Darstellung stabiler rekombinanter Fragmente von Laminin  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  und  $\alpha 5$  konnten deren LN-Module erstmals für Studien zugänglich gemacht werden. Mit den Bindungsstudien dieser Arbeit konnte die Fähigkeit zur Polymerisation aller nicht-verkürzten Laminin  $\alpha$ -Ketten gezeigt werden. Das LN-Modul wurde als maßgeblicher Vermittler der Aggregation identifiziert, welche zur Bildung quasi-hexagonaler Strukturen führt und durch sulfatierte Moleküle beeinflusst wird. Eine eingehende Analyse der Interaktion mit den potentiellen Modulatoren der Selbstaggregation Heparin, Heparansulfat und Sulfatid konnte durch die Kartierung der korrespondierenden Bindungsepitope auf  $\alpha 1VI/V$  vervollständigt werden.

Mit den produzierten polyklonalen Antiseren gegen die Fragmente wurden immunologische Studien zur Verteilung von  $\alpha$ -Ketten in verschiedenen Geweben durchgeführt. Erstmals konnte ein Antikörper hergestellt werden, der nur gegen  $\alpha 3B$  gerichtet ist und eine Differenzierung der  $\alpha 3$ -Isoformen erlaubt.

Mit  $\alpha 1VI/V$  ist erstmalig die Kristallisation eines LN-Moduls gelungen. In Kenntnis der Bindungsepitope sowie der dreidimensionalen Struktur liesse sich eine Struktur/Funktions-Analyse anschließen, die zur mechanistischen sowie strukturellen Aufklärung der Polymerisation beitragen könnte.

Die gefundenen Bindungspartner zeigen die wichtige Rolle des LN-Moduls in der Regulation der ECM-Architektur und der Zell-Kommunikation auf. Durch die Konstruktion stabiler Fragmente, die Kenntnis der Interaktionen und die Etablierung von Polymerisationstests wurde die Grundlage für die weiterführende Erforschung von Mechanismus und Regulation der Polymerisation von Lamininen geschaffen. Die gewonnene Kenntnis über Bindungsepitope schafft die Voraussetzung für die Erforschung der biologischen Relevanz in *in vitro*- oder *in vivo*-Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

- Airenne, T., Haakana, H., Sainio, K., Kallunki, T., Kallunki, P., Sariola, H. & Tryggvason, K. (1996) Structure of the human laminin  $\gamma 2$  chain gene (LAMC2): alternative splicing with different tissue distribution of two transcripts. *Genomics* 32, 54-64.
- Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R. & Timpl, R. (1999) Analysis of heparin,  $\alpha$ -dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin  $\alpha 1$  chain by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* 287, 253-64.
- Antonsson, P., Kammerer, R. A., Schulthess, T., Hanisch, G. & Engel, J. (1995) Stabilization of the  $\alpha$ -helical coiled-coil domain in laminin by C-terminal disulfide bonds. *J Mol Biol* 250, 74-9.
- Ardini, E., Tagliabue, E., Magnifico, A., Buto, S., Castronovo, V., Colnaghi, M. I. & Ménard, S. (1997) Co-regulation and physical association of the 67-kDa monomeric laminin receptor and the  $\alpha 6 \beta 4$  integrin. *J Biol Chem* 272, 2342-5.
- Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K. & Timpl, R. (1989) Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur J Biochem* 184, 241-8.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R. & Fox, J. W. (1993) Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int* 43, 7-12.
- Aumailley, M., Gimond, C. & Rousselle, P. (1996) Integrin-mediated cellular interactions with laminins. In: Ekblom, P. & Timpl, R. (Hrsg.) *The laminins*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 127-158.
- Aumailley, M. & Krieg, T. (1996) Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J Invest Dermatol* 106, 209-214.
- Aumailley, M. & Gayraud, B. (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76, 253-65.
- Bandtlow, C. E. & Zimmermann, D. R. (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80, 1267-90.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A. & Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807-10.
- Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M. & Timpl, R. (1992) Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208, 359-66.
- Beck, K., Hunter, I. & Engel, J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4, 148-60.
- Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J. & Parry, D. A. (1993) Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J Mol Biol* 231, 311-23.
- Belkin, A. M. & Stepp, M. A. (2000) Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51, 280-301.
- Benson, S., Page, L., Ingersoll, E., Rosenthal, E., Dungca, K. & Signor, D. (1999) Developmental characterization of the gene for laminin  $\alpha$ -chain in sea urchin embryos. *Mech Dev* 81, 37-49.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-77.
- Bernier, S. M., Utani, A., Sugiyama, S., Doi, T., Polistina, C. & Yamada, Y. (1995) Cloning and expression of laminin  $\alpha 2$  chain (M-chain) in the mouse. *Matrix Biol* 14, 447-55.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Bork, P., Downing, A. K., Kieffer, B. & Campbell, I. D. (1996) Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* 29, 119-67.
- Brown, J. C., Wiedemann, H. & Timpl, R. (1994) Protein binding and cell adhesion properties of two laminin isoforms (AmB1eB2e, AmB1sB2e) from human placenta. *J Cell Sci* 107, 329-38.
- Brown, J. C. & Timpl, R. (1995) The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 484-90.

- Brown, J. C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y. & Timpl, R. (1997) The C-terminal domain V of perlecan promotes  $\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* 250, 39-46.
- Bruch, M., Landwehr, R. & Engel, J. (1989) Dissection of laminin by cathepsin G into its long-arm and short-arm structures and localization of regions involved in calcium dependent stabilization and self-association. *Eur J Biochem* 185, 271-9.
- Bruckner-Tuderman, L. & Bruckner, P. (1998) Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders. *J Mol Med* 76, 226-37.
- Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J. R., Timpl, R., Tryggvason, K., Yamada, Y. & Yurchenco, P. D. (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 14, 209-11.
- Burgeson, R. E. & Christiano, A. M. (1997) The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 651-8.
- Burkin, D. J., Kim, J. E., Gu, M. & Kaufman, S. J. (2000) Laminin and  $\alpha 7 \beta 1$  integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors. *J Cell Sci* 113, 2877-86.
- Burnett, W. V. (1997) Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *BioTechniques* 22, 668-71.
- Busby, T. F., Argraves, W. S., Brew, S. A., Pechik, I., Gilliland, G. L. & Ingham, K. C. (1995) Heparin binding by fibronectin module III-13 involves six discontinuous basic residues brought together to form a cationic cradle. *J Biol Chem* 270, 18558-62.
- Buto, S., Tagliabue, E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli, C., Van den Brule, F., Castronovo, V., Colnaghi, M. I., Sobel, M. E. & Ménard, S. (1998) Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem* 69, 244-51.
- Calof, A. L., Campanero, M. R., O'Rear, J. J., Yurchenco, P. D. & Lander, A. D. (1994) Domain-specific activation of neuronal migration and neurite outgrowth-promoting activities of laminin. *Neuron* 13, 117-30.
- Cardin, A. D. & Weintraub, H. J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32.
- Champlaud, M. F., Lunstrum, G. P., Rousselle, P., Nishiyama, T., Keene, D. R. & Burgeson, R. E. (1996) 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, 1189-98.
- Chandrasekaran, S., Tanzer, M. L. & Giniger, M. S. (1994a) Oligomannosides initiate cell spreading of laminin-adherent murine melanoma cells. *J Biol Chem* 269, 3356-66.
- Chandrasekaran, S., Tanzer, M. L. & Giniger, M. S. (1994b) Characterization of oligomannoside binding to the surface of murine melanoma cells. Potential relationship to oligomannoside-initiated cell spreading. *J Biol Chem* 269, 3367-73.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.
- Cheng, Y. S., Champlaud, M. F., Burgeson, R. E., Marinkovich, M. P. & Yurchenco, P. D. (1997) Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem* 272, 31525-32.
- Chung, C. Y. & Erickson, H. P. (1997) Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C. *J Cell Sci* 110, 1413-9.
- Colognato, H., MacCarrick, M., O'Rear, J. J. & Yurchenco, P. D. (1997) The laminin  $\alpha 2$ -chain short arm mediates cell adhesion through both the  $\alpha 1 \beta 1$  and  $\alpha 2 \beta 1$  integrins. *J Biol Chem* 272, 29330-6.
- Colognato, H., Winkelmann, D. A. & Yurchenco, P. D. (1999) Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* 145, 619-31.
- Colognato, H. & Yurchenco, P. D. (1999) The laminin  $\alpha 2$  expressed by dystrophic *dy<sup>2J</sup>* mice is defective in its ability to form polymers. *Curr Biol* 9, 1327-30.
- Colognato, H. & Yurchenco, P. D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218, 213-34.
- Colognato-Pyke, H., O'Rear, J. J., Yamada, Y., Carbonetto, S., Cheng, Y. S. & Yurchenco, P. D. (1995) 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, 9398-406.



- Coppolino, M. G. & Dedhar, S. (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 171-88.
- Costell, M., Mann, K., Yamada, Y. & Timpl, R. (1997) Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycans and oligosaccharides. *Eur J Biochem* 243, 115-21.
- Czaker, R. (2000) Extracellular matrix (ECM) components in a very primitive multicellular animal, the dicyemid mesozoan *Kantharella antarctica*. *Anat Rec* 259, 52-9.
- Dean, J. W., Chandrasekaran, S. & Tanzer, M. L. (1990) A biological role of the carbohydrate moieties of laminin. *J Biol Chem* 265, 12553-62.
- Del Rosso, M., Cappelletti, R., Viti, M., Vannucchi, S. & Chiarugi, V. (1981) Binding of the basement-membrane glycoprotein laminin to glycosaminoglycans. An affinity-chromatography study. *Biochem J* 199, 699-704.
- Doliana, R., Bellina, I., Bucciotti, F., Mongiat, M., Perris, R. & Colombatti, A. (1997) The human  $\alpha 3b$  is a 'full-sized' laminin chain variant with a more widespread tissue expression than the truncated  $\alpha 3a$ . *FEBS Lett* 417, 65-70.
- Dziadek, M. & Timpl, R. (1985) Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 111, 372-82.
- Dziadek, M., Clements, R., Mitrangas, K., Reiter, H. & Fowler, K. (1988) Analysis of degradation of the basement membrane protein nidogen, using a specific monoclonal antibody. *Eur J Biochem* 172, 219-25.
- Ehrig, K., Leivo, I., Argraves, W. S., Ruoslahti, E. & Engvall, E. (1990) Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3264-8.
- Ekblom, M., Klein, G., Mugrauer, G., Fecker, L., Deutzmann, R., Timpl, R. & Ekblom, P. (1990) Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell* 60, 337-46.
- Ekblom, P., Durbeej, M. & Ekblom, M. (1996) Laminin isoforms in development. In: Ekblom, P. & Timpl, R. (Hrsg.) *The laminins*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 185-216.
- Engel, J. & Furthmayr, H. (1987) Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen IV, collagen VI, and proteoglycans. *Methods Enzymol* 145, 3-78.
- Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K. & Timpl, R. (1998) The N-terminal globular domain of the laminin  $\alpha 1$  chain binds to  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett* 430, 217-21.
- Fägerstam, L. G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B. & Ronnberg, I. (1992) Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* 597, 397-410.
- Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. & Rees, D. C. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 271, 1116-20.
- Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E. & Ekblom, P. (1999) Restricted distribution of laminin  $\alpha 1$  chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol* 18, 557-68.
- Ferrigno, O., Virolle, T., Galliano, M. F., Chauvin, N., Ortonne, J. P., Meneguzzi, G. & Aberdam, D. (1997) Murine laminin  $\alpha 3A$  and  $\alpha 3B$  isoform chains are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *J Biol Chem* 272, 20502-7.
- Ford, C. L., Randal-Whitis, L. & Ellis, S. R. (1999) Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are required for 20S ribosomal RNA processing and the maturation of 40S ribosomal subunits. *Cancer Res* 59, 704-10.
- Forsberg, E., Lindblom, A., Paulsson, M. & Johansson, S. (1994) Laminin isoforms promote attachment of hepatocytes via different integrins. *Exp Cell Res* 215, 33-9.
- Fox, J. W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J. & Chu, M. L. (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10, 3137-46.
- Fraenkel-Conrat, H. (1957) Methods for investigating the essential groups for enzyme activity. *Methods Enzymol* 4, 247-69.

- Franco, C. R., Rocha, H. A., Trindade, E. S., Santos, I. A., Leite, E. L., Veiga, S. S., Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (2001) Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res* 34, 971-5.
- Freire, E. & Coelho-Sampaio, T. (2000) Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J Biol Chem* 275, 817-22.
- Friedrich, M. V. K., Göhring, W., Mörgelin, M., Brancaccio, A., David, G. & Timpl, R. (1999) Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J Mol Biol* 294, 259-70.
- Fujiwara, S., Wiedemann, H., Timpl, R., Lustig, A. & Engel, J. (1984) Structure and interactions of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane. *Eur J Biochem* 143, 145-57.
- Fujiwara, S., Shinkai, H., Deutzmann, R., Paulsson, M. & Timpl, R. (1988) Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. *Biochem J* 252, 453-61.
- Galliano, M. F., Aberdam, D., Aguzzi, A., Ortonne, J. P. & Meneguzzi, G. (1995) Cloning and complete primary structure of the mouse laminin  $\alpha 3$  chain. Distinct expression pattern of the laminin  $\alpha 3A$  and  $\alpha 3B$  chain isoforms. *J Biol Chem* 270, 21820-6.
- Garbe, J. H. O., Göhring, W., Mann, K., Timpl, R. & Sasaki, T. (2001) Complete sequence, recombinant analysis and binding to laminins and sulfated ligands of the N-terminal domains of laminin  $\alpha 3B$  and  $\alpha 5$  chains. *Biochem J*, in Druck.
- Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* 285, 1028-32.
- Giannelli, G. & Antonaci, S. (2000) Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin Exp Metastasis* 18, 439-43.
- Golbik, R., Eble, J. A., Ries, A. & Kühn, K. (2000) The spatial orientation of the essential amino acid residues arginine and aspartate within the  $\alpha 1\beta 1$  integrin recognition site of collagen IV has been resolved using fluorescence resonance energy transfer. *J Mol Biol* 297, 501-9.
- Goodman, S. L., Aumailley, M. & von der Mark, H. (1991) 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, 931-41.
- Guicheney, P., Vignier, N., Helbling-Leclerc, A., Nissinen, M., Zhang, X., Cruaud, C., Lambert, J. C., Richelme, C., Topaloglu, H., Merlini, L., Barois, A., Schwartz, K., Tome, F. M., Tryggvason, K. & Fardeau, M. (1997) Genetics of laminin  $\alpha 2$  chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscul Disord* 7, 180-6.
- Gullberg, D., Tiger, C.-F. & Velling, T. (1999) Laminins during muscle development and in muscular dystrophies. *Cell Mol Life Sci* 156, 442-60.
- Hägg, P., Vaisanen, T., Tuomisto, A., Rehn, M., Tu, H., Huhtala, P., Eskelinen, S. & Pihlajaniemi, T. (2001) Type XIII collagen: a novel cell adhesion component present in a range of cell-matrix adhesions and in the intercalated discs between cardiac muscle cells. *Matrix Biol* 19, 727-42.
- Hall, D. E., Reichardt, L. F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. & Damsky, C. H. (1990) The  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$  integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* 110, 2175-84.
- Hall, H., Deutzmann, R., Timpl, R., Vaughan, L., Schmitz, B. & Schachner, M. (1997) HNK-1 carbohydrate-mediated cell adhesion to laminin-1 is different from heparin-mediated and sulfatide-mediated cell adhesion. *Eur J Biochem* 246, 233-42.
- Hatzopoulos, A. K., Folkman, J., Vasile, E., Eiselen, G. K. & Rosenberg, R. D. (1998) Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125, 1457-68.
- Heino, J. (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* 19, 319-23.
- Henry, M. D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fässler, R. & Campbell, K. P. (2001) Distinct roles for dystroglycan,  $\beta 1$  integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J Cell Sci* 114, 1137-44.
- Herouy, Y., Vanscheidt, W., Schöpf, E. & Norgauer, J. (1999) Gen- und Proteinfamilie der Matrix-Metalloproteinasen: Struktur, Funktion und Expression in der Haut. *Hautarzt* 50, 825-36.

- Hoffman, M. P., Engbring, J. A., Nielsen, P. K., Vargas, J., Steinberg, Z., Karmand, A. J., Nomizu, M., Yamada, Y. & Kleinman, H. K. (2001) Cell type-specific differences in glycosaminoglycans modulate the biological activity of a heparin-binding peptide (RKRLQVQLSIRT) from the G domain of the laminin  $\alpha$ 1 chain. *J Biol Chem* 276, 22077-85.
- Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J. F. & Timpl, R. (1999) 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, 783-92.
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. & Timpl, R. (1999) Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* 259, 917-25.
- Hopf, M., Göhring, W., Mann, K. & Timpl, R. (2001) Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *J Mol Biol* 311, 529-41.
- Hunter, D. D., Shah, V., Merlie, J. P. & Sanes, J. R. (1989) A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 338, 229-34.
- Hunter, W. M. & Greenwood, F. C. (1962) Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194, 495-6.
- Hynes, R. O. (1996) Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol* 180, 402-12.
- Iivanainen, A., Sainio, K., Sariola, H. & Tryggvason, K. (1995) Primary structure and expression of a novel human laminin  $\alpha$ 4 chain. *FEBS Lett* 365, 183-8.
- Iivanainen, A., Korttesmaa, J., Sahlberg, C., Morita, T., Bergmann, U., Thesleff, I. & Tryggvason, K. (1997) Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin  $\alpha$ 4 chain. *J Biol Chem* 272, 27862-8.
- Iozzo, R. V., Cohen, I. R., Grassel, S. & Murdoch, A. D. (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302, 625-39.
- Iozzo, R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67, 609-52.
- Iozzo, R. V. (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 274, 18843-6.
- Johnsson, B., Lofas, S. & Lindquist, G. (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198, 268-77.
- Jonsson, U., Fägerstam, L. G., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I. & *et al.* (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques* 11, 620-7.
- Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, J. F., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R. & Ekblom, P. (1997) Importance of nidogen binding to laminin  $\gamma$ 1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development* 124, 683-91.
- Kalb, E. & Engel, J. (1991) Binding and calcium-induced aggregation of laminin onto lipid bilayers. *J Biol Chem* 266, 19047-52.
- Keppel, E., Fenger, U. & Schaller, H. C. (1997) Expression and characterization of the "laminin binding protein" in hydra. *Cell Tissue Res* 287, 507-12.
- Kikkawa, Y., Sanzen, N. & Sekiguchi, K. (1998) Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1. *J Biol Chem* 273, 15854-9.
- Kim, W. H., Nomizu, M., Song, S. Y., Tanaka, K., Kuratomi, Y., Kleinman, H. K. & Yamada, Y. (1998) Laminin  $\alpha$ 1 chain sequence Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg (LQVQLSIR) enhances murine melanoma cell metastases. *Int J Cancer* 77, 632-9.
- Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-75.
- Klass, C. M., Couchman, J. R. & Woods, A. (2000) Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* 113, 493-506.

- Klein, D. J., Brown, D. M., Oegema, T. R., Brenchley, P. E., Anderson, J. C., Dickinson, M. A., Horigan, E. A. & Hassell, J. R. (1988) Glomerular basement membrane proteoglycans are derived from a large precursor. *J Cell Biol* 106, 963-70.
- Klein, G., Ekblom, M., Fecker, L., Timpl, R. & Ekblom, P. (1990) Differential expression of laminin A and B chains during development of embryonic mouse organs. *Development* 110, 823-37.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K. & Martin, G. R. (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-93.
- Knibbs, R. N., Perini, F. & Goldstein, I. J. (1989) Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. *Biochemistry* 28, 6379-92.
- Koch, M., Olson, P. F., Albus, A., Jin, W., Hunter, D. D., Brunken, W. J., Burgeson, R. E. & Champlaud, M. F. (1999) Characterization and expression of the laminin  $\gamma 3$  chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol* 145, 605-18.
- Koch, M., Foley, J. E., Hahn, R., Zhou, P., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R. & Gordon, M. K. (2001)  $\alpha 1$ (XX) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J Biol Chem* 276, 23120-23126.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. & Timpl, R. (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* 414, 557-61.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W. & Timpl, R. (1998) Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* 282, 99-109.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-64.
- Kouzi-Koliakos, K., Koliakos, G. G., Tsilibary, E. C., Furcht, L. T. & Charonis, A. S. (1989) Mapping of three major heparin-binding sites on laminin and identification of a novel heparin-binding site on the B1 chain. *J Biol Chem* 264, 17971-8.
- Kuang, W., Xu, H., Vachon, P. H., Liu, L., Loechel, F., Wewer, U. M. & Engvall, E. (1998) Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models. *J Clin Invest* 102, 844-52.
- Kühn, K. (1995) Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol* 14, 439-45.
- Kuratomi, Y., Nomizu, M., Nielsen, P. K., Tanaka, K., Song, S. Y., Kleinman, H. K. & Yamada, Y. (1999) Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin  $\alpha 1$  chain. *Exp Cell Res* 249, 386-95.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lander, A. D. (1994) Targeting the glycosaminoglycan-binding sites on proteins. *Chem Biol* 1, 73-8.
- Lander, A. D. & Selleck, S. B. (2000) The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. *J Cell Biol* 148, 227-32.
- Lee, E. C., Lotz, M. M., Steele, G. D. Jr & Mercurio, A. M. (1992) The integrin  $\alpha 6\beta 4$  is a laminin receptor. *J Cell Biol* 117, 671-8.
- Lee, J. Y. & Spicer, A. P. (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12, 581-6.
- Libby, R. T., Champlaud, M. F., Claudepierre, T., Xu, Y., Gibbons, E. P., Koch, M., Burgeson, R. E., Hunter, D. D. & Brunken, W. J. (2000) Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci* 20, 6517-28.
- Liétard, J., Loreal, O., Théret, N., Champion, J. P., L'Helgoualc'h, A., Turlin, B., Ramée, M. P., Yamada, Y. & Clément, B. (1998) Laminin isoforms in non-tumoral and tumoral human livers. Expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\gamma 1$  chain mRNA and an  $\alpha$  chain homologous to the  $\alpha 2$  chain. *J Hepatol* 28, 691-9.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. & Kjellén, L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273, 24979-82.
- Liu, W., Litwack, E. D., Stanley, M. J., Langford, J. K., Lander, A. D. & Sanderson, R. D. (1998) Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. *J Biol Chem* 273, 22825-32.

- Luckenbill-Edds, L. (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev* 23, 1-27.
- Määttä, M., Virtanen, I., Burgeson, R. E. & Autio-Harmainen, H. (2001) Comparative analysis of the distribution of laminin chains in the basement membranes in some malignant epithelial tumors. The  $\alpha 1$  chain of laminin shows a selected expression pattern in human carcinomas. *J Histochem Cytochem* 49, 711-26.
- Marinkovich, M. P., Lunstrum, G. P. & Burgeson, R. E. (1992a) The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J Biol Chem* 267, 17900-6.
- Marinkovich, M. P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. & Burgeson, R. E. (1992b) The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol* 119, 695-703.
- Martoglio, B. & Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8, 410-5.
- Maruyama, I. N., Rakow, T. L. & Maruyama, H. I. (1995) cRACE: a simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Res* 23, 3796-7.
- Mauch, C. (1998) Regulation of connective tissue turnover by cell-matrix interactions. *Arch Dermatol Res* 290, S30-6.
- Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Göhring, W., Timpl, R. & Engel, J. (1995) The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* 253, 347-57.
- Mayer, U., Nischt, R., Pöschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y. & Timpl, R. (1993) A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J* 12, 1879-85.
- Mayer, U. & Timpl, R. (1994) Nidogen, a versatile binding protein of basement membranes. In: Yurchenco, P. D., Birk, D. & Mecham, R. P. (Hrsg.) *Extracellular Matrix Assembly and Structure*. Orlando: Academic Press, 389-416.
- Mayer, U., Kohfeldt, E. & Timpl, R. (1998) Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann N Y Acad Sci* 857, 130-42.
- McGowan, K. A. & Marinkovich, M. P. (2000) Laminins and human disease. *Microsc Res Tech* 51, 262-79.
- McGrath, J. A., Kivirikko, S., Ciatti, S., Moss, C., Dunnill, G. S., Eady, R. A., Rodeck, C. H., Christiano, A. M. & Uitto, J. (1995) A homozygous nonsense mutation in the  $\alpha 3$  chain gene of laminin 5 (LAMA3) in Herlitz junctional epidermolysis bullosa: prenatal exclusion in a fetus at risk. *Genomics* 29, 282-4.
- Mecham, R. P. & Hinek, A. (1996) Non-integrin laminin receptors. In: Ekblom, P. & Timpl, R. (Hrsg.) *The laminins*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 159-183.
- Ménard, S., Castronovo, V., Tagliabue, E. & Sobel, M. E. (1997) New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem* 67, 155-65.
- Miner, J. H., Lewis, R. M. & Sanes, J. R. (1995) Molecular cloning of a novel laminin chain,  $\alpha 5$ , and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol Chem* 270, 28523-6.
- Miner, J. H., Patton, B. L., Lentz, S. I., Gilbert, D. J., Snider, W. D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Sanes, J. R. (1997) The laminin  $\alpha$  chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of  $\alpha 1$ -5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel  $\alpha 3$  isoform. *J Cell Biol* 137, 685-701.
- Miner, J. H., Cunningham, J. & Sanes, J. R. (1998) Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin  $\alpha 5$  chain. *J Cell Biol* 143, 1713-23.
- Miner, J. H. & Li, C. (2000) Defective glomerulogenesis in the absence of laminin  $\alpha 5$  demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol* 217, 278-89.
- Mongiati, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J. M. & Iozzo, R. V. (2000) The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J Biol Chem* 275, 7095-100.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M. & Nischt, R. (2000) The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol* 20, 7007-12.
- Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48, 443-53.
- Nielsen, P. K., Gho, Y. S., Hoffman, M. P., Watanabe, H., Makino, M., Nomizu, M. & Yamada, Y. (2000) Identification of a major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin  $\alpha 5$  chain. *J Biol Chem* 275, 14517-23.

- Nielsen, P. K. & Yamada, Y. (2001) Identification of cell-binding sites on the laminin  $\alpha 5$  N-terminal domain by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 276, 10906-12.
- Niimi, T., Kumagai, C., Okano, M. & Kitagawa, Y. (1997) Differentiation-dependent expression of laminin-8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) mRNAs in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Matrix Biol* 16, 223-30.
- O'Brien, D. P., Johnson, G. C., Liu, L. A., Guo, L. T., Engvall, E., Powell, H. C. & Shelton, G. D. (2001) Laminin  $\alpha 2$  (merosin)-deficient muscular dystrophy and demyelinating neuropathy in two cats. *J Neurol Sci* 189, 37-43.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-85.
- Ochieng, J. & Warfield, P. (1995) Galectin-3 binding potentials of mouse tumor EHS and human placental laminins. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 402-6.
- Pan, T. C., Kluge, M., Zhang, R. Z., Mayer, U., Timpl, R. & Chu, M. L. (1993) Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *Eur J Biochem* 215, 733-40.
- Pande, G. (2000) The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 569-74.
- Park, P. W., Reizes, O. & Bernfield, M. (2000) Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem* 275, 29923-6.
- Patton, B. L., Miner, J. H., Chiu, A. Y. & Sanes, J. R. (1997) Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* 139, 1507-21.
- Patton, B. L., Chiu, A. Y. & Sanes, J. R. (1998) Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* 393, 698-701.
- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. & Engel, J. (1987) Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* 166, 11-9.
- Paulsson, M. (1996) Biosynthesis, tissue distribution and isolation of laminins. In: Ekblom, P. & Timpl, R. (Hrsg.) *The laminins*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1-25.
- Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. & Blundell, T. L. (2000) Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029-34.
- Pfaff, M., Göhring, W., Brown, J. C. & Timpl, R. (1994) 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, 975-84.
- Porter, J. C. & Hogg, N. (1998) Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 8, 390-6.
- Pöschl, E., Mayer, U., Stetefeld, J., Baumgartner, R., Holak, T. A., Huber, R. & Timpl, R. (1996) Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin  $\gamma 1$  chain. *EMBO J* 15, 5154-9.
- Provencher, S. W. & Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-7.
- Rao, C. N., Margulies, I. M., Goldfarb, R. H., Madri, J. A., Woodley, D. T. & Liotta, L. A. (1982) Differential proteolytic susceptibility of laminin  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *Arch Biochem Biophys* 219, 65-70.
- Rao, C. N., Goldstein, I. J. & Liotta, L. A. (1983) Lectin-binding domains on laminin. *Arch Biochem Biophys* 227, 118-24.
- Relan, N. K. & Schuger, L. (1999) Basement membranes in development. *Pediatr Dev Pathol* 2, 103-18.
- Richards, A. J., Al-Imara, L., Carter, N. P., Lloyd, J. C., Leversha, M. A. & Pope, F. M. (1994) Localization of the gene (LAMA4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin A chain. *Genomics* 22, 237-9.
- Richards, A. J., Al-Imara, L. & Pope, F. M. (1996) The complete cDNA sequence of laminin  $\alpha 4$  and its relationship to the other human laminin  $\alpha$  chains. *Eur J Biochem* 238, 813-21.
- Ries, A., Göhring, W., Fox, J. W., Timpl, R. & Sasaki, T. (2001) Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies. *Eur J Biochem* 268, 5119-28.

- Roberts, D. D., Rao, C. N., Magnani, J. L., Spitalnik, S. L., Liotta, L. A. & Ginsburg, V. (1985) Laminin binds specifically to sulfated glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1306-10.
- Roberts, D. D., Sherwood, J. A. & Ginsburg, V. (1987) Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *J Cell Biol* 104, 131-9.
- Roberts, D. D. & Ginsburg, V. (1988) Sulfated glycolipids and cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 267, 405-15.
- Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. & Burgeson, R. E. (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol* 114, 567-76.
- Rudenko, G., Hohenester, E. & Muller, Y. A. (2001) LG/LNS domains: multiple functions - one business end? *Trends Biochem Sci* 26, 363-8.
- Ruoslahti, E. (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 4, 229-55.
- Ryan, M. C., Tizard, R., VanDevanter, D. R. & Carter, W. G. (1994) Cloning of the Lama3 gene encoding the  $\alpha 3$  chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. *J Biol Chem* 269, 22779-87.
- Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y. & Carter, W. G. (1999) Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J Cell Biol* 145, 1309-23.
- Salmivirta, M., Lidholt, K. & Lindahl, U. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J* 10, 1270-9.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, A2.
- Sanes, J. R., Hunter, D. D., Green, T. L. & Merlie, J. P. (1990) S-laminin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55, 419-30.
- Sarras, M. P. Jr, Yan, L., Grens, A., Zhang, X., Agbas, A., Huff, J. K., St John, P. L. & Abrahamson, D. R. (1994) Cloning and biological function of laminin in *Hydra vulgaris*. *Dev Biol* 164, 312-24.
- Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R. & Yamada, Y. (1988) Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J Biol Chem* 263, 16536-44.
- Sasaki, T., Wiedemann, H., Matzner, M., Chu, M. L. & Timpl, R. (1996) Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *J Cell Sci* 109, 2895-904.
- Sasaki, T., Forsberg, E., Bloch, W., Addicks, K., Fässler, R. & Timpl, R. (1998) Deficiency of  $\beta 1$  integrins in teratoma interferes with basement membrane assembly and laminin-1 expression. *Exp Cell Res* 238, 70-81.
- Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E. & Timpl, R. (1999) Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 18, 6240-8.
- Sasaki, T., Göhring, W., Mann, K., Brakebusch, C., Yamada, Y., Fässler, R. & Timpl, R. (2001) Short arm region of laminin-5  $\gamma 2$  chain: structure, mechanism of processing and binding to heparin and proteins. *J Mol Biol*, in Druck.
- Schittny, J. C. & Yurchenco, P. D. (1990) Terminal short arm domains of basement membrane laminin are critical for its self-assembly. *J Cell Biol* 110, 825-32.
- Schittny, J. C. & Schittny, C. M. (1993) Role of the B1 short arm in laminin self-assembly. *Eur J Biochem* 216, 437-41.
- Schwarzbauer, J. (1999) Basement membranes: Putting up the barriers. *Curr Biol* 9, R242-4.
- Schwarzbauer, J. E. & Sechler, J. L. (1999) Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol* 11, 622-7.
- Seebacher, T., Medina, J. L. & Bade, E. G. (1997) Laminin  $\alpha 5$ , a major transcript of normal and malignant rat liver epithelial cells, is differentially expressed in developing and adult liver. *Exp Cell Res* 237, 70-6.
- Selleck, S. B. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet* 16, 206-12.
- Shaw, L. M. & Olsen, B. R. (1991) FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 16, 191-4.
- Shibata, S., Peters, B. P., Roberts, D. D., Goldstein, I. J. & Liotta L.A. (1982a) Isolation of laminin by affinity chromatography on immobilized *Griffonia simplicifolia* I lectin. *FEBS Lett* 142, 194-8.

- Shibata, S., Goldstein, I. J. & Baker, D. A. (1982b) Isolation and characterization of a Lewis b-active lectin from *Griffonia simplicifolia* seeds. *J Biol Chem* 257, 9324-9.
- Smalheiser, N. R. (1996) Proteins in unexpected locations. *Mol Biol Cell* 7, 1003-14.
- Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. & Edgar, D. (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144, 151-60.
- Son, Y. J., Scranton, T. W., Sunderland, W. J., Baek, S. J., Miner, J. H., Sanes, J. R. & Carlson, S. S. (2000) The synaptic vesicle protein SV2 is complexed with an  $\alpha 5$ -containing laminin on the nerve terminal surface. *J Biol Chem* 275, 451-60.
- Sonnenberg, A., Linders, C. J., Modderman, P. W., Damsky, C. H., Aumailley, M. & Timpl, R. (1990) 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, 2145-55.
- Sorokin, L. M., Pausch, F., Durbeej, M. & Ekblom, P. (1997) Differential expression of five laminin  $\alpha$  (1-5) chains in developing and adult mouse kidney. *Dev Dyn* 210, 446-62.
- Stetefeld, J., Mayer, U., Timpl, R. & Huber, R. (1996) Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (LE) modules of laminin  $\gamma 1$  chain harboring the nidogen binding site. *J Mol Biol* 257, 644-57.
- Stow, J. L. & Farquhar, M. G. (1987) Distinctive populations of basement membrane and cell membrane heparan sulfate proteoglycans are produced by cultured cell lines. *J Cell Biol* 105, 529-39.
- Sun, X. J. & Chang, J. Y. (1990) Evidence that arginine-129 and arginine-145 are located within the heparin binding site of human antithrombin III. *Biochemistry* 29, 8957-62.
- Sunada, Y., Bernier, S. M., Utani, A., Yamada, Y. & Campbell, K. P. (1995a) Identification of a novel mutant transcript of laminin  $\alpha 2$  chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in *dy*<sup>2j</sup> mice. *Hum Mol Genet* 4, 1055-61.
- Sunada, Y., Edgar, T. S., Lotz, B. P., Rust, R. S. & Campbell, K. P. (1995b) Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology* 45, 2084-9.
- Takahashi, K. (1968) The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J Biol Chem* 243, 6171-9.
- Talts, J. F., Mann, K., Yamada, Y. & Timpl, R. (1998) Structural analysis and proteolytic processing of recombinant G domain of mouse laminin  $\alpha 2$  chain. *FEBS Lett* 426, 71-6.
- Talts, J. F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A. & Timpl, R. (1999) Binding of the G domains of laminin  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains and perlecan to heparin, sulfatides,  $\alpha$ -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J* 18, 863-70.
- Talts, J. F. & Timpl, R. (1999) Mutation of a basic sequence in the laminin  $\alpha 2$ LG3 module leads to a lack of proteolytic processing and has different effects on  $\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion and  $\alpha$ -dystroglycan binding. *FEBS Lett* 458, 319-23.
- Tang, D. & Goldberg, D. J. (2000) Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol Cell Neurosci* 15, 303-13.
- Tani, T., Lehto, V. P. & Virtanen, I. (1999) Expression of laminins 1 and 10 in carcinoma cells and comparison of their roles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 248, 115-21.
- Tanzer, M. L., Chandrasekaran, S., Dean, J. W. 3rd & Giniger, M. S. (1993) Role of laminin carbohydrates on cellular interactions. *Kidney Int* 43, 66-72.
- Taraboletti, G., Rao, C. N., Kruttsch, H. C., Liotta, L. A. & Roberts, D. D. (1990) Sulfatide-binding domain of the laminin A chain. *J Biol Chem* 265, 12253-8.
- Terranova, V. P., Rao, C. N., Kalebic, T., Margulies, I. M. & Liotta, L. A. (1983) Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 444-8.
- Theret, N., Musso, O., Turlin, B., Lotrian, D., Bioulac-Sage, P., Campion, J. P., Boudjema, K. & Clement, B. (2001) Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 34, 82-8.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. & Martin, G. R. (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933-7.



- Timpl, R. (1982) Antibodies to collagens and procollagens. *Methods Enzymol* 82, 472-98.
- Timpl, R., Paulsson, M., Dziadek, M. & Fujiwara, S. (1987) Basement membranes. *Methods Enzymol* 145, 363-91.
- Timpl, R. (1996a) Binding of laminins to extracellular matrix components. In: Ekblom, P. & Timpl, R. (Hrsg.) *The laminins*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 97-125.
- Timpl, R. (1996b) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8, 618-24.
- Timpl, R. & Brown, J. C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* 18, 123-32.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T. & Hohenester, E. (2000) Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* 19, 309-17.
- Tisi, D., Talts, J. F., Timpl, R. & Hohenester, E. (2000) Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin  $\alpha 2$  chain harbouring binding sites for  $\alpha$ -dystroglycan and heparin. *EMBO J* 19, 1432-40.
- Tomaselli, K. J., Hall, D. E., Flier, L. A., Gehlsen, K. R., Turner, D. C., Carbonetto, S. & Reichardt, L. F. (1990) A neuronal cell line (PC12) expresses two  $\beta 1$ -class integrins- $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$ -that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron* 5, 651-62.
- Tumova, S., Woods, A. & Couchman, J. R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 269-88.
- Utani, A., Nomizu, M. & Yamada, Y. (1997) Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *J Biol Chem* 272, 2814-20.
- Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P. K. & Shinkai, H. (2001) A unique sequence of the laminin  $\alpha 3$  G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 276, 28779-88.
- Van der Rest, M. & Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814-23.
- Vuolteenaho, R., Nissinen, M., Sainio, K., Byers, M., Eddy, R., Hirvonen, H., Shows, T. B., Sariola, H., Engvall, E. & Tryggvason, K. (1994) 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, 381-94.
- Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-42.
- Wewer, U. M. & Engvall, E. (1996) Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6, 409-18.
- Winder, S. J. (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26, 118-24.
- Wong, P. & Burgess, W. H. (1998) FGF2-Heparin co-crystal complex-assisted design of mutants FGF1 and FGF7 with predictable heparin affinities. *J Biol Chem* 273, 18617-22.
- Xu, H., Wu, X. R., Wewer, U. M. & Engvall, E. (1994) Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin  $\alpha 2$  (Lama2) gene. *Nat Genet* 8, 297-302.
- Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, H., Okazaki, I., Nomizu, M., Beck, K. & Kitagawa, Y. (2000) High and low affinity heparin-binding sites in the G domain of the mouse laminin  $\alpha 4$  chain. *J Biol Chem* 275, 29458-65.
- Yurchenco, P. D. & Cheng, Y. S. (1993) Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem* 268, 17286-99.
- Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. & Colognato, H. (1992) Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* 117, 1119-33.
- Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. & Schittny, J. C. (1990) Heparin modulation of laminin polymerization. *J Biol Chem* 265, 3981-91.
- Yurchenco, P. D. & O'Rear, J. J. (1994) Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6, 674-81.
- Yurchenco, P. D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y. & O'Rear, J. J. (1997) 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, 10189-94.
- Yurchenco, P. D., Tsilibary, E. C., Charonis, A. S. & Furthmayr, H. (1985) Laminin polymerization *in vitro*. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem* 260, 7636-44.

## *Danksagung*

Meinen ersten Dank möchte ich Herrn Dr. Rupert Timpl für die Überlassung des Themas, die gute fachliche Anleitung sowie die stete Unterstützung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller (Hannover) möchte ich herzlich für die Übernahme des Referats und die akademische Heimat an der Universität Hannover danken.

Zu Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Bernd Otto (Hannover) für die Übernahme des Koreferats und die Kontinuität seiner Bemühungen verpflichtet.

Frau Dr. Takako Sasaki danke ich für ihren Einsatz in der Komplettierung der Sequenzen sowie in der Immunhistologie und für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Vera van Delden für ihre unermüdliche herzlich-fröhliche Unterstützung und die Einblicke in die Kunst der Proteinreinigung. Zudem sei ihr für die Durchführung der Polymerisationstests und der HPLC gedankt.

Frau Mischa Reiter danke ich für ihr heiteres Gemüt, die Durchführung der Radioimmuntests sowie die Herstellung der Antiseren und wünsche ihr einen großen Lottogewinn.

Herrn Dr. Karlheinz Mann danke ich für die unzähligen Proteinsequenzierungen, seine stete Hilfsbereitschaft sowie die konstruktive Durchsicht des Manuskriptes.

Auch Herrn Dr. Günter Kostka danke ich für sein Engagement bei der Durchsicht des Manuskriptes, aber auch für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Für die Durchführung der Plasmonresonanz-Messungen danke ich Herrn Dr. Walter Göhring.

Bei Herrn Wolfgang Strasshofer möchte ich mich für die 188 Aminosäure- bzw. Hexosamin-Analysen bedanken.

Frau Hanna Wiedemann sei für die Elektronenmikroskopie gedankt.

Herrn Marius Boicu möchte ich für die DNA-Sequenzanalysen danken.

Frau Dr. Marie Dziadek (Melbourne) danke ich für den Antikörper Anti-Nd1.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Jörg Stetefeld (Basel) für seine Geduld bei der Kristallisation und die unkomplizierte Zusammenarbeit - in der Hoffnung auf die Lösung der dreidimensionalen Struktur des LN-Moduls von Laminin  $\alpha 1$ .

Meinen Eltern möchte ich für die allzeit erfahrene Unterstützung danken.