

4 Diskussion

Die Familie der Laminine stellt typische Proteine der Basalmembranen verschiedener Gewebe dar, die aus drei Polypeptidketten α , β und γ bestehen. C-terminal sind die Ketten über einen großen Bereich einer *coiled-coil*-Domäne mit α -helikaler Struktur und durch Disulfidbrücken miteinander kovalent vernetzt. Zur Zeit kennt man zehn verschiedene Laminin-Ketten (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 , γ_2) und elf verschiedene Isoformen (Sasaki und Timpl, 1999), von denen, das aus dem Engelbreth-Holm-Schwarm (EHS)-Tumor isolierte Laminin-1, mit der Kettenkonfiguration $\alpha_1\beta_1\gamma_1$, am umfassendsten charakterisiert ist (Timpl *et al.*, 1983). Die Komplexität dieser Proteinfamilie ist vermutlich noch größer, da kürzlich eine neue Laminin γ_3 -Kette identifiziert wurde (Koch *et al.*, 1999; Iivanainen *et al.*, 1999). Strukturanalysen zeigten, daß diese aus drei genetisch differenten aber homologen Ketten im nativen Molekül zu einer kreuzförmigen Gestalt mit drei kurzen und einem langem Arm assoziiert sind. Die kurzen Arme enthalten die Domänen III bis VI, während der lange Arm die Domänen I und II des Multidomänenproteins umfaßt. Die α_1 -Kette ragt mit den fünf, tandemartig angeordneten LG-Modulen (LG1-LG5) C-terminal aus der *coiled-coil* Domäne heraus (Maurer und Engel, 1996).

Als integraler und multifunktionaler Bestandteil der Basalmembran ist Laminin-1 an vielfältigen Interaktionen beteiligt, welche für die Struktur und Funktionalität einer Basalmembran essentiell sind. Ein in diesem Zusammenhang relevanter Bindungsbereich im Laminin-1 ist das E3-Fragment, das aus den beiden endständigen, tandemartig angeordneten LG-Module (α_1 LG4 und α_1 L5) am C-terminalen Ende der α_1 -Kette gebildet wird.

In früheren Studien wurde für das proteolytisch erhaltene E3 Fragment die Bindung an Heparin, Heparansulfat-Ketten des Perlecan (Ott *et al.*, 1982; Battaglia *et al.*, 1992), Sulfatide (Taraboletti *et al.*, 1990) und an α -Dystroglycan (Gee *et al.*, 1993; Brancaccio *et al.*, 1995) nachgewiesen. Diese Interaktionen sind wahrscheinlich für die Modulation der Polymerisation von Laminin-Netzwerken nahe der Zelloberfläche verantwortlich (Yurchenco *et al.*, 1990). Beim α -Dystroglycan führt die Interaktion zur Verknüpfung mit dem Cytoskelett (Henry und Campbell, 1996).

Das Thema der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Herstellung des E3-Fragments und seiner beiden α 1LG4- und α 1LG5-Module mit dem Ziel die Heparin-Bindungsstelle zu identifizieren und anschließend den Vergleich zur Sulfatid- als auch zur α -Dystroglycan-Bindungsstelle zu ziehen. Dazu mußten zuvor die Grenzen selbständiger Faltungseinheiten für das Gesamtfragment und seine einzelnen Module genau definiert werden.

Die Modulgrenzen des E3-Fragments und seiner Einzelmodule wurden bisher kontrovers diskutiert. Dies bezieht sich insbesondere auf die Anzahl und die Zuordnung der Cysteine der einzelnen Modulen. Das Problem wird dadurch hervorgerufen, daß eine große Variabilität innerhalb der LG-Module vorhanden ist und selbst ein Vergleich von diesen innerhalb eines Proteins oder auch innerhalb der Isoformen nur bedingt zur Modulgrenzensetzung herangezogen werden kann.

In der bisherigen Literatur wurden für die LG-Module des E3-Fragments uneinheitliche Grenzen angegeben, die auf computergestützten Sequenzvergleichen oder auf die durch proteolytische Spaltung erhaltenen Ergebnisse beruhen. Nach Richards *et al.* (1996) enthält das E3-Fragment sechs Cysteine, wobei dem α 1LG4-Modul zwei und dem α 1LG5-Modul vier zugeordnet werden. Im Gegensatz hierzu vermuten Deutzmann *et al.* (1988), daß E3 sieben Cysteine enthält. Hiernach beginnt das E3-Fragment an Position 2666 mit der Startsequenz LHREH und besteht aus 395 Aminosäuren. Dagegen beschreiben Sung *et al.* (1997) den Beginn von E3 an Position 2684 mit der Startsequenz ELCAVDT. Dem α 1LG4-Modul werden hierbei drei Cysteine und dem α 1LG5-Modul vier Cysteine zugeordnet.

Sequenzvergleiche der beiden Module α 1LG4 und α 1LG5, basierend auf zwei invarianten Cysteinen am C-terminalen Ende sowie zwei hochkonservierten Hexapeptidsequenzen (Patthy, 1992), zeigten am N-terminus einen lang gestreckten Bereich mit nur einem Cystein. Ob dieser Bereich zum α 1LG4-Modul gehört oder eine separate Verbindungsregion repräsentiert war bislang noch ungeklärt.

Um diesen Sachverhalt zu klären wurden je zwei verschiedene cDNA-Konstrukte für das E3-Fragment und für die einzelnen LG-Module (α 1LG4 und α 1LG5) unter Anwendung der PCR-Technik mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden hergestellt. Das rekombinante α 1LG4-5-Fragment, das exakt dem proteolytischen E3-Fragment entspricht (Ott *et al.*, 1982), wurde so geplant, daß es die Aminosäurepositionen 1-395 umfaßt und somit sieben Cysteine (C1-C7) enthält. Dem alternativen Fragment (α 1LG4-5(k)-Fragment) (C2-C7) fehlt das erste N-terminale Cystein und es entspricht somit dem von Richards *et al.*, 1996 postulierten Fragment. α 1LG4 erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 1-206 und besitzt die ersten drei Cysteine (C1-C3), dem kleineren Pendant (α 1LG4(k)-Fragment) fehlt das dritte C-terminale Cystein. α 1LG5 wurde so gewählt, daß es die letzten vier Cysteine (C4-C7) repräsentiert. Der N-terminale Bereich der längeren Fragmentvariante (α 1LG5(l)-Fragment) (C3-C7) umfaßt den C-terminalen Bereich von α 1LG4.

Um eine korrekte Faltung und posttranslationale Modifikation zu gewährleisten wurden eukaryontische Zelllinien verwendet. Die Transfektion der Zellen mit den sechs hergestellten DNA-Konstrukten führte nicht in allen Fällen zur Proteinexpression. α 1LG4-5 konnte in ausreichender Menge erhalten werden, wogegen die kleinere Variante (α 1LG4-5(k)-Fragment) selbst durch Western-Blot-Analyse nicht nachzuweisen war. Die Produktion von α 1LG4 war mit dem von α 1LG4-5 vergleichbar. Das kleinere Fragment (α 1LG4(k)-Fragment) konnte im Zellkulturüberstand nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde bei beiden α 1LG5-Konstrukten Proteinexpression festgestellt, wobei α 1LG5 in der Produktion stärker war, als das längere Fragment α 1LG5(l).

Die fehlende Korrelation zwischen mRNA und Proteinexpression läßt vermuten, daß die Proteine nicht in der nativen Struktur vorliegen und deswegen rasch intrazellulär degradiert werden, was bereits für andere Proteine festgestellt wurde (Pottgiesser *et al.*, 1994; Talts *et al.*, 1998). Northern-Blot-Analysen bestätigten jedoch, daß alle transfizierten Zellen Laminin-spezifische mRNAs der erwarteten Größe enthielten weshalb man eine mangelnde Transfektion der Zellen als Ursache für die fehlende Proteinproduktion ausschließen kann.

So belegt diese Arbeit, daß für die Ausbildung der nativen und somit korrekten Faltung des rekombinanten $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragments das erste Cystein (C1) essentiell ist, womit es über sieben Cysteine verfügt. Diese Aussage wurde durch den Vergleich mit dem kleineren Fragment ($\alpha 1\text{LG4-5(k)}$ -Fragment) unterstützt, welches aufgrund des fehlenden Cysteins nicht produziert wird. Das $\alpha 1\text{LG4}$ -Fragment benötigt für seine korrekte Faltung die Cysteine eins bis drei. Ist das dritte Cystein nicht vorhanden, wie im $\alpha 1\text{LG4(k)}$, kann eine korrekte Ausbildung der Proteinfaltung nicht erfolgen. Sequenzvergleiche des $\alpha 1\text{LG4}$ -Fragments mit LG4 -Modulen aus der $\alpha 2$ bis $\alpha 5$ -Kette demonstrieren die konservierte Position des ersten Cysteins (C1) und den danach folgenden 20 Aminosäureresten mit einer Sequenzidentität von 35-40 %. Die Analysen unterstützen die Aussage, daß das erste Cystein für die Faltung von $\alpha 1\text{LG4}$ - bzw. $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragment essentiell ist. Kürzlich konnte dies auch für das $\alpha 2\text{LG4}$ -Modul des Laminin-2 experimentell bestätigt werden (Talts *et al.*, 1998). Die gute Expression beider $\alpha 1\text{LG5}$ -Fragmente erklärt sich dadurch, daß die für die eigenständige Faltung dieses Moduls notwendigen Cysteine vier bis sieben in beiden Konstrukten vorliegen. Folglich werden die vier Cysteine (C4-C7) dem $\alpha 1\text{LG5}$ -Fragment zugeordnet.

Die Reinigung der Proteine $\alpha 1\text{LG4-5}$ und $\alpha 1\text{LG4}$ aus dem konditionierten Medium erfolgte mit Hilfe von Heparin-Affinitätssäulen. Dadurch konnten die meisten verunreinigenden Proteine effizient entfernt werden. Da aufgrund eines freien Cysteins Dimere entstanden, war für das $\alpha 1\text{LG4-5}$ jedoch ein weiterer Reinigungsschritt durch Molekularsiebchromatographie erforderlich. $\alpha 1\text{LG5}$ konnte in einer Reinheit von 90 % lediglich in geringen Mengen aus dem Durchlauf eines Anionenaustauschers isoliert werden. Für die längere Fragmentvariante $\alpha 1\text{LG5(l)}$ war unter gleichen Reinigungsbedingungen die Anwesenheit von Proteaseinhibitoren notwendig, um einen Abbau durch endogene Proteolyse zu verhindern. Dieser Umstand ist auf die nicht korrekt gesetzten Modulgrenzen zurückzuführen.

Einen ersten Hinweis auf die korrekte Ausbildung von konformationsstabilisierenden, intramodulären Disulfidbrücken gab die in allen Fällen bei der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen verminderte Mobilität der rekombinanten Proteine.

Die gegenüber ihrem theoretisch berechneten Molekulargewicht, verzögerten Laufeigenschaften der Proteine beweisen zusätzlich, daß die Proteine in glycosylierter Form sezerniert werden. So konnte hier erstmals der Rückschluß auf eine korrekte Expression der rekombinanten Proteine, sowie ihr Vorliegen in nativer Struktur gezogen werden. Das rekombinante α 1LG4-5-Fragment zeigte ein analoges Laufverhalten wie das alternative E3-Fragment, dem ein hoher Anteil an N-Glycosylierung zugeschrieben wird und der über komplexe Oligosaccharide erfolgt (Deutzman *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 1988).

Für die Fragmente mit den richtigen Modulgrenzen (α 1LG4-5, α 1LG4, α 1LG5) erbrachte die N-terminale Sequenzanalyse nach Edman den erwarteten rekombinanten Aminoterminal. Die elektronenmikroskopische Analyse des Gesamtfragments α 1LG4-5 bestätigte die aufgrund von früheren Analysen vorausgesagte globuläre Struktur (Beck *et al.*, 1990). Die Analyse dieses Fragments durch Circular dichroismus zeigte eine definierte Konformation für das rekombinante Protein. Es besaß hiernach einen Anteil von 10-14 % α -Helix und 40-47 % β -Faltblatt, was im Einklang mit den ermittelten Anteilen für das native E3-Fragment (Ott *et al.*, 1982) steht.

Der Immunnachweis mit polyklonalen Kaninchen-Antiseren (Ott *et al.*, 1982), die gegen Laminin-1 bzw. Fragment E3 gerichtet sind, kann als Indiz dafür angesehen werden, daß eine korrekte Ausbildung immunologischer Epitope in den rekombinanten Fragmenten vorliegt. Ein Antiserum gegen das native E3-Fragment konnte die konformationellen Epitope der drei rekombinanten Proteine erkennen. Die Affinität zu dem α 1LG4-5-Fragment lag um einen Faktor fünf höher als gegenüber den einzelnen Fragmenten α 1LG4 und α 1LG5, für die der Titer identisch war. Folglich liegt eine gleichmäßige Verteilung der Stärke der antigenen Epitope auf den einzelnen Fragmenten vor. Durch den Kontakt beider Module kann es zur Ausbildung weiterer Epitope kommen, wodurch die höhere Affinität des α 1LG4-5 Fragments gegenüber den einzelnen Fragmenten erklärt werden kann. Zusätzlich wurde durch Immunisierung von Kaninchen ein Antiserum gegen das rekombinante α 1LG4-Fragment hergestellt.

Die ELISA-Titration des Antiserums zeigte für die Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4 vergleichbare Titer, was auf einen gleichen Satz von immunologischen Epitopen hinweist. Dagegen konnte das Antiserum keine Epitope auf dem α 1LG5-Fragment erkennen, wie es auch von seiner begrenzten Sequenzidentität (25 %) zu erwarten ist. Das beweist, daß beide Fragmente immunologisch klar unterschieden werden können und wurde auch durch die radioimmunologischen Analysen, die spezifischer und sensitiver sind, bestätigt.

Da das α 1LG4-Antiserum gegen eine immunologisch relevante Struktur in Laminin-1 gewonnen wurde, war das Antiserum für weitere quantitative immunologische Charakterisierung unterschiedlicher Gewebe und Zellkulturüberstände zur Detektion von Laminin α 1-Ketten verwendbar. Solch ein Radioimmuno-Inhibitions-Testverfahren war bis jetzt nicht zugänglich.

Ein Satz von monoklonalen Antikörpern, die gegen das native E3-Fragment gerichtet sind (Sorokin *et al.*, 1992), wurde auf ihre Affinität zu den rekombinanten Fragmenten getestet, um sie genauer zu charakterisieren. Dabei konnten für α 1LG4-5 und α 1LG4 ähnliche Titer festgestellt werden, wobei keine signifikante Bindung an α 1LG5 festgestellt wurde. Folglich sind die hier getesteten monoklonalen Antikörper ausschließlich gegen die konformationellen Epitope des α 1LG4-Fragments gerichtet.

Da die bisher diskutierten Ergebnisse eine korrekte Expression und die Ausbildung der nativen Struktur der rekombinant exprimierten Proteine bestätigten, konnten jetzt weiterführende Analysen zur Interaktion mit den drei Bindungspartnern von Laminin-1 für diese Region durchgeführt werden. Wie schon erwähnt, wurde mit dem proteolytischen Fragment E3 des Laminins in früheren Untersuchungen die Bindung an Heparin, Sulfatide und an den N-terminalen Bereich des α -Dystroglycan festgestellt, wobei es bislang keine genaueren Erkenntnisse über die Beteiligung der einzelnen Module bei diesen Interaktionen gab. Die Analysen (Heparin-Affinitätschromatographie, Ligandenbindungstest mit Heparin-Albumin-Konjugat, Sulfatiden und α -Dystroglycan) dieser Liganden auf Wechselwirkung mit den rekombinanten Proteinen belegen eindeutig, daß das α 1LG4-Fragment den alleinigen Bindungspartner im E3-Fragment darstellt.

Die Bindungseigenschaften des α 1LG4-Fragments entsprachen demzufolge denen des nativen E3-Fragments. Frühere Studien belegen, daß Heparin mit einem K_d von 94 nM an eine einzige Stelle im E3-Fragment bindet (Yurchenco *et al.*, 1990), was mit den hier erhaltenen Daten übereinstimmt, daß ausschließlich das α 1LG4-Fragment für die Heparin-Bindung verantwortlich ist. In Insektenzellen wurde ein rekombinantes α 1LG5-Fragment exprimiert, daß größer ist als das in der vorliegenden Arbeit erhaltene (Sung *et al.*, 1997). Dieses konnte nur in geringen Mengen exprimiert werden und zeigte schwache Bindung an die Heparin-Affinitätssäule. Dieses unterschiedliche Ergebnis kann damit erklärt werden, daß das Fragment nach den in dieser Arbeit benutzten Modulgrenzen (Sung *et al.*, 1997) N-terminal mit dem hier definierten α 1LG4-Fragment überlappt, wobei sowohl die schwache Bindung als auch die verminderte Expression auf den unkorrekt gesetzten Modulgrenzen beruht. Bei der Eingrenzung der Heparin-Bindungsstelle in der Laminin α 2-Kette wurde jedoch im Gegensatz zur α 1-Kette für das α 2LG5-Fragment eine starke Heparin-Bindung gefunden, nicht jedoch für α 2LG4 (Talts *et al.*, 1999). Dies zeigt eine Verschiebung der Heparin-Bindungssepitope im Verlauf der evolutionären Differenzierung der Laminin α -Ketten, basierend auf einer limitierten Anzahl von Punktmutationen. Es zeigt auch, daß die Position von Heparin-Bindungsstellen in Lamininen variabel sein kann. Ob dies zu funktionellen Unterschieden führt, bleibt eine offene Frage.

Die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und dem E3-Fragment wird auf Wechselwirkungen mit den O-glykosylierten Kohlenhydraten der Mucin-Domäne, die sich im N-terminalen Bereich von α -Dystroglycan befindet, zurückgeführt (Gee *et al.*, 1993; Chiba *et al.*, 1997). Bislang ist noch unklar in wieweit Protein-Protein Interaktionen dabei eine Rolle spielen. Obgleich die N-terminale globuläre Domäne von α -Dystroglycan, die in Bakterien exprimiert wurde keine Bindung an Laminin und Agrin zeigte (Brancaccio *et al.*, 1997), deuten die neuesten Daten darauf hin, daß die Bindung durch die Abspaltung eines Propeptids induziert werden könnte (Bozic *et al.*, 1998). Untersuchungen der Laminin α 2-Kette zeigten eine ausgeprägte Bindungsaktivität für α 2LG4-5 an α -Dystroglycan, jedoch nicht für die einzelnen Fragmente α 2LG4 und α 2LG5 (Talts *et al.*, 1999).

Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, daß die Interaktion zwischen α -Dystroglycan und verschiedenen Lamininen auch über Protein-Protein Interaktionen verlaufen können.

Zusätzlich konnte in Ligandenbindungstests, in denen die Aktivität des α 1LG4-5-Fragments im Vergleich zum E3-Fragment um Faktor zehn größer war, die native Faltung des rekombinanten Proteins nochmals bestätigt werden. Die verminderte Aktivität des E3-Fragments kann durch die Bedingungen während der Proteolyse und Aufreinigung erklärt werden (Ott *et al.*, 1982), so daß hieraus möglicherweise auf eine partielle Zerstörung der Bindungsstellen geschlossen werden kann. Ein weiterer Grund kann auch eine andersartige Glycosylierung sein (Fujiwara *et al.*, 1988; Deutzmann *et al.*, 1988).

Das weitere Ziel war eine nähere Eingrenzung der Heparin-Bindungsstelle im rekombinanten α 1LG4-Fragment. In vorangegangenen Studien gab es Hinweise darauf, daß die Aminosäuren Arginin und Lysin durch ihre polaren Seitenketten an der Heparin-Bindung beteiligt sind (Lander, 1994). Ein Sequenzvergleich der beiden rekombinanten α 1LG4- und α 1LG5-Fragmente zeigte, daß im α 1LG4 eine größere Anzahl von diesen basischen Aminosäuren vorhanden sind. Insgesamt verfügt α 1LG4 über zwölf Arginine und neun Lysine, wobei sie an gewissen Positionen gehäuft vorkommen und mit einem Tyrosin benachbart sind. Um den Beitrag dieser Aminosäuren für die Heparin-Bindung zu überprüfen, wurden diese chemisch modifiziert und anschließend deren Bindungsverhalten an Heparin überprüft. Durch die Modifikationsversuche im α 1LG4-Fragment wurde die essentielle Bedeutung der Arginin- und der Lysin-Seitenketten für die Heparin-Bindung offensichtlich. Im Gegensatz dazu konnte keine eindeutige Aussage über die Tyrosin-Seitenketten gemacht werden.

Gegenüber einer proteolytischen Degradation mit Trypsin, Endoproteinase Glu-C und Endoproteinase-Lys-C zeigte sich α 1LG4 resistent, so daß hier die Ausbildung einer stabilen Konformation nachgewiesen werden konnte. Dagegen bestand eine Sensitivität gegenüber Pepsin, was zu einem Abbau der globulären Struktur des α 1LG4 führte und zur Eingrenzung der an der Heparin-Bindung beteiligten Aminosäuren ausgenutzt wurde.

Der limitierte Abbau mit dieser Protease führte zu stabilen Fragmenten von 6 kDa bis 18 kDa. Die anschließende Analyse der Fragmente auf ihre Affinität zu Heparin ergab daß 30 % der proteolytischen Fragmente gebunden wurden. Von Interesse waren die Peptide, die ein analoges Elutionsprofil aufwiesen wie das Gesamtfragment α 1LG4. Es lagen häufig eindeutig identifizierbare Mehrfachsequenzen vor, die ausschließlich aus den letzten 100 Aminosäuren des α 1LG4-Fragments stammen. Die Sequenz IKRKAFMT (Pos. 125-132), die eine Anhäufung von basischen Aminosäuren darstellt, wurde immer wieder nachgewiesen. Diese Region ist demnach wahrscheinlich wichtig für die Heparin-Bindung. Gleichzeitig konnten die Daten eine Disulfidbrückenbildung zwischen dem zweiten und dem dritten Cystein beweisen, da die sequenzierten Peptidfragmente ausschließlich vor und nach dem zweiten Cystein und nicht vor dem ersten Cystein angeordnet sind. Die Natur von Cystein-1 ist noch unklar und wurde auch nicht weiter untersucht. Aufgrund der Oligomerisierung des α 1LG4-5-Fragments, liegt die Vermutung nahe, daß es als freies Thiol vorliegt und somit nicht in intramodulärer Disulfidbindung involviert ist.

Nachfolgend wurden durch Punktmutationen zu Alanin die Aminosäuren die an der Heparin-Bindung aktiv sind direkt identifiziert. Die Herstellung der vierzehn Mutanten erfolgte durch Fusions-PCR, die die gezielte Einführung von ort-spezifischen Mutationen erlaubt. Die Klonierung der Konstrukte in den eukaryontischen Expressionsvektor und die anschließende Transfektion in eine humane Nierenzelllinie (293-EBNA) führte in allen Fällen zur Expression von Proteinen, die in das umgebende Kulturmedium sezerniert wurden. Ein erster Hinweis auf den Einfluß der eingeführten Mutationen wurde bereits bei der Aufreinigung erhalten, wobei die Mutanten K1, K1/1, K1/2, K1/3, K2 und K3 unterschiedliche Affinitäten zu der Heparin-Säule aufwiesen. Die Analyse der Mutanten durch SDS-Gelelektrophorese zeigten die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das nicht mutierte Fragment α 1LG4. Dies stellte den ersten Beweis dafür dar, daß die Mutanten korrekt exprimiert wurden und in der nativen Struktur vorlagen.

Der Immunnachweis mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum, das gegen das α 1LG4-Fragment gerichtet ist, zeigte daß sowohl die Mutanten als auch das nicht mutierte Protein identische Titer im ELISA ergaben.

Dies bestätigte, daß die jeweiligen Mutationen in keiner Weise die korrekte Faltung des Proteins beeinflußt haben. Da die bisher diskutierten Untersuchungen die korrekte Expression und die native Faltung der α 1LG4-Mutanten bestätigten, wurden weiterführende Analysen zur Interaktion mit Heparin, Sulfatiden und Dystroglycan durchgeführt.

In den Bindungsanalysen (Affinitätschromatographie, Ligandenbindungstest) mit den α 1LG4-Mutanten wurden zwei nicht benachbarte Sequenzregionen im α 1LG4-Fragment identifiziert, die einen wesentlichen Beitrag zu Heparin-Bindung leisten. Dabei handelt es sich um die schon in vorangegangenen Experimenten für wichtig erachtete Sequenz **KRK** an Position 126-128 und um die Sequenz **KGRTK** an Pos. 101, 103, 105 die in den K1 bzw. K3-Mutanten verändert wurden. Dies deutet auch darauf hin, daß diese beiden Regionen im nativen Protein exponiert dicht beieinander liegen, was im Einklang mit heparin-bindenden Epitopen aus anderen Proteinen steht (Lander, 1994). Einzelsubstitutionen der **KRK**-Sequenz (Pos. 126-128) zeigten die Stärke der Beteiligung der Aminosäuren in der Reihenfolge **K** (Pos. 126) > **R** (Pos. 127) > **K** (Pos. 128) bei der Heparin-Affinitätschromatographie. Frühere Studien zeigten auch, daß Peptidfragmente die bestimmten Sequenzbereichen des E3-Fragments entsprechen, an Heparin binden. Dies gilt für das GD-4 Peptid (Skubitz *et al.*, 1991), das den Bereich der K1-Mutante, und das P2/3 Peptid (Timpl *et al.*, 1990), das den Bereich der K3-Mutante umfaßt. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ist die geringe Aktivität dieser einzelnen Peptide jetzt dadurch erklärbar, daß sie einzeln keine kooperative Bindung eingehen können. Zwei weitere Regionen die eine geringere Beteiligung aufweisen sind die Sequenzen **RK** an Pos. 154, 155 (K2) und **RAR** an Pos. 166, 168 (R1). Der Einfluß der R1-Mutante ist wahrscheinlich so minimal, daß dieser nur anhand des Ligandenbindungstest festgestellt werden konnte.

Die Bindungsanalysen der α 1LG4-Mutanten an Sulfatide, zeigten ähnliche aber nicht absolut identische Bindungsprofile wie an Heparin. Auch hier sind die nachgewiesenen Bindungsaktivitäten für die K1- K2- und K3-Mutanten analog mit dem der Heparin-Bindung.

Die hier verifizierten feinen Unterschiede beim Vergleich der gefundenen Bindungsepitope für Heparin bzw. Sulfatide im α 1LG4-Fragment, lassen momentan vermuten, daß diese sich substantiell überlappen aber nicht komplett identisch sind. Sowohl für die Heparin- als auch Sulfatid-Bindung ist die Notwendigkeit von Sulfatgruppen beschrieben worden (Roberts *et al.*, 1986). Auch konnte durch Zugabe von Heparin die Sulfatid-Bindung an Laminin-1 inhibiert werden (Taraboletti *et al.*, 1990). Die Unterschiede in den hier ermittelten Parametern für beide Liganden könnte demnach eher von deren unterschiedlicher polymeren Natur herrühren und nicht von einem unterschiedlichen Bindungsepitop auf dem α 1LG4-Fragment. Hierdurch könnte auch erklärt werden, daß die partielle Reduzierung von Disulfidbindungen des E3-Fragments die Heparin- aber nicht die Sulfatid-Bindung vermindert (Taraboletti *et al.*, 1990).

Durch Zugabe von Heparin bzw. hohen Salzkonzentrationen konnte die Bindung des α -Dystroglycans an E3-Fragment inhibiert werden (Brancaccio *et al.*, 1995; Pall *et al.*, 1996), wobei in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß die Bindung an Laminin-1 ausschließlich durch das α 1LG4-Fragment erfolgt. Die Bindungsanalysen der α 1LG4-Mutanten mit α -Dystroglycan zeigten eine distinkte Verminderung der Bindungsaktivitäten für die K1- und K3-Mutante, vergleichbar zum Heparin- bzw. Sulfatid-Test. Eine partielle Überlappung der Heparin- und α -Dystroglycan-Bindungsepitope wurde auch für Agrin beschrieben (Gesemann *et al.*, 1996). Überraschend war dagegen die starke Verminderung der Bindungseigenschaften der K2-, K4- und der R1-Mutanten gegenüber α -Dystroglycan, die entweder keine oder nur eine schwache Reduzierung der Heparin- und Sulfatid-Bindung zeigten. Eine schwächere Beteiligung konnten zusätzlich für die Mutanten K5 (**K**, Pos. 126), K6 (**K**, Pos. 121), R2 (**R**, Pos. 204) und Y1 (**Y**, Pos. 124) gezeigt werden. Interessant ist, daß hier zum ersten mal zusätzlich zu den basischen Aminosäuren die Mutation eines Tyrosins einen leichten Effekt aufweist, was in zukünftigen Analysen weiter verifiziert werden sollte. Außerdem kann gefolgert werden, daß das Bindungsepitop des α -Dystroglycans auf dem α 1LG4-Fragment größer ist und mit dem Bindungsepitop des Heparins bzw. der Sulfatide zwar überlappt aber weitere Strukturen benötigt werden.

Die Daten aller relevanten Bindungstest belegen übereinstimmend, daß im α 1LG4-Fragment die basischen Regionen **KRK** an Pos. 126-128 (K1-Mutante), **KGRTK** an Pos. 101, 103, 105 (K3-Mutante) und **RK** an Pos. 154, 155 (K2-Mutante) sowohl zur Heparin- als auch zur Sulfatid-Bindung ihren Beitrag leisten. Wenn man diese substituierten Sequenzen (Mutanten) nach dem ermittelten Beitrag zur Bindung in dem jeweiligen Testsystem (Heparin-Affinitätschromatographie Heparin-BSA-Test, Sulfatid-Test) vergleicht, so kann man sie folgendermaßen ordnen: K1>K3>K2. Aus den drei gefundenen Regionen kann außerdem gefolgert werden, daß diese zwar in der Sequenz entfernt, aber räumlich beieinander liegen und zusammen das für die Heparin- und Sulfatid-Bindung verantwortliche Epitop ausbilden. Diese drei Regionen und zusätzlich zwei weitere basische Regionen **RAR** an Pos. 166, 168 (R1-Mutante) und **KDR** an Pos. 193, 195 (K4-Mutante) sind an der α -Dystroglycan-Bindung am stärksten beteiligt.

Für die monoklonalen Antikörper war gezeigt worden, daß sie die Heparin-Bindung an das E3-Fragment in unterschiedlichen Stärken inhibieren können (Sorokin *et al.*, 1992). In dieser Arbeit konnte in vorangegangenen ELISA-Titrations bestätigt werden, daß sie ausschließlich gegen das α 1LG4-Fragment gerichtet sind, wodurch die Ergebnisse der Bindungsanalysen, daß das α 1LG4-Fragment allein für die Heparin-Bindung verantwortlich ist, hiermit übereinstimmen. Die Regionen **RK** an Pos. 154, 155 (K2-Mutante) und **KGRTK** an Pos. 101, 103, 105 (K3-Mutante) die bereits als relevante Bindungsstellen für die Heparin-, Sulfatid- und α -Dystroglycan-Bindung verifiziert wurden, konnten anhand der ELISA-Titrations der monoklonalen Antikörper mit den Mutanten auch als solche erkannt werden. Die durchgeführten Experimente unterstützen die Annahme, daß die Region **KGRTK** (Pos. 101, 103, 105), dem eine starke Beteiligung bei allen drei Bindungen zugeschrieben wird, im LG4-Fragment besonders exponiert vorliegt. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß alle monoklonalen Antikörper gegen diese Bindungsregion gerichtet sind, aber aufgrund der Substitution keine Wechselwirkung mehr stattfinden kann. Für einige der monoklonalen Antikörper konnte der Nachweis erbracht werden, daß sie zusätzlich die Region **RK** (Pos. 154, 155) erkennen.

Die in dieser Arbeit erbrachten Daten liefern einen interessanten und nicht erwarteten

Einblick in einen besonderen Proteinliganden, das α 1LG4-Fragment. Es weist Bindungseigenschaften zu diversen Partnern (Heparin, Sulfatide und α -Dystrolycan) auf, die wahrscheinlich auf anionischen Strukturen beruhen. Durch die jetzt möglich gewordene rekombinante Produktion von α 1LG4 in großen Quantitäten, können umfassende Strukturanalysen mittels Röntgenkristallographie durchgeführt und die räumliche Nähe zwischen den einzelnen Regionen überprüft werden. Die hergestellten α 1LG4-Mutanten erlauben in der Zukunft in transgenen Experimenten eine genauere Analyse dieser Interaktionen im Hinblick auf ihre biologische Funktion. Dabei kann der Einfluß einzelner Mutanten auf die Bindung an Heparin/Sulfatide und/oder α -Dystroglycan untersucht werden, wenn sie über homologe Rekombination in das Genom von embryonalen Stammzellen der Maus eingeführt werden.