

5 Zusammenfassung

Das proteolytische Spaltprodukt E3-Fragment am C-terminalen Ende der Laminin-1 α 1-Kette repräsentiert die beiden tandemartig angeordneten LG4- und LG5-Module. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das E3-Fragment und seine einzelnen Module sechs verschiedene Konstrukte hergestellt, um die Grenzen selbstständiger Faltungseinheiten und insbesondere die Zugehörigkeit der einzelnen Cysteine festzulegen. Die Transfektion dieser sechs Konstrukte in 293 bzw. 293-EBNA Zellen führte nicht in allen Fällen zur Expression der rekombinanten Fragmente, obwohl Northern-Blot-Analysen bestätigten, daß alle transfizierten Zellen Laminin-spezifische mRNAs der erwarteten Größe produzierten. Die Daten bestätigten, daß für die korrekte Faltung des rekombinanten α 1LG4-5 Fragments (entspricht dem nativen E3-Fragment), sieben Cysteine benötigt werden, wobei man α 1LG4 drei und α 1LG5 vier zuordnen konnte.

Die Reinigung der rekombinanten Proteine mit den korrekten Modulgrenzen gelang in chromatographischen Schritten, und führte in allen Fällen zu reinen Proteinfractionen, die gelelektrophoretisch homogene Banden aufwiesen.

Die N-terminale Sequenzierung der rekombinanten Fragmente bestätigte den korrekten Übergang zur erwarteten Laminin-Sequenz. Die native Faltung wurde durch Elektronenmikroskopie, CD-Spektroskopie, Proteaseresistenz und immunologische Nachweise unter Verwendung verschiedener Antikörper, die bestimmte konformationelle Bindungsepitope erkennen, bestätigt. Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten α 1LG4-Fragment lieferte ein polyklonales Antiserum mit dem ein spezifischer und sensitiver Radioimmunassay entwickelt wurde.

Bindungsanalysen der rekombinanten Proteine mit Heparin, Sulfatiden und α -Dystroglycan konnten den Bindungsbereich auf das α 1LG4-Fragment eingrenzen.

Chemische Seitenkettenmodifikationen an α 1LG4 erbrachten erste Anhaltspunkte, daß Lysin und Arginin an der Heparin-Bindung beteiligt sind, wobei die Beteiligung des Tyrosins noch unklar blieb. Der limitierte Abbau mit Pepsin führte zu stabilen Fragmenten. Aufgrund der Charakterisierung der Bindungseigenschaften dieser Fragmente an der Heparin-Affinitätssäule konnte die Heparin-Bindungsstelle auf die letzten 100 Aminosäuren eingegrenzt werden. Auffällig war dabei die Sequenz KRK (Pos.126-128), die eine Anhäufung von basischen Aminosäuren darstellt. Gleichzeitig konnte eine Disulfidbrückenbindung zwischen den zweiten und dritten Cystein bestätigt werden.

Für die rekombinante Produktion von vierzehn verschiedenen α 1LG4-Mutanten wurden eukaryontische Zelllinien verwendet. Alle Mutanten konnten in ausreichenden Mengen im Medium der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Reinigung der Mutanten konnte mit Hilfe der Heparin-Affinitätschromatographie erfolgen. Sie wurden als gelelektrophoretisch homogene Banden mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie das nicht mutierte Fragment auf einem SDS-Gel identifiziert. Die native Faltung konnte durch Immunnachweis mit dem polyklonalen Antiserum, das gegen das α 1LG4-Fragment gerichtet ist, bestätigt werden.

Die Bindungsanalysen der Mutanten konnten das Heparin-Bindungssepitop auf zwei nicht benachbarte Sequenzregionen KRK (Pos. 126-128) und KGRTK (Pos. 101, 103, 105) kartieren, die wahrscheinlich im nativen Protein exponiert nahe beieinander liegen. Eine deutlich schwächere Beteiligung wurde für die Regionen RK (Pos. 154, 155) und RAR (Pos. 166, 168) gefunden. Als weitere Bindungspartner für diese Regionen erweisen sich Sulfatide. Die geringen Differenzen in dem Verlust an Bindungsaktivität lassen vermuten, daß die Heparin-Bindungsstelle mit der Sulfatid-Bindungsstelle größtenteils überlappt, aber trotzdem nicht vollkommen identisch ist. Dieselben zwei Sequenzregionen sind auch maßgeblich an der α -Dystroglycan-Bindung beteiligt, wobei den Regionen RK (Pos.154, 155), RAR (Pos. 166, 168) und KDR (Pos.193, 195) eine zusätzliche stärkere Beteiligung zugeschrieben werden konnte. Weitere Sequenzbereiche (siehe Tabelle 8) tragen in geringem Maße zur Bindung bei. Dadurch ist die α -Dystroglycan-Bindungsstelle auf dem α 1LG4-Fragment deutlich größer als die für Heparin und Sulfatide.

Die Sequenzregionen RK (Pos.154, 155) und KGRTK (Pos.101, 103, 105), die für die Heparin-, Sulfatid- und α -Dystroglycan-Bindung wichtige Bindungsbereiche darstellen, stellen für verschiedene α 1LG4-spezifische monoklonale Antikörper eine wichtige Bindungsregion dar. Für dieselben Antikörper ist gezeigt worden, daß sie die Heparin-Bindung inhibieren.