

Aus dem Institut für Medizinische Genetik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zur Pathogenese des Marfan-Syndroms:  
Untersuchung der Matrix-Metalloproteinase-Regulierung nach Stimulierung  
mit rekombinanten Fibrillin-1-Konstrukten und Untersuchung der  
Selbstassoziation eines rekombinanten Versikan-Konstruktes**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
– Universitätsmedizin Berlin

von  
Andreas Ney  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Mundlos

2. Prof. Dr. P. Knaus

3. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek

Datum der Promotion: 07. 09. 2007

Meinen Eltern

Mitten in diesem leeren unendlichen Schneesaal war ein zugefrorener See, der war in tausend Stücke zersprungen;  
aber jedes Stück war dem andern so gleich, dass es ein vollkommenes Kunstwerk war.  
Und mitten auf dem See saß die Schneekönigin, wenn sie zu Hause war, und dann sagte sie, dass  
sie im Spiegel des Verstandes säße und dass dieser der einzige und der beste in der Welt sei.

Hans Christian Andersen, Die Schneekönigin

## **Publikationsübersicht und Autoren**

Die in dieser Übersicht aufgeführten Publikationen wurden dieser Zusammenfassung für eine Publikationspromotion zugrunde gelegt.

Publikation 1:

Human Genetics (2005) 116: 51–61,

Titel:

RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome

Autoren:

Patrick Booms, Reinhard Pregla, Andreas Ney, Frank Barthel, Dieter P. Reinhardt, Angelika Pletschacher, Stefan Mundlos, Peter N. Robinson

Publikation 2:

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2006) 40:234–246,

Titel:

A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis

Autoren:

Patrick Booms\*, Andreas Ney\*, Frank Barthel, Gautier Moroy, Damian Counsell, Christoph Gille, Gao Guo, Reinhard Pregla, Stefan Mundlos, Alain J.P. Alix, Peter N. Robinson

Publikation 3:

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2006) 38:23–29,

Titel:

Calcium-dependent self-association of the C-type lectin domain of Versican

Autoren:

Andreas Ney, Patrick Booms, Guido Epple, Matthias Mörgelin, Gao Guo, Gerhard Kettelgerdes, Reinhard Geßner, Peter N. Robinson

\*Die ersten beiden Autoren haben im gleichen Ausmaß an der Arbeit für diese Publikation mitgewirkt.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Abstrakt</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2. Zielstellung</b>	<b>2</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>3</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>7</b>
<b>Referenzen</b>	<b>11</b>
<b>Appendix</b>	<b>13</b>
Publikationen (1-3)	
Selbständigkeitserklärung	
Erklärung über den Eigenanteil	
Lebenslauf	
Danksagung	

## **Abstract**

Das Marfan-Syndrom (MFS) ist eine relativ häufige hereditäre Störung des Bindegewebes, die durch Mutationen in dem Gen für Fibrillin-1 (FBN1) verursacht wird. Das Fibrillin-1 ist eine Hauptkomponente der 10-12-nm-Mikrofibrillen, die zusammen mit dem Elastin die elastischen Fasern in Geweben wie zum Beispiel der Aorta bilden. Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Fibrillin-1-Fragmenten auf die Expression und Proteinregulation der Matrixmetalloproteinase (MMP) Typ 1, 2 und 3 in einem Zellkultursystem geprüft. Einerseits können Mutationen im FBN1 die Anfälligkeit von Fibrillin-1 gegenüber Proteolyse erhöhen; andererseits liegen Literaturberichte vor, die eine erhöhte MMP-Expression und Protein-Fragmentierung in Geweben von MFS-Patienten belegen. Dies legte die Frage nahe, ob Fibrillin-1-Fragmente für die Erhöhung der MMP-Konzentrationen mitverantwortlich sein können, was in anderen biologischen Systemen für Fragmente anderer Matrixproteine, wie zum Beispiel Fibronectin, bereits bekannt war. Es wurden daher verschiedene Fibrillin-1-Konstrukte kloniert, die jeweils das einzige integrin-bindende Arginin-Glycin-Asparginsäure (RGD)-Motif des Fibrillin-1 enthalten, und dann in einem eukaryontischen Expressionssystem exprimiert. Dermale Fibroblastenkulturen wurden mit den so gewonnenen Konstrukten inkubiert, um die Expression und Proteinregulation von MMP-1, -2 und -3 mittels quantitativer reverser Transkriptase (RT) Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) und Western-Blot zu messen. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Expression und Proteinregulation von MMP-1 und MMP-3 nachgewiesen. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass ein Fragment, welches das Elastin-binding-protein (EBP)-Erkennungsmotiv Glycin-x-x-Prolin-Glycin (GxxPG) aufweist, die Expression und Proteinregulation von MMP-1 signifikant erhöht. Diese Ergebnisse liefern eine plausible Erklärung für die Erhöhung der MMP-Konzentrationen in den Geweben von Patienten mit MFS. Im zweiten Teilprojekt wurde ein rekombinantes (Abkürzung: r) Versikan-Konstrukt mit der C-Typ-Lektin-Domäne (CLD) des Versikans aus dem Bereich der bereits bekannten Interaktion zwischen Fibrillin-1 und Versikan erzeugt (rCLD). Das Versikan ist ein großes ( $1-2 \times 10^6$  kDa) Chondroitinsulfat-Proteoglykan, das mittels Interaktionen mit Hyaluronan (Hyaluronsäure, HA) größere Aggregate bilden und außerdem an eine Reihe von anderen Matrixproteinen, Chemokinen und Zelloberflächenmolekülen binden kann. Nachdem initiale Untersuchungen mittels Gelelektrophorese eine Homodimerbildung nahe legten, konnten wir mittels Blot-Overlay-Assay und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie nachweisen, dass dieses Fragment eine kalziumabhängige Selbstassoziation eingeht. Die Charakterisierung der Bindungsinteraktionen dieses rekombinanten Versikan-Fragments stellt

einen ersten Schritt zum Verständnis der Funktionen der verschiedenen Domänen des Versikans dar.

## **1. Einleitung**

Das MFS ist eine häufige monogene Bindegewebeerkrankung, die durch eine klinisch hochvariable Manifestation vor allem im kardiovaskulären, skelettalen und okulären System gekennzeichnet ist. Das MFS wird durch Mutationen im Fibrillin-1-Gen verursacht [1]. Das Fibrillin-1 ist eine Hauptkomponente der 10-12 nm-Mikrofibrillen, die eine wichtige Rolle bei der Einlagerung des Tropoelastins während der Bildung von elastischen Fasern spielen und eine verankernde strukturelle Funktion in vielen Gewebstypen besitzen [2]. Die Pathogenese des MFS ist vielschichtig und umfasst dominant negative Störungen des Aufbaus der Mikrofibrillen [3], Störungen des Transforming-Growth-Factor- $\beta$ (TGF $\beta$ )-Stoffwechsels [4], der Gewebshomöostase [5] und der Stabilität der Mikrofibrillen gegenüber Proteasen [6]. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen anhand von rekombinanten Fibrillin-1- und Versikan-Fragmenten, um ausgewählte Aspekte der Physiologie und Pathophysiologie der Fibrillin-enthaltenden Mikrofibrillen zu untersuchen.

## **2. Zielstellung**

In der vorliegenden Arbeit sollten Fibrillin-1-Fragmente rekombinant hergestellt werden um die Frage zu prüfen, ob diese Fragmente die Expression und Proteinsyntheseregulation von ausgewählten Matrixmetalloproteinasen in einem Fibroblasten-Zellkultursystem beeinflussen können. Dafür mussten Fragmente kloniert und expremiert werden, die das einzige RGD-Motiv des Fibrillin-1 und das mutmaßliche GxxPG-Erkennungsmotiv für das Elastin-Bindungsprotein (EBP) enthalten. Der Spezifitätsbeweis für die Wirkung des GxxPG-Motivs sollte mittels in vitro Mutagenese der GxxPG-Sequenz erbracht werden. Ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen der Mikrofibrillen mit anderen Komponenten des Bindegewebes, wie zum Beispiel den Proteoglykanen, könnte für die Ursachenaufklärung des MFS ebenfalls von Bedeutung sein. Im Rahmen von Voruntersuchungen der CLD-Domäne des Versikans, für die eine Bindung mit dem Fibrillin-1 bereits bekannt ist (Isogai et al. 2002), wurden Hinweise für eine bislang noch nicht bekannte CLD-Selbstassoziation der rekombinanten CLD (rCLD) gefunden. Die Untersuchung der CLD-Selbstassoziation mittels Blot-Overlay-Assay und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie war daher eine weitere Zielstellung.

### 3. Methodik

#### Herstellung der rekombinanten Polypeptide (Konstrukte)

Die Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der folgenden Polypeptidfragmente wurde für alle Projekte mit denselben Methoden durchgeführt. Einzelheiten zu Primersequenzen, PCR-Bedingungen usw. werden in den Originalarbeiten (siehe Publikationsübersicht) näher beschrieben.

Konstrukt	Aminosäurenreste	Bemerkung	Referenz
rFib35-40	Asp <sup>1446</sup> -Asp <sup>1689</sup>	RGD-Motiv	Booms 2005
rFib37-38	Asp <sup>1528</sup> -Glu <sup>1605</sup>	RGD-Motiv	Booms 2005
rFib24-28	Asp <sup>952</sup> -Val <sup>1196</sup>	Negativkontrolle (kein RGD-Motiv enthalten)	Booms 2005
rFib47 <sup>wt</sup>	Ile <sup>1929</sup> -Glu <sup>2205</sup>	EGFEPG	Booms 2006
rFib47 <sup>mt</sup>	Ile <sup>1929</sup> -Glu <sup>2205</sup>	EGFESG, Mutation der EBP-Erkennungssequenz	Booms 2006
rCLD	Gln <sup>316-4</sup> -Lys <sup>3291</sup>	CLD des Versikans	Ney 2006

*SfiI*-*ApaI*-gespaltenen PCR-Produkte, die den oben aufgelisteten Konstrukten entsprechen, wurden in den *SfiI*-*ApaI*-gespaltenen Vektor *pSeqTag 2A* (Invitrogen) ligiert. Nach Vervielfältigung des Vektors in *E. coli* und Isolierung des Vektors mit Standardmethoden wurden die Insertsequenz und -orientierung mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Um das Elastin-binding-protein (EBP)-Erkennungsmotiv EGFEPG im rFib47<sup>wt</sup>-Konstrukt zu verändern, wurde mit dem *GeneTailor Site-Directed Mutagenesis system*<sup>1</sup> (Invitrogen) eine in vitro Mutagenese durchgeführt. Der Vorwärts-Primer (mutiert) hat ein "T" anstelle eines "C", was zu einem Austausch eines Prolin-Restes durch einen Serin-Rest (EGFEPG → EGFESG) führt, dadurch wird die EBP-Konsensus-Sequenz aufgehoben. Das mutierte rekombinante Polypeptid (rekombinante Konstrukt) erhielt die Bezeichnung rFib47<sup>mt</sup> (Fib: Abkürzung für Fibrillin-1).

#### Herstellung der rekombinanten Zellklone durch stabile Transfektion

Humane embryonale Nierenzellen (Human embryonic kidney [HEK] 293 EBNA Zellen, Invitrogen) wurden in Wachstumsmedium *Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM)* mit 2mM L-Glutamin und 4,500mg/l Glukose mit 10% (v/v) fötales Kälberserum] ausplattiert. Die oben beschriebenen Plasmide wurden über die *ScaI*-Schnittstelle linearisiert und nach 24 Stunden in einem Wachstumsmedium ohne Serum für die stabile Transfektion der HEK Zellen in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Wells) eingesetzt. Für die stabile Transfektion wurde das Reagenz *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) verwendet. Für die Selektion von

<sup>1</sup> Produktbezeichnungen werden im Text *kursiv* gesetzt.

Zellklonen mit stabiler Expression wurden die Zellen in frischem Kulturmedium passagiert, bevor nach 24 Stunden für die Selektion *Zeocin* (Invitrogen) mit einer Konzentration von 400µg/ml in das Wachstumsmedium pipettiert wurde. Die Klonkolonien wurden bezüglich ihrer Expression mittels Western-Blot, bei dem ein anti-myc Antikörper (Invitrogen) verwendet wurde, analysiert. Die Klonkolonien mit den höchsten Expressionen wurden für die weitere Präparation ausgewählt. Für die Produktion von rekombinanten Polypeptiden wurden die einzelnen Zellklone in *D-MEM* Medium mit 10 % (v/v) Kälberserum und 200µg/ml *Zeocin* bis zum Subkonfluenzstadium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit 1x Phosphat gepufferter NaCl-Lösung (1xPBS) wurden die Zellklone 48 Stunden in Erntemedium (Serumfreies *D-MEM*) inkubiert. Zwei Ernten wurden hintereinander nach jeweils 48 Stunden vorgenommen, das Erntemedium mit dem sezernierten Polypeptid wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 800ml gesammelt.

### **Reinigung der rekombinanten Polypeptide**

Für die nichtdenaturierende Reinigung der rekombinanten Polypeptide, die ein C-terminales Hexa-Histidin-Tag enthalten, wurde das serumfreie Erntemedium (ca. 800ml) mit 0,5mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt und dann mit einer 0,2µm Filtereinheit (Nalgene) filtriert, um Zellbestandteile zu entfernen. Mit einem *Centricon Plus-80*- Filtergerät (Millipore) wurde das Volumen bis ca. 12ml konzentriert (Ultrazentrifugation).

Danach folgte eine Dialyse des Ultrakonzentrats gegen Equilibrierungs-Puffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7.2). Das dialysierte Medium wurde dann auf 1ml mit Nickel (Ni) geladener Ni-NTA Agarose (Qiagen) Komplexbildungs-Säule aufgetragen und das rekombinate Polypeptid gereinigt. Polypeptidhaltige Elutionsfraktionen mit einer über 95%-igen Reinheit wurden gesammelt, mittels Ultrafiltration (Centricon) konzentriert und dann gegen eine mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) gepufferte NaCl-Lösung (1xTBS) dialysiert.

### **Zellkultur und Stimulierung der primären Zellen mit Fibrillin-1-Konstrukten**

Primäre Hautfibroblasten aus humanen Hautbiopsie-Explantaten wurden in *D-MEM* mit 10% (v/v) Kälberserum bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Für alle nachfolgenden Experimente wurden nur Zellen nach 5-10 Passagen verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert, auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausplattiert, und dann in *D-MEM* mit 10%(v/v) fötalem Kälberserum bis zum Subkonfluenzstadium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden

rekombinante Fibrillin-1-Konstrukte (0-2 $\mu$ M) oder synthetische Peptide (0-200 $\mu$ g/ml) in das serumfreie Kulturmedium pipettiert, danach folgte eine Inkubation über 48 Stunden bei 37 °C und 5%CO<sub>2</sub>. Es erfolgte dann die Ernte des Mediums mit der *peqGOLD TriFast* Methode (PeqLab), die Lyse der Zellen und die RNA-Extraktion. Die angereicherten serumfreien Medien wurden direkt nach der Ernte für die Bestimmung der MMP-Konzentrationen im Western-Blot eingesetzt. Die Zellen auf den Oberflächen der Plattenvertiefungen wurden für die RNA-Extraktion eingesetzt. Die Zellen wurde dafür am Boden der Zellkulturplattenvertiefung durch Zugabe von 1ml *peqGOLD TriFast* mit 70 $\mu$ g Glykogen als Präzipitationsvermittler lysiert.

### **Western Blot**

Typischerweise wurde das Zellkulturmedium von 6 parallelen Proben nach 48 Stunden Inkubationszeit geerntet. Das angereicherte Medium von jeder Plattenvertiefung wurde mit 5x sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Probenpuffer versetzt. 80 $\mu$ l Lysat wurde für die Gelelektrophorese mit der *Hoefler SE 600*-Kammer(Amersham) pro Gelspur eingesetzt. Nach dem Western-Blot erfolgte die Inkubation der Blotmembranen mit dem primären Antikörper (Anti-MMP-1, Anti-MMP-2 oder Anti-MMP-3) bei einer Endkonzentration von 1 $\mu$ g/ml bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Blotmembranen mit dem sekundärem Antikörper (Anti-Maus-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase) für 2 Stunden bei Raumtemperatur (bei einer 1: 3000 Verdünnung) inkubiert, bevor die Entwicklung mit dem *ECF Western blotting kit* (Amersham) erfolgte. Die Bildanalyse der Blots zur Bestimmung der Proteinkonzentration für MMP1, -2 und -3 erfolgte durch Scanning-Densitometrie unter Verwendung des *FluorImager SI Densitometer* (Amersham). Nach Hintergrundkorrektur wurde die Quantifizierung der Bilddaten mit der *ImageQuant Software* (Amersham) realisiert.

### **Biotinylation des rCLD**

Das rCLD-Konstrukt wurde biotinyliert, um es als „Sonde“ für die mobile Phase von Blot-Overlay-Assays einzusetzen. Die rCLD-Präparate wurden bis 2mg/ml mittels Ultrafiltration (*Centricon Centrifugal Filter Device YM-3*, cutoff 3kDa; Millipore) konzentriert. Die Biotinylierung wurde mit dem *EZLink™ NHS-PEO4-Biotin-Kit* (Pierce) durchgeführt. Für die Biotin-Quantifizierung wurde der *EZ Biotin Quantitation Kit* (Pierce) eingesetzt.

## **Blot-Overlay-Assay Analysen mit dem rCLD**

Für den Blot-Overlay-Assay wurden 4µg rCLD Versikan mit SDS-PAGE (15% (w/v) Acrylamid) separiert und dann auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (*Immobilon™-P transfer membrane*, Millipore) transferiert. Nicht spezifische Bindungsstellen wurden mit dem Dilution Buffer (ProFound™ Far-Western Biotinylated Protein: Protein Interaction Kit, Pierce) blockiert. Danach folgte eine kurze Waschung mit 1xTBS und 2% (w/v) fettfreier Trockenmilch. Die nachfolgende Inkubation erfolgte bei leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C und dann für 6 Stunden bei Raumtemperatur mit 2µg/ml biotinyliertem rCLD-Versikan in Blot-Overlay-Assay Puffer (1xTBS, 2% (w/v) fettfreie Trockenmilch, 2mM CaCl<sub>2</sub>). Danach folgte ein dreifaches Waschen der PVDF-Membranen mit 1xTBS unter Zusatz von 0,025% Tween 20 und 2mM CaCl<sub>2</sub>. Für die Detektion wurden die Membranen zunächst mit Streptavidin (konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen sechsmal mit 1xTBS unter Zusatz von 0,025% (v/v) Tween 20 und 2mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen, bevor sie dann mit *UnBlot substrate working solution* (ProFound™ Far-Western Biotinylated Protein:Protein Interaction Kit, Pierce) inkubiert wurden. *Hyperfilm ECL™ chemiluminescence* -Filme (Amersham Pharmacia) wurden für die Auswertung des Assays mit den PVDF-Membranen exponiert.

## **Bindungsanalysen rCLD-Bindungsanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie**

Das nichtmarkierte rCLD-Versikan Konstrukt wurde mit HBS-P Puffer (0,01 HEPES; pH7,4; 0,15M NaCl; 0,005% *Tensid P20*) verdünnt und dann an einem *CM5 Sensor Chip* (BIAcore) als Ligand immobilisiert (maximale Immobilisierung bei einem Niveau von 3680 Resonanzeinheiten [RU]). Für Affinitätsmessungen wurde die Bindung und die Dissoziation mit einem *Biacore X*-Messgerät (BIAcore) aufgezeichnet. Rekombinantes rCLD wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen als sogenannter Analyt auf die mit rCLD beschichtete Chipoberfläche injiziert, bei einer Flussrate des Laufpuffers (HBS-P Puffer mit 1mM CaCl<sub>2</sub>) von 20µl/Min. Weitere Messungen erfolgten bei einer Konzentration von 2,5mM CaCl<sub>2</sub>. Kontrollexperimente wurden mit HBS-P und einem Zusatz von 3mM EDTA anstelle von CaCl<sub>2</sub> durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde eine Kupplungsreaktion in einer Flusszelle ohne Anwesenheit von rCLD durchgeführt, um größere unspezifische Bindungen des rCLD an die Chipmatrix (Dextran) auszuschließen. Die rCLD-Oberfläche auf dem Chip wurde nach jeder

Messung durch die Pulsinjektion von 2x60µl HBS-P Laufpuffer mit 20mM EDTA und dann 1x60µl 20mM CaCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O regeneriert. Nach einer X- und Y- Normalisierung der Sensogramme wurden der Kurvenverlauf der Negativkontrolle (Flusszelle ohne rCLD-Beschichtung) vom Kurvenverlauf der Bindungsreaktion (Flusszelle mit rCLD-Beschichtung) subtrahiert, bevor die Bewertung mit dem *BiaEvaluation*-Programm (Version 3.1, BIAcore) erfolgte.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

### **Teilprojekt 1 (Publikationen 1 und 2):**

#### **Hochregulierung der MMP-Expression und -Proteinsynthese durch Fibrillin-1-Fragmente – ein potentieller Faktor in der Pathogenese des MFS**

Die Analyse des Einflusses von Fragmenten, die entweder ein integrin-bindendes RGD-Motiv oder aber ein GxxPG-Motiv für das Elastin-Bindungsprotein (EBP) enthalten, auf die Expression und Proteinsregulation ausgewählter MMPs stand im Mittelpunkt diese Teilprojekts.

#### **Die Fibrillin-1 Fragmente rFib35-40 und rFib37-38 mit dem integrin-bindenden RGD-Motiv erhöhen die MMP-1- und MMP-3 -Proteinsyntheseregulation**

Subkonfluente Hautfibroblasten wurden jeweils mit 0,0; 0,5 und 2,0 µM dem Konstrukt rFib35-40 inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Stimulationen mit 50ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) durchgeführt. Das angereicherte Zellkulturmedium wurde nach 48 Stunden mit Anti-MMP-1 im Western-Blot untersucht. Der Gehalt von MMP-1 wurde nach einer Stimulierung mit 0,5 µM Konstrukt rFib35-40 um einen durchschnittlichen Faktor von 2,0 verstärkt. Wir beobachteten allerdings auch variable Ergebnisse nach der Stimulierung mit 2,0 µM Konstrukt rFib35-40 mit einer Erhöhung der MMP-1-Proteinsynthese um den Faktor von bis zu 3,0 in einzelnen Experimenten. Die Western-Blot-Analyse nach Stimulation mit 1,0µM Konstrukt rFib37-38 zeigte eine durchschnittliche Hochregulation der MMP-1 Proteinsynthese um das 1,4-fache. Als Negativkontrolle wurde eine Stimulierung mit dem Konstrukt rFib24-28, das kein RGD-Motiv enthält, durchgeführt. Eine Hochregulation der MMP-1 war mit diesem Konstrukt nicht nachweisbar. Die von den Mitautoren R. Pregla und F. Barthel durchgeführte quantitative RT-PCR bestätigte diese Ergebnisse (siehe Publikation 1 in der

Publikationsübersicht). Die Western-Blot-Analysen für MMP-3 wurden nach der Stimulierung mit rFib35-40 in gleicher Weise, wie oben für MMP-1 beschrieben, durchgeführt. Die MMP-3 Konzentration erhöhte sich um einen Faktor von 2,0 nach Stimulierung mit 0,5  $\mu$ M Konstrukt rFib35-40. Wie schon bei der Analyse für MMP-1 wurde eine höhere Variabilität nach der Stimulierung mit 2,0  $\mu$ M Konstrukt rFib35-40 beobachtet.

### **Das Fibrillin-1 Konstrukt mit der EBP-Konsensussequenz GxxPG erhöht die MMP-1 Expression und Proteinsynthese**

In diesem Projekt untersuchten wir den Einfluss eines rekombinanten Fibrillin-1 Fragments, das eine mutmaßliche EBP Bindungsstelle enthält, bezüglich der Expression und Proteinsynthese von MMP-1. Ein rekombinantes Konstrukt (rFib47<sup>wt</sup>), das die Aminosäuresequenz Glutaminsäure-Glycin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Prolin-Glycin (EGFEPG) enthält, die der putativen Konsensussequenz GxxPG für die Interaktion mit dem EBP entspricht [7], wurde, wie oben beschrieben, hergestellt. Semikonfluente Hautfibroblasten von Kontrollen wurden mit 0,0; 0,1; und 0,2 $\mu$ M Konstrukt rFib47<sup>wt</sup> inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium zur Bestimmung der MMP-1-Produktion isoliert. Durch Untersuchung des angereicherten Zellkulturmediums mittels Anti-MMP-1 im Western-Blot wurde ein bis zu 7x erhöhter Anstieg der MMP-1-Proteinsynthese in Abhängigkeit zur Dosis nachgewiesen.

### **Eine Punktmutation im GxxPG-Motiv reduziert den Stimulationseffekt auf die MMP-1 - Proteinsynthese signifikant**

Um die Spezifität des Stimulationseffekts in Bezug auf die Interaktion mit dem EBP zu prüfen, wurde ein *in vitro* Mutagenesesystem eingesetzt, mit dem die EBP Konsensussequenz des Fibrillin-1 von GFEFG nach GFESG verändert wurde. Das dadurch hergestellte rekombinante Konstrukt rFib47<sup>mt</sup> war bis auf die darin enthaltende Mutation identisch mit dem Konstrukt rFib47<sup>wt</sup> (Wildtyp). Stimulationen mit 0,1 $\mu$ M Konstrukt wurden, wie oben für das Wildtyp-Konstrukt beschrieben, durchgeführt. Das mutante Konstrukt rFib47<sup>mt</sup> zeigte keine Stimulation der MMP-1-Expression. Die erzielten Daten legen nahe, dass die Hochregulierung der MMPs mit dem dann folgendem Abbau des Bindegewebes von Geweben, wie beispielsweise der Aortenmedia, ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese des MFS ist.

In einer Studie wurden die Hochregulationen von verschiedenen MMPs in der glatten Muskulatur der Aorta in Operationsproben von Personen mit MFS in der Randzone zur

zystischen Medianekrose nachgewiesen [8]. Außerdem wurden in den Zonulafasern des Auges Immunreaktionen gegen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 nach Linsenextraktion bei Patienten mit MFS beobachtet [9]. Zudem weisen kardiovaskuläre Gewebe von Patienten mit MFS eine Fragmentierung auf [10]. Auf der anderen Seite können verschiedene MMPs Fibrillin-1 verdauen [11]. Da *FBNI*-Mutationen die Anfälligkeit von Fibrillin-1 gegenüber Proteolyse erhöhen können [6, 12, 13], ist es aufgrund unserer Ergebnisse plausibel, dass Fibrillin-1-Fragmente zur Erhöhung der Konzentration einzelner MMPs in den Geweben von Patienten mit MFS beitragen könnten. Die Frage, ob eine Inhibition der MMP-Aktivität eine sinnvolle therapeutische Ergänzung für diese Patienten bietet, ist ein Thema für weitere Forschungstätigkeiten. Es ist plausibel, dass Fragmente von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), die eine MMP-stimulierende Eigenschaft besitzen, zu einem *Circulus vitiosus* führen, in dem die erhöhte MMP-Konzentration wiederum die Fragmentierung der EZM-Proteine erhöht.

### **Teilprojekt 2 (Publikation 3)**

#### **Nachweis der Selbstassoziation des rCLD**

Es wurde ein rekombinantes Konstrukt entsprechend der CLD des Versikans hergestellt. Diese Domäne interagiert bekanntermaßen mit einer Reihe von Proteinen der EZM, einschließlich Fibrillin-1 [14], Fibulin-1 [15], Fibulin-2 [16], und Tenascin-R [17]. rCLD wurde über eine stabile Transfektion in einer HEK-293 Zell-Linie exprimiert, und danach mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Fraktionen mit einer Reinheit von mindestens 95% wurden gesammelt und für weitere Experimente eingesetzt. Das rekombinante Polypeptid lag nach nicht-reduzierender und -denaturierender Elektrophorese des gernteten Zellkulturmediums bzw. der gereinigten Fraktion überwiegend als Monomer vor. In einer ersten Analyse testeten wir die Bindungseigenschaften des rCLD mittels Blot-Overlay-Analyse. Das rCLD wurde mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert und dann auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mittels Western-Blot übertragen, danach folgte ein Inkubation der Membran mit biotinyliertem rCLD und 2mM CaCl<sub>2</sub>. Die Ergebnisse zeigten Hinweise auf eine Eigenbindung des rCLD-Konstruktes. Danach erfolgte deshalb eine Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie Analyse mit dem rCLD-Konstrukt. Die Analyse der Bindungsdaten erfolgte für den gesamten Verlauf, inklusive der gesamten Assoziations- und Dissoziationsphase, unter Verwendung von 1,0mM CaCl<sub>2</sub> im Laufpuffer. Kein Bindungsmodell, das von der *BiaEvaluation* Software (Version 3.1) vorgegeben wird, resultierte in einer

ausreichenden Anpassung der Sensogramme, was auf einen komplexen Bindungsmodus hindeutet. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig eine Selbstassoziation zwischen den rCLD-Molekülen. Analoge Experimente, bei denen 3mM EDTA anstelle von 1mM CaCl<sub>2</sub> als Laufpufferkomponente appliziert wurde, resultierten in einer schwachen Bindungsantwort. Der maximale Bindungswert lag dann bei einer Konzentration von 1000mM rCLD bei 24 Einheiten, verglichen mit 323 Einheiten mit 1mM CaCl<sub>2</sub> im Laufpuffer. Dies zeigt, dass die Eigenassoziation des rCLD kalziumabhängig ist, wie man es von einer CLD auch erwartet. Die durch den Mitautor, Herrn M. Mörgelin (Publikation 3 in der Publikationsübersicht), durchgeführte elektronenmikroskopische Analyse lieferte eine weitere Bestätigung der Selbstassoziation dieser Domäne.

### **Die potentielle biologische Funktion für die Selbstassoziiierung der C-Typ-Lektin-Domäne (CLD) des Versikans**

Der Hauptbestandteil des Versikan-Moleküls besteht aus einer zentralen Achse, an der sich Chondroitinsulfat-Einheiten neben der N-terminalen globulären Domäne befinden, über die Bindungen an das Hyaluronan erfolgen. Über das C-terminale Ende werden Bindungen zu anderen Proteinen der EZM vermittelt. Eine der Funktionen der CLD-vermittelten Bindung könnte die Organisation des Hyaluronan/Hyalectin-Komplexes während des Aufbaus der extrazellulären Matrix sein [16], indem andere Matrixkomponenten mit multiplen Hyalectin-CLD-Bindungsstellen an diesen Komplex gebunden werden. In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass ein rekombinantes C-terminales Versikan-Domänen-Fragment mit sich selbst binden und Aggregate bilden kann. Dieser Prozess befähigt das Versikan zur Organisation von Matrixkomponenten durch die Induktion der Vernetzung von einzelnen HA/Hyalectin-Komplexen. Es ist denkbar, dass die Selbstassoziiierung der CLD-Region nur eine Komponente eines von mehreren Interaktionskomponenten ist, die sich in den verschiedenen Gewebetypen und Entwicklungsstadien unterscheiden. Die G3-Domäne von Aggrekan und Versikan kann intermolekulare Disulfid-Bindungen ausbilden, die die Zell-Matrix Interaktion stabilisieren [18]. Die Autoren erzeugten eine Serie von Konstrukten, die verschiedene Kombinationen von Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (carbohydrate recognition domain, CRD) und Komplement-Bindungs-Domänen (CBP) der G3-Region von Aggrekan und Versikan enthielten, sowie Konstrukte mit oder ohne Mutationen für jeden Cystein-Rest im CRD- oder CBP-Motiv des Aggrekan. Mit den Konstrukten konnten mittels nichtdenaturierender PAGE und nachfolgendem Western-Blot multiple Banden (Dimer- und höhere Multimer-Produkte)

nachgewiesen werden. Im Rahmen des hier berichteten Projekts wurden aber keine signifikanten Anteile von Disulfid-Bindungsformationen in den rCLD-Präparationen beobachtet. Der Unterschied zu den Ergebnissen von Chen et al. ist durch Parameter in der experimentellen Methodik erklärbar. So wurden von Chen et al. [18] transient transfizierte HEK-Zellen und oxidierende Agenzien im Elektrophoresesystem verwendet.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass das rCLD reversiblen, kalziumabhängigen Bindungen unterliegt. Es erscheint unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Chen et al. daher denkbar, dass die kalziumabhängige Bindung der notwendige erste Schritt vor der Disulfid-Bindung ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir mittels Blot-Overlay-Assay, Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und mit der Elektronenmikroskopie einen Nachweis für eine Selbstassoziations-Eigenschaft der CLD erbracht haben. Die Eigenschaft ist auch ein Hinweis für eine mögliche Aggregatformation der CLD. Die Selbstinteraktion der CLD kann die Formation von Matrixkomponenten über die Induktion oder Modifizierung der HA/Hyalectin-Komplexe beeinflussen oder andererseits auch die Interaktionen zwischen der CLD des Versikan und Fibulin-1 und -2, Fibrillin-1 und Tenascin steuern.

Weitere Arbeiten sollten sich auf die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen dieser Interaktionen konzentrieren.

## **5. Referenzen:**

1. Dietz, H.C., et al., Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*, 1991. 352(6333): p. 337-9.
2. Robinson, P.N., et al., The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*, 2006.
3. Dietz, H.C., et al., Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics*, 1993. 17(2): p. 468-75.
4. Neptune, E.R., et al., Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 2003. 33(3): p. 407-11.
5. Pereira, L., et al., Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(7): p. 3819-23.
6. Booms, P., et al., Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet*, 2000. 107(3): p. 216-24.
7. Brassart, B., et al., Conformational Dependence of Collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) Up-regulation by Elastin Peptides in Cultured Fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2001. 276(7): p. 5222-5227.
8. Segura, A.M., et al., Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*, 1998. 98(19 Suppl): p. II331-7; discussion II337-8.

9. Sachdev, N.H., et al., Lens dislocation in Marfan syndrome: potential role of matrix metalloproteinases in fibrillin degradation. *Arch Ophthalmol*, 2002. 120(6): p. 833-5.
10. Fleischer, K.J., et al., Immunohistochemical abnormalities of fibrillin in cardiovascular tissues in Marfan's syndrome. *Ann Thorac Surg*, 1997. 63(4): p. 1012-7.
11. Ashworth, J.L., et al., Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J*, 1999. 340 ( Pt 1): p. 171-81.
12. McGettrick, A.J., et al., Molecular effects of calcium binding mutations in Marfan syndrome depend on domain context. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(13): p. 1987-94.
13. Reinhardt, D.P., et al., Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome. *J Biol Chem*, 2000. 275(16): p. 12339-45.
14. Isogai, Z., et al., Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 4565-72.
15. Aspberg, A., et al., Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem*, 1999. 274(29): p. 20444-9.
16. Olin, A.I., et al., The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem*, 2001. 276(2): p. 1253-61.
17. Aspberg, A., et al., The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(19): p. 10116-21.
18. Chen, L., et al., G3 domains of aggrecan and PG-M/versican form intermolecular disulfide bonds that stabilize cell-matrix interaction. *Biochemistry*, 2003. 42(27): p. 8332-41.

## **Appendix**

Publikationen (1-3)

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über den Eigenanteil

Lebenslauf

Danksagung

Publikation 1:

Human Genetics (2005) 116: 51–61,

Titel:

RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome

Autoren:

Patrick Booms, Reinhard Pregla, Andreas Ney, Frank Barthel, Dieter P. Reinhardt, Angelika Pletschacher, Stefan Mundlos, Peter N. Robinson

Publikation 2:

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2006) 40:234–246,

Titel:

A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis

Autoren:

Patrick Booms<sup>\*</sup>, Andreas Ney<sup>\*</sup>, Frank Barthel, Gautier Moroy, Damian Counsell, Christoph Gille, Gao Guo, Reinhard Pregla, Stefan Mundlos, Alain J.P. Alix, Peter N. Robinson

<sup>\*</sup>Die ersten beiden Autoren haben im gleichen Ausmaß an der Arbeit für diese Publikation mitgewirkt.

Publikation 3:

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2006) 38:23–29,

Titel:

Calcium-dependent self-association of the C-type lectin domain of Versican

Autoren:

Andreas Ney, Patrick Booms, Guido Epple, Matthias Mörgelin, Gao Guo, Gerhard Kettelgerdes, Reinhard Geßner, Peter N. Robinson

## **Erklärung**

„Ich, Andreas Ney, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:  
Zur Pathogenese des Marfan-Syndroms: Untersuchung der Matrix-Metalloproteinase-  
Regulierung nach Stimulierung mit rekombinanten Fibrillin-1-Konstrukten und Untersuchung  
der Selbstassoziation eines rekombinanten Versikan-Konstruktes selbst verfasst und keine  
anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe  
Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

20.09. 2006

Unterschrift

A. Ney

An den Vorsitzenden des Promotionsausschusses  
der Charité – Universitätsklinikum Berlin

Antrag auf Zulassung zur Durchführung einer Publikationspromotion zur Promotion zum  
Dr. rer. medic. an der Charité – Universitätsmedizin Berlin

### **Erklärung über den Anteil an den Publikationen**

#### Zur Publikation 1:

Human Genetics (2005) 116: 51–61,

Titel:

RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome

Autoren:

Patrick Booms, Reinhard Pregla, Andreas Ney, Frank Barthel, Dieter P. Reinhardt, Angelika Pletschacher, Stefan Mundlos, Peter N. Robinson

#### Eigener Anteil:

Im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation wurde ich zunächst von Herrn Dr. P. Booms (Post doc) in die folgenden Methoden eingewiesen: Herstellung der rekombinanten Konstrukte und Zellklone , Reinigung der rekombinanten Polypeptide, Zellkultur und Behandlung der primären Zellen mit Fibrillin-1 Fragmenten, Western Blot und Detektion der MMPs mittels spezifischer Antikörper und anschließende Quantifizierung der Ergebnisse. Nach der Einweisung in die obigen Methoden wurden von mir die Arbeiten selbständig weitergeführt, an der Auswertung und der Diskussion war ich beteiligt . Die quantitative RT-PCR wurde durch Mitautoren durchgeführt und ausgewertet.

### Zur Publikation 2:

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2006) 40:234–246,

Titel:

A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis

Autoren:

Patrick Booms\*, Andreas Ney\*, Frank Barthel, Gautier Moroy, Damian Counsell, Christoph Gille, Gao Guo, Reinhard Pregla, Stefan Mundlos, Alain J.P. Alix, Peter N. Robinson

\*Die ersten beiden Autoren haben im gleichen Ausmaß an der Arbeit für diese Publikation mitgewirkt.

### Eigener Anteil:

Herstellung der rekombinanten Konstrukte und Zellklone, künstliche Mutagenese des rFib47<sup>mut</sup>, Reinigung der rekombinanten Polypeptide, Zellkultur und Behandlung der primären Zellen mit Fibrillin-1 Fragmenten, Western Blot und Detektion der MMPs mittels spezifischer Antikörper und anschließender Quantifizierung der Ergebnisse, Auswertung und Diskussion. Die quantitative RT-PCR und die bioinformatischen Methoden wurden durch Mitautoren durchgeführt, ausgewertet und diskutiert.

### Publikation 3:

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2006) 38:23–29,

Titel:

Calcium-dependent self-association of the C-type lectin domain of Versican

Autoren:

Andreas Ney, Patrick Booms, Guido Epple, Matthias Mörgelin, Gao Guo, Gerhard Kettelgerdes, Reinhard Geßner, Peter N. Robinson

### Eigener Anteil:

Herstellung der rekombinanten Konstruktes rCLD (fragmentarisches Versikan) und des Zellklons, Reinigung des rekombinanten Polypeptids, Western Blot und Detektion mittels spezifischer Antikörper, Blot-Overlay-Assay und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, Auswertung und Diskussion. Die elektronenmikroskopische Analyse der rCLD Monomere, -Dimere und -Multimere wurde von einem Mitautor durchgeführt, ausgewertet und diskutiert.

Finanzierung:

Die Drittmittel für die Projekte wurden vom Arbeitsgruppenleiter,  
Herrn Dr. med. P. N. Robinson, eingeworben.

Datum, Unterschrift

Datum, Unterschrift

20. 09. 2006, Mundlos

20. 09. 2006, Andreas Ney

Betreuer des Promotionsvorhabens

Antragsteller

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht

Andreas Ney

## **Danksagung**

Für Rat und Tat bei konzeptionellen und formalen Fragestellungen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Mundlos, Dr. Peter Robinson, Dr. Patrick Booms, Dr. Gao Guo, Dr. Matthias Mörgelin, Dr. Reinhard Gessner, Dr. Guido Epple, Gerhard Kettelgerdes, Dr. Hartmut Peters und bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Genetik der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Für die Teilfinanzierung des Projekts bin ich der Canadian Marfan Association, der Temerty Family Foundation, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ro-2005/3) und der Charité - Universitätsmedizin Berlin zu Dank verpflichtet.