

**Rekombinante Herstellung und
Charakterisierung des E3-Fragments sowie
seiner einzelnen Module LG4 und LG5 aus
der Laminin-1 α 1-Kette**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Freien Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie**

**von
Zeynep Andaç
aus Mons (Belgien)**

1999

1. Referent: Dr. Robert Timpl

2. Referent: Prof. Dr. Werner Reutter,

3. Referent: Prof. Dr. Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2000

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Mutter und meiner lieben Schwester

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1995 bis Juli 1999 in der Abteilung Proteinchemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Dr. Timpl durchgeführt.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Timpl für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas, für sein fortwährendes Interesse an sämtlichen Stadien des Projekts und für seine wertvollen und konstruktiven Ratschläge.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Reutter danken, der meine Arbeit von der Fakultät für Chemie, Biologie und Pharmazie an der Freien Universität Berlin betreut hat und mir stets zur Seite stand.

Auch Herrn Prof. Dr. Erdmann danke ich für die problemlose Übernahme dieser Arbeit als zweiter Gutachter.

Danken möchte ich auch ganz besonders herzlich Frau van Delden, die mich vom ersten Tag an unter ihre Obhut genommen und nicht nur in fachlichen Dingen immer perfekt beraten hat. Ich hatte das Glück mit ihr ein Labor zu teilen und auf diese Weise die Möglichkeit von ihrem außergewöhnlichen Wissen zu profitieren.

Frau Sasaki danke ich für die wertvollen Diskussionen, ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit, die ganz wesentlich zu einem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Perfektionierung der molekularbiologischen Methoden sei Herrn Dr. Kohfeldt und für die Herstellung der Northern Blots Herrn Dr. Giltay herzlich gedankt.

Weiterhin möchte ich Herrn Professor Dr. Deutzmann von der Universität Regensburg für die Überlassung der cDNA vom E3-Fragment danken, ohne die diese Arbeit gar nicht zustande gekommen wäre.

Bei den Wissenschaftlern Frau Dr. Sorokin von der Universität Erlangen bedanke ich mich für die zur Verfügungstellung der monoklonalen Antikörpern, Herrn Dr. Brancaccio von der Universität Cattolica del Sacro Cuore, Rom, für das schwer zu isolierende α -Dystroglycan.

Den Herren Dr. Göhring, Boicu und Ries danke ich für ihre Hilfe in technischen Angelegenheiten.

Herrn Dr. Mann danke ich für die Ansequenzierung der Proteine, Herrn Straßhofer für die Hydrolysen und Frau Wiedemann für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Kirchisner möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Überwindung bürokratischer Hürden danken und Frau Wesse für die Hilfe, die weit über ihre Aufgaben als Sekretärin hinaus ging.

Für die nette Betreuung in der Zellkultur danke ich besonders Frau Wendt und Frau Reiter für die humorvolle Zusammenarbeit bei den zahlreichen Bindungsassays.

Für die Hilfsbereitschaft und den zahlreichen konstruktiven Diskussionen möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Kaltenhauser, Dr. Mayer, Herrn Friedrich, Herrn Hopf, Dr. Talts und Dr. Falkenstein bedanken.

Herrn Sajadpour und seiner Familie (DICO GmbH) danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin allen, die mich unterstützt haben und in obiger Aufzählung fehlen.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. Knäblein bedanken, der mich während der letzten Jahre immer sehr unterstützt hat.

Vor allem aber sei meiner Mutter und meiner Schwester ein herzlicher Dank ausgesprochen. Auch möchte ich nicht meinen Großvater Ömer Gürel, Großmutter Musavver Gürel, Tante Gülsün Gürel und Onkel Hakan Gürel vergessen. Sie ermöglichten unter nicht gerade leichten Bedingungen überhaupt erst meinen bisherigen Weg und standen mir stets hilfreich zur Seite.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Die Extrazelluläre Matrix	1
1.2	Aufbau, Struktur und Funktion der Basalmembran	1
1.3	Die Familie von Lamininen	5
1.4	Laminin-1	8
1.4.1	Funktionelle Charakterisierung der einzelnen Domänen in Laminin-1	10
1.4.1.1	Interaktionen des Laminin-1 mit Matrixproteinen	11
1.4.1.2	Interaktionen des Laminin-1 mit Zellen	12
1.4.2	LG-Module	13
1.4.2.1	Interaktionen der α 1LG-Module	14
1.5	Aufgabenstellung	17

2 Material und Methoden

2.1	Material	20
2.1.1	Plasmide	20
2.1.2	Bakterienstämme	20
2.1.3	Zelllinien	20
2.1.4	Enzyme	21
2.1.5	Synthetisierte Oligonukleotide	21
2.1.6	Verwendete Kits	21
2.1.7	Gewebeextrakte, Proteine und Antikörper	22
2.1.8	Chemikalien	22
2.1.9	Radiochemikalien	22
2.1.10	Lösungen und Puffer	23
2.1.11	Nährmedien	25
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	Anzucht von Bakterien	26
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	26

2.2.1.2	Messung der optischen Dichte	27
2.2.1.3	Aufbewahrung von Bakterien	27
2.2.2	DNA-Isolierung	27
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Kit	27
2.2.2.2	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	27
2.2.3	DNA-Techniken	27
2.2.3.1	Reinigung und Konzentrierung von DNA	27
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung der DNA	28
2.2.3.3	DNA-Restriktion	28
2.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.4	Klonierung	29
2.2.4.1	Dephosphorylierung geschnittener DNA	29
2.2.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.2.4.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	29
2.4.4.4	Transformation durch "Hitzeschock"	30
2.2.5	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	30
2.2.6	Präparative Reinigung von RNA	30
2.2.6.1	Präparation von RNA aus Zellen	30
2.2.6.2	Nachweis von mRNA durch Northern-Blotting	30
2.2.7	Sequenzierung von DNA	31
2.2.8	PCR-Techniken	32
2.2.8.1	Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR	32
2.2.8.2	Mutagenese-PCR	33
2.3	Zellkulturmethoden	35
2.3.1	Transfektion von Zellen	36
2.3.2	Sammeln konditionierten Mediums	37
2.3.3	Passagieren von Zellen	37
2.3.4	Aufbewahrung von Zellen	37
2.3.5	Auftauen von Zellen	37
2.4	Proteinchemische Methoden	38
2.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38

2.4.2	Heparinaffinitätschromatographie	38
2.4.3	FPLC-Gelfiltrationschromatographie	39
2.4.4	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Säule	40
2.4.5	Umkehrphasen-Chromatographie	40
2.4.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	40
2.4.6.1	Präzipitation von Protein(en) mit TCA	40
2.4.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
2.4.8	N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau)	41
2.4.9	Proteolytische Degradation	
	41	
2.4.10	Chemische Seitenkettenmodifikationen	41
2.4.11	Erstellung von CD-Spektren	42
2.4.12	Elektronenmikroskopie nach Kegelbedampfung	
	42	
2.4.13	¹²⁵ I-Markierung	42
2.4.14	Herstellung von polyklonalem Antiserum gegen α 1LG4	42
2.5	Immunologische Methoden	43
2.5.1	Immuno-Blotting (Western-Blotting)	43
2.5.2	Radioimmunotest	43
2.5.3	ELISA-Titration	43
2.5.4	Proteinbindungstest (Solid Phase Assay)	44

3 Ergebnisse

3.1	Bestimmung der Modulgrenzen sowie rekombinante Herstellung	
		45
3.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren	45
3.1.2	Nachweis der rekombinanten Proteinexpression	
	48	
3.1.2.1	Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4-5(k)	49
3.1.2.2	Fragmente α 1LG4, α 1LG4(k), α 1LG5 und α 1LG5(l)	50
3.1.2.3	Northernblot-Analyse der transfizierten Zellen	52

3.1.2.4	Zusammenfassung der rekombinanten Produktion	52
3.2	Reinigung und proteinchemische Charakterisierung der Proteine	53
3.2.1	Fragment α 1LG4-5	54
3.2.2	Fragment- α 1LG4	56
3.2.3	Fragment- α 1LG5	58
3.2.4	N-terminale Sequenz der rekombinanten Fragmente	59
3.3	Immunchemische Analysen der rekombinanten Fragmente	59
3.3.1	Charakterisierung mit polyklonalen Antiseren	59
3.3.2	Charakterisierung mit radioimmunologischen Analysen	60
3.3.3	Charakterisierung mit monoklonalen Antikörpern	62
3.4	Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Proteine	63
3.4.1	Bindung an Heparin	64
3.4.2	Bindung an Sulfatide	65
3.4.3	Bindung an α -Dystroglycan	66
3.5	Eingrenzung des Heparin-Bindungsepitops auf dem α 1LG4-Fragment	67
3.5.1	Chemische Modifikationen von Aminosäureseitenketten	67
3.5.2	Limitierte Proteolyse	69
3.6	Punktmutationen im α 1LG4-Fragment	72
3.6.1	Klonierung und Reinigung der α 1LG4-Mutanten	72
3.6.2	Immunchemische Analysen der α 1LG4-Mutanten	74
3.6.2.1	Charakterisierung der Mutanten mit einem Antiserum gegen α 1LG4	74
3.6.2.2	Charakterisierung der Mutanten mit monoklonalen Antikörpern	74
3.6.3	Funktionelle Charakterisierung der α 1LG4-Mutanten	75
3.6.3.1	Bindung an Heparin	76
3.6.3.2	Bindung an Sulfatide	78
3.6.3.3	Bindung an α -Dystroglycan	79

3.6.3.4	Charakterisierung der Mutanten mit monoklonalen Antikörpern	80
4	Diskussion	82
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	98
7	Verzeichnis der Abkürzungen	108
8	Abstract	111

CURRICULUM VITAE

Name : **Zeynep Zehra Andaç**
Geburtsdatum/-ort : 03.04.1965 in Mons, Belgien
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch
Wohnort : Schweinfurter Weg 59, Frankfurt

Schulbildung :
1971-73 Sair Nedim Grundschule, Istanbul
1974-76 Johannes-Tews-Grundschule, Berlin
1977-78 Werner-Von-Siemens-Oberschule, Berlin

1978-80 Deutsche Schule Istanbul, Istanbul
1981-83 Werner-Von-Siemens-Oberschule, Berlin
Abschluß: Abitur

Studium und Fortbildungen :
1984 Studium der Chemie und externes Medizinstudium
1985 Studium der Biochemie und externes
Medizinstudium
1990 Vordiplom: Biochemie
1992 Mitarbeit an einem Spezial-Projekt: *in vitro*
Mutagenese des menschlichen pADPRT-Promotors
Qualifikation zur „Beauftragten für den
1992 Strahlenschutz,,
1992-94 Tutorin des „Praktikum der Radiochemie für
Biochemiker,,
1994-95 Tutorin des „Praktikum der Biochemie für
Mediziner,,
1995 Abschluß: Dipl. Biochemikerin
Titel der Diplomarbeit : Bindungsstudien mit Prostaglandin E2 an isolierten
Hühnerosteoklasten und Verdrängungstest mit
Prostacyclin
1995 Fortbildungsveranstaltung für „Projektleiter und
Beauftragte für die biologische Sicherheit“ am Max-
Planck-Institut für Biochemie Martinsried bei
München
seit Juli 1995 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried
Titel der Doktorarbeit : Rekombinante Herstellung und Charakterisierung
des E3-Fragments sowie seiner einzelnen Module
LG4 und LG5 aus der Laminin-1 α 1-Kette

Praktische Tätigkeiten :
Externes Medizin-Studium
Krankenpflegerin (PJ v.P.)
Dolmetscherin bei Veranstaltungen des Bundestags
Account-Managerin bei der Berliner Volksbank
Sekretärin