

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Extrazelluläre Matrix**

Alle mehrzelligen Organismen sind in Zellverbänden - den Geweben - organisiert, die sich zu größeren Funktionseinheiten, den Organen verbinden. In den Geweben stehen die Zellen in engem Kontakt mit einem komplexen Maschenwerk extrazellulärer Makromoleküle, das man als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet. Diese ist für die mechanische Stabilität von Geweben, aber auch die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen verantwortlich und dient als Substrat für spezifische Zelladhäsion und -migration (Adams und Watt, 1993). Zu der heterogenen Population von Proteinen der extrazellulären Matrix zählen zahlreiche Proteoglycane, die bis jetzt identifizierten neunzehn verschiedenen Typen von Kollagen (Van der Rest und Garrone, 1991; Brown und Timpl, 1995), elf Laminin-Isoformen (Timpl und Brown, 1996), Nidogene, Elastin, Fibronectin und eine große Anzahl weiterer Komponenten. Sie bilden zusammen in der ECM eine große supramolekulare Organisation beruhend auf multiplen molekularen Interaktionen. Es sind diese Strukturen, die die vielfältigen biologischen Funktionen der ECM bedingen.

## **1.2 Aufbau, Struktur und Funktion der Basalmembran**

Eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix sind die 20-200 nm dicken Basalmembranen, die unter allen epithelialen und endothelialen Zellen lokalisiert sind und diese vom darunterliegenden Bindegewebe trennen. Weiterhin sind Muskel-, Fett- und Schwannsche-Zellen von ihnen umgeben und werden dadurch ebenfalls vom umliegenden Bindegewebe getrennt. Die Basalmembran ist für die Funktion und Stabilität von Geweben von großer Bedeutung. Dies äußert sich an ihrem Einfluß auf die Zelladhäsion und -migration sowie die Proliferation und Differenzierung von Zellen (Timpl und Dziadek, 1986; Adams und Watt, 1993). Sie ist auch ein hochselektiver Filter für Makromoleküle in den Nierenglomeruli und Lungenbläschen. Diese vielfältigen Funktionen, von denen hier nur einige beispielhaft erwähnt sind, weisen auf die zentrale Bedeutung, die die Basalmembranen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen einnehmen, hin.

Im Elektronenmikroskop ist die Basalmembran meist aus drei morphologisch unterscheidbaren Schichten aufgebaut. Diese bestehen aus einer elektronendurchlässigen *Lamina lucida (Lamina rara)*, die unmittelbar an der zellulären Plasmamembran anliegt. Darunter befindet sich die elektronendichte *Lamina densa*, zu deren Hauptbestandteilen Laminin, Kollagen IV, Nidogen und das Proteoglycan Perlecan gehören (Timpl, 1989; Yurchenco und Schittny, 1990; Paulsson, 1992). Sie ist über Verankerungsfibrillen und Verankerungsplaques der *Lamina fibroreticulares* von dem darunterliegenden Bindegewebe abgegrenzt. Diese Verankerungsfibrillen sind aus Kollagen VII aufgebaut (Van der Rest und Garrone, 1991).

Die Komponenten der Basalmembran werden hauptsächlich von den Zellen synthetisiert, die auf ihr ruhen. In gewissen Fällen ist jedoch auch eine Kooperation zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen zur Ausbildung einer intakten Basalmembran notwendig (Dziadek, 1995). Am Aufbau der Basalmembran ist eine Vielzahl extrazellulärer Proteine beteiligt. Nach deren Translation und co- bzw. posttranslationalen Modifikation werden sie aus den Zellen ausgeschleust und über verschiedene Mechanismen zu stabilen supramolekularen Strukturen polymerisiert. Die Zusammensetzung der Basalmembran ist häufig gewebespezifisch, wobei sie auch in unterschiedlichen Bereichen ein und derselben Membran verschieden sein kann (Sanes *et al.*, 1990; Miner *et al.*, 1997). Hauptbestandteile aller Basalmembranen sind Kollagen IV und Laminin, die in zahlreichen Isoformen auftreten (Timpl und Brown, 1996; Sasaki und Timpl, 1999). Beide bilden voneinander unabhängige, hochmolekulare Netzwerke aus, die sich in ihrer Morphologie und den molekularen Interaktionen unterscheiden (Yurchenco, 1994). Die kovalente Vernetzung des Kollagen IV sorgt als Grundgerüst der Basalmembran für deren mechanische Stabilität und Flexibilität. Eine eher dynamische Struktur hingegen stellt das Laminin-1 Netzwerk dar, das hauptsächlich durch nicht-kovalente Bindungen stabilisiert wird. Die voneinander unabhängig polymerisierten Netzwerke des Kollagen IV und Laminin-1 werden über Nidogen-1 miteinander verknüpft und dadurch gegenseitig stabilisiert. Die Inhibition dieser Interaktionen in embryonalen Organkulturen durch Antikörper führt zu einer fehlerhaften Basalmembransynthese (Ekblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997). Nidogen-1 besteht aus einer sulfatierten und glykosylierten Polypeptidkette von 150 kDa.

Diese Kette bildet drei globuläre Domänen, die durch zwei stäbchenförmige Elemente miteinander verbunden sind (Mayer und Timpl, 1994). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Basalmembran ist das Proteoglycan Perlecan. Es besteht aus einer 480 kDa Polypeptidkette mit modularer Struktur und ist in der N-terminalen Domäne I mit drei Heparansulfat- oder Chondroitinsulfat-Seitenketten substituiert (Timpl, 1993). Studien zur Interaktion mit anderen Proteinen haben gezeigt, daß Perlecan über seine Heparansulfat-Seitenketten an Laminin-1 und Kollagen IV bindet und somit ebenfalls zu einer Stabilisierung der Basalmembran beiträgt (Battaglia *et al.*, 1992; Sasaki *et al.*, 1998). Ein weiteres Heparansulfat-Proteoglycan (Tsen *et al.*, 1995), das vergleichbare Domänenstrukturen mit Perlecan aufweist, ist das Agrin. Es ist ein ubiquitärer Bestandteil der Basalmembran, der meistens im zentralen Nervensystem, Retina, Spinalstrang und Muskeln vorkommt.

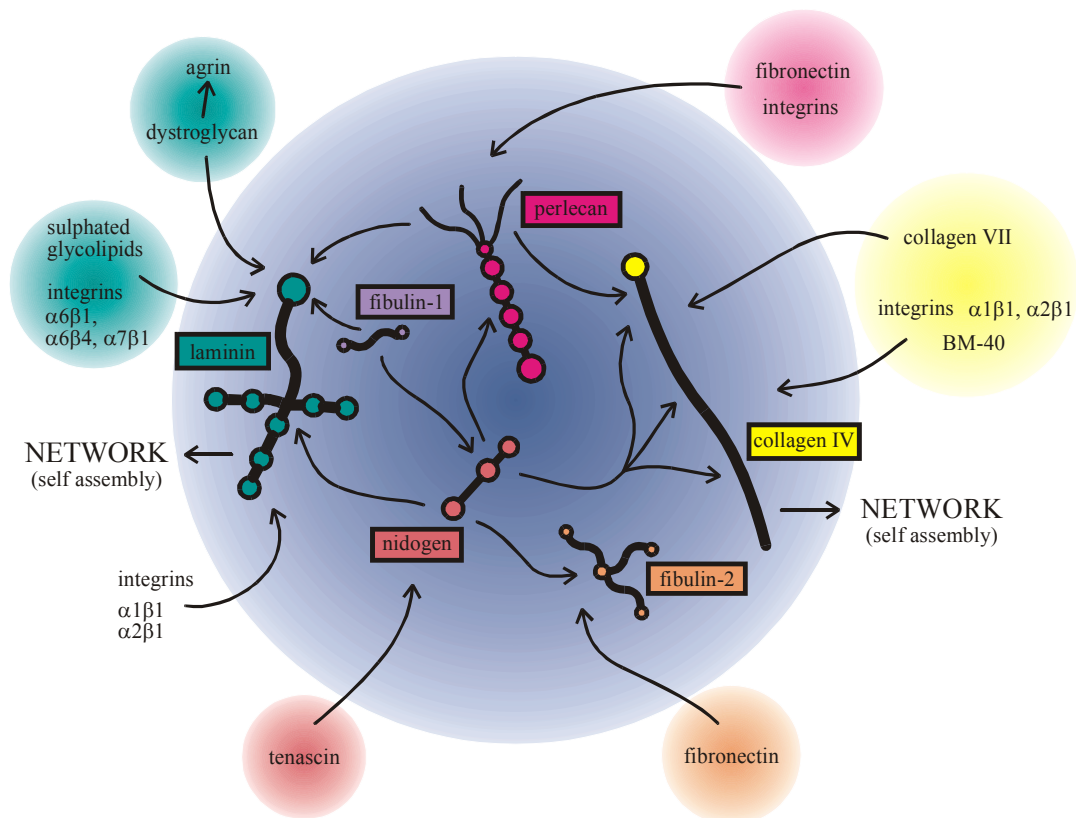
Zu den Komponenten der Basalmembran gehört auch die Familie der Fibuline, von der bisher zwei Mitglieder bekannt (Fibulin-1, Fibulin-2) sind, die sich durch EGF-ähnliche Motive und eine Konsensus-Sequenz für  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung auszeichnen. Eine Calcium-bindende Eigenschaft besitzt auch das BM-40 (SPARC, Osteonektin). Es interagiert mit Kollagen IV (Nischt *et al.*, 1991) und ist hauptsächlich im Knochengewebe lokalisiert, wobei seine genaue Funktion noch nicht geklärt ist.

Zusätzlich sind *in vivo* weitere Proteine in die Basalmembran integriert, die über spezifische Bindung eine Vielzahl anderer Komponenten in dieses komplexe Netzwerk eingreifen lassen. Deren exakte Anzahl ist noch nicht endgültig bestimmt.

Einige Proteine der Basalmembran stellen zelladhäsive Komponenten dar und spielen somit eine entscheidende Rolle in der Verknüpfung zwischen Basalmembran und Zelle. In diese Funktion sind vor allem Zellrezeptoren der Integrinfamilie involviert. Diese Heterodimere sind aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut, für die bislang mehr als zwanzig verschiedene Kombinationsmöglichkeiten bekannt sind (Hynes, 1992). Integrine sind Rezeptoren, die als transmembranes Element der Basalmembran das intrazelluläre Cytoskelett mit extrazellulären Matrixproteinen verbinden. Integrin-vermittelte Zellbindung hat einen starken Einfluß auf die Zellen. Dies führt zu einer Kontrolle der Genexpression, Zellpolarisation, Zellmigration oder auch zur Apoptose.

Vor kurzem erst wurde ein weiteres Protein, das  $\alpha$ -Dystroglycan als ein Nicht-Integrin-Rezeptor identifiziert, das hauptsächlich in Leber, Lunge, Herz, Placenta und im Skelettmuskel vorkommt. Es ist eine Komponente des Dystrophin-Dystroglycan-Komplexes, der eine Verankerung zwischen Cytoskelett und extrazellulärer Matrix, vorwiegend Laminin-1 (siehe hierzu auch Abschnitt 1.4.2), Laminin-2 und Agrin darstellt (Henry und Campbell, 1996).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen molekularen Interaktionen, die für die supramolekulare Assemblierung der Basalmembran notwendig sind. Die wichtigsten Komponenten sind in ihrer elektronenmikroskopischen Erscheinungsform dargestellt.



**Abb. 1: Modelldarstellung spezifischer Wechselwirkungen verschiedener Basalmembranproteine, die für den Aufbau und die Funktionalität der Basalmembran entscheidend sind (Timpl und Brown, 1996).**

### 1.3 Die Familie von Lamininen

Laminine gehören zur Gruppe der Glycoproteine und stellen eine der Hauptkomponenten der Basalmembran aller Gewebe dar. Sie sind Heterotrimere bestehend aus den Polypeptidketten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , die zwar Homologien aufweisen, aber alle von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Bisher sind fünf  $\alpha$ - drei  $\beta$ - und zwei  $\gamma$ -Ketten beschrieben, die sich zu elf unterschiedlichen Laminin-Isoformen assemblieren können (Timpl, 1996). Zusätzlich sind für die  $\alpha$ 3-Kette zwei Spleißvarianten ( $\alpha$ 3A,  $\alpha$ 3B) bekannt (Galliano *et al.*, 1995). Die Benennung der einzelnen Laminine erfolgt heute nach der 1994 eingeführten Nomenklatur (Burgeson *et al.*, 1994).

Typische Strukturmodule in den N-terminalen Regionen aller Ketten stellen LE-Module (EGF-ähnliche Module mit acht Cysteinen) dar. Sie werden von globulären Modulen unterbrochen, die aus ca. 250 Aminosäureresten bestehen. Diese beinhalten LN-, L4-Module und einige nicht klassifizierbare Domänen. Eigenständige Module oder Modulgruppen werden auch als Domänen I-VI und G-Domäne bezeichnet. Die carboxyterminalen Regionen verfügen über eine *coiled-coil* Domäne (mit ca. 80 Heptadsequenzen). Diese Heptadsequenzen sind für die Oligomerisierung der drei unterschiedlichen Ketten verantwortlich, wobei sie eine stäbchenförmige Struktur von ca 70 nm Länge ausbilden (Beck *et al.*, 1990). Alle Laminin  $\alpha$ -Ketten besitzen am C-terminalen Ende fünf globuläre LG-Module. Zusätzlich enthalten die  $\beta$ -Ketten ein kurzes Cystein-reiches Insert ( $\alpha$ ), das sich in der Mitte der *coiled-coil* Region befindet und die Domänen I und II voneinander trennt (Abb. 2) (Timpl und Brown, 1994, Timpl und Brown, 1996; Timpl, 1996; Sasaki und Timpl, 1999). Basierend auf diesen modulären Strukturen und der Oligomerisierung bilden die meisten Laminine kreuzförmige Strukturen aus, die aus drei kurzen und einem langen Arm bestehen (Abb. 3). Bei einigen speziellen Isoformen, die die  $\alpha$ 3- oder  $\alpha$ 5-Kette enthalten, ist die Struktur der kurzen Arme variabel. Diese Strukturmodelle wurden durch elektronenmikroskopische Analysen bestätigt.

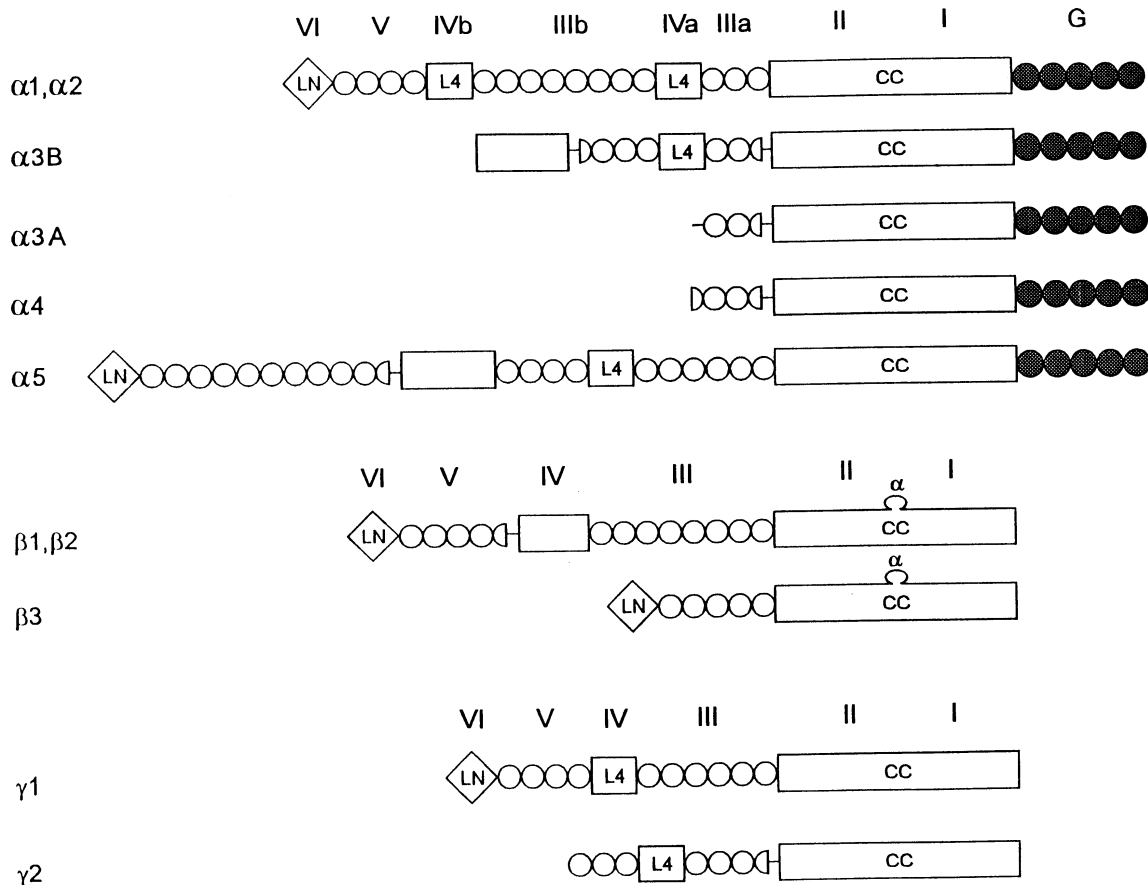


Abb. 2: Modulstruktur der  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Ketten von Lamininen (nach Sasaki und Timpl, 1999). Die römischen Ziffern bezeichnen die einzelnen unterschiedlichen Domänen. *Coiled-coil* Domäne (CC), LE-Module (offene Kreise; halbe Kreise sind unvollständige Module), LG-Module (ausgefüllte Kreise), LN- (Diamanten) und L4- (kleine Rechtecke) Module und noch nicht klassifizierte Module (große Rechtecke). Spleißvarianten der  $\alpha 3$ -Kette werden mit A und B bezeichnet. G und die Zahlen I-VI bezeichnen elektronenmikroskopisch unterscheidbare Domänen der Lamininketten.

Die meisten Laminine sind aus  $\beta 1\gamma 1$ - oder  $\beta 2\gamma 2$ -Ketten mit einer der fünf  $\alpha$ -Ketten kombiniert aufgebaut. In den N-terminalen Regionen unterscheiden sie sich beträchtlich in ihrer Größe und Modulstruktur, ohne ihre grundlegende kreuzförmige Gestalt zu verändern. Das kleinste Laminin (Laminin-5) ist in seiner Kettenkombination einmalig ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ). Nach der Synthese der Laminin-Ketten kommt es zuerst zur intrazellulären Bildung von  $\gamma\beta$ -Dimeren. Die endgültige Assoziation mit einer  $\alpha$ -Kette ist dann die Voraussetzung für die Sekretion von Lamininen in den extrazellulären Raum. Sobald Laminin-5 in den extrazellulären Raum gelangt, wird zusätzlich durch Disulfidbrücken eine Verbindung zu Laminin-6 oder Laminin-7 hergestellt, welche die Verankerungsfilamente im Schichten-Epithel formen (Champlaud *et al.*, 1996).

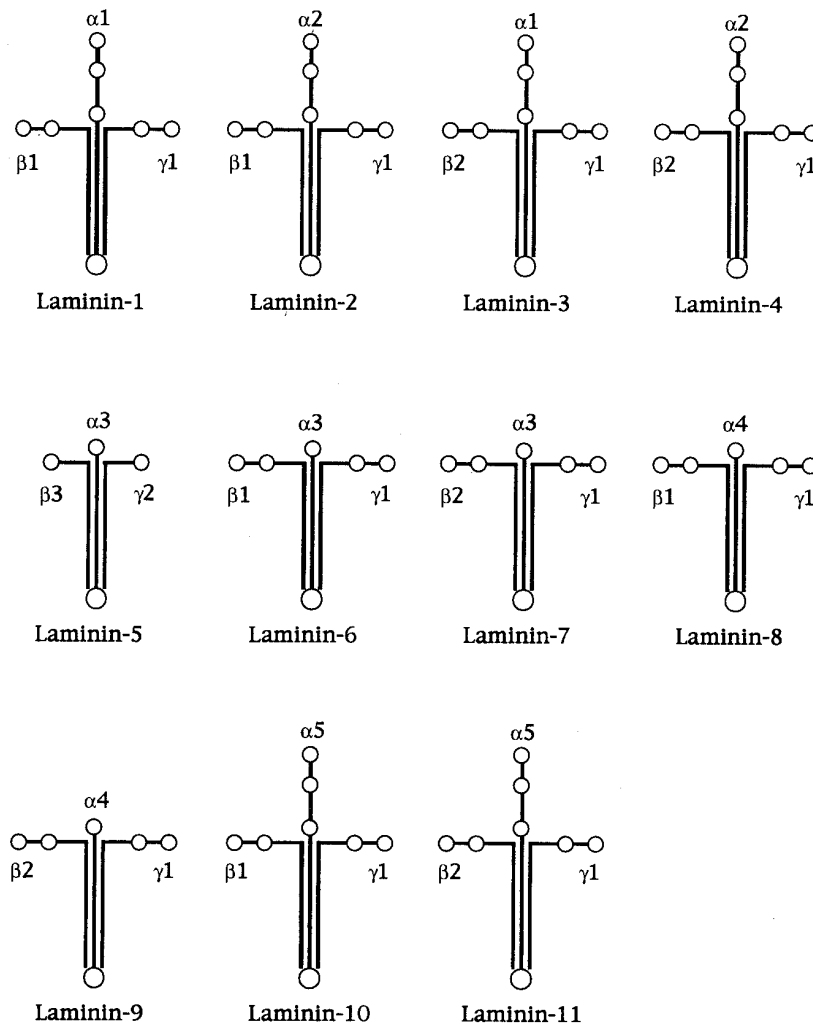


Abb. 3: Schematische Struktur und Kettenkomposition der verschiedenen Laminin-Isoformen. Die globulären Module werden durch Kreise symbolisiert (Verändert nach Timpl und Brown, 1996).

Laminine werden in den Basalmembranen verschiedener Gewebe in früheren Stadien der embryonalen Entwicklung und später in einer großen Anzahl gewebespezifischer Isoformen exprimiert (Engvall, 1993; Ryan *et al.*, 1996). In allen bedeutenden Basalmembranen wird mindestens eine Lamininisoform exprimiert. So wird Laminin-1 ( $\alpha1\beta1\gamma1$ ) meistens in Epithelium und Endothelium, Laminin-2 ( $\alpha2\beta1\gamma1$ ) in Muskeln und in peripheren Nerven, Laminin-3 ( $\alpha1\beta2\gamma1$ ) in der Synapse und Glomerulus, Laminin-4 ( $\alpha2\beta2\gamma1$ ) in Muskel-Sehnenverbindungen und Trophoblasten exprimiert. Laminin-5 ( $\alpha3\beta3\gamma2$ ) findet man in Basalmembranen von spezialisierten Epithelzellen (sekretorischer oder schützender Funktion), wie z.B. in der Haut und Mukosa-membranen und ist im Amnion als auch in der Haut kovalent mit Laminin-6 ( $\alpha3\beta1\gamma1$ ) und Laminin-7 ( $\alpha3\beta2\gamma1$ ) gebunden (Champlaud *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1996).

Über die Expression von Laminin-8 ( $\alpha4\beta1\gamma1$ ), Laminin-9 ( $\alpha4\beta2\gamma1$ ) Laminin-10 ( $\alpha5\beta1\gamma1$ ) und Laminin-11 ( $\alpha5\beta2\gamma1$ ) sind noch keine genaueren Daten vorhanden. Die mRNAs der  $\alpha4$ -

und  $\alpha 5$ -Ketten werden in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe (Lunge, Herz, Muskeln, Gefäße, peripherale Nerven) exprimiert (Iivanainen *et al.*, 1995; Miner *et al.*, 1995). Laminin-8 und Laminin-10 sind besonders in verschiedenen Endothelzellen aufzufinden.

Laminine zeigen ein großes, komplexes Repertoire an funktionellen und biologischen Aktivitäten. Dabei finden Interaktionen sowohl mit dem gleichen Laminin-Typus (Netzwerkbildung) als auch mit anderen Isoformen (Filamentenbildung) und extrazellulären Liganden (supramolekulare Assemblierung) sowie zelluläre Interaktionen durch Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren statt. Alle Interaktionen zusammen haben einen starken Einfluß auf den Phänotyp der Zelle, wie z.B. Zellwachstum, Migration, Geweberegeneration, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion (Ryan *et al.*, 1996; Sasaki und Timpl, 1999).

#### 1.4 Laminin-1

Das als erstes aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumor der Maus isolierte Laminin-1 ist die am besten charakterisierte Isoform (Timpl *et al.*, 1983) und gilt als Prototyp aller Laminine. Die meisten biochemischen und funktionellen Studienergebnisse basieren auf Untersuchungen dieses Proteins (Abb. 4).

Mit einem Molekulargewicht von 850 kDa besteht es aus den drei Polypeptidketten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ , die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die Assoziation der drei Ketten im nativen Molekül führt zu einer spezifischen  $\alpha$ -helikalen Struktur (*coiled-coil* Struktur), die nur als Heterotrimer eine stabile Konfiguration besitzt (Engel *et al.*, 1991).

Im Elektronenmikroskop erscheint Laminin-1 als kreuzförmiges Molekül mit drei kurzen (Domänen III bis VI) und einem langen Arm (Domänen I und II). Die N-terminalen drei kurzen, morphologisch ähnlichen Arme (je 34 nm bzw. 48 nm lang) weisen mehrere globuläre Strukturen auf, die durch LE-Module voneinander getrennt, in zentraler und endständiger Position angeordnet sind. Der lange Arm (77 nm) wird durch die carboxyterminalen Regionen der drei Ketten gebildet und besitzt die Struktur eines Stabes (Engel *et al.*, 1981; Maurer und Engel, 1996).



An seinem C-terminalen Ende befindet sich eine aus dem Heterotrimer herausragende Struktur mit globulären Elementen, den G-Modulen. Diese werden ausschließlich von der  $\alpha 1$ -Kette gebildet und werden in fünf einzelne LG-Module (LG1-LG5), die tandemartig angeordnet sind, eingeteilt (Sasaki *et al.*, 1988), auf die im Folgenden noch näher eingegangen werden soll.

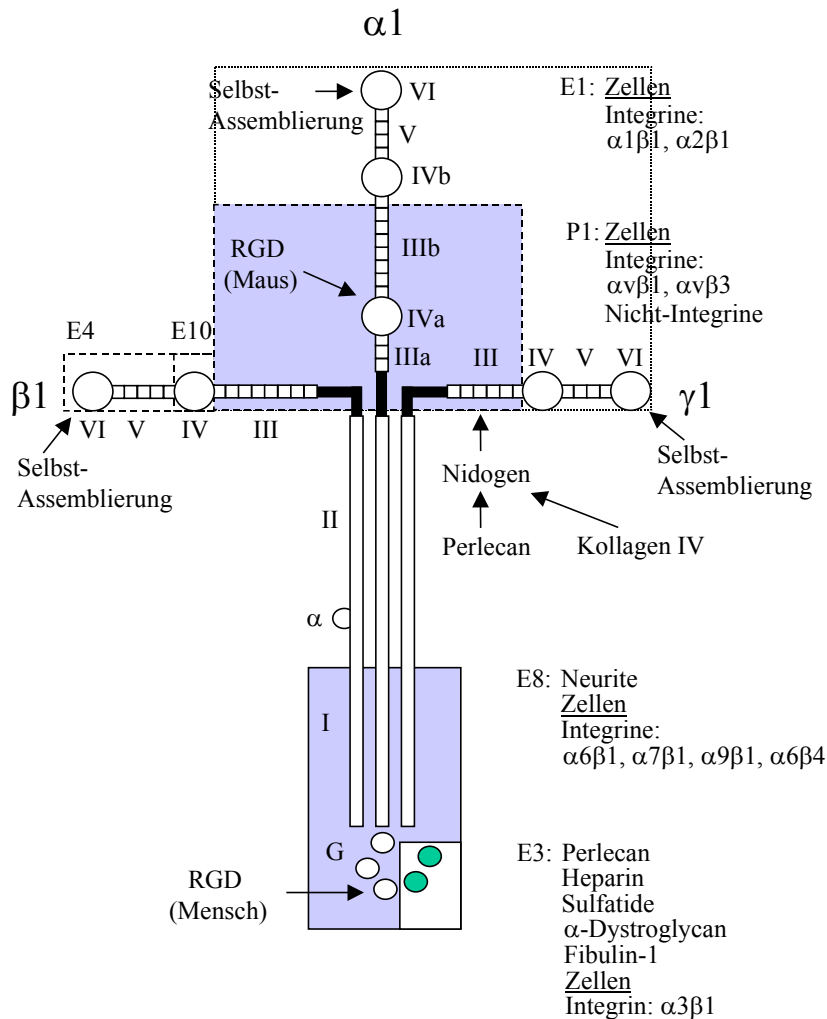


Abb. 4: Domänenstruktur, proteolytische Fragmente und Bindungseigenschaften des Laminin-1. Es enthält verschiedene Strukturelemente, wie die EGF ähnlichen LE-Module (Rechtecke), unterschiedliche globuläre Bereiche (Kreise) und  $\alpha$ -helikale Domänen (offene Balken). Die Domänen sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet (Sasaki *et al.*, 1988) und die Fragmente, die durch Spaltung mit Elastase (E) und Pepsin (P) entstehen, durch gestrichelte Linien (Beck *et al.*, 1990). Liganden, Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren sind hinter den Fragmenten aufgelistet, an die sie binden. Die C-terminalen Enden der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind, befinden sich unten (*coiled-coil* Struktur). Bindungen, die über Nidogen vermittelt werden, sind mit Pfeilen symbolisiert. Außerdem gekennzeichnet sind die Positionen von RGD-Sequenzen, die bei Mensch und Maus unterschiedlich sind (Verändert nach Timpl, 1996).

Die drei Polypeptidketten des Laminin-1 liegen als cDNA kloniert vor (Sasaki *et al.*, 1988). Aus der Sequenzanalyse kombiniert mit Elektronenmikroskopie wurde klar, daß alle drei Ketten sechs strukturelle Domänen I-VI besitzen. Zusätzliche globuläre und stäbchenartige Domänen (IIIa und IVa) sind in dem kurzen Arm der  $\alpha$ 1-Kette enthalten. Die aminoterminalen Domänen VI jeder Kette sind sowohl untereinander als auch zu den Domänen VI anderer Isoformen homolog. Sie sind für die Selbstassemblierung zu Netzwerken verantwortlich.

Das Glycoprotein Laminin-1 enthält einen Kohlenhydratanteil von 15-25 %. Den Hauptanteil stellen N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide dar (Arumugham *et al.*, 1986, Fujiwara *et al.*, 1988; Beck *et al.*, 1990). Die strukturelle Charakterisierung zeigt eine große Anzahl an komplexen Oligosacchariden mit zwei bis vier Antennen, von denen einige noch zusätzliche Lactosaminanteile aufweisen. Der Anteil an O-glykosidischen Oligosacchariden scheint hingegen nur sehr gering zu sein, kann aber die Glycosaminoglycan-bindungen an Domäne IV der  $\beta$ 1-Kette enthalten, was bedeuten würde, daß Laminine auch als Proteoglycane wirken können (Sasaki und Timpl, 1999).

Laminin-1 wird schon in frühen Zellteilungsstadien embryonaler Zellen exprimiert (Adams und Watt, 1993). Es ist wahrscheinlich das erste Laminin, das in den Mausembryonen noch vor dem Blastocystenstadium produziert wird (Dziadek und Timpl, 1985), und ist anschließend in unterschiedlichen Epithelien während der Organogenese vorhanden (Klein *et al.*, 1990).

#### **1.4.1 Funktionelle Charakterisierung der einzelnen Domänen in Laminin-1**

Die Spaltung von Laminin-1 durch Endoproteinasen in Fragmente trug sowohl zu einer genaueren Aufklärung der Tertiärstruktur als auch zur detaillierten Untersuchung der Funktion bei. Die proteolytischen Spaltprodukte erlauben eine nähere Untersuchung funktioneller Einheiten des Laminin-1 und die Zuordnung biologischer Aktivitäten zu den einzelnen Fragmenten. Wichtige Fragmente von Laminin-1 sind E1', E3, E4, E8 und E10, welche Hauptprodukte des Abbaus durch Elastase darstellen, sowie das durch Pepsin-Abbau hergestellte Fragment P1. Untersuchungen dieser Fragmente des Laminin-1 haben schon bald die spezifische Interaktion dinstinkter Laminin-Domänen sowohl mit Matrixkomponenten als auch mit Zellen gezeigt (Abb. 4).

#### 1.4.1.1 Interaktionen des Laminin-1 mit Matrixproteinen

Laminin-1 zeigt eine Temperatur- und Calcium-abhängige Selbstassoziation. Die dafür erforderlichen LN-Module sind auf den Fragmenten E4 und E1' lokalisiert. Genauere Untersuchungen verifizierten, daß diese aminoterminalen LN-Module (Domänen VI) in allen drei Ketten benötigt werden, so wie es in einem kooperativen Dreiarml-Interaktionsmodell beschrieben wird (Yurchenco und Cheng, 1993). Die Fähigkeit, ein quasi-hexagonales Netzwerk auszubilden, wurde auch für Laminin-2 und Laminin-4 beschrieben. Diese Isoformen können auch mit Laminin-1 copolymerisieren (Cheng *et al.*, 1997).

Die Isolierung von Laminin-1 aus dem EHS-Tumor unter nicht-denaturierenden Bedingungen zeigte das Vorliegen eines Komplexes mit Nidogen im Verhältnis 1:1 (Paulsson *et al.*, 1987). Kinetische Analyse dieser Interaktion durch Plasmonresonanzverfahren konnte eine starke Bindung ( $K_d=0.7$  nM) bestätigen. Die Bindungsstelle von Laminin-1 an Nidogen wurde auf das vierte LE-Modul in Domäne III der  $\gamma$ 1-Kette (im P1-Fragment) eingegrenzt (Mayer *et al.*, 1993; Pöschl *et al.*, 1994) und die Struktur konnte mit Hilfe von Punktmutationen und Röntgenkristallographie gelöst werden (Pöschl *et al.*, 1996; Stetefeld *et al.*, 1996). Nidogen erscheint bereits im 16-Zellstadium der Maus zusammen mit der assemblierten Laminin  $\alpha$ 1-Kette im extrazellulären Raum (Cooper und MacQueen, 1983; Dziadek und Timpl, 1995). Die Interaktion zwischen Nidogen und Laminin-1 ist in der Embryonalentwicklung ein wichtiger Prozeß und essentiell für die Organogenese von Niere und Lunge (Ekblom *et al.*, 1994). Nidogen bindet ebenfalls über einen separaten Bereich an den tripelhelikalen Bereich des Kollagen IV und fungiert somit als ein Bindeglied zwischen den beiden von Kollagen Typ IV und Laminin-1 aufgebauten Netzwerken (Timpl, 1996). Die Fähigkeit des Nidogens, ternäre Komplexe entweder mit Laminin-1 und Perlecan oder mit Laminin-1 und Kollagen Typ IV auszubilden, wird als einer der wichtigsten Prozesse in der Matrixbildung angesehen (Aumailley *et al.*, 1993). Laminin-1 besitzt für weitere Proteinliganden aus der extrazellulären Matrix Bindungsstellen, auf die im Abschnitt 1.4.2 näher eingegangen wird.

### 1.4.1.2 Interaktionen des Laminin-1 mit Zellen

Laminin-1 induziert unterschiedliche zelluläre Reaktionen wie Adhäsion, Migration, Polarisation, Differenzierung und Proliferation. Zellbindungen an Laminin-1 werden über eine Vielzahl von Zellrezeptoren vermittelt, die Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren beinhaltet.

#### **Integrin-Rezeptoren**

Bis jetzt wurde für neun Integrine eine Bindung an Laminin-1 gezeigt, wobei die meisten von ihnen zur Familie der  $\beta$ 1-Integrine gehören, die an unterschiedliche Regionen innerhalb des Moleküls binden. Das E1'-Fragment enthält die Bindungsdomänen für die Integrine  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, die zu den klassischen Kollagen-Rezeptoren zählen. Die kryptische RGD-Sequenz in der Maus Laminin  $\alpha$ 1-Kette, die sich in der Mitte des Kreuzes (P1-Fragment) befindet, ist für die Bindung der Integrine  $\alpha$ v $\beta$ 1 und  $\alpha$ v $\beta$ 3 verantwortlich. Weitere Bindungsstellen sind auf dem E8- und E3-Fragment lokalisiert (Aumailley *et al.*, 1996) (siehe hierzu auch Abschnitt 1.4.2).

#### **Nicht-Integrin-Rezeptoren**

Zu den Nicht-Integrin-Rezeptoren zählen ein 67 kDa Rezeptor, der zur Familie der galactosidbindenden Lectine gehört (Castronovo, 1993; Mecham und Hinek, 1996), Galactosyltransferase, 5'Nucleotidase, Galactosidase, einige mikrobielle Oberflächenproteine und Galectine (Mecham und Hinek, 1996). Den zuletzt aufgezählten wird eine Mediatorfunktion bei der Bindung von Lactosaminstrukturen an sowohl Laminine als auch Zelloberflächen zugeschrieben (Sato und Hughes, 1992; Mecham und Hinek, 1996). Auch einer großen Anzahl synthetisch hergestellter Laminin-Peptide wurden zellbindende Funktionen zugeschrieben. Fast alle diese Interaktionen ereignen sich in der Nähe der Kreuzregion des Laminins, wobei in vielen Fällen deren Bindungsepitope noch nicht identifiziert sind (Mecham und Hinek, 1996). Zu den Nicht-Integrin-Rezeptoren gehört auch das  $\alpha$ -Dystroglycan, das in Abschnitt 1.4.2 näher erläutert wird.

### 1.4.2 LG-Module

Die verschiedenen Domänen des Laminin-1 stellen häufig strukturell und funktionell unabhängige Einheiten im Protein dar und werden auch als Module bezeichnet. Eine Domäne kann aus mehreren Modulen bestehen, wobei diese von eingeschobenen Sequenzen voneinander getrennt sein können. Module bestehen aus durchgehenden Sequenzen, die konservierte Bereiche bzw. Konsensus-Sequenzen enthalten (Bork *et al.*, 1996). Eine spezielle Form stellen die LG-Module am carboxyterminalen Ende aller Laminin  $\alpha$ -Ketten dar. Sie sind auch in anderen Proteinen wie Perlecan (Noonan *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1997), Agrin (Patthy und Nikolics, 1993; Gesemann *et al.*, 1998), Neurexin-Rezeptoren (Ushkaryov *et al.*, 1992) und in verschiedenen Hormon-bindenden und regulatorischen Proteinen (Patthy, 1992; Joseph und Baker, 1992) vorhanden, was vermuten läßt, daß sie wichtige aber auch unterschiedliche Funktionen haben. Bislang wurden mehr als 60 verschiedene LG-Module identifiziert und charakterisiert (Bork *et al.*, 1996).

Ein LG-Modul ist aus ca. 180-190 Aminosäureresten aufgebaut (Beck *et al.*, 1990). In jeder Laminin-Isoform konnte man fünf solcher tandemartig angeordnete LG-Module (LG1-LG5) identifizieren, die als eine große globuläre Domäne am distalen Ende des langen Arms erscheinen.

Erstmals wurden durch proteolytischen Abbau mit Elastase unter anderem die LG-Module aus Laminin-1 als E8-Fragment mit den Modulen LG1-LG3 und als E3-Fragment mit den Modulen LG4-LG5 isoliert (Ott *et al.*, 1982; Paulsson *et al.*, 1987; Deutzman *et al.*, 1988). Die rekombinante Herstellung der gesamten LG-Module (LG1-LG5) von der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Kette als auch von Perlecan und Agrin leisteten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des modularen Aufbaus. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und die rekombinante Herstellung einzelner LG-Module aus Laminin-2 (Talts *et al.*, 1998) bestätigen, daß LG-Module autonome Faltungseinheiten repräsentieren. Die Untersuchung solcher LG-Module wird dadurch erschwert, daß Sequenzidentitäten innerhalb dieser Module sehr gering sind (20-40%). Die Grenzen zwischen den einzelnen Modulen und somit auch die Anzahl der Cysteine in den LG-Modulen sind noch nicht klar definiert.

Da zwei  $\alpha$ -Ketten nicht exakt dieselbe Anzahl von Cysteinen in der G-Domäne enthalten, ist es wahrscheinlich, daß sie unterschiedliche intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden und somit eine unterschiedliche Faltung aufweisen (Richards *et al.*, 1996).

Aufgrund von zwei konservierten Heptapeptid-Sequenzen kann man den LG -Modulen des Laminin zwei bis vier Cysteine und eine bis zwei N-glykosylierte Stellen zuordnen (Patty, 1992) (Abb. 5).

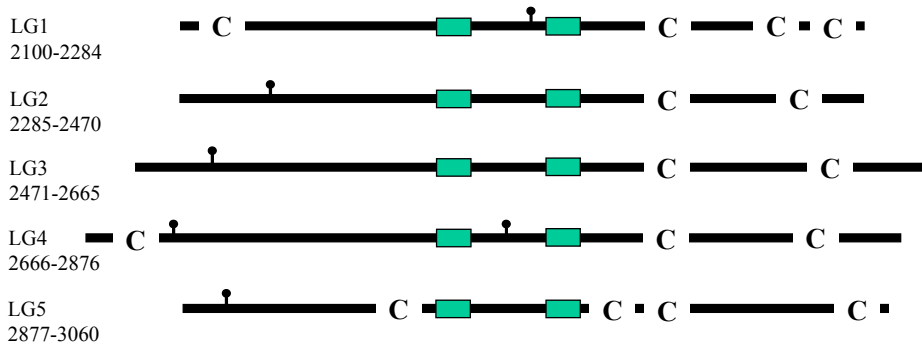


Abb. 5: Schematische Gegenüberstellung der Sequenzen der LG-Module von der Laminin  $\alpha$ 1-Kette. C repräsentiert Cystein, Rechtecke konservierte Regionen und  $\bullet$  Glykosylierungen. Die postulierten Modulgrenzen sind durch Sequenzpositionen (Sasaki *et al.*, 1988) identifiziert.

Anhand von CD-Spektren konnte man den letzten beiden LG-Modulen (E3-Fragment) der Laminin 1-Kette einen hohen Anteil an  $\beta$ -Struktur zuweisen (Ott *et al.*, 1982).

#### 1.4.2.1 Interaktionen der $\alpha$ 1LG-Module

Die Laminin  $\alpha$ 1-Kette ist durch die am Carboxylende gelegenen funktionellen LG-Module (G1-G5) in der Embryogenese, Organogenese und im adulten Organismus in Wechselwirkungen mit Zellen und Matrixkomponenten involviert.

#### Integrine

An das E8-Fragment können viele Zellen unter Verwendung der  $\alpha$ 6 $\beta$ 1,  $\alpha$ 7 $\beta$ 1,  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 oder  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 Integrin-Rezeptoren binden. Die Bindung erfolgt vermutlich über die ersten drei LG-Module, die aber die Kooperation mit der Domäne I benötigen (Aumailley *et al.*, 1996). Die meisten Zellen binden über das  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 Integrin mit Laminin-1.

Diese Interaktion induziert Nierentubulogenese und ist in der Embryonalentwicklung für das Entstehen des ersten Epithels von Bedeutung (Sorokin *et al.*, 1990, Ekblom, 1996). Für das E3-Fragment hingegen wurde bisher ausschließlich die Wechselwirkung mit  $\alpha 3\beta 1$  Integrin beschrieben, der jedoch nur eine geringe Bedeutung beigemessen wird (Sorokin *et al.*, 1992). Eine der ersten biologischen Funktionen, die für Laminin-1 gezeigt wurden, war seine Rolle im Wachstum von Neuriten. Laminin-1 stimuliert das schnelle Wachstum der Neuriten von Nervenzellen, die aus PNS isoliert wurden. Später wurde gezeigt, daß es außerdem das Neuritenwachstum von kultivierten CNS-Neuronen stimuliert (Edgar *et al.*, 1996), was wahrscheinlich für die neuronalen Entwicklungs- und Regenerationsprozesse von Bedeutung ist und im Einklang mit der Expression einiger Laminin-Isoformen im zentralen und peripheren Nervensystem steht. Das Neuritenwachstum wird durch die konformationellen Epitope des Laminin-1 E8-Fragments gesteuert, erfordert aber komplexere Prozesse als nur die Integrin-Bindung (Edgar *et al.*, 1996).

### **Fibulin-1**

Laminin-1 besitzt eine Calcium-abhängige Bindungsaffinität für Fibulin-1, das zur Organisation der extrazellulären Matrix insbesondere der Basalmembran beiträgt. Die Bindungsstelle auf Laminin-1 konnte auf dem E3-Fragment lokalisiert werden (Pan *et al.*, 1993).

### **Glycosaminoglycane/Proteoglycane und Glycolipide**

Laminin-1 zeigt spezifische Bindungsaktivitäten zu einigen sulfatierten Glycolipiden und Polysacchariden, zu denen Heparin/Heparansulfat zählen.

Interaktionen von Laminin mit dem Proteoglycan-Perlecan werden durch die Bindung der Heparansulfat-Ketten des Perlecans an das E3-Fragment vermittelt (Battaglia *et al.*, 1992).

Diese Bindung kann durch Zugabe von Heparin und Heparansulfat und mit einer niedrigen Effizienz auch durch Chondroitinsulfat unterbunden werden. Die Stärke der Bindung entspricht der des gesamten Proteins, was darauf hindeutet, daß es sich um die wichtigste Bindungsstelle handelt.

Heparin ist eine stark modifizierte Form des Heparansulfats und wird meistens in Form eines aus 20-80 Monosacchariden bestehenden Fragments isoliert (Lander, 1994).

Die Bindungsstelle von Laminin-1 an Heparin konnte dem E3-Fragment zugeordnet werden (Ott *et al.*, 1982; Yurchenco *et al.*, 1993). Dies konnte durch ein weiteres Experiment bestätigt werden: Gegen das E3-Fragment gerichtete monoklonale Antikörper zeigen die Inhibition der Heparin- bzw. der Proteoglycan-Bindung von Laminin-1 (Sorokin *et al.*, 1992).

Glycosaminoglycane, die meistens an Proteine gebunden als Proteoglycane vorliegen, stellen ubiquitäre Bestandteile der Basalmembran dar und befinden sich auch häufig auf Zelloberflächen (Sung *et al.*, 1997; David und Bernfield, 1998). Da sie hydrophile Polyanionen sind, ist es nicht verwunderlich, daß alle Experimente darauf hinweisen, daß den kationischen Aminosäuren (Lysin, Arginin) eine essentielle Rolle bei der Bindung zukommt. Tatsächlich haben die meisten Interaktionen einen elektrostatischen Charakter (Olson *et al.*, 1991; Lander, 1994). Anfängliche Untersuchungen zeigten, daß bestimmte kurze polybasische Motive charakteristisch für die Glycosaminoglycan (GAG)-Bindung sind. GAG-Bindungsstellen können auch durch sequenziell weit voneinander entfernt liegende Aminosäuren gebildet werden (Lander *et al.*, 1994).

Obwohl die Funktionen von Heparansulfat-Proteoglycanen nur partiell verstanden wird, weiß man, daß sie bei der Aufrechterhaltung der Feinstruktur der Basalmembran und bei Anhaftung und Regulation des Zellverhaltens in der Zellentwicklung eine wichtige Funktion einnehmen (Sung *et al.*, 1997).

Glycolipide, die Sulfatester enthalten, sind typische Bestandteile der Zellmembran, die einen wichtigen Stellenwert bei Zell-Matrix-Interaktionen einnehmen (Roberts *et al.*, 1985). Dies konnte durch die starke Bindung der Sulfatide (galactosylceramide-I<sup>3</sup>-sulfate) an Laminin-1 bestätigt werden. Weiterführende Bindungsanalysen spezifizierten die Bindungsstelle auf dem E3-Fragment (Taraboletti *et al.*, 1990; Mecham und Hinek, 1996). Die Stärke der Bindung wird von der Länge der Galactosylsulfatide bestimmt. Die Präsenz eines zusätzlichen Zuckers zwischen Galactose-3-sulfat und Ceramide kann die Bindung um einen Faktor fünf bis zehn herabsetzen. Hingegen zeigt Laminin keine Bindung an neutrale Glycolipide oder Ganglioside, sondern bevorzugt Glycolipide mit Sulfatestern an endständigen nicht reduzierten Aminosäureresten (Mecham und Hinek, 1996).



Fucoidin und Heparin inhibieren die Laminin-Sulfatid-Bindung, was darauf hindeutet, daß die Heparin- und die Sulfatid- Bindungsstelle wahrscheinlich äquivalent sind, obwohl die Sulfatid-Bindung eine intakte dreidimensionale Struktur benötigt, die für die Heparin-Bindung nicht von Relevanz ist (Taraboletti *et al.*, 1990).

### **Dystroglycan**

Laminin-1 erwies sich als ein distinkter Bindungspartner von  $\alpha$ -Dystroglycan (Ervasti und Campbell, 1993). Bindungsstudien mit  $\alpha$ -Dystroglycan zeigten, daß für diese spezifische und hochaffine Bindung das E3-Fragment verantwortlich ist (Gee *et al.*, 1993; Brancaccio *et al.*, 1995). Diese Interaktion ist Calcium-abhängig und kann durch niedrige Heparin-Konzentrationen inhibiert werden. Die Vermutung liegt nahe, daß die Bindungsstelle des Laminin-1 für  $\alpha$ -Dystroglycan auf der Dystroglycan-Mucin-Domäne liegt und O-gebundene Oligosaccharide dabei eine wichtige Rolle spielen (Chiba *et al.*, 1997). Eliminierung des Dystroglycan-Gens durch homologe Rekombination führt bei Mäusen bereits im frühen Embryonalstadium zum Tod. Untersuchungen zeigten eine abnorme Entwicklung der Reicherts Membran (Williamson *et al.*, 1997), wo Perlecan und die Laminin  $\alpha$ 1-Kette stark expremiert sind (Talts, unveröffentlicht). Das unterstreicht die Möglichkeit, daß die Bindung von  $\alpha$ -Dystroglycan an Fragment E3 eine wichtige biologische Bedeutung hat.

### **1.5 Aufgabenstellung**

Das aus dem EHS-Tumor isolierte Laminin-1 enthält fünf tandemartig angeordnete LG-Module, die ausschließlich am C-terminalen Ende der  $\alpha$ 1-Kette lokalisiert sind. Durch proteolytischen Abbau mit Elastase konnte man erstmals die Module LG1-LG3 als E8-Fragment und die Module LG4-LG5 als E3-Fragment isolieren. Solche LG-Module treten auch in anderen Multidomänenproteinen auf und stellen somit eine weit verbreitete Struktur dar, denen unterschiedliche wichtige biologische Funktionen zugeschrieben werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des E3-Fragments und seiner einzelnen Module LG4 und LG5 der Laminin  $\alpha$ 1-Kette.

Aufgrund dieser Zielsetzung ergaben sich für die Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

1. Da die Grenzen sowohl des E3-Fragments als auch seiner einzelnen Module bislang unterschiedlich diskutiert wurden, war es unumgänglich, zunächst die strukturellen bzw. funktionellen Modulgrenzen festzusetzen. Dies sollte durch die rekombinante Herstellung verschiedener, den unterschiedlichen Vorschlägen entsprechender Module durchgeführt werden.
2. Die Isolierung des proteolytischen E3-Fragments aus dem EHS-Tumor erfolgt zwar unter schonenden Bedingungen, eine irreversible Zerstörung gewisser funktioneller Epitope kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Reinigung von rekombinant exprimierten Proteinen erfolgt unter wesentlich schonenderen Bedingungen, wodurch deren native Struktur bewahrt bleibt. Durch die rekombinante Herstellung des  $\alpha$ 1LG4-5-Fragments, das dem proteolytischen E3-Fragment entspricht, und seiner einzelnen Module  $\alpha$ 1LG4 und  $\alpha$ 1LG5 mit den korrekten Modulgrenzen sollte Material bereitgestellt werden, das die Durchführung von umfangreicheren und weiterführenden Analysen, als es bisher möglich war, erlaubt.
3. Die strukturellen und konformationellen Untersuchungen der rekombinanten Proteine sollten deren korrekte globuläre Faltung unterstützen. Diese Untersuchungen sollten die Vorhersagen und die früheren Ergebnisse der strukturellen Analysen bestätigen und vervollständigen.
4. Die Charakterisierung des  $\alpha$ 1LG4-5-Fragments und seiner  $\alpha$ 1LG4- und  $\alpha$ 1LG5-Module in Bindungsanalysen mit Heparin, Sulfatiden,  $\alpha$ -Dystroglycan und monoklonalen Antikörpern sollte die funktionelle Bedeutung der einzelnen Modulanteile im E3-Fragment aufklären. Im Mittelpunkt stand hierbei die genauere Untersuchung der Heparin-Bindungsstelle, deren Kartierung ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war. Durch chemische Modifikationen der Aminosäuren, die wahrscheinlich bei der Bindung an Heparin beteiligt sind, und anschließende limitierte Proteolyse sollte die mögliche Heparin-Bindungsstelle partiell eingengt werden.

5. Die aufgrund der erhaltenen Daten durchgeführten gezielten Punktmutationen und somit die rekombinante Expression verschiedener Mutanten sollte ferner genügend Material liefern, um diese bezüglich ihrer Bindung an Heparin zu charakterisieren.

6. Der Vergleich der Heparin-Bindung der Mutanten mit Bindungen an Sulfatide,  $\alpha$ -Dystroglycan und monoklonale Antikörper, die gegen das E3-Fragment gerichtet sind, sollte Aufschluß darüber geben, inwieweit Übereinstimmungen zwischen diesen unterschiedlichen Bindungsepitopen bestehen.