

3 Ergebnisse

Das proteolytische E3-Fragment am C-terminalen Ende der Laminin-1 α 1-Kette repräsentiert die beiden tandemartig angeordneten α 1LG4- und α 1LG5-Module. Zur näheren Lokalisierung der Bindungsstellen vom E3 wurden sowohl das gesamte Fragment als auch die einzelnen Module strukturell bzw. funktionell vergleichend untersucht.

3.1 Bestimmung der Modulgrenzen sowie rekombinante Herstellung des E3-Fragments (α 1LG4-5) und seiner einzelnen Module α 1LG4 und α 1LG5 der Laminin-1 α 1-Kette

3.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Um einzelne LG-Module, wie sie sowohl in den verschiedenen Laminin-Isoformen als auch in anderen Matrixproteinen vorkommen, auf rekombinante Art herzustellen und damit Struktur-/Funktionsanalysen durchzuführen, müssen zuvor die Grenzen autonomer Faltungseinheiten genau definiert werden. Eine distinkte Variabilität innerhalb der Modulgrößen sowie ihre geringe Sequenzidentität (20-40 %) erschweren sowohl den Vergleich zwischen den einzelnen LG-Modulen einer Laminin α -Kette als auch den innerhalb der verschiedenen Isoformen. Da für die α 1LG4- und α 1LG5-Module des E3-Fragments in der bisherigen Literatur uneinheitliche Voraussagen der Grenzen angegeben wurden (Deutzmann *et al.*, 1988; Richards *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1997), war es unerlässlich, diese zunächst exakt auf experimenteller Grundlage zu bestimmen. Um diese Fragestellung und insbesondere die Zuordnung der Cysteine zu den einzelnen Modulen zu beantworten, wurden für das E3-Fragment sowie für seine Module α 1LG4 und α 1LG5 je zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt. Damit sollte geprüft werden, welche Größe ein einzelnes α 1LG-Modul besitzt, was sich durch eine korrekte Faltung der rekombinanten Fragmente feststellen läßt. Auf der Basis von zwei kurzen Sequenzbereichen und zwei Cysteinen, die nahe am C-terminalen Ende in allen fünf α 1LG-Modulen relativ konserviert vorliegen, wurde ein Sequenzvergleich der Module vorgenommen und mögliche Modulgrenzen darauf basierend festgelegt (Patthy, 1992).

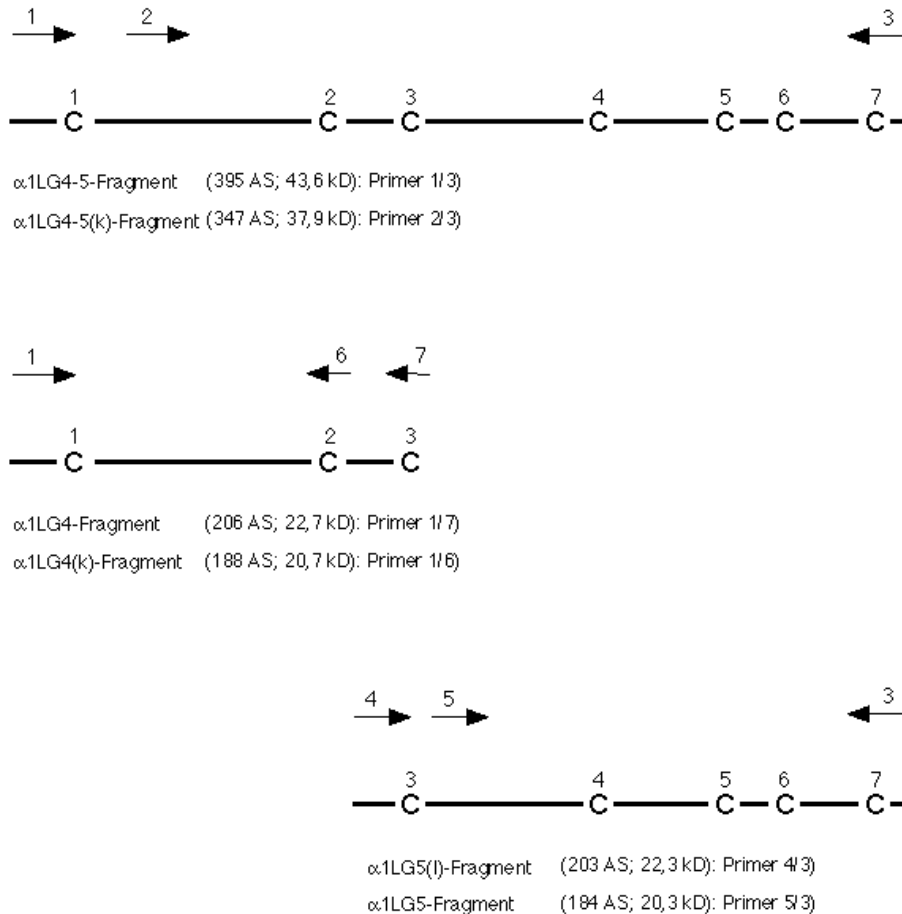


Abb. 7: Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte zur Festlegung der Modulgrenzen für die rekombinanten Fragmente α 1LG4-5, α 1LG4 und α 1LG5. Die verschiedenen Konstrukte wurden mit Hilfe der PCR-Techniken hergestellt. Die Pfeile stellen die unterschiedlichen Primer und die entsprechenden Richtungen dar. Alle Cysteine (C) sind zur besseren Übersicht durchnummeriert.

Abbildung 7 zeigt die Konstrukte, die hergestellt wurden, um die potentiellen Modulgrenzen für die rekombinanten Fragmente α 1LG4-5, α 1LG4 und α 1LG5 zu ermitteln. Die dabei benutzte Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die in dieser Arbeit gewählte Begrenzung des α 1LG4-5-Fragments, wobei die Position 1 der Aminosäure 2666 in der α 1-Kette des Laminin-1 entspricht (Sasaki *et al.*, 1988). Bei der Herstellung der cDNA für α 1LG4-5 wurden die Primer (1/3) so gewählt, daß sie die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 1-395 umfaßt und damit sieben Cysteine enthält. Dieser Bereich entspricht exakt dem proteolytischen Fragment E3 von Laminin-1 α 1-Kette (Ott *et al.*, 1982). Die cDNA für die kleinere Variante α 1LG4-5(k) dagegen wurde mit dem Primerpaar 2/3 hergestellt.

Dieses besteht aus 347 Aminosäuren, ist N-terminal um 48 Aminosäuren kleiner und besitzt einer früheren Annahme entsprechend (Richards *et al.*, 1996) nur sechs Cysteine. Das N-terminale Fragment α 1LG4 wurde über das Primerpaar 1/7 konstruiert. Es erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 1-206 und enthält die ersten drei Cysteine. Dem alternativen N-terminalen Konstrukt α 1LG4(k) (Primer 1/6) fehlt am C-terminalen Ende das dritte Cystein. Das α 1LG5(l)-Fragment umfaßt den C-terminalen Teil von α 1LG4-5. Dieses DNA-Konstrukt aus den Primern 4/3 führt zu einem Fragment, welches das dritte Cystein des α 1LG4-Fragments nahe dem N-terminus einschließt. Bei der zweiten Möglichkeit wurde der 5'-Primer (5) 31 Aminosäurereste hinter dem dritten Cystein eingesetzt und somit ein Fragment α 1LG5 produziert, das nur vier Cysteine enthält.

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der sechs Konstrukte war eine 1,8 kb lange partielle cDNA der α 1-Kette des Laminin-1 (EMBL, DDBJ Nr.X13459) zugänglich, die im Vektor pUC 830 vorlag und von Dr. R. Deutzmann zur Verfügung gestellt wurde. Die unterschiedlichen DNA-Fragmente, die für eine Klonierung in einen Expressionsvektor notwendig waren, wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den beschriebenen Kombinationen der homologen Primer 1 bis 7 hergestellt. Primer 3 enthält das authentische Laminin-Stop-Codon (TAA) der Laminin α 1-Kette am 3'-Ende, in Primer 6 und 7 mußten 3' zum kodierenden Bereich Stop-Codons eingeführt werden. Zusätzlich wurden durch die hierbei benutzten Primer auf der 5'-Seite eine Nhe I bzw. auf der 3'-Seite eine Not I Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine gerichtete Klonierung der Fragmente in die Expressionvektoren ermöglichten.

Bei einer nach der GA-Regel gewählten optimalen Hybridisierungstemperatur von 55 °C konnten alle Konstrukte spezifisch amplifiziert werden. Alle mit Hilfe der PCR hergestellten DNA-Fragmente (α 1LG4-5, α 1LG4-5(k), α 1LG4, α 1LG4(k), α 1LG5 und α 1LG5(l)) wurden nach der Restriktion mit den oben genannten Endonukleasen (Nhe I, Not I) präparativ aus einem Agarosegel gereinigt und an das 3'-Ende des BM-40-Signalpeptids in die eukaryontischen Expressionsvektoren pRC/CMV (Pöschl *et al.*, 1994) bzw. pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997) kloniert (Abb. 8). Der in diesen beiden Vektoren enthaltene starke Promotor des Cytomegalie-Virus kontrolliert die Transkription des transfizierten Gens und bewirkt eine Überexpression der cDNAs.

Zur Sekretion der rekombinanten Proteine in das Zellkulturmedium wurde das Signalpeptid des Basalmembranproteins BM-40 benutzt, dessen cDNA in beiden Vektoren nach dem Promotor 5'-seitig zum inklonierten Fragment vorliegt. Das Signalpeptid führt zum Ausschleusen des Proteins aus der Zelle und wird dabei spezifisch abgespalten. Die Verwendung dieser Strategie hat den großen Vorteil, daß das rekombinante Protein aus dem Medium leichter gereinigt werden kann, als dieses nach einem Zellaufschluß möglich wäre.

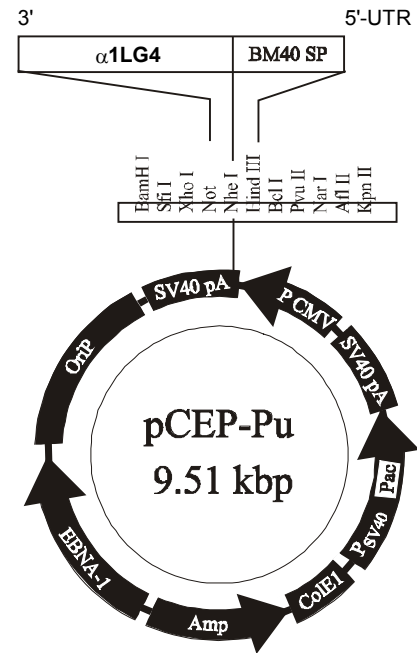


Abb. 8: Der epismale Expressionsvektor pCEP-Pu mit BM-40 Signalsequenz

Durch die proteolytische Abspaltung ergibt sich, daß vier nicht authentische Aminosäuren (APLA) in die N-Termini der rekombinanten Proteine eingeführt werden. Aufgrund ihrer Ladungsneutralität ist jedoch keine substantielle Veränderung der Proteineigenschaften zu erwarten.

Die beiden α 1LG4-5-Fragmente wurden in den Expressionsvektor pRC/CMV kloniert, der eine stabile Integration in das Genom erfordert. Die restlichen Klonierungen erfolgten in den epismalen Expressionsvektor pCEP-Pu. Die korrekten Sequenzen der Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung (Kettenabbruchmethode) bestimmt und zeigten keine Abweichung zur publizierten Sequenz (Deutzmann *et al.*, 1988).

3.1.2 Nachweis der rekombinanten Proteinexpression

Nach der Transfektion in 293 Zellen (humane Nierenembryonalzellen) integriert der Vektor pRC/CMV auf zufällige Weise in das zelluläre Genom. Werden die transfizierten Zellen nachfolgend klonal propagiert, ergibt sich ein Spektrum von Klonen, die das rekombinante Protein entweder stark, moderat oder gar nicht exprimieren. Bei den beiden α 1LG4-5 Konstrukten wurden deshalb je Konstrukt 40 Klone auf die Stärke ihrer Expression überprüft.

Im Gegensatz dazu ist bei Verwendung des episomalen Vektors pCEP-Pu dies nicht notwendig und die Möglichkeit gegeben, das rekombinante Protein aus dem Pool der transfizierten Zellen in ausreichender Menge zu erhalten, wobei die Transfektion in 293-EBNA Zellen erfolgt.

3.1.2.1 Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4-5(k)

Die stabile Transfektion der 293 Zellen wurde mit den beiden α 1LG4-5-Expressionsvektoren als Kotransfektion mit dem Plasmid pSV2pac im Verhältnis 20:1 durchgeführt. Beide Vektoren werden zufällig in das zelluläre Genom integriert. Das auf dem letztgenannten Plasmid enthaltene Pac-Gen verleiht den Zellen eine Resistenz gegen Puromycin, das zur Selektion der mit pCEP-Pu Konstrukten transfizierten Zellen dient. Der hohe Überschuß an Expressionsvektor führt dazu, daß einige puromycin-resistente Zellklone zusätzlich auch dieses Plasmid aufnehmen. Die Stärke der Proteinexpression hängt dabei vom jeweiligen Integrationsort ab. Die Expressionsstärke wurde durch Vergleich von konditioniertem Medium transfizierter und nicht transfizierter Zellen mittels SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Bei den transfizierten Zellen zeigte sich eine sehr gute Expression des rekombinanten α 1LG4-5-Fragments, wogegen bei der kleineren Variante α 1LG4-5(k) keine zusätzliche Proteinbande auftrat (Abb. 9A).

Für α 1LG4-5 berechnet sich nach seiner Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 43,6 kDa. Die Analyse dieses Fragments durch SDS-Gelelektrophorese nach Reduktion zeigte jedoch ein apparentes Molekulargewicht von 63 kDa. Das rekombinante α 1LG4-5-Fragment sowie das native Pendant (E3-Fragment) zeigten die gleiche Mobilität in der SDS-PAGE (hier nicht gezeigt). Zusätzlich wurden beide Fragmente unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit einem gegen das native E3-Fragment gerichteten Antiserum (Nr.992) in einem Immuno-Blot (Western-Blot) analysiert (Abb. 9B). Dabei zeigte sich, daß α 1LG4-5 in analoger Weise detektiert wird. Die kürzere Variante α 1LG4-5(k) konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

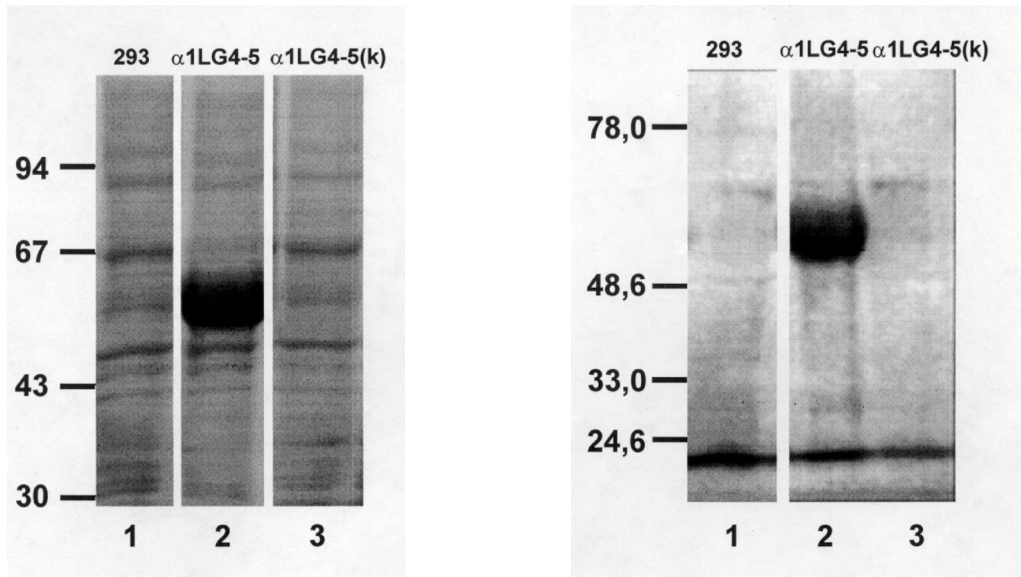


Abb. 9: A (links). Vergleich der in den Zellkulturüberständen der stabil transfizierten Zelllinien enthaltenen Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Gelelektrophorese (Coomassie-Färbung). Spur 1 zeigt die Proteine aus dem Zellüberstand nicht transfizierter parentaler 293 Zellen, Spur 2 und 3 die aus konditioniertem Zellüberstand präzipitierten Proteine der stabilen Zellklone. Die Zahlen am linken Rand markieren die Größen der Kalibrierungsproteine (in kDa). B (rechts). Westernblot-Analyse zum Nachweis der rekombinanten Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4-5(k). Spur 1 zeigt die Proteine aus dem Zellüberstand nicht transfizierter parentaler 293 Zellen, 2 und 3 die aus konditioniertem Zellüberstand präzipitierten Proteine der stabilen Zellklone, wobei in Spur 3 kein spezifisches Fragment detektiert werden konnte. Die Molekularmassen der Kalibrierungsproteine (kDa) sind auf der linken Seite angegeben. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen getrennt und mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gegen das native E3-Fragment (992) detektiert.

3.1.2.2 Fragmente α 1LG4, α 1LG4(k), α 1LG5 und α 1LG5(l)

293-EBNA Zellen wurden mit den episomalen Vektoren transfiziert, welche die cDNAs für die beiden N-terminalen (α 1LG4, α 1LG4(k)) bzw. C-terminalen Fragmente (α 1LG5, α 1LG5(l)) enthielten. Nach der Selektion zeigten die transfizierten Zellen (Abb. 10A) eine starke Expression des rekombinanten α 1LG4-Fragments mit einem apparenten Molekulargewicht von 36 kDa (berechneter Wert 22,7 kDa). Bei der alternativen Variante α 1LG4(k) konnte man im Vergleich zu den nicht transfizierten 293-EBNA Zellen keine zusätzliche Bande erkennen. Eine geringe Menge α 1LG4(k) konnte in der Western Blot-Analyse (Abb. 10B) mit dem Antiserum gegen das E3-Fragment (Nr.992) nachgewiesen werden, das ein Molekulargewicht von 30 kDa (berechneter Wert 20,7 kDa) aufweist.

Im Gegensatz hierzu war bei beiden Fragmenten α 1LG5 und α 1LG5(l) eine rekombinante Produktion durch eine zusätzliche Proteinbande zu beobachten, wobei die von α 1LG5 stärker ausgeprägt war. Beide Proteine bewegten sich im Vergleich zum theoretisch ermittelten Molekulargewicht mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität, entsprechend einem Molekulargewicht von 30 kDa anstatt 22,3 kDa für α 1LG5(l), bzw. 25 kDa anstatt 20,3 kDa für α 1LG5. Die Unterschiede zwischen dem apparenten und dem berechneten Molekulargewicht, die sich sowohl beim nativen E3-Fragment und den rekombinanten Proteinen zeigten, sind vermutlich auf co- und posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Zu diesen Modifikationen eines Proteins, die im Lumen des endoplasmatischen Reticulums bzw. später im Golgi-Apparat stattfinden, gehört unter anderem die Glycosylierung einzelner Aminosäurereste. Das Auftreten der rekombinanten Proteine in glycosylierter Form läßt einen Rückschluß auf eine korrekte Prozessierung zu. Dem nativen E3-Fragment wird hierbei ein hoher Anteil an N-glycosylierung zugeschrieben, die über komplexe Oligosaccharide erfolgt (Deutzmann *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 1988).

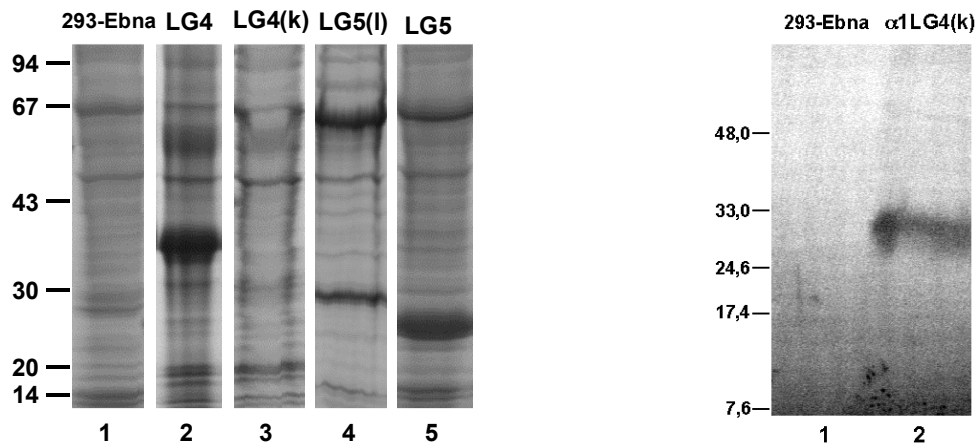


Abb. 10: A (links). Vergleich der in den Zellkulturüberständen der transfizierten Zelllinien enthaltenen Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Gelelektrophorese (Coomassie-Färbung). Spur 1 zeigt die Proteine aus dem Zellüberstand nicht transfizierter 293-EBNA Zellen, Spur 2 bis 5 die aus konditioniertem Zellüberstand präzipitierten Proteine (TCA-Fällung) der mit den entsprechenden Vektoren (obere Linie) transfizierten Zellen. Die Zahlen am linken Rand markieren die Größen der Kalibrierungsproteine (in kDa). B (rechts). Western-Blot-Analyse zum Nachweis des rekombinanten α 1LG4(k)-Fragments durch SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Als Negativkontrolle wurden die Proteine aus dem Zellüberstand nicht transfizierter 293-EBNA Zellen aufgetragen (1). 2 enthält die aus konditioniertem Zellüberstand präzipitierten Proteine. Die Detektion erfolgte mit dem spezifisch gegen das native E3-Fragment gerichteten Antikörper (992).

3.1.2.3 Northernblot-Analyse der transfizierten Zellen

Die Analyse aller transfizierten Zellklone erfolgte durch Northern-Blots der Total-RNA mit einem radioaktiv markierten PCR-Fragment als Sonde (analog der α 1LG4-5-DNA). Es bestätigte sich, daß alle transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Ausgangszelllinien Laminin-spezifische mRNAs der erwarteten Größe produzierten (Abb. 11). Für die α 1LG4-5 bzw. α 1LG4-5(k) transfizierten Zellen wurden mRNAs von ungefähr 1,7 kb detektiert, für die α 1LG4, α 1LG4(k), α 1LG5 und α 1LG5(l) transfizierten Zellen betrug die Größe ca. 1,4 kb. Die Kontrolle mit RNA parentaler 293 Zellen bzw. 293-EBNA Zellen zeigte keine Hybridisierung mit den Sonden und bestätigte die Spezifität der für die Klone erhaltenen Banden.

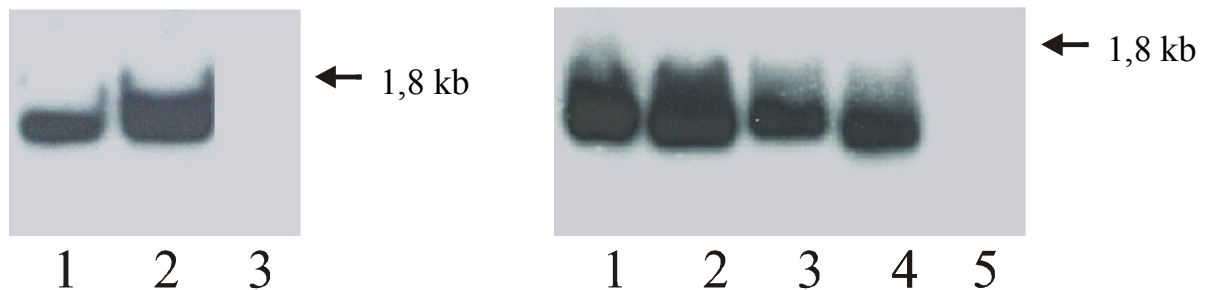


Abb. 11: Northern-Blot zum Nachweis der für die einzelnen Proteine kodierenden mRNAs. A (links) Spur 1 zeigt die Total-RNA von α 1LG4-5(k), Spur 2 α 1LG4-5. Spur 3 zeigt Total-RNA aus parentalen 293 Zellen (Negativkontrolle). B (rechts) Spur 1 zeigt Total-RNA von α 1LG4, Spur 2 α 1LG4(k), Spur 3 α 1LG5(l) und Spur 4 α 1LG5. Als Negativkontrolle wurde in Spur 5 Total-RNA aus parentalen 293-EBNA Zellen aufgetragen. Für die Analyse werden 10 μ g Total-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und für die Hybridisierung ein radioaktiv markiertes PCR-Fragment (analog der α 1LG4-5-DNA) eingesetzt.

3.1.2.4 Zusammenfassung der rekombinanten Produktion

Eine zusammenfassende Darstellung über die hergestellten Expressionskonstrukte und den mRNA- und Protein-Nachweis nach Transfektion findet sich in Tabelle 1. Die in diesem Kapitel 3.1. vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß das rekombinante α 1LG4-5-Fragment mit den sieben Cysteinen in zufriedenstellender Menge exprimiert und ins Medium ausgeschleust wurde. Wenn das erste Cystein wie in der kürzeren Variante (α 1LG4-5(k)-Fragment) fehlt, konnte eine Expression dieses Proteins weder durch die Analyse im SDS-Gel noch durch Immunfärbung nachgewiesen werden.

Die Northern-Blot-Analyse bestätigte jedoch, daß die Laminin-spezifische mRNA vorhanden war und schließt deshalb eine mangelnde Transfektion der Zellen als Ursache für die fehlende Proteinproduktion aus. Für das rekombinante α 1LG4-Fragment mit den drei N-terminalen Cysteinen zeigte sich ebenfalls eine starke Expression. Die alternative Variante (α 1LG4(k)) hingegen, bei der das dritte Cystein fehlt, wurde in so geringen Mengen exprimiert, daß diese nur mit Hilfe eines Western-Blots detektierbar war. Die rekombinanten Proteine α 1LG5 (vier Cysteine) und α 1LG5(l) (fünf Cysteine) wurden wie erwartet exprimiert, wobei größere Mengen von dem α 1LG5 erhalten wurden. Der Grund dafür, daß beide Proteine produziert wurden, liegt darin, daß die Cysteine vier bis sieben, die für die vollständige Faltung dieses Proteins notwendig sind, in beiden Konstrukten vorliegen. Zusammenfassend kann man sagen, daß für die korrekte Faltung des α 1LG4-5-Fragments sieben Cysteine benötigt werden, wobei man α 1LG4 drei und dem α 1LG5 vier zuordnen kann.

Fragmente	Primer	Sequenzposition		Proteinnachweis		mRNA-Nachweis
		im α 1LG4-5	in der α 1-Kette	SDS-PAGE	Western-Blot	(Northern-Blot)
α 1LG4-5	1/3	1-395	2666-3060	+	+	+
α 1LG4-5(k)	2/3	52-395	2717-3060	-	-	+
α 1LG4	1/7	1-206	2666-2871	+	+	+
α 1LG4(k)	1/6	1-187	2666-2852	-	+	+
α 1LG5(l)	4/3	193-395	2858-3060	+	n.b.	+
α 1LG5	5/3	212-395	2877-3060	+	n.b.	+

Tab. 1: Zusammenfassende Tabelle über die hergestellten Konstrukte, die dafür eingesetzten Primer und deren Sequenzpositionen sowie Nachweis der Expression der jeweiligen Proteine über SDS-PAGE bzw. Western-Blot und mRNA-Nachweis über Northern-Blot. Das + Zeichen weist auf ein positives Ergebnis, das - Zeichen auf ein negatives Ergebnis des jeweiligen Versuchs hin. Die Abkürzung n.b. impliziert, daß kein Nachweis durchgeführt wurde.

3.2 Reinigung und proteinchemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Die Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine erfolgte aus den jeweiligen Zellkulturüberständen durch chromatographische Verfahren. Die Fragmente α 1LG4-5(k) und α 1LG4(k) konnten nicht gereinigt werden, weil keine ausreichende Menge an Protein zur Verfügung standen.

3.2.1 α 1LG4-5-Fragment

Für die Reinigung des α 1LG4-5-Fragments wurde dessen Bindung an Heparin ausgenutzt (Ott *et al.*, 1982; Yurchenco *et al.*, 1990). Das Protein wurde mit Hilfe von Heparin-Affinitätschromatographie (5ml Hi-Trap-Heparinsäule) aufgereinigt (Abb. 12).

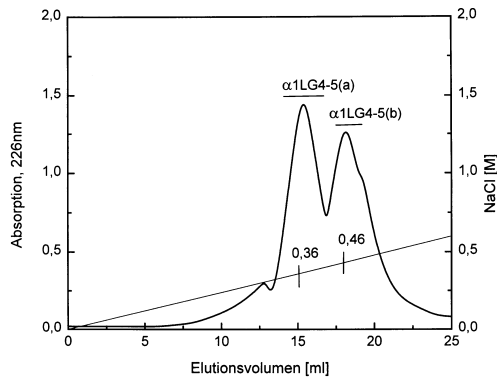


Abb. 12: Chromatogramm der Heparin-Affinität zur Aufreinigung von α 1LG4-5. Es wurden Bereiche (a, b), die bei verschiedenen Konzentrationen eluierten, zur weiteren Untersuchung vereinigt

Im Elutionsprofil fanden sich zwei signifikante Peaks. Das im ersten Peak enthaltene Protein (α 1LG4-5(a)) eluierte im NaCl-Gradienten bei 0,36 M NaCl, das zweite (α 1LG4-5(b)) bei 0,46 M, nahezu identisch zum Elutionsprofil des nativen E3-Fragments (0,42 M). Die Fraktionen dieser beiden Peaks wurden separat gesammelt und durch SDS-Elektrophorese in einem 5-15% Polyacrylamid-Gradientengel unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (Abb. 13).

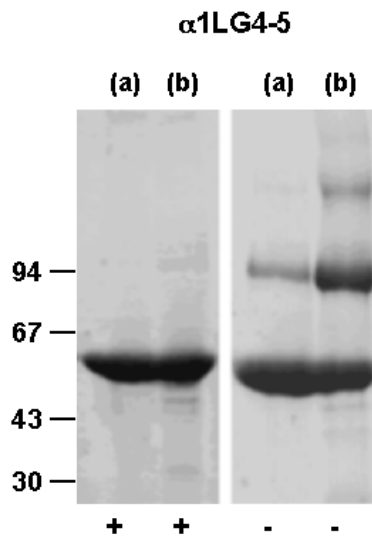


Abb. 13: Analyse der beiden Fraktionen α 1LG4-5(a) und α 1LG4-5(b) durch SDS-PAGE (Coomassie-Färbung). Die Proteine wurden unter reduzierenden (+) und nicht reduzierenden (-) Bedingungen auf einem 5-15% Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Die Balken (links) markieren den Molekulargewichtsstandard (kDa).

Beide Fraktionen lieferten nach Reduzierung homogene Banden bei ca. 55 kDa, die sich unter nicht reduzierenden Bedingungen leicht nach unten verschieben. Die Fraktionen enthielten vor der Reduzierung eine variable Menge an dimeren Fragmenten (96 kDa) und geringe Mengen anderer Oligomere. Die Dimerisierung erfolgt vermutlich durch ein freies Cystein, das im α 1LG4 vorliegt. Die Auftrennung von Monomeren und Dimeren konnte durch Molekularsiebchromatographie an einer Superose 12 Säule erzielt werden (Abb. 14). Alle weiteren Versuche wurden mit dem aus Fraktion (a) hergestellten Fragment α 1LG4-5 durchgeführt.

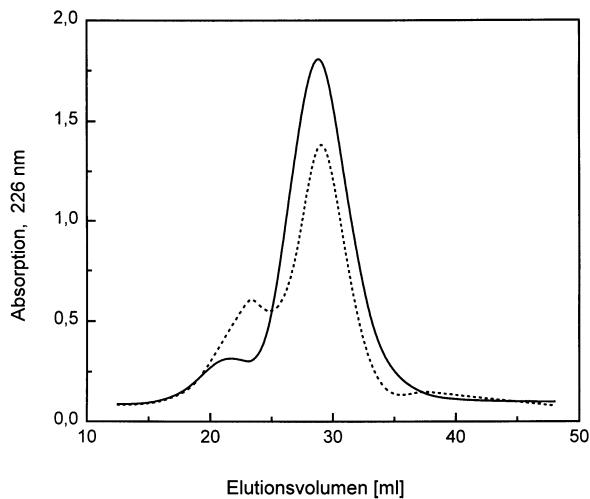


Abb. 14: Chromatogramm der FPLC-Superose 12 Reinigung von Monomeren und Dimeren in den Fraktionen (a) (—) und (b) (---) (siehe Abb. 12) des α 1G4-5-Fragments

Gereinigte Monomere des α 1LG4-5-Fragments wurden mit Hilfe der Kegelbedampfungstechnik im Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 15).

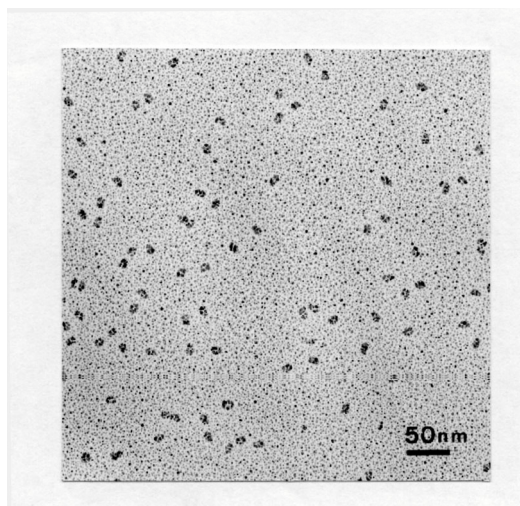


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Darstellung des gereinigten α 1LG4-5(a)-Fragments. Die Vergrößerung beträgt 1:156.000

Das Bild zeigt bevorzugt eine kleine globuläre Struktur von nahezu einheitlicher Größe. Bei wenigen Partikeln wurde eine etwas längliche Form oder Aufspaltung in zwei globuläre Strukturen beobachtet. Die Menge an größeren globulären Strukturen, die Dimere sein können, war minimal. Solche Partikel waren deutlich häufiger in Präparaten vorzufinden, die als Dimerfraktion isoliert wurden (nicht gezeigt).

Die Bestimmung des Circular dichroismus (CD)-Spektrum des rekombinanten $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragments sollte einen Einblick in seine Konformation und strukturelle Eigenschaft geben (Abb. 16).

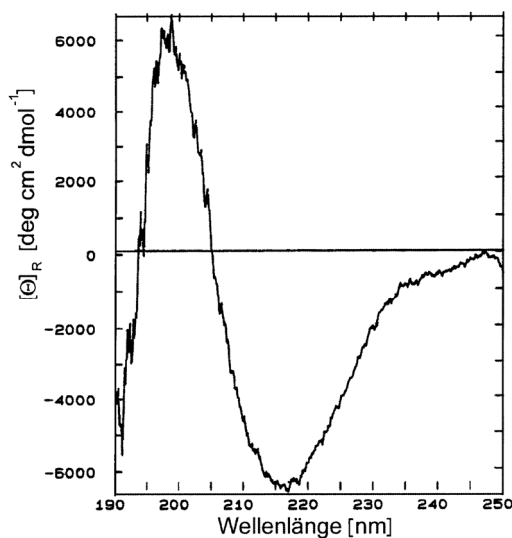


Abb. 16: CD-Spektrum von $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragment. Das Spektrum wurde bei 20°C in 20 mM Natriumphosphat, $\text{pH } 7,4$, aufgenommen und basierend auf zehn gemittelten Einzelmessungen.

Das Spektrum zeigt unter neuen Bedingungen ein typisches β -Spektrum. Das Maximum ist hierbei bei 195 nm , was auf eine reine β -Struktur hinweist, in Richtung 215 nm , das Minimum bei 215 nm verschoben.

Es ergab sich für die berechnete Sekundärstruktur ein Anteil von $10\text{-}14\%$ α -Helix und $40\text{-}47\%$ β -Faltblatt. Diese Werte sind vergleichbar mit denen, die für das proteolytische Fragment E3 aus nativem Laminin-1 der $\alpha 1$ -Kette erhalten wurden (Ott *et al.*, 1982).

3.2.2 $\alpha 1\text{LG4}$ -Fragment

Die Reinigung des $\alpha 1\text{LG4}$ -Fragments konnte effizient in einem einzigen Schritt über eine Heparin-Sepharose-Säule aus dem Zellkulturüberstand erzielt werden (Abb. 17). Das Protein eluierte dabei in einem asymmetrischen Peak. Die Fraktionen, in denen das rekombinante Protein enthalten war, wurden zu zwei Pools, (a) und (b), vereinigt.

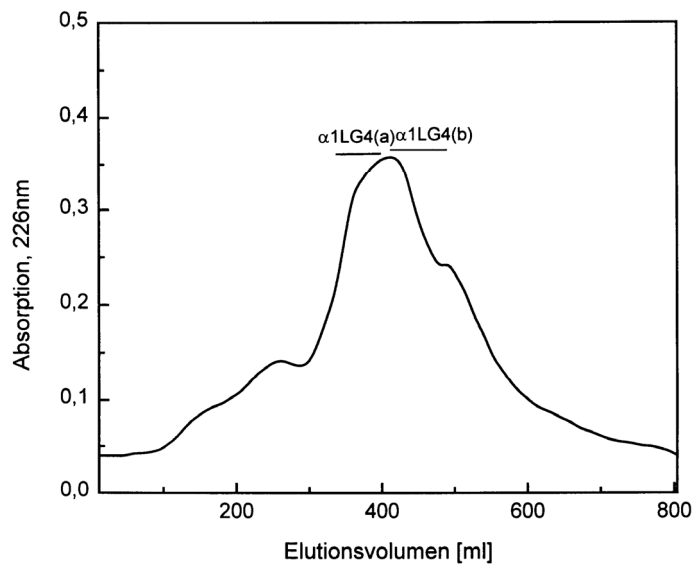


Abb. 17: Chromatogramm Heparin-Affinitätssäule zur Reinigung von α 1LG4. Es wurde Bereiche (a, b), die bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen eluiert wurden, für weitere Untersuchung vereinigt

Unter reduzierenden Bedingungen zeigte Pool (a) eine einheitliche elektrophoretische Bande von 36 kDa, unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte eine leichte Verschiebung nach unten beobachtet werden. In Pool (b) wurde zusätzlich noch eine schwächere Bande von 33 kDa sichtbar (Abb. 18). Die N-terminale Sequenzierung durch Edman-Abbau nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran ergab, daß beide Banden die gleiche N-terminale Sequenz besitzen (siehe Abschnitt 3.2.4). Vermutlich reflektiert diese Größendifferenz einen Unterschied in der N-Glykosylierung, die nicht weiter untersucht wurde.

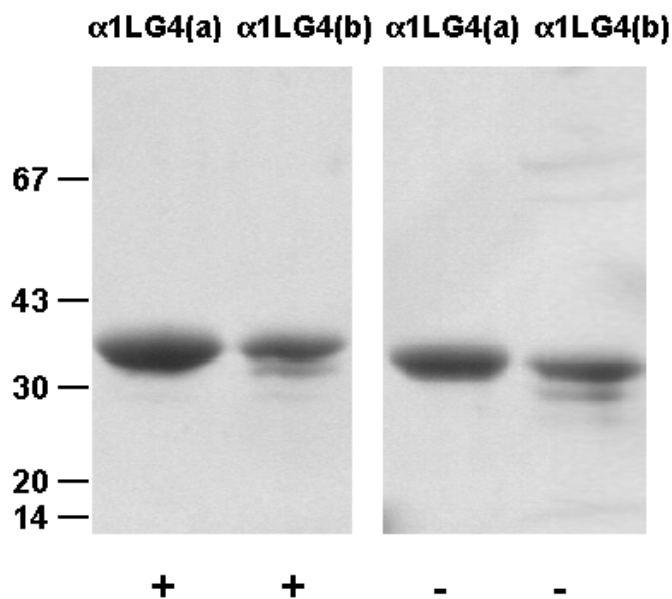


Abb. 18: SDS-PAGE zum Vergleich der gereinigten Pools (a) und (b) von α 1LG4 (Coomassie-Färbung). Die Proteine wurden unter reduzierenden (+) und nicht reduzierenden (-) Bedingungen aufgetrennt. Die Balken (links) markieren den Molekulargewichtsstandard (kDa).

3.2.3 α 1LG5-Fragment

Die Reinigung von Fragment α 1LG5 erwies sich im Vergleich zum α 1LG4 als wesentlich schwieriger. Das Protein war bei Konzentrationen von mehr als 40 μ g/ml nicht mehr komplett löslich und war nach Lyophilisierung in neutralem Puffer unlöslich. Es zeigte unter den gewählten Bedingungen weder Bindung an Heparin noch an DEAE-Zellulose. Da die meisten anderen Proteine aus dem Zellkulturüberstand jedoch Bindung an DEAE-Zellulose aufwiesen, konnte α 1LG5 aus dem Durchlauf in einer Reinheit von ca. 90 % erhalten werden. Ein SDS-Gel zeigte unter reduzierenden Bedingungen hauptsächlich eine Bande von ca. 27 kDa, die sich unter nicht reduzierenden Bedingungen leicht nach unten verschiebt (Abb. 19).

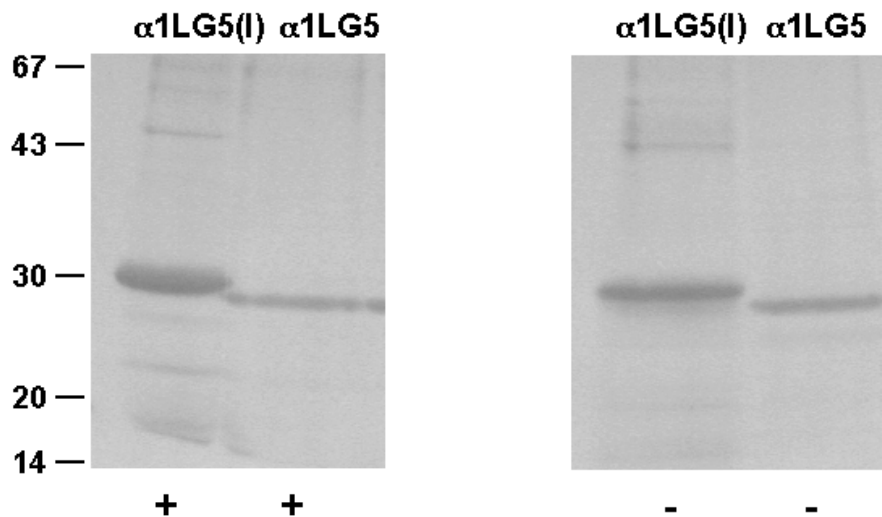


Abb. 19: SDS-PAGE der gereinigten Proteine α 1LG5(l) und α 1LG5 (Coomassie-Färbung). Die Proteine wurden unter reduzierenden (+) und nicht reduzierenden (-) Bedingungen auf einem 5-15 % Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Die Balken (links) markieren den Molekulargewichtsstandard (kDa).

Dieses Fragment wurde nach Zugabe von 0,15 M NaCl zu dem 0,05 M Tris/HCl Puffer pH 8,6 soweit als möglich durch Ultrafiltration konzentriert und für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Die längere Fragmentvariante α 1LG5(l) war noch schwieriger zu reinigen (Abb. 19) und wurde nicht weiter untersucht.

3.2.4 N-terminale Sequenz der rekombinanten Fragmente

Edman-Abbau der exprimierten Proteine mit den korrekten Modulgrenzen zeigte in jedem Fall eine einheitliche N-terminale Sequenz (Tab. 2). Wie erwartet, beginnen alle rekombinanten Proteine N-terminal mit APLA der artifiziellen BM-40 Signalpeptidsequenz. Der Vergleich mit den aus den cDNA-Sequenzen bekannten Aminosäurefolgen (Sasaki *et al.*, 1988) bestätigte den korrekten Übergang zur erwarteten Lamininsequenz. Die weiteren Experimente wurden mit den gereinigten rekombinanten Fragmenten α 1LG4-5, α 1LG4 und α 1LG5 durchgeführt.

Protein	N-terminale Sequenz
α 1LG4-5(a)	APLALHREHG
α 1LG4(a)	APLALHREHG
α 1LG4(b)	APLALHREHG
α 1LG5	APLAGTFFEG

Tab. 2: N-terminale Sequenzen der gerekombinant hergestellten Proteine. (a) und (b) die Sequenzen unterschiedlicher chroma-togra Fraktionen (Abb.13, 18).

3.3 Immunchemische Analysen der rekombinanten Fragmente

3.3.1 Charakterisierung mit polyklonalen Antisera

Die rekombinanten Fragmente α 1LG4-5, α 1LG4 und α 1LG5 wurden durch ELISA-Titration mit polyklonalen Kaninchen-Antisera gegen natives E3-Fragment (992) sowie gegen rekombinantes α 1LG4-Fragment (1060) charakterisiert. Abbildung 20A illustriert, daß das E3-spezifische Antiserum die konformationellen Epitope der drei rekombinanten Proteine erkennt. Die Titrationsanalyse des Antiserums zeigt, daß der Titer (halbmaximale Bindungskapazität des Antiserums gegen das Antigen) sowohl für das rekombinante α 1LG4-5-Fragment als auch für das native Protein (hier nicht gezeigt) bei einer Verdünnung von 1:5000, für die rekombinanten Fragmente α 1LG4 und α 1LG5 hingegen bei 1:1000 lag. Das Antiserum erkennt offensichtlich Epitope auf beiden Fragmenten (α 1LG4, α 1LG5) und wurde deshalb in den später beschriebenen Analysen zum Nachweis der Bindung eingesetzt. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, daß die verschiedenen rekombinanten Fragmente sehr

wahrscheinlich eine dem E3 ähnliche native Struktur aufweisen.

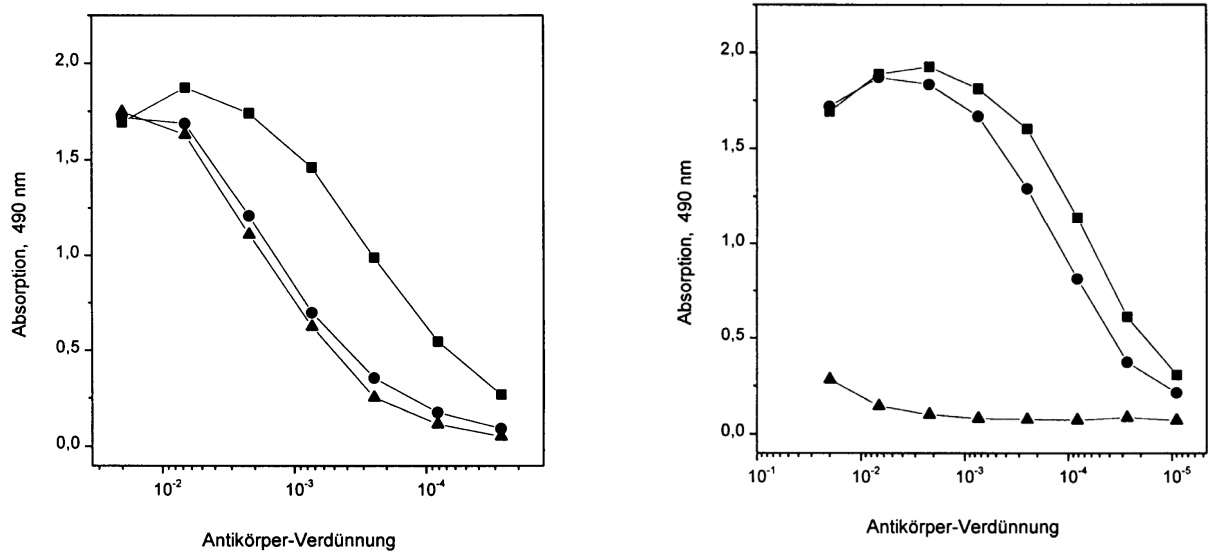


Abb. 20: ELISA-Titration von Antiseren gegen die rekombinanten Fragmente $\alpha 1LG4-5$, $\alpha 1LG4$ und $\alpha 1LG5$. (A, links) Antiserum gegen das native $\alpha 1E3$ -Fragment (992), (B, rechts) Antiserum gegen das rekombinante $\alpha 1LG4$ -Fragment (1060). Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ■ $\alpha 1LG4-5$, ● $\alpha 1LG4$, ▲ $\alpha 1LG5$.

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten $\alpha 1LG4$ -Fragment lieferte ein weiteres polyklonales Antiserum (Nr.1060), das in ELISA-Titrationen gegen alle drei rekombinanten Proteine analysiert wurde (Abb. 20B). Dieses Antiserum zeigte einen ähnlich hohen Titer (1:10.000-20.000) für $\alpha 1LG4-5$ und $\alpha 1LG4$, was auf einen identischen Satz von immunologischen Epitopen auf beiden Fragmenten hinweist. Das Antiserum zeigte keine signifikante Bindung an $\alpha 1LG5$. Die Fragmente $\alpha 1LG4$ und $\alpha 1LG5$ können deshalb immunologisch klar unterschieden werden, wie es von ihrer begrenzten Sequenzidentität (25%) zu erwarten war.

3.3.2 Charakterisierung mit radioimmunologischen Analysen

Die radioimmunologische Analyse beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Inhibierung einer Bindung. Dabei wird untersucht, inwieweit ein Protein (Inhibitor) auf die Bindung eines Antiserums an ein radioaktiv markiertes Protein inhibierend wirkt.

Durch diese Analyse werden die antigenen Eigenschaften des inhibierenden Proteins in

quantitativer Weise charakterisiert. Da sich in diesem Testverfahren alle Komponenten in Lösung befinden, kann man die Maskierung von relevanten Bindungsepitopen durch Immobilisierung ausschließen. Außerdem ist dieses Verfahren sehr sensitiv. In Abbildung 21 ist die Reaktion des Antiserums gegen das nativen E3-Fragment mit radioaktiv markiertem α 1LG4 im Inhibitionstest dargestellt. Analysiert wurden sowohl die inhibitorischen Kapazitäten des Antigens α 1LG4 und α 2LG4 (von Laminin-2), als auch des α 1LG5 und die des nativen E3 (von Laminin-1). Weiterhin wurden EDTA-Extrakte verschiedener Mausgewebe und Zellkulturüberstände der PYS-2 Zellen der Maus untersucht.

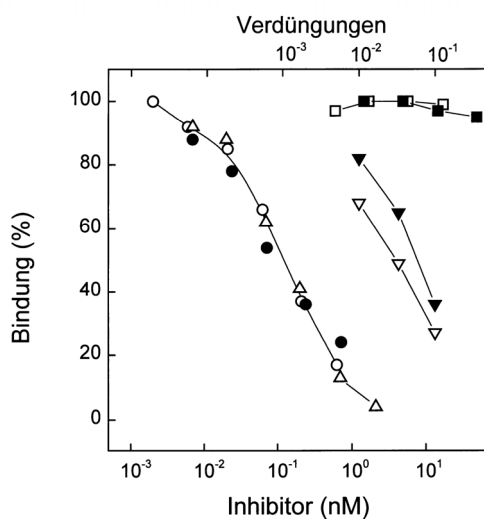


Abb. 21: Radioimmuno-Inhibitionstest spezifisch für Epitope des α 1LG4-Fragments. Getestet wurde die Inhibition der Bindung von E3-Antiserum (992) an ^{125}J -markiertes α 1LG4 durch verschiedene Liganden, die durch folgende Symbole dargestellt sind. ● Laminin-1, ○ E3, △ α 1LG4, □ α 1LG5, ■ α 2LG4, ▼ Mausgehirn EDTA-Extrakt, π Maus PYS-2 Zellkulturmedium. Die molaren Konzentrationen beziehen sich auf die gereinigten Proteine, die Verdünnungen auf die biologischen Präparate

Abbildung 21 illustriert, daß die Werte für 50 % Inhibition des Antiserums (992) vom authentischen Laminin-1 und E3 und vom rekombinanten α 1LG4 mit einer Konzentration von 0,1 nM exakt übereinstimmen, was auf identische Epitope in diesen drei Liganden schließen läßt. Dagegen wirkten die eingesetzten rekombinanten Fragmente α 1LG5 und α 2LG4 selbst bei mehr als 100-fach höheren Konzentrationen nicht inhibitorisch auf die Reaktion, was primär die Spezifität des Antiserums beweist und sekundär auf die unterschiedlichen Epitope der beiden Liganden schließen läßt. Die Steigung der Inhibitionsprofile der Gewebeextrakte und der Zellkulturüberstände der PYS-2 Zellen der Maus sind mit dem des Laminin-1, E3 und dem α 1LG4 identisch. Dies zeigt das Vorliegen identischer immunologischer Epitope in den komplexen biologischen Präparaten und erlaubt deren Quantifizierung.

Das Experiment wurde zusätzlich für verschiedene Gewebeextrakte durchgeführt, wobei die Kalibrierung des Radioimmuntests mit Laminin-1 oder α 1LG4 als Referenzinhibitor innerhalb der üblichen Variabilität ($\pm 30\%$) mit einer Ausnahme (Niere) identische Konzentrationen ergab (Tab. 3). Diese Ergebnisse zeigen, daß der Test auch zur Quantifizierung von Lamininen mit α 1-Ketten in komplexen Proteingemischen geeignet ist.

Proben	(a) nM	(b) nM
Niere	27	13,2
Hoden	2,6	3,9
Gehirn	1,2	1,6
Herz	0,16	0,22
Skelettmuskel	<0,01	<0,02
PYS-2	3,6	3,5

Tab. 3: Quantitative Bestimmung von immunologischen Epitopen der α 1LG4 Struktur in Gewebeextrakten der Maus und PYS-2 Zellmedium. Der Test wurde sowohl mit Laminin-1 (a) als auch Fragment α 1LG4 (b) als Referenzinhibitor ausgewertet und ergab vergleichbare Werte.

3.3.3 Charakterisierung mit monoklonalen Antikörpern

Von der Arbeitsgruppe L. Sorokin wurden sieben monoklonale Ratten-Antikörper (Mab 192, 194, 198, 199, 200, 201, 211), die gegen das native E3-Fragment gerichtet sind (Sorokin *et al.*, 1992), zur Verfügung gestellt. Diese Antikörper erkennen einzelne konformationelle Epitope, deren Natur bisher ungeklärt war. Sie wurden deshalb auf ihre Affinität zu den rekombinanten Proteinen mittels ELISA-Titration getestet. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse von Titrationen mit zwei monoklonalen Antikörpern (192, 201). In beiden Fällen konnten für die Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4 ähnliche Titer bestimmt werden, die bei ca. 1:10.000 (Mab 192) bzw. 1:1000 (Mab 201) liegen. Keiner der beiden monoklonalen Antikörper zeigte eine signifikante Bindung an das rekombinante α 1LG5-Fragment. Die übrigen fünf monoklonalen Antikörper zeigten ähnliche Charakteristika, wobei sie sich in ihren Titern leicht unterscheiden.

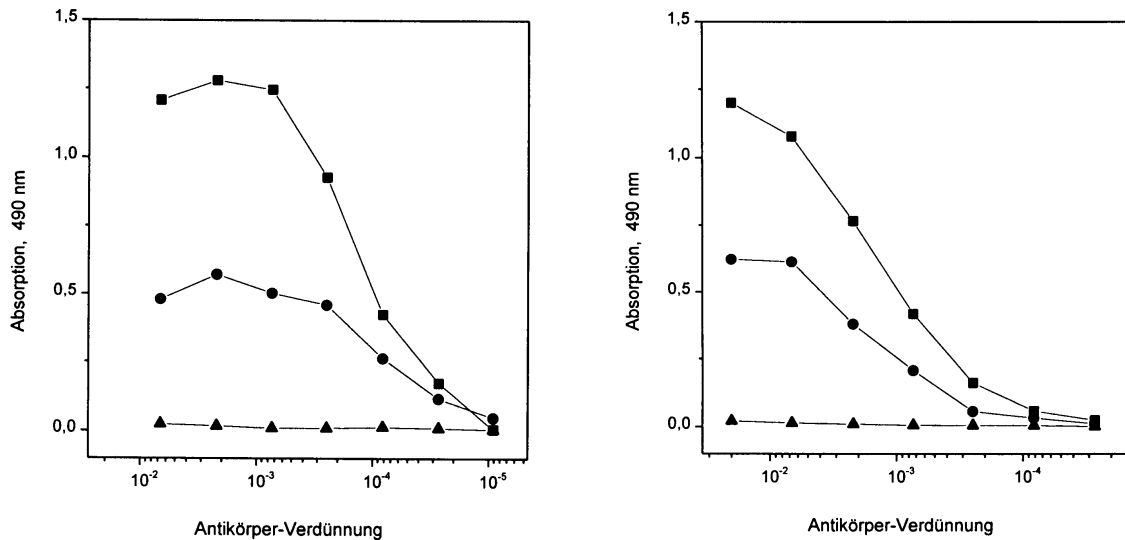


Abb. 22: Elisa-Titrationsen von monoklonalen Antikörpern (Mab) gegen das E3-Fragment. (A, links) Mab 192, (B, rechts) Mab 201. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ■ α 1LG4-5, ● α 1LG4, ▲ α 1LG5. Die Titer (siehe Text) wurden als Verdünnung, die die halbmaximale Bindung ergibt, definiert.

3.4 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Proteine in Bindungsanalysen

Mit dem nativen E3-Fragment aus Laminin-1 der α 1-Kette wurden in früheren Untersuchungen mehrere wichtige Bindungseigenschaften festgestellt. Das betraf einmal eine distinkte Affinität für Heparin, die mittels Chromatographie bestimmt wurde (Ott *et al.*, 1982; Yuchenco *et al.*, 1993). Die Elution von einer Heparinsäule erforderte dabei NaCl-Konzentrationen, die deutlich über dem physiologischen Bereich (0,15 M) lagen. Fragment E3 zeigte auch eine starke Bindung an die Heparansulfatketten des Perlecans (Battaglia *et al.*, 1992; Sasaki *et al.*, 1998). Eine ähnliche Bindungseigenschaft von E3 wurde auch für Sulfatide beschrieben (Taraboletti *et al.*, 1990). Ein weiterer wichtiger Ligand ist der zelluläre Rezeptor α -Dystroglycan, der an Agrin und Laminin-1 bindet und dadurch eine Verbindung zum Cytoskelett herstellt (Henry und Campbell, 1996). Diese Bindungseigenschaft konnte ebenfalls auf dem E3-Fragment lokalisiert werden (Gee *et al.*, 1993; Smalheiser, 1993; Brancaccio *et al.*, 1995). Die drei Liganden wurden im folgenden mit den rekombinanten Fragmenten untersucht, um ihre nativen Eigenschaften zu überprüfen. Weiterhin sollte dadurch die Lokalisierung der Bindung an einzelne LG-Module bestimmt werden.

3.4.1 Bindung an Heparin

Die Bindung der rekombinanten Fragmente wurde zuerst durch Affinitäts-Chromatographie in 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 an einer 1 ml Heparin Hi-Trap Säule und Elution mit einem 0-0,6 M NaCl-Gradienten bestimmt. Bei dieser niederen Ionenstärke kam es zu einer hohen Bindung (>90 %) der Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4, während α 1LG5 keine Bindung zeigte. Die Elutionsprofile zeigten für die gebundenen Proteine eine Verdrängung innerhalb eines engen NaCl-Konzentrationsbereichs, der für α 1LG4-5 bei 0,22 M NaCl und für α 1LG4 bei 0,21 M NaCl das Maximum hatte (Abb. 23). Diese Beobachtung weist auf eine identische Affinität der beiden Fragmente für Heparin hin.

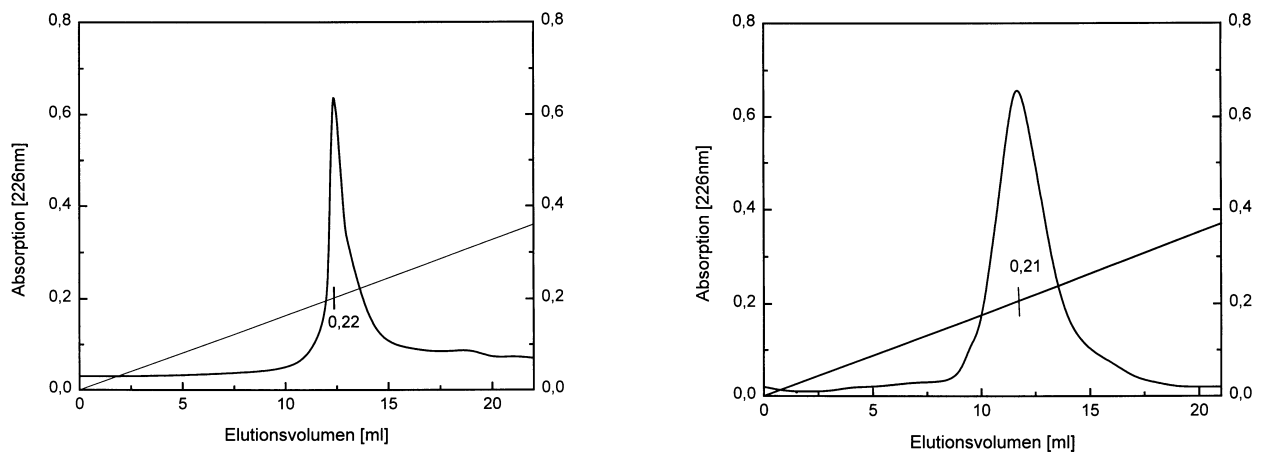


Abb. 23: Chromatographie von α 1LG4-5 (A, links) und α 1LG4 (B, rechts) an einer Heparin-Affinitätssäule. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-0,6 M NaCl (30 ml).

Um in einem weiteren Testsystem die Charakteristika der rekombinanten Proteine in bezug auf die Heparinbindung zu verifizieren, wurden Ligandenbindungstests durchgeführt. Dafür wurde ein Konjugat von Heparin an Albumin in Mikrotiterplatten immobilisiert und die rekombinanten Proteine als lösliche Liganden eingesetzt. Die Bindung an Heparin wurde mittels des für das E3-Fragment spezifischen Antiserums (992) und eines zweiten mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers gegen Kaninchen IgG in einer Farbreaktion nachgewiesen. Es wurden dosisabhängige Profile erhalten, deren Verlauf Aussagen über die Stärke der Wechselwirkungen zulässt.

Die Bindungsanalyse in Abbildung 24 belegt eine starke Interaktion des rekombinanten α 1LG4-5-Fragments mit Heparin, dessen halbmaximale Bindung in einem Konzentrationsbereich von 9 ± 3 nM liegt. Im Vergleich mit dem authentischen E3-Fragment ist diese Bindung um einen Faktor fünf stärker. Die Bindung des α 1LG4 erweist sich als etwas schwächer und liegt im Bereich von 24 ± 14 nM. Für α 1LG5 konnte keine signifikante Interaktion mit Heparin festgestellt werden.

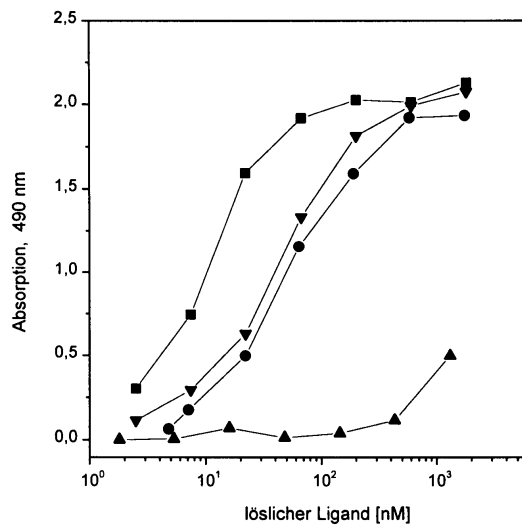


Abb. 24: Bindung des E3-Fragments und der rekombinanten Proteine an immobilisiertes Heparin. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ▼ E3, ■ α 1LG4-5, ● α 1LG4, ▲ α 1LG5.

3.4.2 Bindung an Sulfatide

Die in Abbildung 25 aufgeführten Bindungsprofile, bei denen Sulfatide in immobilisierter Form vorlagen und die rekombinanten Proteine wieder als lösliche Liganden eingesetzt wurden, zeigen keine nennenswerten Unterschiede zum Heparin-Test. Die halbmaximale Bindung des α 1LG4-5-Fragments liegt bei einer Konzentration von 4 ± 3 nM, die des authentischen E3-Fragments ist um einen Faktor zehn schwächer. Das α 1LG4-Fragment war im Vergleich zum α 1LG4-5 jedoch mit 33 ± 6 nM schwächer. Beim α 1LG5 konnte keine signifikante Bindung nachgewiesen werden.

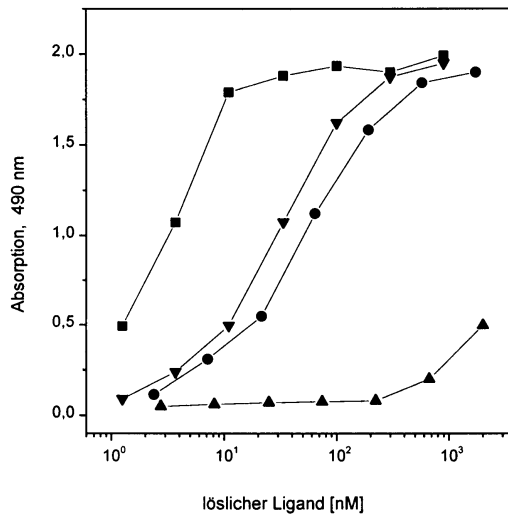


Abb. 25: Bindung des E3-Fragments und der rekombinanten Proteine an immobilisierte Sulfatide. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ▼ E3, ■ α1LG4-5, ● α1LG4, ▲ α1LG5

3.4.3 Bindung an α-Dystroglycan

Sowohl die rekombinanten Proteine als auch das authentische E3-Fragment wurden beim Ligandenbindungstest mit α-Dystroglycan (isoliert aus Huhn) als lösliche Liganden untersucht. Die Bindungsanalysen belegen eindeutig eine Interaktion des α1LG4-5 Fragments mit α-Dystroglycan, deren Wert für die halbmaximale Bindung bei $0,06 \pm 0,02 \mu\text{M}$ liegt. Das authentische E3-Fragment erweist sich mit einem Wert von $0,3 \pm 0,04 \mu\text{M}$ als wesentlich schwächer bindend. Für das α1LG4-Fragment wurde eine halbmaximale Bindung im Bereich von $0,13 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ermittelt. Von einer wesentlichen Beteiligung des α1LG5-Fragments an der Interaktion von α-Dystroglycan mit Laminin-1 ist anhand der vorliegenden Daten nicht auszugehen (Abb. 26).

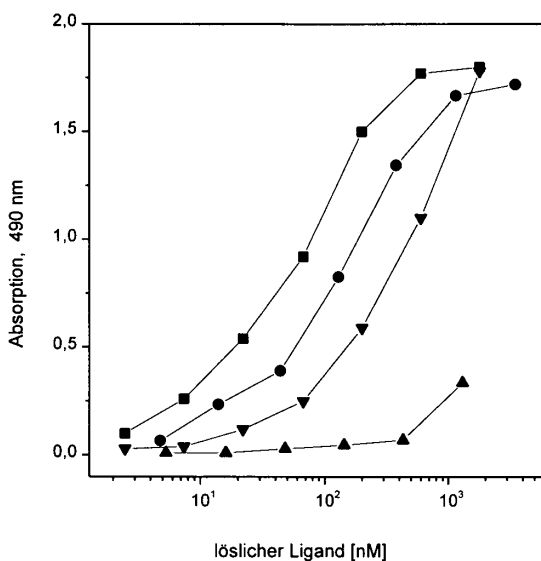


Abb. 26: Bindung des E3-Fragments und der rekombinanten Proteine an immobilisiertem α-Dystroglycan. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ▼ E3, ■ α1LG4-5, ● α1LG4, ▲ α1LG5

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Resultate der Affinitätschromatographie und der Bindungsanalysen (Heparin, Sulfatide und α -Dystroglycan) eindeutige Belege dafür liefern, daß α 1LG4 für die drei Liganden der ausschließliche Bindungspartner ist. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Bindungsparameter.

Protein	NaCl(M)	Heparin-BSA-Test (in nM)	Sulfatid-Test (in nM)	α -Dystroglycan-Test (in μ M)
α 1LG4-5	0,22	9	4	0,06
α 1LG4	0,21	24	33	0,13
α 1LG5	k.b.	k.b.	k.b.	k.b.

Tab. 4: In der Tabelle zusammengefaßt sind die NaCl-Konzentrationen, bei denen die Proteine von einer 1 ml Heparinsäule eluiert wurden, sowie die gemittelten Konzentrationen für die halbmaximale Bindung im Heparin-, Sulfatid- und α -Dystroglycan-Test. k.b bedeutet keine signifikante Bindung.

3.5 Eingrenzung des Heparin-Bindungsepitops auf dem α 1LG4-Fragment

3.5.1 Chemische Modifikationen von Aminosäureseitenketten

In vorangegangenen Studien wurde für eine Vielzahl anderer Proteine nachgewiesen, daß deren Heparin-Bindungsepitope über basische Regionen verfügt, wobei die Aminosäuren Arginin und Lysin durch ihre polaren Seitenketten wahrscheinlich an der Bindung beteiligt sind (Lander, 1994). Um deren Beitrag an der Heparin-Bindung zu untersuchen, wurde die chemische Modifikation von Lysin durch Acetylierung und von Arginin durch Phenylglyoxal durchgeführt. Abbildung 27 zeigt die Aminosäuresequenz von α 1LG4 mit den in dieser Arbeit festgelegten Modulgrenzen. Wie schon in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, entspricht die Position 1 der Aminosäure 2666 in der α 1-Kette des Laminin-1. Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin sind fett hervorgehoben. Bei näherer Betrachtung der Sequenz wird man auf die einzelnen Tyrosine (in der Sequenz ebenfalls fett hervorgehoben) aufmerksam, die meistens in der Nachbarschaft zu gehäuft vorkommenden basischen Aminosäuren plaziert sind. Somit stellt sich die Frage, inwieweit diesen Tyrosinen eine zusätzliche Beteiligung an der Heparin-Bindung zugeschrieben werden kann. Die chemische Modifikation dieser Tyrosine erfolgte durch Nitrierung des Phenolrings.

1 LH**R**EHGELPP EPPTLPQPEL ©AVDTAPG**Y**V AGAHQFGLSQ NSHLVLPLNQ
 51 SDV**R**KRLQVQ LS**I**RTFASSG LI**Y**YVAHQNQ MD**Y**ATLQLQE G**R**LLHF~~M~~FDLG
 101 **K**G**R**T**K**VSHPA LLS**D**G**K**WHTV **K**TE**Y**I**K**R**K**AF MTVDGQESPS VTTVVG**N**ATTL
 151 DVE**R****K**L**Y**LG**G** LPSH**Y**R**A**RNI GTITHSIPA© IGEIMVNGQQ LD**K**D**R**PLSAS
 201 AVDR©**Y**

Abb. 27: α 1LG4-Sequenz mit den in dieser Arbeit festgelegten Modulgrenzen. Die Aminosäuren Arginin Lysin und Tyrosin, die wohl mögliche Kandidaten für die Heparin-Bindung darstellen, sind fett hervorgehoben.

Alle drei Verfahren führen zu einer eingreifenden Veränderung der Natur dieser Aminosäuren (Fraenkel-Conrat, 1957; Takahashi, 1968; Sokolovsky *et al.*, 1966). Die veränderten (modifizierten) Fragmente wurden anschließend über eine 1 ml Heparin-Säule gegeben, um zu ermitteln, inwieweit sich das Elutionsprofil von dem des unmodifizierten Fragments unterscheidet (Tab. 5).

α 1LG4-Fragment	Durchlauf (%)	Elution bei 0,21 M NaCl (%)
unmodifiziertes Protein	14	86
Lysin-Modifikation	96	4
Arginin-Modifikation	100	—
Tyrosin-Modifikation	55	45

Tab. 5: Chemische Modifikationen am α 1LG4-Fragment. Basierend auf den Elutionsprofilen des unmodifizierten bzw. der modifizierten Proteine sind die berechneten prozentualen Anteile von nicht gebundenem und gebundenem Protein an der 1 ml Heparin-Säule angegeben.

Die eluierten Fraktionen wurden entsprechend den Chromatogrammen gepoolt, die Proteinkonzentrationen nach saurer Hydrolyse bestimmt und der prozentuale Anteil an gebundenem und nicht gebundenem Material ermittelt. Das Chromatogramm des unmodifizierten Proteins demonstriert, daß 14 % des Proteins im Durchlauf erscheint und 86 % bei 0,21 M NaCl von der Säule eluiert. Die Modifizierung der Lysin- und Arginin-Seitenketten hatte zur Folge, daß keine Heparin-Bindung mehr stattfindet. Die Nitrierung der Tyrosin-Seitenketten bewirkt eine Herabsetzung der Bindung um 50 %, wobei das gebundene Protein bei 0,21 M NaCl eluiert.

Diese Experimente erbrachten erste Anhaltspunkte dafür, daß gewisse Arginin- und Lysin-Seitenketten in dem α 1LG4-Fragment an der Heparin-Bindung beteiligt sind. Eine eindeutige Aussage über die Tyrosin-Seitenketten konnte nicht gemacht werden.

3.5.2 Limitierte Proteolyse

Proteine, die in einer stabilen, dreidimensionalen Struktur vorliegen, besitzen eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen. Viele der spaltbaren Sequenzen liegen im Inneren der Struktur verborgen oder sind den Proteasen aus anderen, konformationellen Gründen nicht zugänglich. α 1LG4-Fragment wurde auf seine Stabilität gegen Trypsin, Endoproteinase Glu-C und und Endoproteinase-Lys-C getestet (hier nicht gezeigt). Zur Ermittlung der Kinetik der proteolytischen Spaltung wurde α 1LG4 für 1 h, 4 h und 24 h bei pH 7,4 und 37 °C mit den Proteasen inkubiert und durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert. Das Protein blieb gegenüber allen drei Proteasen resistent, was die Stabilität der Konformation des Fragments verdeutlicht. Erheblich instabiler zeigte sich das Protein gegenüber einem Angriff durch Pepsin. Der Abbau durch diese Protease führte bei pH 3 und 25 °C nach 2 h zur Degradation des Proteins in mehrere Fragmente in der Größenordnung von ca. 6 bis 18 kDa. Nach 24 h war das Protein vollständig abgebaut und keine Bande mehr in der Elektrophorese nachzuweisen (Abb. 28).

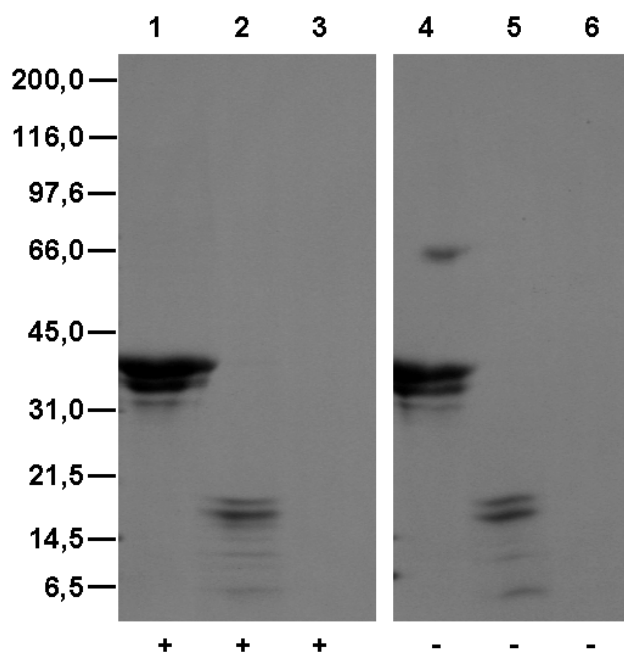


Abb. 28: Proteolytische Degradation α 1LG4 mit Pepsin. Die Auftrennung in Fragmente erfolgte unter reduzierenden und nicht reduzierenden (-) Bedingungen in einem 5-22% Polyacrylamid-Gradienten (Coomassie-Färbung). Arabische Zahlen in den Abbildungen kennzeichnen die Proteinansätze. Unverdautes Protein (1,4), nach Proteolyse mit Pepsin (2, 5) und nach Proteolyse mit Pepsin (3, 6). Die Balken markieren den Größenstandard zugehörigem Molekulargewicht (kDa).

Durch limitierten Pepsinabbau wurden geeignete Fragmente erhalten, die durch Heparin-Affinitätschromatographie (1 ml Säule) in Fraktionen mit kleiner (H1), schwacher (H2 und H3) und starker (H4) Affinität getrennt werden konnten. Die H4-Fraktion wies dabei ein analoges Elutionsprofil (0,21 M NaCl) wie das α 1LG4-Fragment auf (Abb. 29). Die gesamte Menge an heparin-bindenden Fragmenten betrug 30 %.

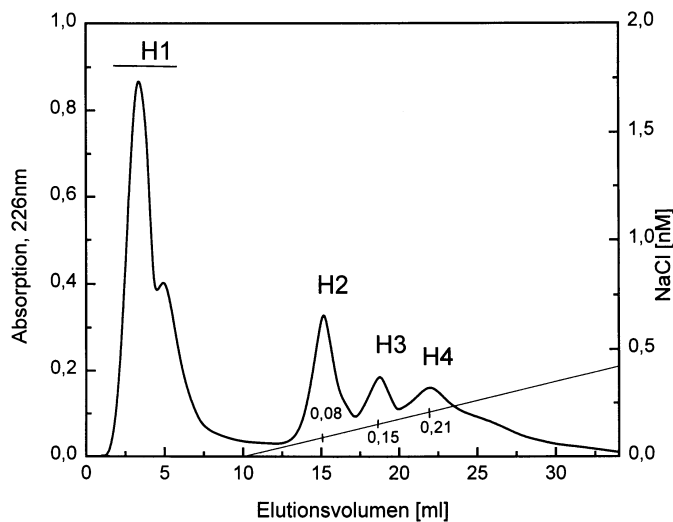


Abb. 29: Chromatographic limitierten Pepsinabbau α 1LG4 an einer H Affinitätssäule. Die Elution mit einem Gradienten von 0 NaCl (30 ml). H1, H2, H3 und H4 markieren die zu Pools vereinigten Fraktionen bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (unter den Peaks).

Durch Umkehrphasen-Chromatographie an einer C18-Säule wurden die in Fraktion H4 enthaltenen Peptide separiert und zugleich entsalzt. Abbildung 30 zeigt das Chromatogramm der Trennung. Anhand des Chromatogramms wurden die Fraktionen in den Pools H4/1-H4/5 vereinigt.

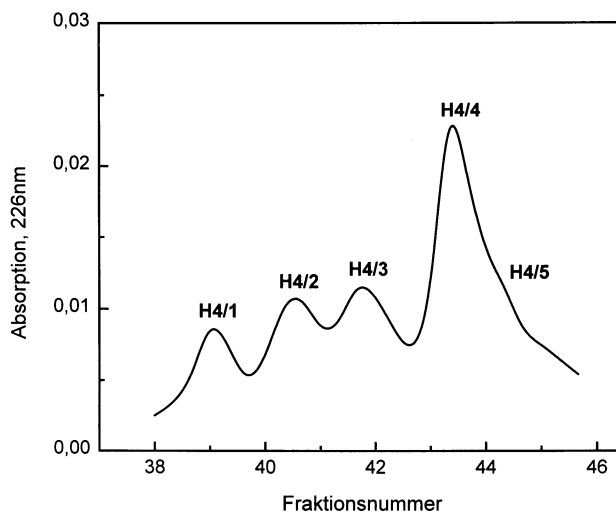


Abb. 30: Chromatogramm der HPLC C18-Reinigung von der H4-Fraktion. H4/1, H4/2, H4/3, H4/4 und H4/5 kennzeichnen die zu Pools zusammengefaßten Fraktionen.

Die N-terminale Sequenzierung der gereinigten Peptide in diesen fünf Pools ergab die in Tabelle 6 aufgeführten Sequenzen, wobei häufig eindeutig identifizierbare Mehrfachsequenzen vorlagen.

Peptide	N-terminale Sequenz (Startposition)
H4/1	(96) MFDLGK
H4/2	(96) MFDLGKGR
	(125) IKRKAFMT
	(184) IMVNGQQ
H4/3	(96) MFDLGKGR
	(125) IKRKAFMT
	(184) IMVNGQQ
H4/4	(96) MFDLGKGR
	(112) LSDGKWHT
	(184) IKRKAFMT
H4/5	(96) MFDLGKGR
	(125) IKRKAFMT

Tab. 6: N-terminale Sequenzen der gereinigten Peptide H4/1-H4/5. Sie stellen vier identifizierbare Mehrfachsequenzen dar, deren N-terminale Sequenzen an den Positionen 96, 112, 125 und 184 beginnen und somit innerhalb der C-terminalen Hälfte von α 1LG4 liegen (Abb. 31).

Werden diese aufgelisteten Sequenzen der Gesamtsequenz des α 1LG4-Fragments zugeordnet (Abb. 31), so beginnen sie an den Positionen 96, 112, 125 und 184, und liegen damit in der C-terminalen Hälfte. Hierdurch konnte die Heparin-Bindungsstelle auf die letzten 100 Aminosäuren von α 1LG4 eingegrenzt werden. Auffällig war auch die immer wieder in den Peptidpools H4/2-H4/5 auftauchende Sequenz IKRKAFMT (Pos. 125-132), die eine Anhäufung von basischen Aminosäuren darstellt (Tab. 6).

1	LHREHGELPP	EPPTLPQPEL	¹ ©AVDTAPGYV	AGAHQFGLSQ	NSHLVLPLNQ
51	SDVRKRLQVQ	LSIRTFASSG	LIYYVAHQNQ	MDYATLQLQE	GRLHF MFDLG
101	KGRT KVSHPA	LLSDGKWHT V	KTEY IKRKAF	MT VDGQESPS	VTVVGNA TTL
151	DVERKLYLGG	LPSHYRARNI	GTITHSIPA ² ©	IGE IMVNGQQ	LDKDRPLSAS
201	³ AVDR©Y				

Abb. 31: Zuordnung der Peptidsequenzen H4/1-H4/5 (fett hervorgehoben) aus Tab. 6 der Gesamtsequenz des rekombinanten α 1LG4-Fragments.

Die in Pool H4/2 H4/3 und H4/4 enthaltenen Peptidfragmente zeigen Sequenzen, die vor und nach dem zweiten Cystein angeordnet sind, aber keine Sequenzen, die vor dem ersten Cystein liegen. Die ermittelten Daten stehen in Übereinstimmung mit der Annahme, daß Cystein-2 und Cystein-3 im α 1LG4-Fragment eine Disulfidbrücke bilden. Die Natur von Cystein-1 ist unklar. Es könnte in Thiolform vorliegen, was die Oligomerisierung des rekombinanten Fragments α 1LG4-5 (siehe Abschnitt 3.2.1) erklären könnte.

3.6 Punktmutationen im α 1LG4-Fragment

3.6.1 Klonierung und Reinigung der α 1LG4-Mutanten

Das nächste Ziel war eine genaue Kartierung der Heparin-Bindungsstelle. Aufgrund der erhaltenen Daten wurde der Versuch unternommen, durch gezielte Punktmutationen in den hundert Aminosäureresten am C-terminalen Ende des α 1LG4-Fragments die Aminosäuren Arginin und Lysin, die an der Heparin-Bindung beteiligt sind, direkt zu identifizieren. Aufgrund der Ungewissheit, inwieweit den Tyrosinen bei dieser Bindung eine Bedeutung zugeschrieben werden kann, wurden diese einzeln mutiert. Insgesamt wurden vierzehn verschiedene Einzel- bis Dreifach-Alaninmutanten hergestellt, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

Mutationen zu Alanin	Sequenzposition
EYIKRK	(126,127,128)
EYIKRK	(126)
EYIKRK	(127)
EYIKRK	(128)
EYIKRK	(124)
ERKLYL	(154,155)
ERKLYL	(157)
HYRARN	(165)
HYRARN	(166,168)
GKGRTK	(101,103,105)
LDKDRP	(193,195)
DGKWH	(126)
VDRCY	(204)
TVKTE	(121)

Tab. 7: Liste der hergestellten α 1LG4-Mutanten. Alanin substituierte Aminosäuren sind hervorgehoben und mit ihrer Sequenz angegeben

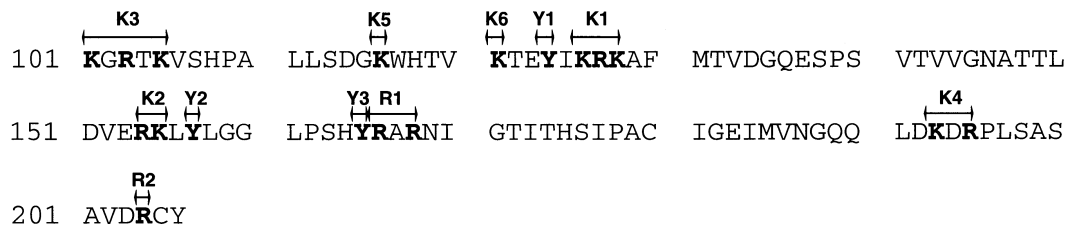


Abb. 32: Lokalisierung und Bezeichnung der hergestellten α 1LG4-Mutanten in der C-terminalen Region des rekombinanten α 1LG4-Fragments.

Abbildung 32 verdeutlicht die Positionen und Benennung der eingeführten Mutationen an Hand der Sequenz von α 1LG4. Alle vierzehn Mutanten wurden durch Fusions-PCR hergestellt, die die gezielte Einführung von ort-spezifischen Mutationen erlaubt. Diese wurden durch die Oligonukleotidprimer eingeführt und lagen für jede Mutation in der Mitte des aus ca. 20-27 Nukleotiden bestehenden Oligonukleotids. Gleichzeitig wurde ein Primer für den Gegenstrang synthetisiert, der sich exakt über denselben DNA-Bereich erstreckte und ebenfalls die gewünschte Mutation enthielt. Beide Primer wurden für die Mutagenese-PCR eingesetzt, wobei der für das α 1LG4-Fragment kodierende Anteil der cDNA als Templat diente. Alle geplanten Mutanten konnten in ausreichenden Mengen im Medium der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Sie wurden mit Hilfe der Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt, wobei unterschiedliche Ionenstärken beobachtet wurden. Die gereinigten Mutanten zeigten im SDS-Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das nicht mutierte Fragment α 1LG4, was anhand von ein paar Beispielen belegt ist (Abb. 33).

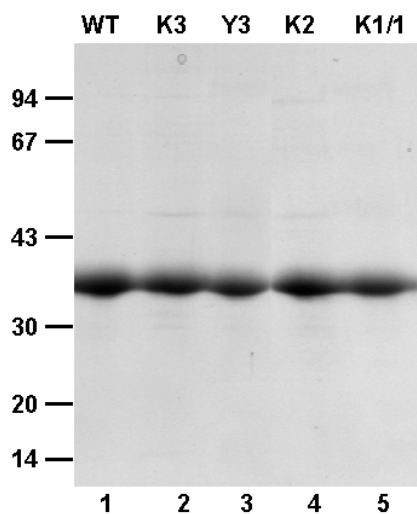


Abb. 33: Vergleich von ausgewählten, gereinigten α 1LG4-Mutanten durch SDS-PAGE (Coo-Färbung). Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen (+) auf einem 5-15 % Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Die Balken markieren den Molekulargewichtsstandard (kDa). Mutanten zeigen wie erwartet keinen Mobilitätsunterschied gegenüber dem nicht mutierten α 1LG4 (Wildtyp).

3.6.2 Immunchemische Analysen der α 1LG4-Mutanten

3.6.2.1 Charakterisierung der Mutanten mit einem Antiserum gegen α 1LG4

Die vierzehn Mutanten wurden durch ELISA-Titration mit einem gegen das rekombinante α 1LG4-Fragment gerichteten Antiserum (1060) charakterisiert.

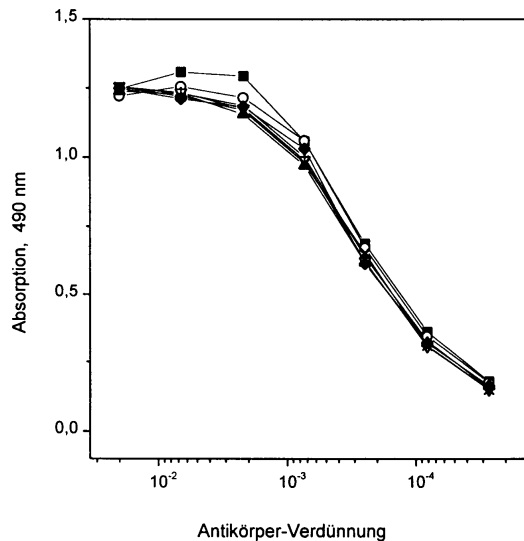


Abb. 34: ELISA-Titration vom Antiserum gegen die α 1LG4-Mutanten. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: ■ α 1LG4, ○ K3, ▲ Y3, □ R2, × K6, × K1.

Abbildung 34 illustriert, daß das α 1LG4-spezifische Antiserum die Epitope der hier gezeigten Mutanten genauso gut erkennt wie die des Wildtyps. Ebenso verhielt sich das Antiserum gegenüber den restlichen Mutanten (hier nicht gezeigt). Dieses Ergebnis reflektiert die generelle Tatsache, daß das Antiserum polyklonal ist und eine begrenzte Mutation, selbst wenn sie ein immunologisches Epitop betreffen sollten, keinen signifikanten Einfluß auf den gesamten Titer hat. Da es in den meisten Fällen konformationsabhängige Epitope sind, zeigt es auch, daß die Mutationen in keiner Weise die korrekte Faltung des Proteins beeinflussen haben.

3.6.2.2 Charakterisierung der Mutanten mit monoklonalen Antikörpern

Die Mutanten wurden in einer ELISA-Titration mit verschiedenen gegen das authentische E3-Fragment gerichteten monoklonalen Antikörpern getestet. Das gleiche Testverfahren wurde schon in Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Zum besseren Verständnis sollen die in diesem Abschnitt erhaltenen Ergebnisse jedoch später präsentiert werden (siehe Abschnitt 3.6.2.2).

3.6.3 Funktionelle Charakterisierung der α 1LG4-Mutanten in Bindungsanalysen

Die vierzehn α 1LG4 Mutanten wurden in Bindungstests mit Heparin, Sulfatiden und α -Dystroglycan untersucht. Die dabei erhaltenen Daten sind in Tabelle 8 zusammengefaßt und durch eine Auswahl von Bindungskurven und ein Chromatogramm illustriert (Abb. 35, 36, 37, 38). Die ursprüngliche Eingrenzung der zu mutierenden Region als auch die Auswahl der Aminosäuren erfolgte auf Grund von Vorversuchen mittels Heparin-Bindung (siehe Abschnitt 3.5). Es war deshalb von Interesse zu vergleichen, ob die gleichen Epitope eine ähnliche Rolle für die Bindung von Sulfatiden und α -Dystroglycan spielen. Für Sulfatide war es durch die Gegenwart von Sulfatgruppen indiziert (Roberts *et al.*, 1986). Bei α -Dystroglycan gab es Hinweise, daß Heparin die Bindung an Fragment E3 inhibiert (Gee *et al.*, 1993; Smalheiser, 1993; Brancaccio *et al.*, 1995).

α 1LG4-Mutanten	Mutationen zu Alanin	Sequenzposition	NaCl(M)	Heparin-BSA-Test (in nM)	Sulfatid-Test (in nM)	α Dystroglycan-Test (in μ M)
α 1LG4	–	–	0,21	24	33	0,13
K1	EYIKRK	(126,127,128)	0,12	>800	835	>3,5
K1/1	EYIKRK	(126)	0,12	27	342	n.b.
K1/2	EYIKRK	(127)	0,16	16	244	n.b.
K1/3	EYIKRK	(128)	0,19	29	80	n.b.
Y1	EYIKRK	(124)	0,21	27	16	0,31
K2	ERKLYL	(154,155)	0,19	73	102	>3,5
Y2	ERKLYL	(157)	0,21	22	18	n.b.
Y3	HYRARN	(165)	0,21	37	22	n.b.
R1	HYRARN	(166,168)	0,21	77	19	2,3
K3	GKGRTK	(101,103,105)	0,18	>800	510	>3,5
K4	LDKDRP	(193,195)	0,21	65	37	1,8
K5	DGKWH	(126)	0,21	24	37	1,3
R2	VDRCY	(204)	0,21	15	30	0,55
K6	TVKTE	(121)	0,21	31	56	1,0

Tab. 8: In der Tabelle zusammengefaßt sind die NaCl-Konzentrationen, bei denen die Mutanten von einer 1 ml Heparinsäule eluiert wurden, sowie die gemittelten Werte für die halbmaximale Sättigung im Heparin-, Sulfatid- und α -Dystroglycan-Test. Zur besseren Übersicht wurden die Daten mit Tabelle 7 verknüpft. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmt.

3.6.3.1 Bindung an Heparin

Die Bindung der Mutanten an Heparin wurde wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ermittelt. Jede der verschiedenen Heparin-Affinitätschromatographien mit den Mutanten wurde mit dem Fragment α 1LG4 kalibriert. Die Elution erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von $0,21 \pm 0,01$ M. Hierbei wurde als erstes die aufgrund der vorangegangenen Experimente auffallende Sequenz IKRKAF untersucht, wobei zuerst die Sequenz **KRK** (Pos. 126-128) zu AAA mutiert wurde. Diese K1-Mutante zeigte eine schwächere Bindung an Heparin und konnte bereits mit 0,12 M NaCl-Konzentration eluiert werden (Abb. 35). Wurden diese Aminosäuresubstitutionen einzeln durchgeführt, zeigte die Änderung von Lysin nach Alanin (K1/1 Mutante, Pos. 126) eine identische Verminderung der Heparin-Bindung (Elution bei 0,12 M NaCl). Die K1/2 Mutante (**R**, Pos. 127) eluierte bei einer Salzkonzentration von 0,16 M NaCl und die K1/3 Mutante (**K**, Pos. 128) bei 0,19 M NaCl. Je eine weitere Dreifach- (K3) und Doppelmutante (K2) zeigten eine stärkere Bindung als die K1-Mutante, jedoch nicht so stark wie α 1LG4. Die Elution der K3-Mutante (**KGRTK**, Pos. 101, 103, 105) konnte bei 0,18 M NaCl und die der K2-Mutante (**RK**, Pos. 154, 155) bei 0,19 M NaCl beobachtet werden. Die Elutionsprofile der Heparin-Affinitätschromatogramme der restlichen elf Mutanten unterschieden sich nicht von α 1LG4. Die Bindungsanalysen der K1-, K2- und K3-Mutanten an der Heparin-Affinitätssäule gaben einen ersten Hinweis, daß drei unterschiedliche, basische Regionen Beiträge zur Heparinbindung leisten. Die in deren Nähe liegenden drei Tyrosine scheinen jedoch für diese Interaktion nicht wichtig zu sein.

Im Ligandenbindungstest mit dem Heparin-Albumin-Konjugat, bei denen die Mutanten als lösliche Liganden eingesetzt wurden, erfolgte der Nachweis der Bindung durch das für α 1LG4 spezifische Antiserum (1060). Die Tests wurden mehrfach wiederholt und als interne Kontrolle wurde jeweils die Bindung von α 1LG4 durchgeführt. Die halbmaximale Bindung wurde für α 1LG4 dabei in 13 Analysen im Konzentrationsbereich von 24 ± 14 nM bestimmt.

Die in Abbildung 36 dargestellten Profile zeigen die Interaktionen ausgewählter Mutanten mit Heparin. Schwache Wechselwirkung wurden für die K1- bzw. K3-Mutanten gefunden, die auch bei 800 nM noch keine halbmaximale Bindung zeigten (Abb. 36A). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den drei Einzelmutanten der K1-Tripelmutante (K1/1, K1/2, K1/3) keine signifikanten Veränderungen der Bindung an Heparin (Tab. 8).

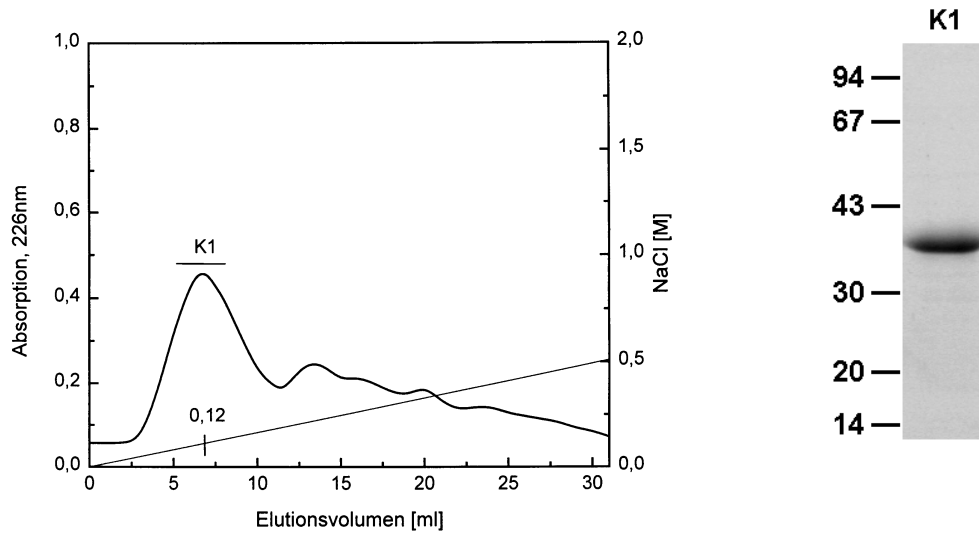


Abb. 35: A (links). Chromatogramm der Heparin-Affinitätssäule der K1-Mutante. Der Balken über dem Peak markiert die zum Pool zusammengefaßte Fraktion, die bei 0,12 M NaCl-Konzentration eluiert wurde. B (rechts). SDS-PAGE derselben Fraktion (K1) (Coomassie-Färbung). Die Balken markieren den Molekulargewichtsstandard (kDa).

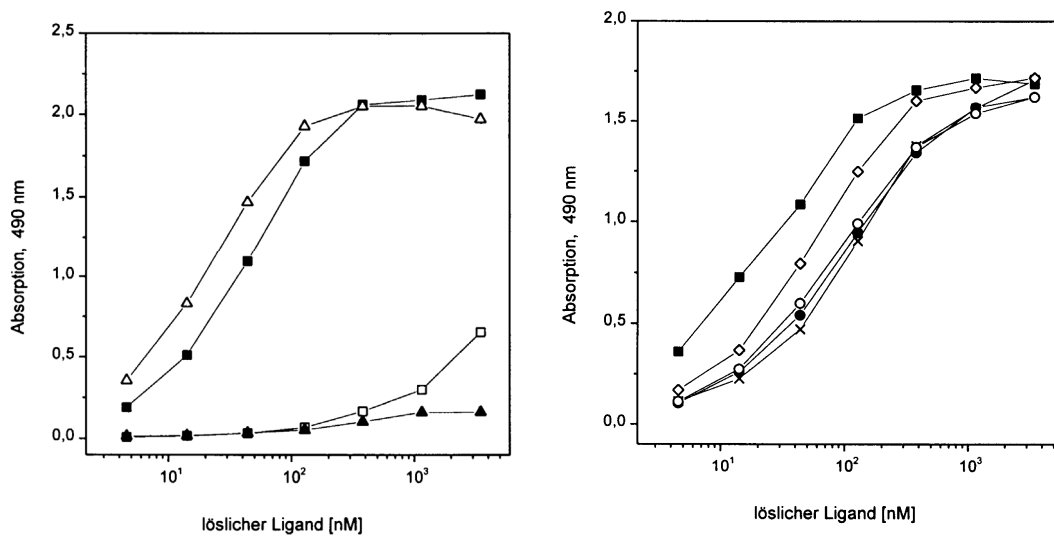


Abb. 36: Bindung der α 1LG4-Mutanten an immobilisiertes Heparin. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: (A, links) ■ α 1LG4 (Kontrolle), □ K3, ▲ K1, △ Y3 (B, rechts) ■ α 1LG4 (Kontrolle), ● K2, × K4, π Y1, ○ R1.

Für die K2-Mutante wurde eine halbmaximale Bindung im Konzentrationsbereich von 73 nM festgestellt. Zwei weitere Mutanten zeigten eine verminderte Interaktion mit Heparin. Dabei handelt es sich um die R1- bzw. K4-Mutante (Abb. 36B).

Die ermittelte Bindung für die R1-Mutante lag im Bereich von 77 nM, für die K4-Mutante von 65 nM. Alle weiteren Mutanten wiesen keine oder vernachlässigbar geringe Abweichungen im Vergleich zu der mit dem α 1LG4-Fragment nachgewiesenen Heparin-Bindung auf (Tab. 8), was am Beispiel der Y3-Mutante in Abbildung 36A und der Y1-Mutante in Abbildung 36B demonstriert wird.

3.6.3.2 Bindung an Sulfatide

Für diese Bindungsanalysen wurden die Mutanten des α 1LG4-Fragments in löslicher Form eingesetzt. Der Nachweis der Bindung erfolgte dabei wie beim Heparin-Test mit dem spezifischen Antiserum 1060. Das zur Kontrolle eingesetzte α 1LG4-Fragment wurde bei jedem Bindungstest mitgeführt. Die für dieses Protein bestimmte halbmaximale Bindung lag im Bereich von 33 ± 6 nM. Aus Abbildung 37A ist ersichtlich, daß die K1-, K2-, und die K3-Mutanten wieder eine schwächere Bindung aufweisen.

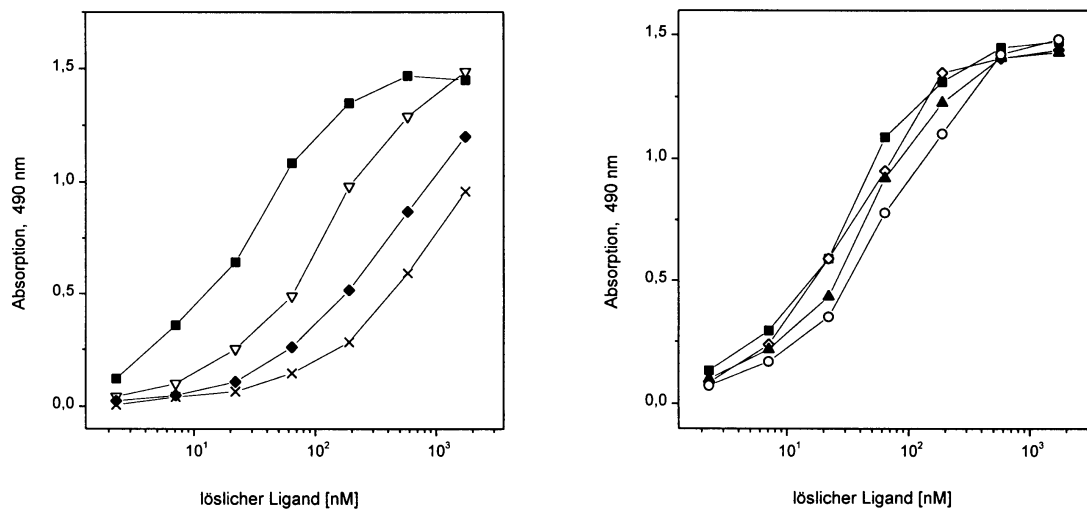


Abb. 37: Bindung der α 1LG4-Mutanten an immobilisierte Sulfatide. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: (A, links) \blacksquare α 1LG4 (Kontrolle), \times K1, π K2, \geq K3, (B, rechts) \blacksquare α 1LG4 (Kontrolle), π K4, \blacktriangledown K5, \circ K6.

Die halbmaximale Bindungskonzentration der K1-Mutante wurde auf 835 nM bestimmt. Die für die K2- bzw. K3-Mutanten ermittelten Werte lagen bei 102 nM bzw. bei 510 nM. Diese nachgewiesenen Bindungsaktivitäten sind eindeutig schwächer als die des nicht mutierten α 1LG4.

Im Gegensatz zum Heparin-BSA-Test zeigten die Einzelsubstitutionen der K1-Tripelmutante eine Verminderung der Sulfatidbindung (Tab. 8). Den größten Effekt erzielte dabei die K1/1-Mutante, deren halbmaximale Bindung bei 342 nM ermittelt wurde, gefolgt von der K1/2-Mutante mit 244 nM und K1/3-Mutante mit 80 nM. Die restlichen acht Mutanten zeigten gegenüber dem α 1LG4-Fragment keine wesentliche Veränderung der Sulfatid-Bindung (Tab.8, Abb. 37B).

3.6.3.3 Bindung an α -Dystroglycan

Die Bindung der Mutanten an α -Dystroglycan wurde wie im Abschnitt 3.4.3 beschrieben ermittelt. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch das α 1LG4 spezifische Antiserum (1060). Als Kontrolle wurde auch hier jeweils die Bindung des nicht mutierten Proteins (α 1LG4) mitbestimmt. Der Wert für die halbmaximale Bindung wurde dabei für einen Konzentrationsbereich von $0,13 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bestimmt. Da nur eine sehr begrenzte Menge an α -Dystroglycan zu Verfügung stand, konnten nicht alle Mutanten auf ihre Bindung untersucht werden. Die in Abbildung 38 dargestellten Profile zeigen die Interaktionen der getesteten Mutanten mit α -Dystroglycan.

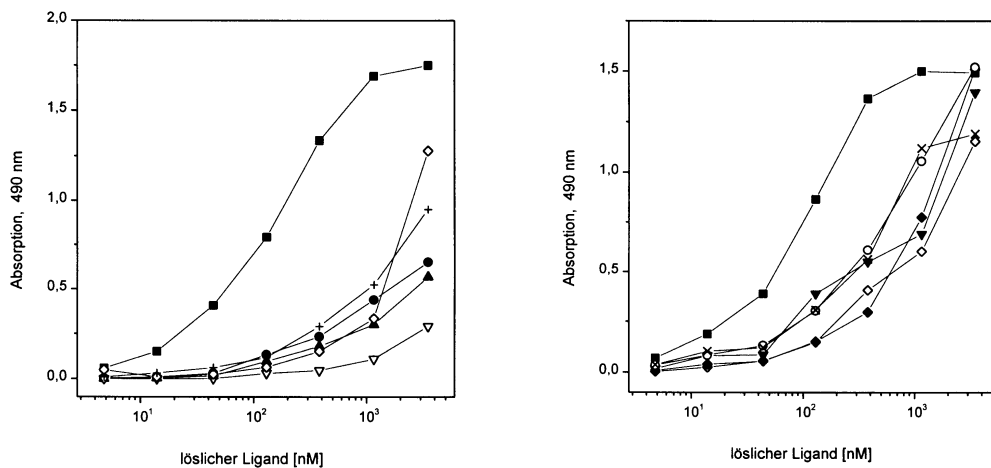


Abb. 38: Bindung der α 1LG4-Mutanten an immobilisiertes α -Dystroglycan. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt: (A, links) ■ α 1LG4 (Kontrolle), ● K1, ▲ K2, □ K3, × K4, +R1, (B, rechts) ■ α 1LG4 (Kontrolle), × K4, ▼K5, □ K6, ○ R2, × Y1.

Sehr schwache Wechselwirkungen wurden bei den K1-, K2- bzw. K3-Mutanten detektiert, die bei 3,5 μM noch keine halbmaximale Sättigung der Bindung zeigten. Auch die Mutanten K4, K5 und R1 wiesen eine verminderte Bindung an α -Dystroglycan auf. Für die K4-Mutante wurde ein Wert von 1,8 μM , für die K5-Mutante von 1,3 μM und für die R1-Mutante ein Wert von 2,3 μM ermittelt (Abb. 38A, 38B). Auch die Mutanten R2 (0,55 μM) und Y1 (0,31 μM) zeigten zwar eine Verminderung der α -Dystroglycanbindung, aber im Vergleich zu den oben erwähnten Mutanten war diese wesentlich geringer (Tab.8, Abb. 38A, 38B).

3.6.3.4 Charakterisierung der Mutanten mit monoklonalen Antikörpern

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 erwähnt, sind die sieben verschiedenen monoklonalen Antikörper ausschließlich gegen das Fragment α 1LG4 gerichtet. Für die meisten dieser monoklonalen Antikörper war gezeigt worden, daß sie die Heparin-Bindung an das α 1LG4-5-Fragment in unterschiedlichen Stärken inhibieren können (Sorokin *et al*, 1992). Um zu klären, ob diese Antikörper direkt gegen die Heparin-Bindungsstellen gerichtet sind oder aber durch sterische Hinderung inhibieren, wurde deren Reaktion mit ausgewählten Mutanten des α 1LG4-Fragments bestimmt, die in den vorangegangenen Bindungstests eine mittlere bis deutlich schwächere Aktivität als Fragment α 1LG4 gezeigt hatten. Hierbei handelt es sich um die K1-, K2-, K3-, K4- und R1-Mutanten. Diese Mutanten wurden im Vergleich zum α 1LG4-Fragment als Kontrolle immobilisiert und mit den sieben monoklonalen Antikörpern (192, 194, 198, 199, 200, 201, 211) titriert. Das ELISA-Profil in Abbildung 39 zeigt beispielhaft die Ergebnisse, die mit zwei ausgewählten monoklonalen Antikörpern (198, 199) erhalten wurden.

Die halbmaximale Bindung des Antikörpers 198 variierte sowohl für α 1LG4 als auch für die K1-, K4- und R1-Mutanten nur um einen Faktor zwei bis drei, d.h. war nahezu identisch. Im Gegensatz dazu konnte nur eine schwache Reaktion mit den K2- und K3-Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 39A). Die geringe Reaktion des Antikörpers mit diesen beiden Mutanten legt die Vermutung nahe, daß in beiden Proteinen das Epitop für diesen Antikörper aufgrund der eingeführten Alanin-Mutationen verändert worden ist.

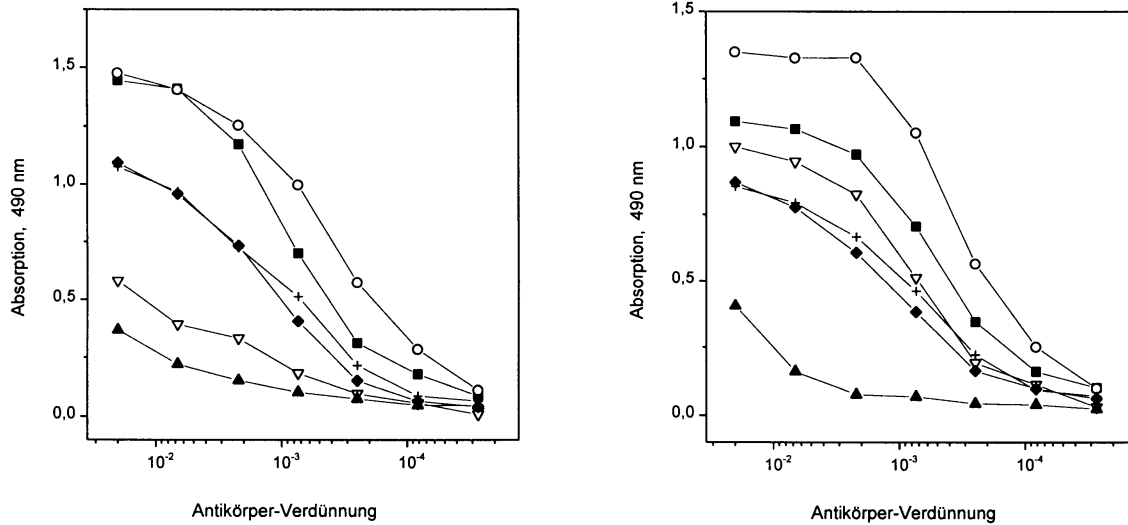


Abb.

39: ELISA-Titration der monoklonalen Antikörper gegen α 1LG4-Mutanten. (A, links) monoklonaler Antikörper 198, (B, rechts) 199. Die getesteten Proteine sind durch folgende Symbole dargestellt. ■ α 1LG4 (Kontrolle), ○ K1, □ K2 ▲ K3, ▽ K4, + R1.

Die in Abbildung 39B dargestellten ELISA-Profile zeigen, daß der monoklonale Antikörper 199 sein Epitop in den K1-, K4- und der R1-Mutanten noch stark bindet und dieses Epitop in der K3-Mutante wie bei dem Antikörper 198 verändert worden ist. Im Gegensatz zum Antikörper 198, reagiert aber der Antikörper 199 auch stark mit der K2-Mutante. Dies deutet darauf hin, daß die Antikörper 199 und 198 verschiedene jedoch überlappende Epitope innerhalb α 1LG4 erkennen.

Von sieben monoklonalen Antikörpern, die getestet wurden, wiesen drei (194, 201, 211) ein zu dem Antikörper 199 identisches Bindungsverhalten auf (Abb. 39B). Die Bindungsprofile der restlichen zwei monoklonalen Antikörper 192 und 200 waren denen des monoklonalen Antikörpers 198 ähnlich.