

Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern der Matriline

Inaugural-Dissertation



zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Henning Mann
aus Leverkusen

Köln, im März 2006

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Paulsson

und

Prof. Dr. rer. nat. H. W. Klein

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2006

„Es gibt kein so schlechtes Buch, sagte der Baccalaureus, worin nicht
irgendetwas Gutes stände“

Der sinnreiche Junker Don Quijote de La Mancha, Miguel de Cervantes Saavedra

Für meine Liebste, mein Söhnchen, meine Eltern.

Ruth, Nicolas, Margret, Günter

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE MATRILINE.....	1
1.1.1 Modulare Domänenstruktur der Matriline	1
1.1.2 Oligomerisierung und Prozessierung der Matriline.....	4
1.1.3 Gewebeverteilung der Matriline in der Maus	6
1.1.4 Interaktionspartner der Matriline und potentielle Funktionen.....	7
1.1.5 Matriline und Pathophysiologie des Knorpels.....	8
1.2 DIE ASSEMBLIERUNG DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX	8
1.3 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN	13
1.3.1 Bindungsversuche im ELISA-ähnlichen Stil	13
1.3.2 Oberflächen Plasma Resonanz (SPR).....	14
1.3.3 Isotherme Titrationskalorimetrie	16
1.3.4 Analytische Ultrazentrifugation	18
1.4 AUFGABENSTELLUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIAL.....	22
2.1.1 Standardpuffer.....	22
2.1.2 Bakterien und Nährmedien.....	23
2.1.3 Expressionsvektoren	23
2.1.4 Oligonukleotide.....	24
2.1.5 Enzyme	24
2.1.6 DNA-Längenstandard und Protein-Molekulargewichtsstandards.....	25
2.1.7 Antikörper	25
2.1.8 Säugerzellen	26
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
2.2.1 Klonierungsstrategie.....	26
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	28
2.2.4 Elution aufgetrennter DNA aus Agarosegelen.....	28
2.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	28

2.2.6	Restriktionsverdau von DNA	28
2.2.7	Ligation von DNA	29
2.2.8	Sequenzierung von DNA	29
2.2.9	Herstellung von Bakterienkulturen.....	30
2.2.10	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	30
2.2.11	Transformation von Bakterien	31
2.2.12	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	31
2.2.13	Präzipitation von DNA (Ethanol-fällung)	31
2.3	ZELLKULTURARBEITEN.....	31
2.3.1	Kultivierung von Zellen	31
2.3.2	Nährmedien von Zellen	32
2.3.3	Expansion von Zellen und Ernte von Zellkulturüberständen	32
2.3.4	Transfektion von HEK-293 EBNA Zellen.....	32
2.3.5	Kryokonservierung von Zellen	33
2.3.6	Ernte serumfreier, konditionierter Überstände.....	33
2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	33
2.4.1	Sequentielle Extraktion von Matrilin-1	33
2.4.2	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mittels StrepII-Markierung	35
2.4.3	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mittels His _{6/8} -Markierung.....	35
2.4.4	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	36
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	37
2.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.4.7	Coomassie Färbung von Proteinen	38
2.4.8	Western Blot	38
2.4.9	Biotinylierung von Glykosaminoglykanen	40
2.4.10	Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD)	40
2.5	BINDUNGSSTUDIEN	41
2.5.1	ELISA-ähnliche Versuche.....	41
2.5.1.1	ELISA-ähnliche Versuche mit Integrin Ektodomänen	42
2.5.2	Oberflächen Plasma Resonanz (SPR)	42
2.5.2.1	Verwendete Chips.....	42
2.5.2.2	Vortests.....	42
2.5.2.3	Kopplung.....	43
2.5.2.4	Messung	43
2.5.3	Zellanhaftungs-Versuche.....	44
2.5.4	Zellanhaftungs-Versuche mit Fluoreszenzfärbung fokaler Kontakte	44

3	ERGEBNISSE	46
3.1	IDENTIFIKATION VON MATRILIN-BINDUNGSPARTNERN	46
3.1.1	Native Isolation und rekombinante Expression von Matrilinen	46
3.1.2	Durchmusterung möglicher Matrilin-Bindungspartner mit Bindungs- versuchen im ELISA-ähnlichen Stil	49
3.1.3	Gelfiltration von bovinem Knorpelextrakt.....	51
3.1.4	Titration der Bindung zwischen Matrilin-4 und COMP bzw. Decorin	53
3.1.5	Bestimmung des Einflusses divalenter Kationen auf die Konformation der Matrilin VWA Domäne	54
3.1.6	Identifikation einer matrilinbindenden Aminosäuresequenz in Kollagen III	56
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER MATRILIN-4 – COMP BINDUNG	57
3.2.1	Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilin-4 und COMP Proteinen	58
3.2.2	Bindungsstudien von Vollängen Matrilin-4 und seinen kleineren Fragmenten an Vollängen COMP und seinen kleineren Fragmenten im ELISA-Stil	62
3.2.3	Identifikation der interagierenden Domänen von Matrilin-4 und COMP mit Oberflächen Plasma Resonanz (SPR) Technologie	65
3.2.3.1	Kovalente Kopplung von Proteinen auf Biacore® CM5 Chips	65
3.2.3.2	Messungen von Bindungen verschiedener Matrilin und COMP Proteine...	66
3.2.4	Quantifizierung der gemessenen Bindungen zwischen Matrilin-4 und COMP Proteinen	79
3.3	STUDIEN ZUR INTERAKTION VON MATRILINEN MIT ZELLULÄREN REZEPTOREN	82
3.3.1	Anhaftung von Zellen auf immobilisierten Matrilinen	82
3.3.2	Bindungen von Matrilinen an $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin Ektodomänen	83
3.3.3	Bindungen von Matrilinen an Proteoglykane	85
3.3.4	Interaktionen von $\beta 1$ -Integrin und Glykosaminoglykan defizienten Zelllinien mit Matrilin-3	89
4	DISKUSSION	93
4.1	IDENTIFIZIERUNG VON MATRILIN-BINDUNGSPARTNERN	93
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER MATRILIN – COMP BINDUNG	96
4.2.1	Bewertung der kinetischen Analysen der Matrilin-4 – COMP Bindung	102
4.2.2	Vergleich der Bindungsprofile kollagener und nicht-kollagener Bindungspartner	104

4.2.3	Rolle der Matrilin-3 – COMP Wechselwirkung bei der Entstehung von MED.....	105
4.3	WECHSELWIRKUNGEN VON MATRILINEN MIT ZELLULÄREN REZEPTOREN	107
4.4	ÜBERSICHT ÜBER DIE QUERVERNETZUNG DER MATRIXKOMPONENTEN DURCH DIE MATRILINE.....	110
4.5	AUSBLICK	112
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
6	ABSTRACT	114
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
	DANKSAGUNG	124
	TEILPUBLIKATIONEN	125
	ERKLÄRUNG	126
	LEBENS LAUF	127

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BSA	bovines Serumalbumin
CC	<i>coiled-coil</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
Chad	Chondroadherin
CMP	<i>cartilage matrix protein</i> , auch: Matrilin-1
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FACIT	<i>fibril associated collagens with interrupted triple-helices</i>
FCS	fötales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GAG	Glykosaminoglykan
HRP	Meerrettichperoxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
LB	Luria Bertani
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption and ionisation – time of flight</i>
MED	Multiple epiphysäre Dysplasie
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
p. c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRELP	<i>proline- and arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
Resp. Diff.	<i>response difference</i> , Signaldifferenz
Rmax	<i>maximal Response</i> , maximale Signaldifferenz

RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance units</i>
SLRP	<i>small leucine rich repeat protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächen Plasma Resonanz)
SV	Säulenvolumen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TSP	Thrombospondin
VWA	von Willebrand Faktor A-ähnliche (Domäne)
ZBA	Zentrale Bioanalytik des ZMMK
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin, Köln

1 Einleitung

1.1 Die Matriline

Die Matriline sind eine aus vier Mitgliedern bestehende Familie nicht-kollagener Proteine der extrazellulären Matrix. Sie bilden eine Unterfamilie der Proteine, die von Willebrand Faktor A (VWA) ähnliche Domänen enthalten (zur Übersicht s. Whittaker und Hynes, 2002) und kommen ausschließlich in Vertebraten vor. Da die Genome einiger Vertebraten inzwischen vollständig sequenziert wurden, ist es nahezu ausgeschlossen, dass noch weitere Matriline existieren (Wagener *et al.*, 2005).

1.1.1 Modulare Domänenstruktur der Matriline

Die Primärstruktur ist bei allen Matrilinen ähnlich und modular aufgebaut. Zwei VWA Domänen sind durch eine variierende Anzahl von epidermalen Wachstumsfaktor- (*epidermal growth factor*, EGF) ähnlichen Domänen miteinander verbunden (Abb. 1.1). C-terminal der VWA Domänen liegt eine α -helikale *coiled-coil* Domäne, die eine Oligomerisierung der Untereinheiten in einer „bouquet“-förmigen Struktur erlaubt. Im Fall des Matrilin-3 fehlt die zweite VWA Domäne, hier schließt sich die *coiled-coil Domäne* direkt an die EGF-ähnlichen Domänen an. Matrilin-2 und -3 enthalten an ihrem N-Terminus außerdem eine kurze, positiv geladene Aminosäuresequenz von sechs bzw. sieben positiv geladenen Argininresten. Einzigartig für Matrilin-2 ist ein 75 Aminosäuren umfassendes Modul zwischen der VWA2 Domäne und der Oligomerisierungsdomäne, dessen Aminosäuresequenz keine Homologie zu bekannten Domänen anderer Proteine aufweist und daher als „*unique*“-Sequenz bezeichnet wird.

VWA Domänen bestehen aus ca. 200 Aminosäuren und zeigen in ihrer Sekundärstruktur eine klassische Rossmann-Faltung mit einem zentralen, von α -Helices umgebenen β -Faltblatt. Sie kommen in einer Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix vor, so z.B. in verschiedenen Kollagenen, WARP und AMACO (Whittaker und Hynes, 2002). Fast alle VWA Domänen zeigen ein konserviertes MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) Motiv (DXSXSXnTXnD), welches die Koordination von divalenten Kationen vermittelt und an der Bindung von Liganden der VWA Domänen beteiligt ist (Lee *et al.*, 1995). Dies indiziert, dass die VWA Domänen die primären Interaktionsmodule der Matriline sein könnten, eine Möglichkeit, die noch dadurch

bestärkt wird, dass im Zebrafärbling *Danio rerio* Matrilin-1- und -3- Spleißvarianten existieren, die keine EGF Domänen tragen.

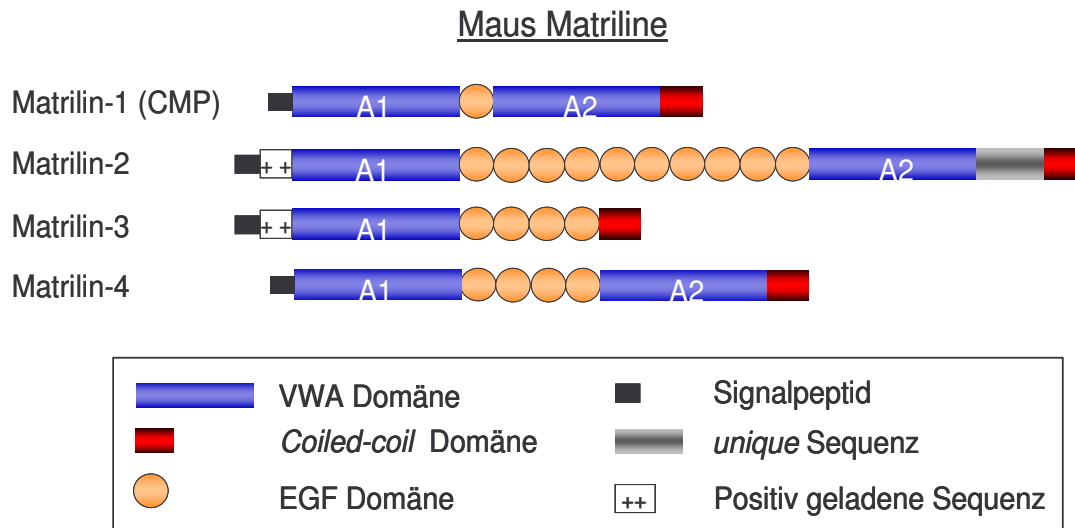


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der modularen Domänenstruktur der Matriline (CMP, *cartilage matrix protein*)

Alle anderen Matriline enthalten zumindest eine EGF-ähnliche Domäne. Diese liegen häufig in mehrfachen Kopien vor und bestehen aus jeweils 40 bis 50 Aminosäureresten, die eine doppelsträngige β -Faltblattstruktur formen, die von drei konservierten Disulfidbrücken stabilisiert wird. Sind EGF Domänen an Bindungen zu Proteinliganden beteiligt, so wird diese Bindung häufig über ein gebundenes Calciumion vermittelt (Rao *et al.*, 1995). In den EGF Domänen der Matriline sind jedoch weder die Schlüsselaminosäuren der Konsensussequenz dieses Calciumbindungsmotivs (Handford *et al.*, 1991), noch nicht-kanonische Calciumbindungsstellen von EGF Domänen anderer Proteine (Malby *et al.*, 2001) konserviert.

Coiled-coil Domänen sind durch repetitive Heptad-Sequenzen (a-g) gekennzeichnet, deren Positionen a und d typischerweise von unpolaren Aminosäureresten ausgefüllt werden. Diese erlauben eine Aneinanderlagerung mehrerer *coiled-coil* Domänen auf Grund hydrophober Wechselwirkungen. Die *coiled-coil* Domänen der Matriline bestehen aus 4,5 Heptadsequenzen, von denen die von Matrilin-3 die geringste Übereinstimmung mit der Konsensussequenz zeigt.

Matrilin-1 wurde erstmals an Aggrecan gebunden aus bovinem Knorpel isoliert und initial als *cartilage matrix protein* (CMP) bezeichnet (Paulsson und Heinegård, 1979). Jede Untereinheit weist einen vermutlich N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrat-

anteil von 3,9% auf und hat ein Molekulargewicht von 52 kDa (Paulsson und Heinegård, 1981). Die beiden VWA Domänen sind nur durch eine einzelne EGF-ähnliche Domäne miteinander verbunden (Kiss *et al.*, 1989). Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen mit nativ aus Gewebe isoliertem Matrilin-1 haben gezeigt, dass es Homotrimere bildet (Paulsson und Heinegård, 1981; Hauser und Paulsson, 1994). Dabei konnten die Strukturen der einzelnen VWA Domänen der Untereinheiten nicht aufgelöst werden, was auf eine mögliche Interaktion der VWA1 und VWA2 Domänen hinweist. Mittels NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die *coiled-coil* Domänen von Matrilin-1 eine parallele, über Disulfidbrücken stabilisierte, dreisträngige α -Helix bilden (Dames *et al.*, 1998).

Matrilin-2 ist mit zehn EGF Domänen zwischen den beiden VWA Domänen das größte Matrilin, es hat ein berechnetes Molekulargewicht von 104,3 kDa, bildet Homotetramere und ist ebenfalls N-glykosyliert (Deak *et al.*, 1997; Piecha *et al.*, 1999). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein ringförmiges Erscheinungsbild der Untereinheiten, was jeweils eine Bindung der VWA1 Domänen an die VWA2 Domänen andeutet.

Matrilin-3 fehlt die VWA2 Domäne. Mit nur einer VWA Domäne ist es das kleinste Familienmitglied, es bildet Homotetramere und ist häufig ko-exprimiert mit Matrilin-1 (Wagener *et al.*, 1997; Klatt *et al.*, 2000; Wagener *et al.*, 2000). Matrilin-3 hat vier EGF Domänen, sein Molekulargewicht liegt bei 49,3 kDa und es weist keine Glykosylierungen auf. Auf Grund der fehlenden zweiten VWA Domäne kann es in den Matrilin-3 Untereinheiten kaum zu intramolekularen Wechselwirkungen kommen, so zeigen auch elektronenmikroskopische Aufnahmen ein tetrameres Matrilin-3 mit relativ gestreckten Armen.

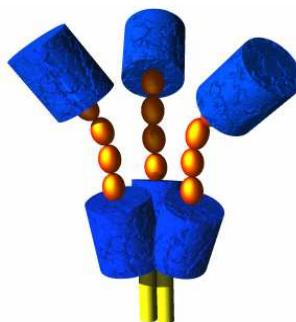


Abb. 1.2: Modellhafte Darstellung eines trimeren Matrilin-4 Proteins.

Murines Matrilin-4 besitzt, wie Matrilin-3, ebenfalls vier EGF Domänen, das humane Matrilin-4 zeigt jedoch nur drei EGF Domänen (Wagener *et al.*, 1998a; Wagener *et al.*, 1998b; Klatt *et al.*, 2001). Das rekombinante Maus-Protein hat ein Molekulargewicht von 72,9 kDa welches von dem theoretischen Gewicht von 66,4 kDa abweicht. Dies

weist darauf hin, dass ca. 7% seiner Masse als posttranslationale Modifikationen vorliegen (Klatt *et al.*, 2001). Matrilin-4 erscheint als ein homotrimeres Protein (Abb. 1.2) mit gestreckten Untereinheiten, dessen VWA Domänen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Interaktionen miteinander zeigen.

1.1.2 Oligomerisierung und Prozessierung der Matriline

Die Matriline oligomerisieren mittels ihrer C-terminalen *coiled-coil* Domänen. Die oligomeren Formen werden durch Disulfidbrücken stabilisiert, die von jeweils unmittelbar N-terminal der *coiled-coil* Domäne lokalisierten Cysteinresten gebildet werden. Biochemische und elektronenmikroskopische Versuche mit Volllängen Matrilinen zeigen Homotrimere für Matrilin-1 und -4 (Paulsson und Heinegård, 1981; Hauser und Paulsson, 1994; Klatt *et al.*, 2001) und Homotetramere für Matrilin-2 und -3 (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000) (Abb. 1.3).

Die Oligomerisierung wurde außerdem auch mit rekombinant exprimierten *coiled-coil* Domänen untersucht (Frank *et al.*, 2002). Die Analyse der Oligomerisierung in Mischungen solcher *coiled-coil* Domänen zeigte ein breites Spektrum möglicher heterooligomerer Interaktionen mit fast allen denkbaren Matrilin-*coiled-coil*-Kombinationen, darunter Matrilin-1/-2, -1/-4, -1/-2/-4 und -2/-4 Heterotrimere und Matrilin-1/-3 Heterotetramere. Nur heterooligomere Mischungen von Matrilin-2- und -3- oder Matrilin-3- und -4 konnten nicht gefunden werden. *In vivo* konnten Heterooligomere von Matrilin-1 und -3 in fötalem Knorpel des Menschen und aus dem Rind nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 1998; Klatt *et al.*, 2000; Kleemann-Fischer *et al.*, 2001). Die Bedeutung der Heterooligomerisierung der Matriline ist unklar.

Alle Matriline, vor allem aber Matrilin-2 und -4 zeigen in Elektronenmikrografien oder nach SDS-PAGE ein sehr heterogenes Erscheinungsbild. Zusätzlich zu den Volllängen-Proteinen gibt es auch Fragmente, denen eine oder mehrere Untereinheiten fehlen (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2001). Für Matrilin-2 und -3 wurden außer den Homotetrameren auch Mono-, Di- und Trimere gefunden, für Matrilin-4 konnte gezeigt werden, dass es außer in der trimeren Form auch als Monomer und Dimer vorliegt (Abb. 1.3). Das Auftreten dieser weniger oligomerisierten Matriline ist auf eine proteolytische Prozessierung zurückzuführen (Klatt *et al.*, 2001). Die Analyse von Matrilin-3 und -4-Fragmenten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Edman-Sequenzierung lokalisierte die Prozessierung auf eine Stelle in der kleinen Verbindungsregion N-terminal der *coiled-coil* Domäne. Dort konnte die Peptidbindung hinter dem in allen Matrilinen konservierten „EE“-Motiv als eine Schnittstelle für Proteasen identifiziert werden (Ehlen, Dissertation, 2005). Die Prozessierung führt zu

beinahe vollständigen, monomeren Untereinheiten und dem verbleibenden Teil des Moleküls, bestehend aus der (immer noch trimeren) *coiled-coil* Domäne zusammen mit den verbliebenen Untereinheiten. Die Prozessierung kann anschließend mit der Freisetzung weiterer Untereinheiten fortgeführt werden, bis nur noch die *coiled-coil*-Region übrig bleibt (Klatt *et al.*, 2001; Ehlen, Dissertation, 2005). Es ist auffällig, dass die Verbindungsregion in Matrilin-1, welches die am geringsten ausgeprägte Prozessierung zeigt, am kürzesten ist. Zumindest für Matrilin-4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Prozessierung auch *in vivo* vorkommt und, wie für rekombinantes Matrilin-4 bereits *in vitro* gezeigt, vermutlich bereits intrazellulär abläuft (Klatt *et al.*, 2001, Ehlen, Dissertation, 2005).

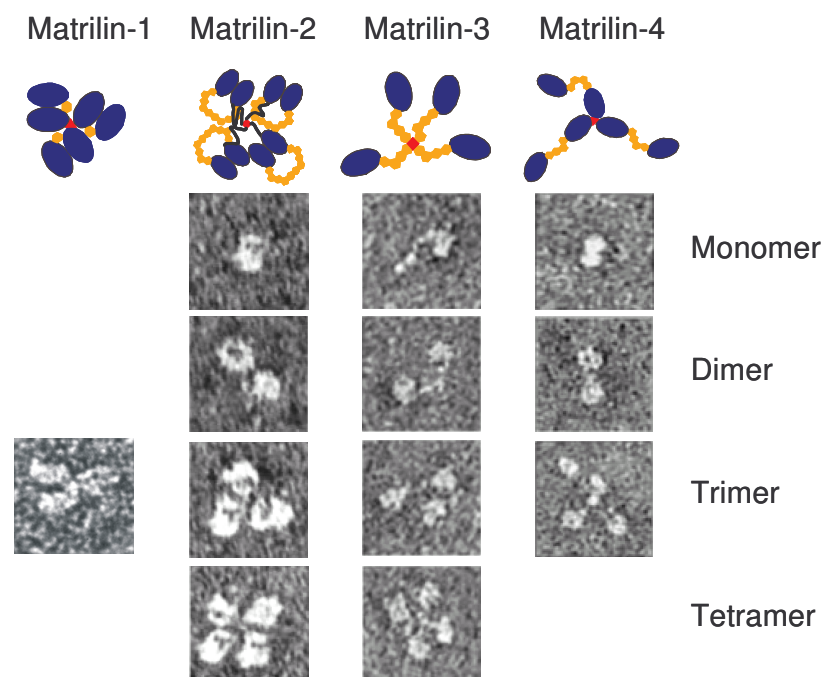


Abb: 1.3: Elektronenmikrographien der Matriline. Die Elektronenmikrographien zeigen nativ extrahierte Matrilin-1 Trimere und unterschiedlichen Oligomere der rekombinanten Matrilin-2, -3 und -4. Die Modelle wurden in Anlehnung an die Aufnahmen der Trimere (Matrilin-1 und -4) bzw. Tetramere (Matrilin-2 und -3) erstellt. *Coiled-coil* Domänen sind rot, VWA Domänen blau, EGF Domänen orange und die „unique“ Sequenz (Matrilin-2) ist schwarz dargestellt.

Fotos übernommen aus Hauser & Paulsson, 1994; Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2000; Modelle verändert übernommen aus Nitsche, Dissertation, 2001.

Ergänzend zu der beschriebenen Oligomerisierung und Prozessierung sind für die Matriline auch alternative Spleißvarianten beschrieben. Da die genomischen Exon/Intron-Grenzen größtenteils mit den Domänengrenzen übereinstimmen, erlaubt eine alternativ gespleißte mRNA eine Variation der Matrilin-Domänenstruktur. In

Säugetern wurden solche Variationen bisher nur für Matrilin-2 und -4 beschrieben. Im Fall von Matrilin-2 ist die Spleißvariante in der „*unique*“ Sequenz um 19 Aminosäuren verkürzt und verliert damit auch einen ungepaarten Cysteinrest, der ansonsten an der Bildung einer Disulfidbrücke beteiligt sein könnte (Deak *et al.*, 1997; Piecha *et al.*, 1999; Muratoglu *et al.*, 2000). Den murinen Spleißvarianten von Matrilin-4 fehlt entweder die VWA1 Domäne (Wagener *et al.*, 1998a), oder, im Fall des humanen Matrilin-4, fehlen ein oder zwei EGF Domänen (Wagener *et al.*, 1998b).

1.1.3 Gewebeverteilung der Matriline in der Maus

Alle vier Matriline sind in der extrazellulären Matrix von skeletalen Geweben präsent, allerdings liegen Matrilin-1 und -3 in diesen Geweben in wesentlich größeren Mengen vor als Matrilin-2 und Matrilin-4. Des Weiteren ist die Expression der Matriline sowohl in zeitlicher als auch in räumlicher Hinsicht streng reguliert.

Sowohl Matrilin-1 als auch -3 werden fast ausschließlich im Knorpelgewebe exprimiert und beide sind bereits sehr früh (ab Tag 12,5 p.c.) im kondensierenden Mesenchym nachweisbar. Ihre Expressionsmuster ähneln mit fortschreitender Skelettentwicklung dem von Kollagen II, in späteren Stadien der Entwicklung sind diese Matriline jedoch eher in tieferen Schichten des artikulären Knorpels als an dessen Oberfläche nachweisbar (Segat *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2002). Beide sind in den Wachstumsfugen von Mäusen sowohl im ruhenden, als auch im proliferierenden und hypertrophen Knorpel vorhanden (Klatt *et al.*, 2002), wobei die Expression der Matrilin-1 mRNA in späteren Stadien der Hypertrophie der Chondrozyten herunterreguliert wird (Aszódi *et al.*, 1996). Mit einsetzender Calcifizierung werden Matrilin-1 und -3 in den verknöchernenden Knorpel fest eingebaut. Die Expression von Matrilin-1 bleibt auch später in allen Knorpelgeweben kontinuierlich erhalten, die Expression von Matrilin-3 wird jedoch nach der Geburt eingestellt (Klatt *et al.*, 2002). Möglicherweise erfolgt die Matrilin-3 Biosynthese zwar früh in der Entwicklung, bleibt das Protein aber auf Grund einer sehr langen Halbwertszeit und eines sehr geringen Abbaus im Gewebe fortwährend bestehen.

Die Gewebeverteilung von Matrilin-2 und -4 ist jeweils wesentlich breiter als die von Matrilin-1 und -3. Obwohl sie ebenfalls im Knorpel vorhanden sind, kommen beide in grösseren Mengen in lockeren Bindegeweben vor. Die Expression von Matrilin-2 ist erstmalig ab Tag 10,5 p.c. im Herzen nachzuweisen, danach wird es von einem breiten Spektrum von Bindegewebszellen, glatten Muskelzellen und einigen epithelialen

Gewebe exprimiert (Piecha *et al.*, 1999). Matrilin-2 wird in der perizellulären Matrix dieser Zellen eingelagert und konnte in einigen Fällen auch mit der Basalmembran assoziiert gezeigt werden. Es ist aber unklar, ob es eine Funktion als integrales Basalmembranprotein hat. In skeletalen Bereichen ist es nur regional und in kleinen Mengen zu finden. Insgesamt zeigt Matrilin-2 eine zu Matrilin-1 und -3 komplementäre Expression.

Matrilin-4 hingegen ist nahezu ubiquitär exprimiert. Es kann bereits ab dem Tag 7,5 p.c. im ekto-plazentalen Konus nachgewiesen werden und ist überall dort präsent, wo auch andere Matrilin exprimiert werden, dabei ist die Expressionsrate des Matrilin-4 in Nervengewebe höher als die aller anderen Matrilin (Klatt *et al.*, 2001).

Die Gewebeverteilung der Matrilin wurde auch im Menschen (Mundlos und Zabel, 1994, Kleemann-Fischer *et al.*, 2001), Huhn (Stirpe und Goetinck, 1989; Belluoccio und Trueb, 1997) und Zebrafisch (Ko *et al.*, 2005) untersucht und die Ergebnisse weisen auf hoch konservierte Expressionsmuster hin.

1.1.4 Interaktionspartner der Matrilin und potentielle Funktionen

Matrilin-1 wurde erstmals in Komplexen mit Aggrecan identifiziert (Paulsson und Heinegard, 1979). Die Bindung erfolgte durch Protein-Protein-Interaktionen von Matrilin-1 mit der verlängerten Chondroitinsulfat-Anheftungsregion von Aggrecan und es konnte gezeigt werden, dass es dabei auch zu kovalenten, teilweise nicht reduzierbaren Verknüpfungen zwischen dem Aggrecan-Kernprotein und Matrilin-1 kommt (Hauser *et al.*, 1996).

Für Matrilin-1 konnte eine Assoziation mit Kollagenfibrillen im Knorpel gezeigt werden (Winterbottom *et al.*, 1992) und Zellkulturexperimente mit Chondrozyten offenbarten für alle Matrilin eine Beteiligung sowohl an Kollagen abhängigen als auch an Kollagen unabhängigen, perizellulären Netzwerken. Für Matrilin-2 und -4 konnte eine Beteiligung an solchen Netzwerken auch bei anderen Zellen gezeigt werden (Chen *et al.*, 1995; Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2001). Mittels Immunogolddetektion wurde die Anwesenheit von Matrilin-1, -3 und -4 in nativ extrahierten, Kollagen VI-assozierten, molekularen Komplexen beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass die kleinen, leucinreichen Proteine Decorin und Biglycan eine Verbindung zwischen den N-terminalen Domänen von Kollagen VI und den Matrilinen herstellen. Diese wiederum verbinden die gebildeten Komplexe mit Kollagen II-Fibrillen und dem Aggrecan-Kernprotein (Wiberg *et al.*, 2003). Darüberhinaus waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine durch Matrilin vermittelten Wechselwirkungen bekannt.

1.1.5 Matrilin und Pathophysiologie des Knorpels

Für Mutationen in Matrilin-3 konnten Verbindungen zu der autosomal dominanten multiplen epiphysären Dysplasie (MED) gezeigt werden. MED zeigt ein relativ mildes Krankheitsbild der Osteochondrodysplasie, das durch eine verspätete und gestörte Ossifikation der Epiphysen und früh einsetzende Osteoarthrose gekennzeichnet ist (Chapman *et al.*, 2001). Die MED-verursachenden Mutationen betreffen meistens die konservierten β -Faltblätter der VWA Domäne (Jackson *et al.*, 2004; Mabuchi *et al.*, 2004). Weitere MED-verursachende Mutationen sind für die Gene von COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*, Briggs *et al.*, 1995) und die α 1-, α 2- und α 3-Ketten von Kollagen IX beschrieben (Muragaki *et al.*, 1996; Paassilta *et al.*, 1999; Czarny-Ratajczak *et al.*, 2001). Interessanter Weise zeigen Mutationen in allen drei Proteinen (Matrilin-3, COMP, Kollagen IX) einen ähnlichen Phänotyp. Mutationen in der Nähe der Matrilin-3 VWA Domäne verursachen außerdem bilaterale, vererbte mikroepiphysäre Dysplasie (BHMED) (Mostert *et al.*, 2003), welche einen ähnlichen, skeletalen Phänotyp zeigt wie MED; eine Mutation in der ersten EGF Domäne von Matrilin-3 verursacht die rezessiv vererbte, spondylo-epi-metaphysiale Dysplasie (SEMD) (Borochowitz *et al.*, 2004). Für eine andere, ebenfalls die erste EGF Domäne von Matrilin-3 betreffende Mutation, konnte eine Verbindung zur Degeneration der Bandscheiben (Min *et al.*, 2006) und Osteoarthrose der Hand gezeigt werden (Stefansson *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004).

1.2 Die Assemblierung der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus einer Vielzahl von sekretierten, extrazellulären Makromolekülen, welches alle Zellen in den Geweben höherer Organismen dicht umgibt und direkt sowohl an Epithel- als auch an Endothelgewebe grenzt. Sie stabilisiert die Zell- und Gewebeverbunde und hat durch die Bildung von Knochen, Haut, Sehnen, Knorpel und Bindegewebe eine stützende und stabilisierende Funktion innerhalb des Organismus. Als Bindegewebe bildet sie ein Netzwerk, durch das Zellen migrieren und miteinander interagieren können oder bietet die Grundlage für die Verankerung von Zellen durch Zell-Matrix Interaktionen. Der größte Teil der Makromoleküle wird von den Zellen innerhalb der extrazellulären Matrix, wie z.B. den Fibroblasten oder Chondrozyten, selbst produziert. Die beiden Hauptklassen sezernierter Makromoleküle sind Polysaccharidketten der Klasse der Glykosaminoglykane, die üblicherweise kovalent an Protein gebunden als Proteoglykane vorliegen, und fibrilläre Proteine, die sowohl strukturelle als auch anhaftende Funktionen innehaben.

Die strukturelle Vernetzung der extrazellulären Matrix beruht auf eng verknüpften, fibrillären Polymeren (Kollagene, Elastin), die ein dichtes, zugfestes und elastisches Netzwerk bilden. Die auf die extrazelluläre Matrix wirkenden Kräfte werden außerdem von den in großen Mengen in der Matrix enthaltenen Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen (z.B. Aggrecan) getragen. Diese sind bei physiologischem pH stark negativ geladen und stark hydrophil. So können sie große Mengen von Kationen und deren voluminöse Wasserhüllen an sich binden und die hoch hydrierte, gelartige Grundsubstanz der extrazellulären Matrix bilden, in die die fibrillären Komponenten eingebettet sind (Jackson *et al.*, 1991). Auf diese Weise kann die wässrige Phase des Polysaccharidgels Druckkräfte, und die kollagene Phase Zugkräfte auf die Matrix kompensieren (Birk *et al.*, 1991; Hay, 1991). Während der Entstehung der Kollagenfibrillen und bei ihrer späteren Vernetzung sind zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix nötig, z.B. mit fibrillenassoziierten Kollagenen (*fibril associated collagens with interrupted triple-helices*, FACIT). FACIT-Kollagene können Kollagenfibrillen untereinander verbinden und außerdem als Adapter für weitere, die Vernetzung fördernde Komponenten dienen, so z.B. für Proteoglykane und strukturelle Glykoproteine wie Fibronectin, Thrombospondine, Matrilin und Fibrilline (Yamagata *et al.*, 1992; Watt *et al.*, 1992; van der Rest *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 2004). Diese Komponenten tragen durch ihre Bindungen an fibrilläre Kollagene und möglicherweise auch FACIT-Kollagene zu der Vernetzung der fibrillären Matrix bei. Kleine, leucinreiche Proteine (*small leucine rich repeat protein*, SLRP) (Iozzo, 1999) spielen bei der Kollagenvernetzung sowie bei der Kollagenfibrillogenese eine große Rolle. Sie zeichnen sich durch eine Anzahl von leucinreichen Wiederholungssequenzen (*leucine rich repeats*) aus und sind häufig mit Glykosaminoglykan-Ketten substituiert. Biglycan und Decorin beispielsweise besitzen jeweils zehn solcher Wiederholungssequenzen und eine (Decorin) bzw. zwei (Biglycan) Chondroitin-/Dermatansulfatketten. Beide SLRP-Proteine sind in einem Komplex mit Matrilinen an der Vernetzung von Kollagen VI Mikrofibrillen mit Kollagen II und Aggrecan beteiligt (Wiberg *et al.*, 2003). Mit Bindungen an die fibrillären Kollagene wie z.B. Typ I, II, III, V, VI und XIV können sie deren Fibrillogenese hemmen bzw. regulieren (Kadler *et al.*, 1996). Des Weiteren sind sie an der Bildung von Haut, Knochen, Sehnen und Cornea beteiligt. Studien mit SLRP- (Decorin, Biglycan, Fibromodulin und Lumican) defizienten Mäusen zeigten Phänotypen mit irregulären Kollagenfasernetzwerken (Danielson, *et al.*, 1997), reduzierter Knochendichte (Xu *et al.*, 1998), abnormaler Sehnenformierung (Svensson *et al.*, 1999) und erhöhter Fragilität der Haut (Chakravarti *et al.*, 1998).

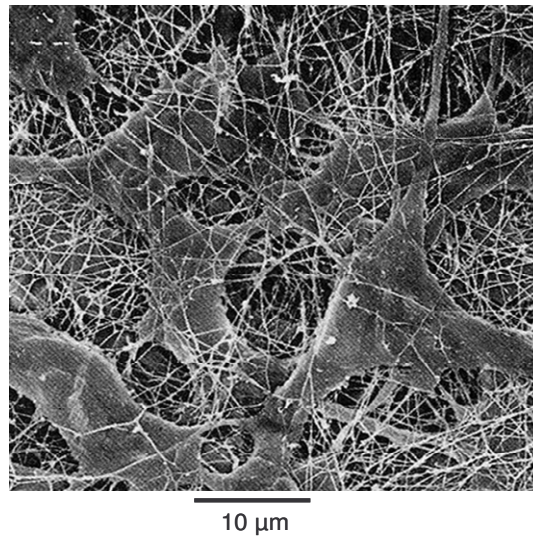


Abb: 1.4: Scanning Electron Mikroskopie von Fibroblasten in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Das Gewebe ist der Hornhaut der Ratte entnommen worden. Die die Fibroblasten umgebende extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen. Die Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Proteoglykane wurden enzymatisch und durch Säurebehandlung entfernt (Nishida *et al.*, 1988).

Eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix ist die Basalmembran. Sie besteht im Wesentlichen aus Laminin, Kollagen IV, Nidogen, Perlecan, Integrin und Heparansulfat-Proteoglykan (Martin und Timpl, 1987; Timpl und Brown, 1994) und ist ein sehr gut untersuchtes Beispiel für die Selbstorganisation und Architektur einer spezialisierten extrazellulären Matrix. Laminin ist eine der Hauptkomponenten, kann an sich selbst binden und bildet auf diese Weise filzartige Netzwerke. Darüber hinaus knüpfen Laminine Kontakte zu weiteren extrazellulären Matrixkomponenten, wie z.B. den Integrinen, netzwerkbildenden Kollagenen (z.B. Kollagen IV) und Proteoglykanen (z.B. Perlecan) (Timpl und Brown, 1994; Burgeson *et al.*, 1994). Analog zu Laminin bildet auch Kollagen IV ein dichtes Netzwerk, welches über Nidogen mit dem Laminin-Netzwerk verknüpft wird; beide Geflechte werden durch Verknüpfungen mit Nidogen und dem Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan weiter verdichtet (Yurchenco und Schittny, 1990; Reinhardt *et al.*, 1993; Aumailley *et al.*, 1993; Ekblom *et al.*, 1994). Vollständig assembliert liegt die Basallamina wie eine dichte Matte direkt auf den Epithelzellen auf und verbindet diese mit der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Die dazu notwendigen zellulären Haftkontakte erfolgen u. a. über Bindungen von Lamininen an zellmembranständige Integrine.

Die Vermittlung der anhaftenden Kontakte zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen des Bindegewebes und des Epithels (Zelladhäsion) ist die zweite Hauptfunktion der Matrix-Makromoleküle und wird durch so genannte Zellanhaftungsmoleküle (*cell adhesion molecules*) vermittelt. Die extrazelluläre Matrix ist mit relativ wenigen Zellen (z. B. Fibroblasten) durchsetzt, dies gilt auch für spezialisierte Bindegewebe wie z.B. den Knorpel (Chondrozyten) und die Basallamina. Die im Bindegewebe wirkenden Kräfte werden von den Zellen über starke intrazelluläre Proteinfilamente, die das Zytoskelett bilden, direkt an die Matrix weitergegeben. Die Filamente des Zytoskeletts sind dabei direkt und indirekt über Transmembranproteine mit den umgebenden Matrixnetzwerken verbunden. Ein Beispiel für diese Interaktion des Zellinneren mit dem Zelläußeren ist Dystroglycan, ein auf extrazellulärer Seite lamininbindendes Plasmamembranprotein, das auf zytosolischer Seite (über Sarkoglycane und Dystrophin) mit dem Actingerüst in Verbindung steht und auf diese Weise als Adapter zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskelett fungiert (Ervasti *et al.*, 1990; Brown, 1997; Winder, 1997).

Die Haftungskontakte und mechanischen Interaktionen zwischen der Matrix und den Zellen (z.B. Fibroblasten und Epithelzellen) bzw. der Basallamina werden hauptsächlich durch zwei Gruppen von Zellanhaftungsmolekülen vermittelt. Einerseits durch zellmembrandurchspannende Heparansulfat-Proteoglykane wie z.B. Syndecane und Glypicane, die als Rezeptoren für verschiedene Makromoleküle, wie Kollagene, Fibronectin, Laminin und andere Matrixproteine dienen (Scott *et al.*, 1992; Bernfield *et al.*, 1992; Iozzo, 2005; Essner *et al.*, 2006), und andererseits durch Integrine, heterodimere Proteine, die aus zwei miteinander assoziierten Glykoprotein-Ketten, α und β , bestehen. Sie enthalten, wie die Matriline, in beiden Ketten ebenfalls VWA Domänen mit einem MIDAS-Motiv (*metal ion dependent adhesion site*) und binden in kationenabhängiger Weise an ihre Bindungspartner (Emsley *et al.*, 2000; Hynes, 2002). Integrine dienen für eine ganze Reihe von Liganden als Rezeptoren; die extrazellulären Domänen dieser Transmembranproteine haben Bindungsstellen für Adhäsionsproteine mit dem "RGD"-Erkennungsmerkmal (Arg-Gly-Asp) (RGD-Proteine) wie z.B. Fibronectin, für "Nicht-RGD Proteine" wie z.B. interzelluläre Anhaftungsmoleküle (*intercellular adhesion molecule*, ICAMs) und für eine große Zahl weiterer Proteine der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagene und Laminin (Hynes, 2002). Die Verankerung von Bindegewebszellen an den Komponenten des Extrazellulärtraums unter der Beteiligung von Integrinen und Syndecanen (z.B. an Kollagen und Fibronectin) erfolgt über die Bildung so genannter fokaler Kontakte (zwischen Basallamina und Epithel: Hemidesmosomen) (Singer *et al.*, 1987;

Couchman *et al.*, 1999; Wozniak *et al.*, 2004). Indem sie die Ansatzpunkte zur Kraftübertragung auf das extrazelluläre Netzwerk bilden, ermöglichen diese Kontakte einigen Zellen, wie z.B. den Fibroblasten, außerdem auch eine Migration innerhalb des Bindegewebes.

Vorgänge der Strukturbildung und der Zellanhaftung in der extrazellulären Matrix sind nicht isoliert zu betrachten, da manche Matrixmoleküle an beiden Prozessen beteiligt sind und an Schlüsselkomponenten beider Vorgänge binden. Ein gutes Beispiel dafür ist das dimere Glykoprotein Fibronectin. Es kommt überall in der extrazellulären Matrix vor und hat mehrere Domänen, die jeweils Bindungsstellen für unterschiedliche Bindungspartnergruppen haben, darunter Kollagen und Heparin, außerdem trägt es eine RGD-Sequenz, die spezifisch an Integrin bindet. So kann Fibronectin ein breites Panel extrazellulärer Komponenten wie faserbildende Kollagene, nicht-kollagene Proteine und Heparansulfat-Proteoglykane untereinander verbinden. Gebunden an Integrin kann es die extrazellulären Makromoleküle außerdem mit der Zellmembran von Epithelzellen und Fibroblasten verknüpfen. Damit ist Fibronectin neben der Vernetzung auch an der Anheftung der extrazellulären Matrix an zelluläre Systeme beteiligt; dabei hat es Einfluß auf Morphologie, Differenzierung, Ausbreitung und Wanderung von Zellen (Hynes, 1986).

Die ständige Interaktion mit den extrazellulären Makromolekülen erlaubt den beteiligten Zelladhäsionsmolekülen neben ihren Beiträgen zur Zellanhaftung auch regulierende Signalübertragungen von der extrazellulären Matrix auf die Bindegewebszellen. Die extrazelluläre Matrix kann damit Prozesse zellulärer Proliferation und Differenzierung, Zytoskelettorganisation und der Proteinexpression selbstständig steuern (Birk *et al.*, 1991; Lin und Bissell, 1993; Hay, 1993; Adams und Watt, 1993; Adams *et al.*, 2001). Die Bindung extrazellulärer Liganden, wie z.B. Laminin oder Kollagen an Integrin, Syndecan oder den Dystrophin-Komplex kann einen bidirektionalen Austausch von Informationen ermöglichen, so dass durch einen extrazellulären Reiz intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden (Cavaldesi *et al.*, 1999; Hynes, 2002; Iozzo, 2005). Integrine alleine besitzen keine katalytische Aktivität und sind daher bei der Signalweiterleitung auf andere Proteine mit Kinase-Aktivität angewiesen. So führt die Bindung von z.B. Kollagenen an Integrine über die Aktivierung der FAK (*fokal adhesion kinase*) und die Zwischenschaltung weiterer Adaptorproteine und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Fyn und Shc schließlich zur Aktivierung des Raf/Ras/MapK- oder JNK- (Jun-aminoternale Kinase) Signalweges (Giancotti und

Ruoslahti, 1999; Turner, 2000). Die einzigen bisher beschriebenen Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, die eine intrinsische Kinaseaktivität tragen, sind die beiden Discoidin Domänen Rezeptoren (DDR) 1 und 2. Deren Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität wird ebenfalls durch die Bindung von Kollagenen ausgelöst und führt zu einer Homodimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren (Vogel *et al.*, 1997) und der Aktivierung weiterer Signalkaskaden. Sowohl Syndecane als auch Integrine spielen außerdem auch eine Rolle beim Transport von Zellen und Metaboliten innerhalb der Matrix und dienen auf der Zelloberfläche als Ko-Rezeptoren für zahlreiche Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, TGF- β) und andere Hormone (Flaumenhaft *et al.*, 1992; Wight *et al.*, 1992).

1.3 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen

Zur Charakterisierung von Protein-Protein Wechselwirkungen ist eine große Bandbreite von Methoden entwickelt worden, die nicht nur die qualitative, sondern auch die quantitative Bestimmung der Wechselwirkungen ermöglichen. Die Proteine sollten für Interaktionsstudien in nativer Form vorliegen und möglichst wenig artifiziell modifiziert sein. Grundsätzliche Eigenschaften der zu untersuchenden Proteine, wie Löslichkeit, Tendenz zur Aggregation oder erzielbare Konzentrationen sind wichtige Faktoren. Alle Methoden sind in hohem Maße abhängig von der genauen Bestimmung der Proteinkonzentration, da diese in die Berechnung der Reaktionskonstanten eingehen. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, wie beide Wechselwirkungspartner während der Versuche vorliegen können. Entweder ist der eine der beiden Interaktionspartner an eine feste Phase gekoppelt (immobilisiert) und der andere Partner liegt in gelöster Form vor, z.B. bei ELISA-ähnlichen und bei SPR-Versuchen, oder beide Wechselwirkungspartner liegen in gelöster Form vor, z. B. bei der analytischen Ultrazentrifugation und der isothermen Mikrokalorimetrie.

1.3.1 Bindungsversuche im ELISA-ähnlichen Stil (enzyme linked immunosorbent assay)

Versuche im ELISA-ähnlichen Stil stellen eine einfache Methode zur Ermittlung von Bindungspartnern dar. Ein Protein wird dabei fest an eine Kunststofffläche gebunden und mit einem zweiten, in löslicher Phase vorliegenden Protein inkubiert (Kemeny, 1994). Durch die Verwendung von 96-Loch-Platten können viele Messungen gleichzeitig durchgeführt werden. Bei einer Bindung kann nach einer festgelegten Zeit das gebundene Protein mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die

Entwicklung geschieht über einen enzymgekoppelten Zweitantikörper, die Umsetzung eines Substrats kann photometrisch in einem Plattenlesegerät gemessen werden. Eine Titration der zugegebenen Proteine erlaubt über die Bestimmung der halbmaximalen Sättigung der immobilisierten Proteine die Ermittlung der Dissoziationskonstanten. Sehr schwache Interaktionen sind mit den ELISA-ähnlichen Versuchen nicht zu messen, die Nachweisgrenze liegt bei Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich. Die Immobilisierung des zu untersuchenden Proteins ist ein Nachteil dieser Methode, da die Orientierung des immobilisierten Proteins nicht steuerbar und daher die Blockade an Bindungen beteiligter Proteinoberflächen möglich ist. Außerdem ist auch die Effizienz der Kopplung nur schwer zu kontrollieren und kann durch Modifikationen der Proteine wie z.B. Glykosylierungen stark verringert werden.

1.3.2 Oberflächen Plasma Resonanz (*surface plasmon resonance, SPR*)

Wie beim ELISA-ähnlichen Bindungsversuch wird auch bei der Oberflächen Plasma Resonanz (SPR) zu Beginn ein Protein (hier: Ligand) auf einer Oberfläche immobilisiert. Die SPR misst die Protein-Protein Interaktionen in Form von Änderungen der Masse nach der Bindung von Proteinen (hier: Analyt) an die oberflächen-immobilisierten Proteine (Myszka, 1997; Schuck, 1997; Morton und Myszka, 1998; Technologie Handbuch, Biacore, 1999; Nice und Catimel, 1999). Die Versuchsoberfläche besteht z.B. bei dem System der Firma Biacore™ aus einem goldbedampften Chip aus Glas. Die weitere Beschaffenheit der Chipoberfläche ist abhängig von der zu wählenden Kopplungsmethode des Proteins. Es gibt die Möglichkeit einer kovalenten Kopplung über Aminogruppen auf einer carboxylgruppenreichen Dextranmatrix (CM5-Chips) oder nicht-kovalente Kopplungen biotinylierter oder His-markierter Proteine über Streptavidin- bzw. NTA-(*nitrilotriacetic acid*) präparierte Chipoberflächen. Ist der Chip in dem Biacore-Gerät montiert, bildet jede seiner Versuchsoberflächen jeweils eine Wand einer Flusszelle und auf diese Weise eine geschlossene Kavität, durch die die Lösung mit dem Analyten strömt.

Auf der der Flusszelle abgewandten Seite des Chips befindet sich ein Prisma, durch das ein monochromatischer Lichtstrahl ($\lambda = 760\text{nm}$) hindurchgeleitet wird. An der Phase zwischen Glasschicht und Goldfilm wird dieses Licht totalreflektiert, dabei entsteht ein den Goldfilm durchdringendes, evaneszentes Feld. Dieses kann mit den „schwingenden“ Elektronen des Elektronengases (Plasma) wechselwirken, was zur Entstehung einer Resonanz führt. Diese Resonanz erzeugt innerhalb des reflektierten Lichtstrahls eine Auslöschung, also ein Intensitätsminimum welches mittels eines

Dioden-Array-Detektors registriert werden kann. Die Umgebung der Goldoberfläche, also die Schicht nahe der Sensoroberfläche, bestimmt den Reflexionswinkel dieses Intensitätsminimums, der gemessene Winkel dieses Minimums wird SPR-Winkel genannt. Kommt es zu einer Bindung von Protein (und damit zu einer Änderung der Masse auf der Chipoberfläche), ändert sich die Umgebung der Sensoroberfläche und damit auch der SPR-Winkel; die gemessene Änderung kann dann analytisch weiterverrechnet werden. Das Biacore-Gerät misst den SPR-Winkel in *Resonance Units* (RU), dabei entspricht eine Winkeländerung von 360 Winkelsekunden 1000 RU und einer Massenänderung auf dem Chip in der Flusszelle von 1ng/mm^2 . Die das Bindungssignal ausdrückende Winkeländerung wird als *Response Difference* (Signaldifferenz) bezeichnet.

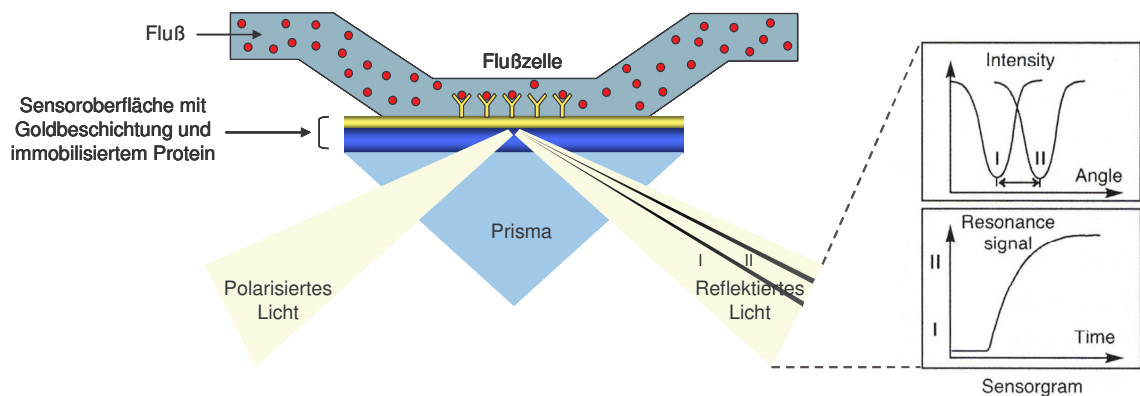


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Vorgänge beim SPR-Versuch. Die Bindung des Proteins erzeugt eine Änderung des SPR-Winkels (I \rightarrow II) die von einem Sensor registriert und weiterverarbeitet wird. Die Analyse des geänderten Resonanzsignals erfolgt in einem Sensorgramm. Abb. verändert übernommen von www.biacore.de.

Während eines Versuchs interagieren die in die Flusszelle injizierten Analyten reversibel mit dem immobilisierten Liganden auf der Sensoroberfläche und erzeugen auf diese Weise eine Zunahme der Masse an dieser Stelle und damit einen geänderten SPR-Winkel. Mit dem Ende der Injektion liegt in dem Puffer über der Sensoroberfläche kein Protein mehr vor und reversibel gebundenes Protein dissoziiert von dem immobilisierten Protein der Oberfläche, was eine Verringerung der Masse über der Sensoroberfläche zum – im Idealfall – Ursprungswert zur Folge hat. Die Signaländerungen sind proportional zu den Änderungen in der Masse des gebundenen Analyten, die Signaldifferenz im Gleichgewicht kann daher nach den Gesetzen des Massenwirkungsgesetzes und der Langmuir Isothermen analysiert werden. Die Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion liefert die Grundlage für Analysen nach

kinetischen Gesichtspunkten. Ergänzend zu den qualitativen Aussagen der Protein-Protein Bindung liefert eine mitgelieferte Evaluationssoftware anhand der während eines Versuchs gesammelten Daten ausserdem die Werte für Assoziations- (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) und für die Dissoziationskonstante K_d .

SPR bietet eine Anzahl von Vorteilen gegenüber anderen Methoden, insbesondere hinsichtlich der Gewinnung von kinetischen Daten. Die Abläufe der Experimente werden in Echtzeit dokumentiert, wobei sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation direkt beobachtet werden können. Bei der Evaluation der Daten werden k_a , k_d und K_d direkt berechnet, die Ermittlung dieser Werte ist unkompliziert und wenig zeitintensiv, wie insgesamt die Durchführung des gesamten Versuchs. SPR kann Wechselwirkungen mit K_d -Werten zwischen 10^{-3} und 10^{-13} M messen und liefert damit einen sehr breiten Bereich untersuchbarer Interaktionen. Die Wiederverwendbarkeit fertig präparierter Chips ermöglicht umfangreiche Versuchsserien mit einem grossen Repertoire zu untersuchender Analyten, diese können DNA-, komplexe Kohlenhydrate, Proteine oder ganze Zellen sein. Der gesamte Versuchsablauf ist automatisiert und hochgradig standardisiert und seitens des Experimentators kaum fehleranfällig, da die Messungen vollständig innerhalb des Gerätes stattfinden. Vorteilhaft sind außerdem die geringen Probemengen, die für die Nutzung dieser Methode notwendig sind; insbesondere die Immobilisierung ist hier herauszustellen, da hierfür z.B. bereits 10ng Protein ausreichen können.

Für diese Arbeit wurde das SPR-Gerät der Firma Biacore verwendet, allerdings gibt es noch weitere Hersteller von Geräten, die nach dem gleichen Meßprinzip arbeiten (Affinity Sensors, Intersense Instruments, BioTul und Artificial Sensing Instruments).

1.3.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC)

Im Gegensatz zu den Festphasenmethoden wie z.B. ELISA und SPR sind für die ITC keine chemischen Modifikationen der Bindungspartner und kein physikalischer Kontakt mit einer Oberfläche notwendig; hier finden die zu untersuchenden Bindungen vollständig in Lösung statt (Bundle und Sigurskjold, 1994; Fisher und Singh, 1995; Doyle, 1997; Jelesarov und Bosshard, 1999). Dies ist ein Vorteil dieser Methode, da z.B. die Kopplung an Oberflächen sterische Beeinträchtigungen auslösen und für eine Bindung wichtige Protein-Oberflächen blockieren kann.

Bei der ITC erfolgt die quantitative Analyse von beobachteten Bindungen über ermittelte thermodynamische Größen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass jede

Wechselwirkung von einer Änderung der Enthalpie begleitet ist (ΔH), also entweder für ihren Ablauf Wärme aus der Umgebung entzieht (endotherme Reaktion) oder während ihres Ablaufs Wärme an die Umgebung abgibt (exotherme Reaktion). Daher können mit der ITC z.B. die Bildung von Proteinkomplexen und Interaktionen zwischen Proteinen, DNA und Lipiden untersucht werden. Solche makromolekularen Interaktionen beruhen sehr oft auf der Bildung von Komplexen zwischen zwei Partnern, A und B. Die Affinität beider Partner füreinander wird durch die Bindungskonstante K beschrieben, diese ist durch die Gleichgewichtslage des Komplexes AB definiert. K ist mit der freien Reaktionsenthalpie ΔG verknüpft, welche sich wiederum aus der Reaktionsenthalpie ΔH und der Reaktionsentropie ΔS ergibt:

Gleichung 1:
$K = \frac{[AB]}{A \times B}$

Gleichung 2 (Gibbs-Helmholz):
$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Ein isothermer Titrationskalorimeter besteht aus jeweils einer exakt thermostatisierten Referenz- und Probenzelle, deren Temperaturen zu Beginn eines Experimentes exakt gleich sind. In der Probenzelle liegt ein Puffer mit dem gelösten Bindungspartner A vor. Während des Experiments wird eine den Bindungspartner B enthaltende Lösung schrittweise in die Probenzelle injiziert. Die Proteine A und B vermischen sich und im Falle einer Wechselwirkung kommt es zur Bildung des Komplexes AB. Die Referenzzelle enthält nur den (identischen) Puffer aber kein Protein und dient als Vergleich für die Messung der Temperaturänderung die mit der Bildung des Komplexes AB in der Probenzelle auftritt.

Beide Messzellen weisen jeweils höhere Temperaturen auf, als die Umgebung. Es müssen also beide Zellen kontinuierlich mit einem gewissen, kontrollier- und messbaren Heizstrom versorgt werden, um ihre Temperaturen konstant (isotherm) zu halten. Mit jeder Injektion von Protein B setzt eine weitere Bildung des AB-Komplexes ein (bis zur Sättigung allen Proteins A) und löst eine zusätzliche Aufnahme oder Abgabe von Wärme des Systems aus. Um die Temperatur innerhalb der Probenzelle konstant zu halten, reagiert der Kalorimeter mit einer entsprechend erhöhten oder verringerten Heizleistung, die veränderten Heizleistungen werden registriert und liefern auf diese Weise die Dokumentation der ablaufenden Protein-Interaktion. Aufgetragen gegen die ansteigenden Konzentrationen von A und B (bzw. deren molares Verhältnis) kann die Wechselwirkung von A und B grafisch dargestellt werden. Die ITC liefert eine ganze Reihe verschiedener thermodynamischer Größen mit nur einem einzigen Experiment. Die Anpassung einer theoretischen Kurve an die erhaltenen Daten liefert

die Bindungskonstante K des Komplexes AB und dessen Bindungsenthalpie ΔH . Messungen bei verschiedenen Temperaturen lassen Rückschlüsse auf die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p bei der Komplexbildung zwischen A und B zu, die Verwendung von K und ΔH in Gleichung 2 erlaubt ausserdem die Berechnung der Änderung der Entropie ΔS (Luque und Freire, 1998; Leavitt und Freire, 2001).

Der gemessene Wärmefluss bei der Mischung zweier Komponenten wird wegen der extrem geringen Wärmemengen mit einem Nanowattverstärker ermittelt, der geringe Temperaturunterschied als elektrische Spannung mit Hilfe von Peltier Elementen gemessen. Die Sensitivität dieser Methode ist abhängig von den verwendeten Kalorimetern und erlaubt heutzutage die Verwendung von Konzentrationen bis ca. $2 - 5 \mu\text{M}$. Dies ermöglicht die Bestimmung von Bindungskonstanten zwischen 10^{-4} und 10^{-9} M, schwächere Komplexe benötigen höhere Konzentrationen. Die Löslichkeit und die erreichbare Konzentration der zu untersuchenden Proteine können hier limitierend werden.

Die isotherme Titrationskalorimetrie wird bei konstanter Temperatur durchgeführt, mit ihr wird die bei einer chemisch/physikalischen Reaktion abgegebene bzw. aufgenommene Wärme gemessen. Alternativ gibt es außerdem die differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC). Dabei wird die Wärmeaufnahme/-abgabe als Funktion der Temperatur gemessen. Auch hier wird die Messung bei konstanten Bedingungen durchgeführt, allerdings werden hier die Wärmekapazität des Systems und die Phasenübergänge gemessen (kooperative Prozesse, z.B. Schmelzen von Eis, Proteinentfaltung/-faltung, verschiedene Phasen von Lipiddoppelschichten, Dissoziation und Assoziation von Nukleinsäuresträngen).

1.3.4 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

(analytical ultracentrifugation)

Wie bei der ITC findet auch bei der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) die untersuchte Wechselwirkung zwischen zwei Partikeln oder Makromolekülen in Lösung statt. Die AUZ bedient sich des Einflusses starker Zentrifugalkräfte, um die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen oder Partikeln jeglicher Art zu untersuchen (Rivas und Minton, 1993; Laue, 1995; Schuster und Toedt, 1996). Bei einer maximalen Drehzahl von 60000 U/min entwickelt die Zentrifuge ein Schwerfeld von ca. $260000 \times g$. Diese Kraft ist stark genug, nahezu beliebige Partikel zum Sedimentieren oder Flotieren zu bringen. Die Sedimentation während des Versuchs bewirkt, dass die Lösung vom Meniskus her an Partikeln verarmt, in Zellbodennähe aber angereichert wird, die Sedimentationsfront wandert also Richtung

Zellboden. Dieser Vorgang wird optisch detektiert und analysiert, dazu wird die Meßzelle während der Sedimentation parallel zur Rotationsachse von photometrischen Systemen mit monochromatischem Licht ($\lambda=190\text{--}800\text{ nm}$) durchstrahlt. Dies erlaubt die Messung von lokalen Makromolekülkonzentrationen (bzw. damit zusammenhängenden Größen) in der Probe sowie die Erstellung eines orts aufgelösten Konzentrationsprofils über den radialen Verlauf der Meßzelle. Die Wiederholung der Messung während des Experiments ergibt eine zeitliche Auflösung der erhaltenen Messdaten. Die Meßgröße ist die Absorption der gelösten Partikel, also eine der Molekülkonzentration proportionale Größe.

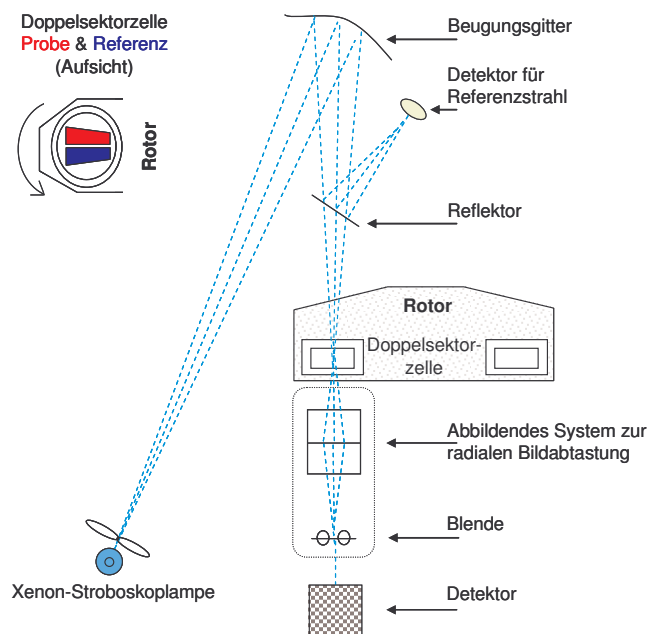


Abb. 1.6: Schematischer Aufbau einer analytischen Ultrazentrifuge.

(Abb. verändert übernommen von http://www.fmp-berlin.de/nmr/labudde_leitner/practical_period.pdf)

Die beiden wichtigsten Typen von AUZ-Experimenten sind die Sedimentationsgeschwindigkeits- und die Sedimentationsgleichgewichtsläufe. Bei den erstgenannten wird die Geschwindigkeit, mit der sich die Makromoleküle oder Partikel unter dem Einfluß von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen, gemessen. Die dabei ermittelte Konzentrationsverteilung innerhalb der Meßzelle wird in eine Sedimentationskoeffizienten- (s) verteilung (s -Verteilung) umgerechnet. Diese Werte liefern bereits Informationen über die Anzahl und Konzentration der Komponenten, Homogenität der Probe, Aggregate und Verteilungsbreiten. Die

Sedimentationsgeschwindigkeit selbst wird auch als Sedimentationskoeffizient s bezeichnet, die Angabe von s erfolgt in „Svedberg-Einheiten“ S : $1S = 10^{-13}$ sec.

Die meisten Auswertungen von AUZ-Experimenten basieren auf der Grundlage der Svedberg-Gleichung.

Svedberg-Gleichung:
$M = \frac{s R T}{D (1 - \bar{v} \rho)}$

Mit dieser Gleichung werden die Transportgröße s , der Diffusionskoeffizient D (enthält auch den Reibungskoeffizienten f des Partikels) mit der Molmasse M des Makromoleküls und den Partikeleigenschaften Masse und Dichte vereint. Ausgehend von der Svedberg-Gleichung und der s -Verteilung erlaubt die Methode der AUZ die Bestimmung von Molmassen, Molmassenverteilungen, Teilchengrößenverteilungen und Teilchendichteverteilungen. Die Bestimmung der Molmassen ist eine klassische Anwendung der AUZ. Sie kann alternativ auch über das Sedimentationsgleichgewicht ermittelt werden. Auf die Teilchen in der Lösung wirken außer Kräften der Sedimentation auch Kräfte der Diffusion. Je mehr Partikel am Zellboden angereichert werden, desto stärker werden die Kräfte der Rückdiffusion. Entsteht während des Versuchs das sogenannte Sedimentations-Diffusions-Gleichgewicht, sind Rückdiffusion vom Zellboden und die Sedimentation zum Zellboden hin ausgeglichen. Es finden keine Transportprozesse mehr statt und die Molmasse wird unabhängig von der Sedimentations- und Diffusionskonstante erhalten.

Mit der AUZ können aber auch Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen untersucht werden. Diese äußern sich während der Experimente in der Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten (k_s , Sedimentationsgeschwindigkeit) und in der Konzentrationsabhängigkeit der ermittelten, apparenten Molmasse (A_2 , Sedimentationsgleichgewicht). Durch die Durchführungen von Titrations lassen sich auf der Basis der gewonnenen Wechselwirkungsdaten auch Dissoziationskonstanten (im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-9} M) berechnen.

Die AUZ ist eine sehr vielseitige Methode, die kaum Beschränkungen bzgl. der Lösungsmittel- oder Partikelbeschaffenheit hat, die untersuchten Makromoleküle können sowohl Proteine, als auch Nukleinsäuren, supramolekulare Aggregate, Micellen und Lipide umfassen. Nachteilig bei dieser Methode ist der hohe zeitliche Aufwand der mit den Experimenten verbunden ist. Bei einigen Anwendungsbereichen (Sedimentationsgeschwindigkeitsversuche) lässt sich der Zeitrahmen für einen Versuch auf 3–5 Stunden einschätzen, für Sedimentationsgleichgewichtsversuche liegt der zeitliche Rahmen bei 12–24 Stunden.

Außer den vorgestellten Methoden gibt es noch eine große Anzahl weiterer Methoden zum Studium von Protein-Protein Interaktionen, so z.B. die (Gleichgewichts-) Gelfiltration und die Größenausschlusschromatographie mit Lichtstreuung, aber auch spektroskopische Methoden sowie Alternativen zu den beschriebenen Festphasenversuchen (z.B. Luminex).

1.4 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war über die funktionelle Rolle der Matriline in der extrazellulären Matrix nur wenig bekannt. Das Ziel war demnach eine Vertiefung der Untersuchung und Identifizierung von Bindungspartnern der Matriline. Mit breit angelegten Bindungsstudien sollte ein Einblick in die Beteiligungen der Matriline an der Assemblierung der extrazellulären Matrix gewonnen werden. Dafür sollten alle vier Matriline untersucht werden, die auf Grund der unterschiedlichen Gewebeverteilung vermutlich unterschiedliche Bindungen eingehen. Für die Durchführung dieser Studien wurde die Methode der ELISA-ähnlichen Bindungsversuche ausgewählt, da sie einfach und relativ schnell durchzuführende Versuche mit einer Vielzahl von möglichen Bindungspartnern zulässt und daher für eine initiale Durchmusterung sehr gut geeignet ist.

Besonders starke Wechselwirkungen sollten anschließend im Detail charakterisiert werden. Dazu sollten Bindungsstudien mit verkürzten Proteinfragmenten der Matriline und ggfs. des identifizierten Bindungspartners durchgeführt werden, um die Lokalisation der Bindungsstellen, die an den Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind, näher zu bestimmen. Auf diese Weise sollten außerdem die Mechanismen, nach denen eine Bindung durch die Matriline erfolgt, aufgeklärt werden. Neben den ELISA-ähnlichen Versuchen wurde für die detaillierten Bindungsstudien die Methode des SPR ausgewählt. Die Gründe dafür waren die sehr viel höhere Sensitivität dieser Methode, außerdem die geringen Mengen der benötigten Proteine und die gute Möglichkeit, präzise kinetische Daten zu gewinnen. Ein weiterer Vorteil war die Möglichkeit der Immobilisierung eines der möglichen Bindungspartner. So konnte der starken Tendenz der Matriline, zu aggregieren, zumindest zum Teil entgegengewirkt werden.

In einem anderen Teilprojekt sollte eine mögliche Beteiligung der Matriline an Wechselwirkungen der extrazellulären Matrix mit Zellen untersucht werden. Dabei sollte durch Zellanhaftungsversuche und weitere Bindungsstudien eine Rolle der Matriline als potentielle Liganden von zellulären Rezeptoren bzw. als Zellanhaftungsvermittelnde Proteine untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien des Qualitätsstandards *pro analysi* und die Enzyme wurden von den Firmen Fluka, Gibco, Merck, Roche, Serva, Sigma und NEB bezogen. Anderweitig bezogene Chemikalien und Verbrauchsmaterialien werden an entsprechender Stelle bezeichnet. Für molekularbiologische und zellkulturbezogene Arbeiten verwendetes Wasser, hergestellte Lösungen, sowie alles Verbrauchsmaterial wurden jeweils für 40 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1.1 Standardpuffer

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden in entionisiertem Reinstwasser (qH_2O , MilliQ Biocel System, Millipore) angesetzt. Angegebene pH-Werte sind bezogen auf die Raumtemperatur. Nicht aufgeführte Puffer werden im Kapitel Methoden an entsprechender Stelle beschrieben.

Tab. 2.1: Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
6 x DNA Auftragspuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 70 % (v/v) Glycerin
TAE	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
2 x SDS-PAGE Auftragspuffer	4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM TrisHCl, pH 8,3
PBS	140 mM NaCl 10 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4 pH 7,4
TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TBST 0,01	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,01 % (v/v) Tween 20
TBST 0,05	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,05 % (v/v) Tween 20

2.1.2 Bakterien und Nährmedien

Für Klonierungsarbeiten wurde der Escherichia coli (E. coli) Stamm DH5 α eingesetzt (Invitrogen). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani (LB) Medium und LB Agar, beide wurden nach Herstellerangaben (GibcoBRL, Life Technologies) angesetzt und autoklaviert. Zur Selektion wurde Ampicillin (Amp) in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml in Medien und Agar eingesetzt.

Tab. 2.2: Bakteriengenotyp und Nährmedien

DH5 α Genotyp	LB-Medium	LB-Agar
F-, Φ 80, lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 (rK-, mK+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1, λ -	1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) Pepton	1,5 % Agar in LB-Medium

2.1.3 Expressionsvektoren

Für die Transfektion und die anschließende rekombinante Expression von Proteinen in Säugerzellen wurden zwei Varianten des Expressionsvektors pCEP-Pu (Kohfeld et al., 1997) verwendet (Abb. 2.2). Neben der Signalsequenz für das BM40-Protein im 5'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle enthält die Variante V27 im 3'-Bereich die Sequenz für ein C-terminales Histidinmotiv (His₆). Die N-His-Variante enthält im 5'-Bereich der Klonierungsstelle eine Sequenz für ein N-terminales Histidinmotiv (His₈).

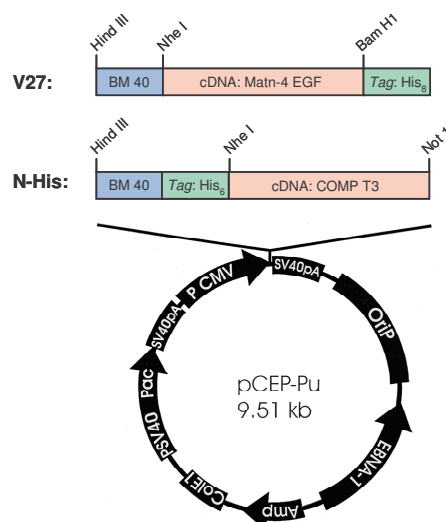


Abb. 2.1: Vektorkarte der verwendeten Expressionsvektoren.

BM 40 = Sequenz des BM40-Signalpeptids, His_{6/8} = Sequenz der 6-fachen bzw. 8-fachen Histidin-Markierung.

Beide Varianten tragen außerdem die Gene für eine Ampicillin und eine Puromycin-Resistenz und erlauben damit die Selektionierung transformierter Bakterien bzw. transfizierter Säugerzellen. Die extrachromosomale Replikation des Plasmids in Säugerzellen und seine stabile Verteilung auf sich teilende Zellen wird über das im Vektor enthaltene EBNA-1-Gen sichergestellt. Dieses kodiert für das virale, DNA-bindende Protein *nuclear antigen 1*, welches an die Epstein-Barr Virus Replikationsstelle (oriP) bindet und zu einer starken Replikation des Plasmids führt. pCEP-Pu V27 wurde freundlicher Weise von M. Koch zur Verfügung gestellt, pCEP-Pu N-His von N. Smyth.

2.1.4 Oligonukleotide (Primer)

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen und sind unter Tab. 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind blau markiert.

Bezeichnung	Sequenz	Restriktions-enzym	Kodiertes Proteinfragment
M4 dA1 fw	5'-gcccc act agt a aag gac ctg tgt gct gag ttg g-3'	Spe I	Matrilin-4 EGF
M4 EGF rev	5'-caat gga tcc ccg gtc aca gct ctt gcc atc-3'	Bam HI	
COMP Pr4 fw	5'-gcccc gct agc ccg cga cac aga cct gg-3'	Nhe I	COMP T3
COMP M2 rev	5'-ca atg act gcg gcc gc tta ggc gtt ctc ggg gca c-3'	Not I	

2.1.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden den Angaben der Hersteller folgend verwendet und sind in Tab. 2. 4 aufgeführt.

Tab. 2.4: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB)
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Polymerase I, großes (Klenow) Fragment	NEB
<i>Expand High Fidelity</i> Polymerase	Roche
<i>Expand Long Template</i> Polymerase	Roche

2.1.6 DNA-Längenstandard und Protein-Molekulargewichtsstandards

Als Referenz bei der Durchführung von Agarosegelelektrophoresen und SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden die folgende Längen- bzw. Molekulargewichtsstandards verwendet:

DNA-Längenstandard: 1kb DNA-Ladder (Life Technologies)

Protein-Molekulargewichtsstandards: High Molecular Weight Marker (Roche)
Broad Range Marker (NEB)

Der *High Molecular Weight Marker* und der *Broad Range Marker* wurden verwendet, um auch für die hohen Molekulargewichte vollständig oligomerisierter Matrilin einen Maßstab zu liefern. Beide Molekulargewichtsstandards sind ausschließlich in reduzierter Form erhältlich und wiesen daher bei der SDS-PAGE geringfügige Laufunterschiede gegenüber den untersuchten, nicht-reduzierten, Proteinen auf.

2.1.7 Antikörper

Die Verwendung der (Sekundär-)Antikörper für Immunoblots (IB), ELISA-ähnliche Versuche (ELISA) und Immunfluoreszenzen (IF) entsprach den Herstellerangaben. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei 4 °C oder -20 °C.

Tab. 2.5: Verwendete Primärantikörper.

Antigen/Bezeichnung	Spezies	Anbieter/Referenz	Verd. ELISA	Verd. IB	Verd. IF
Matrilin-1 BTC-1	ra (poly)	N. Hauser, n. p.	1:500	1:500	-
Matrilin-3 ΔCT	ra (poly)	Klatt <i>et al.</i> , 2000	1:500	1:500	-
Matrilin-4	ra (poly)	Klatt <i>et al.</i> , 2001	1:1000	1:1000	-
COMP	ra (poly)	Hedbom <i>et al.</i> , 1992	1:1000	1:1000	-
Vinculin	m (mono)	Sigma	-	-	5-10 µg/ml

BTC = boviner Tracheaknorpel, m = Maus, ra = Kaninchen, n. p. = nicht publiziert,
poly = polyklonal, mono = monoklonal

Tab. 2.6: Verwendete Sekundärantikörper.

Antigen/Bezeichnung	Typ	Anbieter/Referenz	Verd. ELISA	Verd. IB	Verd. IF
Kaninchen IgG	HRP-konj.	Dako	1:4000	1:2500	-
Maus IgG	Cy3-konj.	Jackson Laboratories	-	-	1:500

HRP = Meerrettichperoxidase

2.1.8 Säugerzellen

Tab. 2.7: Verwendete Säuger-Zelllinien

Zelllinie	Modifikation	Ursprung	Verwendung
HEK-293 EBNA	EBNA Gen	Humane Niere (Invitrogen)	Rek. Protein Expression
Wi26	-	Humane Lungenfibroblasten ¹	Zellanhaftungsversuche
HaCaT	-	Humane Keratinozyten ¹	Zellanhaftungsversuche
CHO K1	-	Hamster Ovarien ²	Zellanhaftungsversuche
CHO 745	GAG-defizient	Hamster Ovarien ²	Zellanhaftungsversuche
GD25	β 1-Integrin defizient	Maus Fibroblasten ³	Zellanhaftungsversuche
β 1-res. GD25	β 1-Integrin rekonstituiert	Maus Fibroblasten ³	Zellanhaftungsversuche

1 = Zur Verfügung gestellt von M. Aumailley, Universität zu Köln

2 = Zur Verfügung gestellt von S. Ricard-Blum, IBCP, Lyon, Frankreich

3 = Zur Verfügung gestellt von A. Aszodi, Martinsried

2.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben entsprach die Durchführung molekularbiologischer, biochemischer und zellkulturbezogener Methoden den Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989; Rehm, 2000) oder den mitgelieferten Anweisungen der Hersteller. In Einzelfällen wurden die Protokolle angepasst bzw. für die geplanten Versuche optimiert.

2.2.1 Klonierungsstrategie

Die meisten für diese Arbeit benötigten Proteine und Proteinfragmente lagen zu Beginn des Projekts bereits vor. Zur rekombinanten Expression der noch fehlenden Matrilin-4 EGF- und COMP-T3-Fragmente wurden die gewünschten cDNA-Abschnitte mittels PCR und den geeigneten Primern amplifiziert. Die gewonnenen DNA-Abschnitte wurden über die Schnittstellen NheI und BamHI bzw. NheI und NotI (Abb. 2.1) in die Expressionsvektoren V27- und N-His-pCEP-Pu inseriert. Dazu wurden sowohl die PCR-Produkte als auch die vorliegenden Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf Agarosegelen aufgetrennt. Nach der Reinigung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgten eine Ligation der jeweiligen Vektoren und Fragmente und eine Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien.

Tab. 2.8: Klonierungsstrategie

Konstrukt	Vektor	Schnittstellen
Matrilin-4 EGF	V27 pCEP-Pu 8x C-His	Vektor : Nhe I, Bam HI Insert : Spe I, Bam HI *
COMP T3	pCEP-Pu 6x N-His	Vektor : Nhe I, Not I Insert : Nhe I, Not I

* = Spe I und Nhe I erzeugen kompatible Enden

Einzelne Bakterienkolonien wurden in Flüssigkulturen vermehrt. Mit der daraus isolierten Plasmid-DNA wurden schließlich HEK-293 EBNA-Zellen transfiziert. Die Identität und Korrektheit der Konstrukte wurde vorher mittels Restriktionsanalyse mit den zur Ligation verwendeten Restriktionsenzymen und durch die Sequenzierung der cDNA-Inserts überprüft.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der zu klonierenden DNA-Fragmente wurden präparative PCRs mit kleinen Mengen Matrizen-DNA und den entsprechenden Primern durchgeführt, die DNA-Fragmente wurden in bis zu 24 Zyklen mit der *Expand Long Template* oder der *Expand High Fidelity* Polymerase (Roche) amplifiziert. Zur Fehlervermeidung während der DNA-Synthese wurden eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion und eine möglichst geringe Anzahl von Zyklen gewählt. Die Anlagerungstemperatur der Oligonucleotide richtete sich nach deren optimaler Hybridisierungstemperatur, die Elongationszeit nach der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts. Nachfolgend sind ein PCR-Ansatz und ein PCR-Temperaturprogramm beispielhaft wiedergegeben.

Touchdown-PCR Protokoll			
Ansatz		Temperaturprogramm	
1 – 20 ng	DNA	1.) 3 min	95°C Denaturierung 1X
0,5 µl	5'-Oligonukleotid (10µM)	2.) 30 sec	95°C Denaturierung
0,5 µl	3'-Oligonukleotid (10µM)	3.) 30 sec	62-57°C * Hybridisierung
0,2 µl	dNTP Mix [25µM]	4.) 60-90 sec	68°C Elongation
2,5 µl	10x Expand PCR-Puffer (Roche)	9x	Wiederholung 2. – 4-
2 U	<i>Expand Polymerase</i> (Roche)	5.) 30 sec	95°C Denaturierung
Ad 25 µl	H ₂ O	6.) 30 sec	58°C Hybridisierung
		7.) 60-90 sec	68°C Elongation
		24x	Wiederholung 5. – 7.
		8.) 10 min	68°C Endsynthese

* = Abnehmend um 0,5°C pro Zyklus

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in TAE-Puffer nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989). Agarose (Seakem) wurde in TAE-Puffer unter Aufkochen vollständig gelöst und nach kurzer Abkühlung und der Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) in eine Gießkammer gegossen. Die Konzentration der Agarose entsprach der Größe der erwarteten DNA-Fragmente und lag zwischen 0,7 und 1,5%. Sobald auspolymerisiert, wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden zusammen mit der entsprechenden Menge des 6x DNA-Probenpuffers in die Geltaschen geladen, als Referenzwert wurde außerdem der DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4-8 Volt/cm Elektrodenabstand. Ins Nukleinsäuregerüst interkaliert und durch UV-Licht zur Lumineszenz angeregt, machte das Ethidiumbromid nach der Elektrophorese die aufgetrennte DNA sichtbar und ermöglichte das Ausschneiden gewünschter Banden.

2.2.4 Elution aufgetrennter DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Präparation der DNA aus dem Gel erfolgte unter Verwendung des *UltraClean15*-Kits (Macherey-Nagel) und nach dessen Protokoll. Dabei erfolgte die Elution im letzten Schritt mit H₂O.

2.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Im Agarosegel wurde die DNA-Konzentration gegenüber einem standardisierten Marker geschätzt, verifiziert wurde sie durch die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\text{dsDNA-Konzentration (}\mu\text{g/ml)} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times 2 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei $\lambda = 260$ nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht demnach eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit präparierter DNA wurde anhand des Quotienten von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ermittelt, das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für reine DNA bei ca. 1,8 liegen.

2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA und durch PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma NEB geschnitten. Die Versuche wurden den Herstelleranweisungen folgend und mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt.

Bei gleichzeitig mit zwei Enzymen durchgeführten Doppelverdau wurden jeweils die empfohlenen Puffer gewählt, die eine ausreichende Aktivität für beide Enzyme gewährleisten.

Restriktionsspaltung von DNA	
DNA	1 µg
Restriktionsenzym (NEB)	2-10 U
10x Restriktionspuffer (NEB)	2 µl
100x BSA (NEB)	0,2 µl
ad 20 µl H ₂ O	
Inkubation für 2 h bei 37°C	

2.2.7 Ligation von DNA

Die Insertion von DNA-Fragmenten in den modifizierten Expressionsvektor pCEP-Pu wurde unter der Verwendung der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dabei wurden ca. 25ng geschnittener Vektor-DNA mit einem 3-5-fachen molaren Überschuss des geschnittenen DNA-Fragments eingesetzt.

Ligation von DNA	
DNA Insert	25 ng
DNA Vektor	ca. 25-125 ng
T4-DNA-Ligase (NEB)	5-10 U
10x T4-DNA-Ligase Puffer(NEB)	1µl
ad 10 µl H ₂ O	
Inkubation für 1 h bei RT	

2.2.8 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden durch die Zentrale Bioanalytik (ZBA) des ZMMK (Zentrum für molekulare Medizin der Universität zu Köln) durchgeführt und erfolgten unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes vom Typ *ABI Prism 377 DNA Sequencer* und des *Big Dye v1.1 Cycle Sequencing Kits* (beide Applied Biosystems). Die Sequenzierung erfolgte unter der Verwendung der zur Amplifikation verwendeten Primer sowie durch Sequenzierungsprimer (COMP T3, zur Verfügung gestellt von M. Schmitz) und interne Primer des ZMMK. Zur Sequenzierung wurden 200-400 ng gereinigter Plasmid-DNA 0,5 µl Primer (10 µM) zugesetzt und das

Volumen mit H₂O auf 6µl eingestellt. Die erhaltenen Sequenzen wurden entweder internetbasiert mittels NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder dem Programm GeneTool Lite mit den Datenbanksequenzen verglichen. Fehlerfreie Plasmid-DNA Konstrukte wurden zur Transformation von Bakterienkulturen verwendet.

2.2.9 Herstellung von Bakterienkulturen

Die Kultivierung von E.coli Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium bei 37°C (Brutschrank: Heraeus, Typ B5050 E, Heraeus Instruments) und entweder in An- oder Abwesenheit von Ampicillin (50 µg/ml). Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde frisches LB-Medium mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft (1 Kolonie/5 ml, ebenfalls mit oder ohne Ampicillin) und für 8 – 16 Stunden bei 37°C und 200-250 U/min geschüttelt. Für eine langfristige Lagerung transformierter Bakterien wurden Übernachtkulturen mit 0,1 Volumen Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.10 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Bakterienkultur (Typ DH5α) angeimpft und 2-3 h bei 37°C schüttelnd (220 U/min) inkubiert. Die Vermehrung der Zellen erfolgte unter photometrischer Kontrolle ($\lambda = 600 \text{ nm}$) bis die Kultur eine optische Dichte von 0,5 erreicht hatte. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in 50ml Falcon-Röhrchen (Greiner) 15 min auf Eis weiterinkubiert und schließlich zentrifugiert (15 min, 1200 x g, 4°C). Der Resuspension der Bakterien in 33 ml steriler RF I Lösung schloß sich eine weitere Inkubation (30 min) auf Eis und eine erneute Zentrifugation (15 min, 1200 x g, 4°C) an. Die sedimentierten Bakterien wurden dann in 8 ml RF II Lösung resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Tab. 2.9: Lösungen zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien.

RF I Lösung	RF II Lösung
100 mM RbCL	10 mM MOPS
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM KAc	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin
15 % (v/v) Glycerin	

2.2.11 Transformation von Bakterien

50 µl transformationskompetente DH5α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng rekombinanter Plasmid-DNA versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 80 sec bei 42°C inkubiert und direkt danach für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zu den vorbereiteten Bakterien hinzugegeben und die Suspension bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurden jeweils 10 µl und 100 µl der Bakterienkultur auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien auf ihre Transformation hin untersucht.

2.2.12 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Einzelkolonien transformierter Bakterien wurden in 5 ml für 8-16 h bei 37°C geschüttelt (200-250 U/min), anschließend wurden 2 ml der Bakterienkultur für 1 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den pelletierten Bakterien wurde nach Herstellervorschrift mit dem „Nukleo Spin Plasmid“-Kit (Macherey-Nagel) und dessen zugehörigen Puffern durchgeführt.

2.2.13 Präzipitation von DNA (Ethanol-fällung)

Zur Ethanol-fällung von DNA wurden den entsprechenden Lösungen 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2 Volumen eiskaltes Ethanol (96 %) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation (10 min, 12000 x g, 4°C) pelletiert, das Pellet zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und wiederum zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

2.3 Zellkulturarbeiten

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Für die rekombinante Expression von Proteinen wurde die humane Nierenzelllinie HEK-293 EBNA (Invitrogen) verwendet. Für die meisten der für diese Arbeit benötigten Proteine und Proteinfragmente lagen bereits fertig transfizierte Zelllinien vor. Die noch fehlenden Konstrukte wurden ebenfalls in EBNA Zellen transfiziert. Die HEK-293 EBNA Zellen enthalten eine Neomycin-Resistenz und sind dadurch mit Geneticin (G418) selektionierbar, außerdem enthalten sie das EBNA-1 Gen (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*), welches die Expression und Replikation des Vektors pCEP-Pu unterstützt.

Für die Durchführung von Zellanhaftungsversuchen wurden Keratinozyten- (HaCaT), Fibroblasten- (Wi26, GD25) und CHO-Zelllinien verwendet (Herkunft s. 2.1.7). Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ in modifizierten DMEM/F12 Nährmedien (s. Tab. 2.10), zur Selektionierung frisch transfizierter HEK-293 EBNA-Zellen wurde dem Medium Puromycin (0,5 µg/ml) hinzugefügt.

2.3.2 Nährmedien von Zellen

Tab. 2.10: Nährmedien von Zellen

DMEM Vollmedium	DMEM Vollmedium - serumfrei	DMEM CHO Medium
DMEM/F12 ¹	DMEM/F12	DMEM/F12
10 % FCS ²	2 mM Glutamin	1 % nicht-essentielle Aminosäuren ¹
2 mM Glutamin ¹	1 % Penicillin/Streptomycin	10 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin ¹		0,5 µg/ml Gentamycin ¹

1 = bezogen von Gibco, 2 = fötales Kälberserum

2.3.3 Expansion von Zellen und Ernte von Zellkulturüberständen

Konfluente Zellschichten wurden dreifach mit PBS gewaschen. Zur Ablösung vom Boden der Kulturschale und zur Vereinzelnung der Zellen wurde der Zellrasen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %/2 mM in PBS) bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte anschließend durch die Zugabe von 2-10 Vol. Vollmedium zu der Zellsuspension, danach konnten die Zellen im gewünschten Verhältnis (1:2 – 1:10) passagiert oder für Zellanhaftungsversuche verwendet werden.

2.3.4 Transfektion von HEK-293 EBNA Zellen

Die Transfektion von 293 EBNA Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des nicht-liposomalen Reagens FuGENE 6 (Roche) und mit Zellen die zu 50-70 %iger Konfluenz (10 cm Kulturschale) herangewachsen waren. Parallel zu einem Wechsel des Zellmediums zu frischem Vollmedium wurden 3 µl FuGENE-Lösung mit 97 µl serumfreiem Medium versetzt und 5 min bei RT inkubiert. 1µg Plasmid-DNA wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und nach der Inkubation tropfenweise mit der verdünnten FuGENE-Lösung vermischt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-FuGENE-Gemisch zu den vorbereiteten Zellen hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde durch die Zugabe von 1µg/ml Puromycin die Selektion eingeleitet.

2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Zu 80-90 % konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst. Nach der Inaktivierung des Trypsins mit mind. 2 Vol. Vollmedium wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, RT, 100 x g) und anschließend in Kryomedium (Vollmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. In 1 ml-Fraktionen (pro Zellkulturschale) wurden die Zellen in Kryoröhrchen (Greiner) pipettiert und in Gefäßen mit Isopropanol (Nalgene) langsam (ca. $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) auf -80°C eingefroren. Für eine langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.6 Ernte serumfreier, konditionierter Überstände

Zur Gewinnung rekombinant exprimierter Proteine wurden in großen Dreifach-Zellkulturflaschen (Nunc) konfluent gewachsene, transfizierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Vollmedium weiterkultiviert. Nach 24 h wurde das Medium erneut gegen frisches, serumfreies Vollmedium ausgetauscht, die Ernte des konditionierten Zellkulturüberstands erfolgte nach 3-4 weiteren Tagen. Es konnte bis zu 3 Mal erfolgreich von einer Zellkultur geerntet werden. Das Medium wurde sofort zentrifugiert (20 min, 12000 x g, 4°C) und anschließend filtriert, danach wurden ihm 0,02 % NaN_3 und, im Fall von COMP-enthaltenden Überständen, jeweils 2mM der Proteasehemmer PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und NEM (N-Ethyl-Maleinimid) zugesetzt. Danach erfolgte die Reinigung der Proteine, die Überstände wurden bestenfalls kurzzeitig gelagert (4°C) und nicht eingefroren.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Sequentielle Extraktion von Matrilin-1

Für die native Extraktion von Matrilin-1 aus bovinem Gewebe wurde Rippen- und Brustbeinknorpel eines Rinderfötus verwendet. Das Tier (ca. 5. Monat der Gestation) wurde vom Schlachthof Euskirchen bezogen und hatte eine Scheitel-Steiß-Länge von ca. 50 cm. Alle Vorgänge fanden auf Eis oder im Kühlraum (4°C) statt. Der präparierte Knorpel (ca. 15 g) wurde im 20-fachen Volumen (g/ml Naßgewicht) des vorgekühlten TBS-Extraktionspuffers E I bis zur breiigen Konsistenz zerkleinert (Polytron Homogenisator) und über Nacht im Kühlraum (4°C) rollend extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt (ca. 300 ml) durch Zentrifugation (20 min, 10000 x g, 4°C) von festen Rückständen befreit. Das Pellet wurde in TBS-Extraktionspuffer E II (Volumen wie E I) resuspendiert, erneut über Nacht extrahiert und wiederum zentrifugiert. Das Protein konnte mittels Ionenaustauscherchromatografien aus dem Überstand isoliert werden.

Tab. 2.11: Extraktionspuffer I und II

TBS-Extraktionspuffer E I	TBS-Extraktionspuffer E II
150 mM NaCl	150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
2 mM PMSF	2 mM PMSF
2 mM NEM	2 mM NEM
	10 mM EDTA

Anionenaustauscher

20 ml einer DEAE-Sepharose (GE Healthcare) wurden in einen Säulenkörper gefüllt und bei einer Flußrate von 0,5-0,7 ml/min mit Puffer E II gepackt und äquilibriert. Zur Entfernung von Proteoglykanen wurde der von Rückständen befreite Überstand des Knorpelextrakts bei gleich bleibender Flußrate über die DEAE-Matrix passagiert. Der durchgelaufene Überstand wurde dann zur Elution des Matrilin-1 Proteins über einen Kationenaustauscher gegeben.

Kationenaustauscher

Der nach dem Anionenaustauscher gewonnene Extrakt wurde mit 50 mM Tris, pH 7,4 auf eine NaCl-Konzentration von 90-100 mM verdünnt. Ein FPLC-Säulenkörper (Amersham) wurde mit 8 ml einer SP-Sepharose *Fast-Flow* (Amersham) gefüllt und bei einer Flußrate von 1 ml/min mit Puffer E III gepackt und äquilibriert. Der Knorpel-extrakt wurde bei gleich bleibender Flußrate über die Säule passagiert, anschließend wurde die Säulenmatrix mit 5 SV Puffer E III gewaschen. Danach wurde die Säule in einer FPLC-Anlage (Pharmacia) montiert und das gebundene Protein mittels eines linear ansteigenden NaCl-Gradienten (100 ml, 100 mM – 500 mM) eluiert. Der Gradient wurde durch die sukzessive Vermischung von Puffer III und IV erreicht. Die Eluate wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt und bereits während der Elution photometrisch auf ihren Proteingehalt untersucht und im Anschluß mittels SDS-PAGE und Immunoblot weiter analysiert.

Tab. 2.12: Extraktionspuffer III und IV

Puffer E III	Puffer E IV
100 mM NaCl	500 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
2 mM PMSF	2 mM PMSF
2 mM NEM	2 mM NEM
0,02 % NaN ₃	0,02 % NaN ₃

2.4.2 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mittels StreptII-Markierung

Rekombinant exprimierte Vollängen Matrilin wurden über ihre C-terminale StreptII-Markierung affinitätsgereinigt. Dazu wurden 1-2 ml einer Streptactin-Sepharose (IBA) in einen Säulenkörper eingefüllt und mit 10 Säulenvolumen (SV) Puffer I und einer Flußrate von ca. 150-200 µl/min äquilibriert und gepackt. Anschließend wurden die konditionierten Überstände (ca. 500 ml) mit einer Flußrate von ca. 100 µl/min über die Säule gegeben. Danach wurde die Säule bei gleich bleibender Flußrate mit 5-10 SV Puffer S I gewaschen und über die StreptII-Markierung gebundenes Protein schließlich mit 10 SV Puffer S II eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Um Dialysen zu vermeiden, wurde der Puffer S II auf der Basis des SPR-Laufpuffers (HBS-P, Biacore, s. Kapitel 2.5.2) angesetzt, wenn die eluierten Proteine für SPR-Versuche eingesetzt werden sollten.

Tab. 2.13: Puffer zur Affinitätsreinigung über StreptII

Puffer S I	Puffer S II	Puffer S II (SPR)
150 mM NaCl	150 mM NaCl	HBS-P (Biacore)
100 mM Tris-HCl, pH 8,0	100 mM Tris-HCl pH 8,0	2,5 mM Desthiobiotin (IBA)
	2,5 mM Desthiobiotin (IBA)	0,02 % NaN ₃
	0,02 % NaN ₃	

2.4.3 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mittels His_{6/8}-Markierung

Rekombinant exprimierte Matrilin- und COMP-Fragmente und Vollängen COMP-Protein wurden über ihre N- und C-terminale His_{6/8}-Markierung affinitätsgereinigt. Dazu wurde 1 ml einer Metallionen-Affinitätsmatrix (*Talon Superflow Metal Affinity Resin*[®], Clontech) in einen Säulenkörper eingefüllt, und mit ca. 10 Säulenvolumen (SV) Puffer H I und einer Flußrate von 1 – 2 ml/min äquilibriert und gepackt. Anschließend wurden die konditionierten Überstände (50 – 500 ml, COMP: bis zu 2 l) mit der gleichen Flußrate über die Säule gegeben. Danach wurde die Säule mit 5-10 SV Puffer H I gewaschen und über die His-Markierung gebundenes Protein schließlich mit 10 SV Puffer H II eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Im Fall von COMP-Proteinen wurden dem Puffer H II je 2 mM PMSF und NEM hinzugefügt. Wie für Puffer S II (2.4.1) wurde auch der Puffer H II für Proteine, die für SPR-Versuche eingesetzt werden sollten, auf der Basis des SPR-Laufpuffers angesetzt.

Tab. 2.14: Puffer zur Affinitätsreinigung über His_{6/8}

Puffer H I	Puffer H II	Puffer H II (SPR)
150 mM NaCl	150 mM NaCl	HBS-P (Biacore)
50 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 mM Tris-HCl pH 7,4	200 mM Imidazol (Sigma)
	200 mM Imidazol (Sigma)	0,02 % NaN ₃
	0,02 % NaN ₃	

2.4.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Antikörper wurden aus vorhandenen Antiseren mittels CNBr-Sepharose affinitäts-gereinigt. Antiserum mit 500 µg des gewünschten Antigens (ca. 2-2,5 ml) wurde dazu über Nacht gegen 5 l Kopplungspuffer dialysiert. 150 mg CNBr-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) wurden in 500 µl 1mM HCl bei 4°C für 1 h aktiviert, 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert und erneut in 500 µl 1 mM HCl resuspendiert. Nach vier Wiederholungen wurde die aktivierte CNBr-Sepharose (in 500 µl HCl) mit dem dialysierten Antiserum vermischt und der gesamte Ansatz 16 h bei 4°C langsam rollend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert und zweimal in je 1 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zur Absättigung frei gebliebener Bindungsstellen wurde die aktivierte Sepharose anschließend in 750 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und 2 h bei 4°C inkubiert. Die Protein-gekoppelte Sepharose wurde in einen kleinen (1 ml) Säulenkörper überführt und bei einer Flußrate von 0,1 ml/min mit 5 SV 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 (Puffer A I) gewaschen und gepackt. Weitere Waschschriffe erfolgten alternierend mit jeweils 10 SV Puffer A II und 10 SV Puffer A I und jeweils mindestens drei Wiederholungen.

Tab. 2.15: Puffer zur Affinitätsreinigung über His_{6/8}

Kopplungspuffer	Puffer A I	Puffer A II	Puffer A III	Puffer A IV
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl		500 mM NaCl
100 mM NaHCO ₃	100 mM Tris-HCl	100 mM Na-Acetat	10 mM Tris	10 mM Tris
	pH 8	pH 4	pH 7,5	pH 7,5
Puffer Blockierung/Neutralisierung			Elutionspuffer	
1M Tris-HCl, pH 8			100 mM Glycin pH 2,5	

5 ml Antiserum wurden durch Zentrifugation geklärt (1 h, 12000 x g, 4°C) und im Verhältnis 1:10 in Puffer A III verdünnt. Das verdünnte Serum wurde mit einer Flußrate von 100 µl/min auf die Affinitätssäule geladen und bis zu 2 Tage im geschlossenen System zirkuliert. Anschließend wurde die Säule mit 5 SV Puffer A III und 5 SV Puffer A IV gewaschen. Gebundene Antikörper wurden in 6 Fraktionen von jeweils 0,75 ml Elutionspuffer in Reaktionsgefäße mit vorgelegten 0,75 ml 1M Tris-HCl, pH 8 eluiert.

Für diese Arbeit lagen bereits affinitätsgereinigte Antikörper gegen Matrilin-4 vor, Antikörper gegen Matrilin-3 wurden aus bereits früher hergestelltem Antiserum neu gereinigt, dieses war gegen rekombinantes Matrilin-3 ohne C-terminale *coiled-coil* Domäne gerichtet (Klatt et al., 2000). Die verwendeten Antikörper gegen Matrilin-1 und COMP wurden für die vorliegende Arbeit nicht affinitätsgereinigt, da sie bereits als Serum eine genügend hohe Spezifität und einen hohen Titer aufwiesen.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösungen erfolgte unter Anwendung der Bradford-Methode. Bradford-Stammlösung wurde 1:5 in H₂O verdünnt, im Verhältnis 50:1 zu der Proteinlösung gegeben (200 µl + 4 µl) und 5 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei 595 nm bestimmt, als Referenz diente eine BSA-Standardreihe, angesetzt mit dem gleichen Puffer in dem das zu messende Protein vorlag. Die Erstellung der BSA-Regressionskurve (nicht-linear) erfolgte automatisch im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf).

Bradford-Stammlösung (5x)
2,5 ml Ethanol (96 %, v/v)
25 mg Coomassie Brilliant Blue G250
25 ml H ₃ PO ₄ (konz.)
ad 50 ml H ₂ O

2.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden nach der Methode der diskontinuierlichen vertikalen Elektrophorese (Laemmli, 1970) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, verwendet wurde dabei das Elektrophorese-System Hoefer SE 200 Mighty Small System (Amersham Pharmacia). Als Grundlage für die Trenngelmatrix wurde eine 30%ige Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5 : 1, National Diagnostics) eingesetzt, deren Acrylamidkonzentration an die zu untersuchenden Proben angepasst wurde. Für hochmolekulare, heterogene Proteinlösungen wurden Gele mit linearen Acrylamidgradienten aus zwei Lösungen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen hergestellt, die Acrylamidkonzentration in der Sammelgelmatrix betrug immer 4 %. Nach dem Ansetzen der Gellösung mit der gewählten Acrylamidkonzentration wurde die Auspolymerisierung zu einem Gel durch radikalische Polymerisation nach Zugabe von 75 µl Ammonium-persulfatlösung (APS, 10 %, v/v) und 3 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin) pro 7 ml Acrylamidlösung ausgelöst.

Tab. 2.16: SDS-PAGE Puffer

Sammelgelpuffer	Trenngelpuffer
375 mM Tris-HCl pH 6,8	125 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS

Die Acrylamidlösung bzw. ein Gradient aus zwei Lösungen verschiedener Acrylamidkonzentrationen wurde in eine Gießkammer gegossen und mit wasser-gesättigtem Butanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung wurde das Butanol entfernt, der Sammelgelpuffer ebenfalls mit APS und TEMED versetzt, über das Trenngel gegossen und auspolymerisiert.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und nach ca. 5 min auf das in der Laufkammer montierte und mit SDS-Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Zur Analyse reduzierter Proteinproben wurde der Auftragspuffer vorher mit β -Mercaptoethanol (Endkonz. 0,5 %; v/v) versetzt und die Proteine 5-10 min bei 100°C reduziert. Zum Größenvergleich aufgetrennter Proteine wurde außerdem ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 150 V.

2.4.7 Coomassie Färbung von Proteinen

In SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine wurden mit einer Coomassie Färbelösung denaturiert, fixiert und angefärbt. Zur Färbung wurden die SDS-Gele für 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung wieder entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Die Nachweisgrenze liegt für diese Färbemethode bei ca. 0,5 μ g Protein. Die Lagerung der Gele erfolgte, wenn nötig, in 7 % (v/v) Essigsäure bei RT.

Tab. 2.17: (Ent-)Färbelösungen SDS-PAGE

Coomassie Blau Färbelösung	Entfärbelösung
50 % (v/v) Methanol	40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure	10 % (v/v) Essigsäure
0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250	

2.4.8 Western Blot

Transfer

Mittels Immuno- bzw. Western Blot können elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA45, Schleicher & Schüll) transferiert werden, um dann immunologisch mit spezifischen Antikörpern detektiert zu werden. Für die

vorliegende Arbeit wurden die Proteine im Tankblot (Hoefer TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit) bei 400 mA für 1-2 h oder 100 mA über Nacht auf Membranen transferiert, der dabei verwendete Blotpuffer bestand aus 50 mM Borsäure (pH 8,5) und 10 % Methanol.

Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für 5 min bei RT mit einer Ponceau S-Lösung (Serva) gefärbt und danach kurz mit H₂O gewaschen. So konnten die transferierten Proteine reversibel gefärbt werden, die Nachweisgrenze liegt hier bei ca. 1-2µg Protein. Nach der Markierung des, ebenfalls transferierten, Molekulargewichtsmarkers erfolgte die vollständige Entfärbung mit TBS. Vor der immunologischen Detektion von Proteinen wurden freie Bindungsstellen der Membran und unspezifische Proteinbindungsstellen durch eine Inkubation der Membran mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (1 h, RT) blockiert. Die zu untersuchenden, transferierten Proteine wurden mittels spezifisch gegen die jeweiligen Proteine gerichteten (Primär-) Antikörpern detektiert. Die Primär-Antikörper wurden dazu in optimaler Konzentration in 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBS verdünnt und die Membranen für 1 h bei RT in den entsprechenden Antikörperlösungen inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich gewaschen (3 x 5 min, TBST 0,01; 3 x 5 min TBS). Die gebundenen, primären Antikörper wurden mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert, diese wurden dazu ebenfalls in 5 % Milchpulver/TBS-Lösung den Herstellerangaben gemäß verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum gründlich gewaschen (3 x 5 min, TBST 0,01; 3 x 3 min TBS; 3 x 1 min H₂O) und schließlich zur Entwicklung eines Chemolumineszenzsignals für 1 min bei RT mit der Substratlösung für die an den Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase inkubiert. Die Chemolumineszenzsignale reichten aus, um Röntgenfilme (Super RX, Fuji) zu belichten, nach entsprechender Expositionszeit (10 – 90 sec) wurden diese entwickelt und das Ergebnis analysiert.

Substratlösung Westernblot	
333 µl	3 M Tris-HCl, pH 8,5
22 µl	90 mM p-Coumarinsäure
50 µl	250 mM Luminol
3 µl	H ₂ O ₂ [30 % (v/v)]
ad 10 ml H ₂ O	

2.4.9 Biotinylierung von Glykosaminoglykanen

Die Glykosaminoglykane wurden in Konzentrationen von 1 mM in 10 ml PBS gelöst, mit 10nM Biotin LC Hydrazid (in DMSO) versetzt und über Nacht bei 4°C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz 2 x gegen jeweils 5 l PBS dialysiert. Die verwendeten Glykosaminoglykane wurden von Sigma (Heparin, Chondroitinsulfat) und Celsus, Ohio (Heparansulfat) bezogen.

2.4.10 Cirkulardichroismus Spektroskopie (CD)

Aus dem Vergleich von gemessenen UV-Circulardichroismusspektren mit Referenzspektren bekannter Sekundärstrukturen lassen sich Sekundärstrukturen von Proteinen ableiten. Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm gemessen und als Elliptizität angegeben. Die Elliptizität ist in der Chiralität der untersuchten Strukturen begründet, vor allem der Carbonylgruppen der Proteine, die bei asymmetrischer Substitution zwei Absorptionsübergänge haben. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode benutzt, um die Konformationsänderung der Sekundärstruktur von Proteinen nach der Zugabe von divalenten Kationen zum Lösungsmittel zu messen.

Die zu untersuchenden Proteine (400 µl, 100 µg/ml) wurden dazu gegen 5 mM Tris, pH 7,4 dialysiert. Dabei wurde zu dem Dialysepuffer eine hohe Konzentration (50g/l) von Chelex (Biorad) hinzugegeben, einem Chelatbildner, der in dem Puffer gelöste divalente Kationen ohne die Verwendung von EDTA vollständig entzog. Die CD-Spektren wurden mit dem JASCO 710 CD-Spektrometer bei einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Die *Scan*-Geschwindigkeit betrug 20 nm/min, die Bandbreite 1 nm, die Auflösung 0,1 nm, die Empfindlichkeit 20 mdeg, die Zeitkonstante 4s, die Temperatur 25°C und die Schichtdicke der Quarzküvette 0,1 cm. Beginnend mit einer kationfreien Lösung wurde die Messung mit 200 µl Probelösung mehrfach wiederholt und dabei die Konzentration von Mg²⁺ bzw. Ca²⁺ durch schrittweise Zugaben kleiner Volumina (1 µl) einer 100 mM Kationen-Lösung schrittweise erhöht ($\Delta [c] = 0,5 \mu\text{M}$). Die Analysen im Spektrometer fanden nach 15-minütiger Inkubationszeit der Protein-Kationen-Gemische statt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der JASCO-Software *Standard Analysis*.

2.5 Bindungsstudien

2.5.1 ELISA-ähnliche Versuche (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Die zu untersuchenden Proteine wurden zur Immobilisierung mit TBS (nicht-kollagene Proteine) oder 3 % Essigsäure (Kollagene) auf die gewünschten Konzentrationen (10–50 µg/ml) verdünnt. Alle während der ELISA-ähnlichen Versuche verwendeten Puffer und Lösungen enthielten 2 mM Mg²⁺ und Ca²⁺. Die Immobilisierung auf ELISA-Platten (Maxisorb[®], Nunc) erfolgte mit 100 µl pro Meßkammer über Nacht bei RT (Kollagen III-Peptide: 4°C). Anschließend wurden die Meßkammern drei Mal gewaschen (TBST 0,05, jeweils 400 µl/Meßkammer) und frei gebliebene Bindungsstellen des Kunststoffes mit TBS/5 % Milchpulver (2 h, RT, 100 µl/Meßkammer) blockiert. Die Exponierung der immobilisierten Proteine zu den möglichen Bindungspartnerproteinen erfolgte nach drei weiteren Waschschritten durch Inkubation für 1 h bei RT (100 µl/Meßkammer), die entsprechenden Proteine wurden zuvor in TBS/5 % Milchpulver auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt (10–50 nM). Die Detektion gebundener Proteine erfolgte nach erneutem, dreifachem Waschen mittels spezifischer Primärantikörper (1 h, RT, 100 µl/Meßkammer, in optimaler Konzentration in TBS/5 % Milchpulver verdünnt). Anschließend 3 Waschschritten folgte die Detektion der gebundenen primären Antikörper mittels geeigneter, HRP-konjugierter Sekundärantikörper, die in empfohlener Konzentration in TBS/5% Milchpulver verdünnt und mit 100 µl/ Meßkammer 1 h bei RT auf der ELISA-Platte inkubiert wurden. Vier letzte Wasch-schritte mit TBST 0,05 wurden von einem Waschschrift mit H₂O und der Entwicklung des Versuchsansatzes gefolgt. Diese erfolgte im Dunkeln durch Inkubation (20-90 min, RT, 50 µl/Meßkammer) mit dem frisch angesetzten Detektionsreagenz. Eine positive Reaktion war an einer Blaufärbung erkennbar, die durch die enzymatische Umsetzung des Substrats durch die HRP erzeugt wurde. Bei Erreichen des optimalen Farbumsatzes wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl H₂SO₄ (10 %) abgestoppt. Die Zugabe der Schwefelsäure führte zu einem Farbumschlag nach gelb, die Absorption des Reaktionsansatzes wurde bei 450nm im Plattenlesegerät (Titertek) photometrisch bestimmt. Für alle Versuche wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

ELISA-Detektionsreagens	
9 ml	H ₂ O
1 ml	1 M Na-Acetat/Zitronensäure pH 6
62,5 µl	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (10 mg/ml in DMSO)
15 µl	3,5% H ₂ O ₂

2.5.1.1 ELISA-ähnliche Versuche mit Integrin Ektodomänen

Die Durchführung der ELISA-ähnlichen Versuche mit Integrin Ektodomänen unterschied sich geringfügig. Die Immobilisierung der Matriline erfolgte mit 15 µg/ml, die der Kontrollen mit 10 µg/ml (humanes Kollagen IV Fragment CB3) bzw. 20 µg/ml (bovines Kollagen I) in TBS/1 mM MgCl₂ (Matriline) und 0.1 M Essigsäure (Kollagene). Die Blockierung wurde hier mit 1 % BSA in TBS/1 mM MgCl₂ durchgeführt, danach wurden α1β1 Integrin und α2β1 Integrin mit 50 nM bzw. 40 nM für 2 h bei RT inkubiert, dabei enthielten die Puffer entweder 1mM MnCl₂ oder 1 mM MnCl₂ und 200 mM des Integrin-aktivierenden Antikörpers 9EG7 (Bazzoni *et al.*, 1995) oder 10 mM EDTA. Die Waschschritte erfolgten mit 50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM MnCl₂, anschließend wurde gebundenes Protein mit 2.5 % Glutaraldehyd fixiert und in der ELISA-üblichen Art mit einem gegen humanes β1-Integrin gerichteten Antikörper (Eble *et al.*, 2001) detektiert.

2.5.2 Oberflächen Plasma Resonanz (SPR)

Alle SPR-Messungen wurden mit einem Biacore 2000 SPR-Gerät bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0.

2.5.2.1 Verwendete Chips

Typ	Kopplungsmechanismus
CM 5 (Biacore)	Kovalente Kopplung der Liganden über Aminogruppen auf einer carboxylgruppenreichen Dextranmatrix.
SA (Biacore)	Nicht-kovalente Kopplungen biotinylierter Liganden auf einer mit Streptavidin präparierten Chipoberfläche

2.5.2.2 Vortests

Mit Vortests wurde überprüft, bei welchem pH-Wert und bei welcher Konzentration das jeweilige Protein auf einer nicht aktivierten CM 5-Sensorchip Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen in optimaler Weise aufkonzentriert werden konnte. Die Injektionen dafür erfolgten nach der Äquilibration des Systems (Flußrate 5 µl/min) mit Laufpuffer (Biacore, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,005 % P20, pH 7,4). Die zu koppelnden Proteine wurden bei den in Frage kommenden Konzentrationen in Natriumacetatpuffern (10–20 mM, pH 4–5) verdünnt. Dabei sollte der pH-Wert der Lösung immer kleiner sein als der pI des zu untersuchenden Proteins da die ionischen Wechselwirkungen an der Chipoberfläche sonst nicht zu Stande kommen können. Die

Injektionen erfolgten mit dem Injektionsbefehl „*Inject*“ bei Flußraten von 5 µl/min und mit Volumina zwischen 30 und 40 µl. Ziel war, Bedingungen (Konzentration, pH) zu finden, bei der nach ca. 35 µl Injektion die Basislinie ein um ca. 800–2000 RU erhöhtes SPR-Signal zeigte (abhängig vom immobilisierten Liganden) und die Kopplung mit der optimalen Kinetik ablief, nämlich möglichst langsam, um eine gleichmäßige Verteilung des Liganden auf der Chipoberfläche zu erreichen. Zwischen einzelnen Versuchen wurde der Chip durch die Injektion von geeigneter Regenerationslösung (1-2 M NaCl) regeneriert (Befehl „*Quickinject*“).

Mit SA-Chips und biotinylierten Liganden wurden keine Vortests durchgeführt, sondern die Kopplungen nach Herstelleranweisungen direkt durchgeführt.

2.5.2.3 Kopplung

Für die Kopplung wurde das System mit Laufpuffer bei einer Flußrate von 5 µl/min äquilibriert. CM 5 Chips wurden durch die Injektion von 50µl NHS/EDC¹ (0,05 M/ 0,2 M, Biacore, verdünnt nach Herstelleranweisung) aktiviert. Danach wurden 50 µl des Liganden unter den vorher ermittelten Bedingungen in das System injiziert (Flußrate 5µl/min, Befehl „*Inject*“). Anschließend wurden alle verbliebenen freien Bindungsstellen durch die Injektion von 50µl 1 M Ethanolamin, pH 8,5 (Biacore, verdünnt nach Hersteller-anweisung) abgesättigt und zum Waschen des Chips zwei Injektionen mit Laufpuffer durchgeführt (je 5 µl, *Quickinject*)

SA-Chips wurden zur Kopplung bei Flußraten von 15 µl/min mit Laufpuffer äquilibriert. Mit Laufpuffer auf pM-Konzentrationen verdünnte, biotinylierte Liganden wurden bei dieser Flußrate in Volumina von ca. 15 µl injiziert und immobilisiert.

2.5.2.4 Messung

Für die Messungen wurde das System mit Laufpuffer bei einer Flußrate von 30 µl/min äquilibriert. Mit Vorhandensein einer stabilen Basislinie (Schwankungen < 2 RU) wurden die zu untersuchenden Proteine bei gleicher Flußrate in den gewünschten Konzentrationen injiziert (120 µl), dabei wurde der Befehl *Kinject* (an Stelle des üblichen *Inject*) gewählt um das vollständige Datenspektrum zu sammeln und kinetische Analysen zu ermöglichen. Alle Injektionen wurden bei ansteigenden Konzentrationen durchgeführt, die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen zwischen 1 nM und 4 µM und wurden den Versuchen angepasst. Die Injektionsvolumina lagen immer bei 50 µl, die Dissoziationszeit zwischen 180 und 360 Sekunden. Nach jeder Messung wurde der Chip durch die Injektion von hochmolaren

¹ N-Hydroxysuccinimid/1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl] Carbodiimid

NaCl-Lösungen (1–2 M) regeneriert (gleiche Flußraten, 50 – 100 µl), um alles nicht abgelöste Protein von der Chipoberfläche zu verdrängen und das SPR-Signal wieder zurück auf Basislinienniveau zu bringen. Nach jeder Messung erfolgte eine Waschung der Injektionsnadel und der Internen Flußzelle.

2.5.3 Zellanhaftungs-Versuche

96-Loch Zellkulturplatten (Costar, Cambridge, MA) wurden mit den zu untersuchenden Proteinen in gewünschter Konzentration (verdünnt in PBS) gekoppelt (über Nacht, 4°C, 100 µl/Meßkammer). Anschließend wurden die Meßkammern drei Mal mit PBS gewaschen und freie Bindungsstellen des Kunststoffes mit 100 µl 1 % BSA (bovines Serumalbumin) in PBS blockiert (1 h, RT). Zellen von ca. 90 % konfluent gewachsenen Zellkulturplatten wurden abgelöst und vereinzelt, zentrifugiert (5 min, 400 x g) und in serumfreiem DMEM/F12 Medium resuspendiert. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass die Zellen anschließend in Konzentrationen von 4-8 x 10⁵ Zellen/ml vorlagen. 100 µl der Zellsuspension wurden pro Meßkammer zu den immobilisierten Proteinen hinzugegeben und inkubiert (30 min, 37°C). Die anhaftenden Zellen wurden vorsichtig ein Mal mit PBS gewaschen, fixiert (1 % Glutaraldehyd in PBS, 10 min, RT) und gefärbt (0,1 % Kristall-Violett in H₂O, 25 min, RT). Der Überschuß der Färbelösung wurde danach unter laufendem Wasser gewegewaschen. Der an den haftenden Zellen verbliebene Farbstoff wurde mit 1 % Triton-X 100 in Wasser (50 µl/Meßkammer) gelöst und die Absorption bei 540 nm im Plattenlesegerät photometrisch bestimmt. Für alle Versuche wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

2.5.4 Zellanhaftungs-Versuche mit Fluoreszenzfärbungen fokaler Kontakte

Für Durchführungen von Fluoreszenzfärbungen von anhaftenden Zellen wurden die Versuche wie unter 2.5.3 beschrieben auf Objektträgern mit Kammereinteilung (Lab-Tek™ Chamber Slides (Nunc) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit 20 µg/ml immobilisiert (über Nacht, 4°C) und anschließend mit den Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Zweimaligem Waschen (PBS) folgte die Fixierung für 10-15 min (2 % Paraformaldehyd in PBS), die Permeabilisierung der Zellen (0,2 % Triton X-100, 1 min, RT) und erneutes zweimaliges Waschen. Danach wurden freie Bindungsstellen des Kunststoffes mit 1 % BSA in PBS blockiert (1 h, RT). Alle folgenden Schritte wurden in feuchtem Milieu (Feuchtkammer) durchgeführt. Die immunologische Detektion von Vinculin erfolgte über eine Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper (s. Tab. 2.5, Sigma) mit 10 µl/Kammer, 5-10 µg/ml und für 30-60 min. Gründlichen Waschschritten (3 x 2 min in PBS) folgte die Detektion des primären

Antikörpers mit einem geeigneten Cy[™]3-konjugierten Sekundärantikörper (Jackson Laboratories) in optimaler Konzentration in PBS (45 min, im Dunkeln). Zur Visualisierung der Actin-Filamente des Zellkörpers wurden gleichzeitig in demselben Puffer auch FITC-konjugiertes Phalloidin (2,5 µg/ml, Sigma) inkubiert. Nach zwei letzten Waschschrinen (3 x 2 min in PBS) wurden die Objektträger unter Eindeckmedium (DAKO[®] *Mounting Medium*[™]) mit Deckgläschen versiegelt. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse unter einem Axiophot-Mikroskop von Zeiss.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von Matrilin-Bindungspartnern

In früheren Arbeiten (Hauser *et al.*, 1996; Piecha *et al.*, 2002; Wiberg *et al.*, 2003; Budde *et al.*, 2005; Wagener *et al.*, 2005) wurden die Matrilin-1 als Proteine identifiziert, die in der Matrix wahrscheinlich eine Adaptorfunktion zur Assemblierung und Vernetzung unterschiedlicher Matrix-Komponenten erfüllen. Zur erweiternden Charakterisierung der für die Matrilin-1 vermuteten Rolle als Adaptorproteine sollte eine umfassende Suche nach Bindungspartnern mit einer größtmöglichen Anzahl an potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt werden, gefolgt von einer detaillierten Analyse der Wechselwirkung der Matrilin-1 mit den stärksten ermittelten Bindungspartnern.

3.1.1 Native Isolation und rekombinante Expression und Reinigung von Matrilinen

Die verwendeten Matrilin-1 sollten unter nativen Bedingungen gewonnen werden, um bestmögliche Voraussetzungen für glaubwürdige, reproduzierbare und spezifische Bindungsstudien zu schaffen. Die native Reinigung von rekombinantem Matrilin-1 mittels Affinitätschromatografie war als sehr unergiebig bekannt, da die starke Neigung zu Aggregation und unspezifischen Wechselwirkungen mit allen umgebenden Materialien die Ausbeuten von Matrilin-1 zu unbrauchbaren Mengen sinken lies. Infolgedessen wurde Matrilin-1, wie bereits früher beschrieben (Hauser und Paulsson, 1994), unter nativen Bedingungen aus fötalem bovinem Rippenknorpel isoliert. Die sequenzielle Extraktion ergab ein Gemisch von Matrilin-1 Homotrimer, Matrilin-1/-3 Heterotetramer und Proteoglykanen (hauptsächlich Aggrecan), das durch die Passage über einen Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose Fast Flow) von Proteoglykanen befreit wurde. In einem weiteren Ionenaustauscher-Chromatografie-Schritt wurde das Anionenaustauschereluat über den starken Kationenaustauscher SP-Sepharose passagiert und die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 100 mM bis 500 mM eluiert (Abb. 3.1). Auf diese Weise war es möglich, die Matrilin-1 Homotrimer von den Matrilin-1/-3 Heterotetrameren zu trennen, um reines Matrilin-1 zu gewinnen.

Das Matrilin-1 Homotrimer eluierte bei einer Salinität von 180 mM – 350 mM NaCl, das Matrilin-1/-3 Heterotetramer erst ab ca. 350 mM NaCl. Die Analyse der Eluatfraktionen erfolgte anschließend mit SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 3.1). Um die

Reinheit des Matrilin-1 und die Qualität der chromatografischen Trennung abschließend zu beurteilen, wurden die Fraktionen #23 bis #65 nach einer SDS-PAGE per Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach reversibler Färbung mit Ponceau S folgte die Detektion der eluierten Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen Matrilin-1 und -3, womit die Exklusivität von rein trimerem Matrilin-1 in den Fraktionen bis #35 und Abwesenheit von Matrilin-3 in den Fraktionen bis #43 nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Die ausschließlich Matrilin-1 Homotrimer enthaltenden Fraktionen (#23 bis #39) wurden vereint und ihre Konzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt.

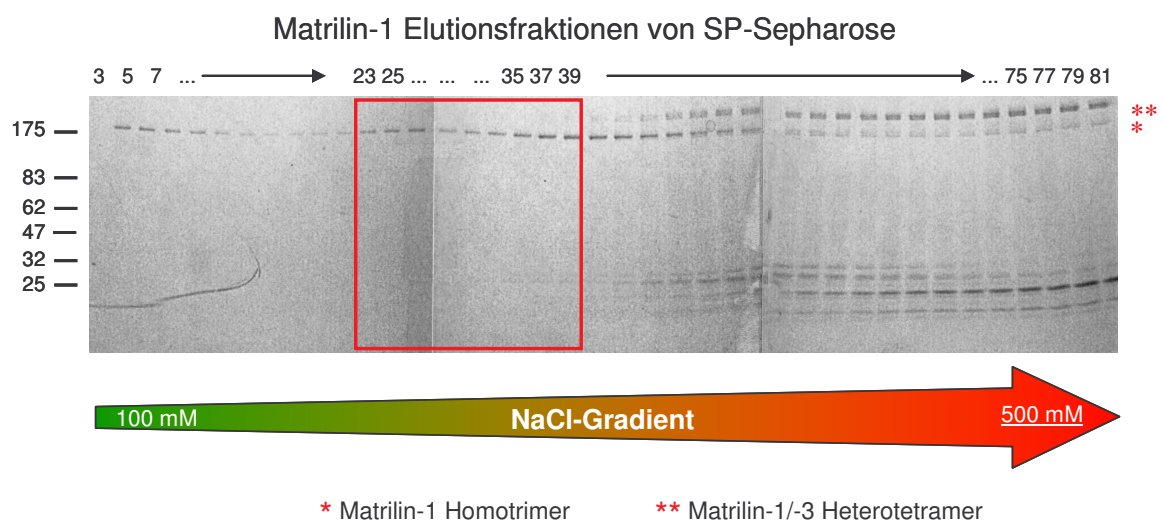


Abb. 3.1: Übersicht über die gesammelten Elutionsfraktionen nach der SP-Sephrose. Die Elution verlief über 100 x 1 ml, der NaCl-Gradient lag zwischen 100 mM und 500 mM NaCl. Die signifikanten Fraktionen #1 - #81 wurden mit einer 4-15 %igen SDS-PAGE analysiert und die eluierten Proteine mit Coomassie Blau angefärbt. Es ist jede zweite Fraktion aufgetragen worden. Die markierten Fraktionen #23 bis #39 wurden vereint und nach der Konzentrationsbestimmung für die späteren Versuche verwendet. Angaben des Molekulargewichtsstandards in kDa.

Das Konstrukt zur rekombinanten Expression und Reinigung von Matrilin-2 wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit von Patric Nitsche (Dissertation, 2001) erzeugt. Die Protein-Ausbeuten nach der Reinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatographie waren leider so gering, dass im Folgenden auf eine Verwendung von Matrilin-2 verzichtet wurde.

Rekombinant hergestelltes Matrilin-3 und -4 wurde über ein *Tag*-System affinitäts-gereinigt. Dazu wurden die entsprechenden Vollängen-Konstrukte als C-terminal StrepII-markierte Fusionsproteine rekombinant exprimiert. Die Generierung und

Beschreibung dieser Konstrukte erfolgte vor Beginn dieser Arbeit durch Andreas Klatt (Matrilin-4, Dissertation, 2001) und Harald Ehlen (Matrilin-3, Diplomarbeit, 2002). Die stabilen Zelllinien wurden in serumhaltigem Medium expandiert und schließlich serumfrei kultiviert. Die rekombinanten Proteine konnten aus dem Zellkultur-Überstand mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose-Säulen aufgereinigt werden; die Reinheit der Proteine wurde durch eine SDS-PAGE der Eluate mit anschließender Coomassie Blau-Färbung nachgewiesen. Abb. 3.2 zeigt eine zusammenfassende Übersicht über die verwendeten, gereinigten Matriline der initialen Durchmusterung. Die als Bindungspartner-Kandidaten getesteten Matrixproteine waren freundliche Gaben von M. Aumailley (Laminin-1, Fibronectin), U. Hansen (Collagen XI), M. Koch (Collagen XII, XIV, XXII), M. Mörgelin (Chad, PRELP), P. Nitsche (Biglycan), N. Smyth (Decorin) und F. Zaucke (COMP) oder wurden bei Sigma erworben (Kollagene I und II).

Bei dem nativ aus fötalem bovinem Rippenknorpel isolierten Vollängen Matrilin-1 war kein klassisches Matrilin-Bandenmuster zu sehen, das isolierte Material lag ausschließlich in seiner trimeren Form vor und lief bei apparenten 185 kDa (theoretisch 148kDa). Die Bandenmuster der rekombinant exprimierten und nativ gereinigten Vollängen Matrilin-3 und -4 Proteine wiesen erwartungsgemäß eine starke Heterogenität auf, wobei die Banden den unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden entsprachen (Abb. 3.2).

Rekombinantes Matrilin-3 kam in allen seinen oligomeren Formen mit zunehmenden Konzentrationen vor,

vom Monomer mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 65 kDa (theoretisch: 49 kDa) über das Dimer (theoretisch: 100 kDa) und das Trimer (theoretisch: 150 kDa)

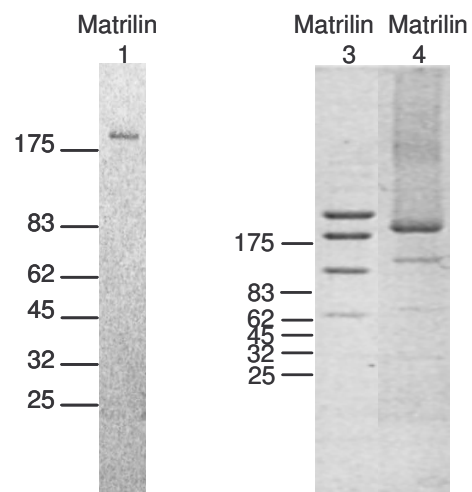


Abb. 3.2: SDS-PAGE der für die Durchmusterung möglicher Matrilin-Bindungspartner verwendeten Matrilin-Präparationen.

Die Abbildung zeigt die gereinigten Proben von Matrilin-1, -3 und -4 elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Matrilin-1 wurde auf einem 4-15 %igen, Matrilin-3 und -4 auf einem 4-12 %igen Gel analysiert. Die Angaben des Molekulargewichtsstandards sind in kDa.

bis hin zum vollständig assemblierten Tetramer mit einem apparenten Molekulargewicht von über 200 kDa (theoretisch: 196 kDa) (Abb. 3.2).

Matrilin-4 lag in rekombinanter Form hauptsächlich im vollständig oligomerisierten Trimer mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 210 kDa vor, die kleineren Oligomere (Dimer mit ca. 140 kDa und Monomer mit ca. 70 kDa) waren in sehr viel geringeren Mengen vorhanden (Abb. 3.2).

3.1.2 Durchmusterung möglicher Matrilin-Bindungspartner mit Bindungsversuchen im ELISA-ähnlichen Stil

Um möglichst viele potentielle Bindungspartner der Matriline innerhalb einer einzigen Versuchsreihe zu identifizieren, sollten Festphasen-Versuche im ELISA-ähnlichen Stil durchgeführt werden. Um zu ermitteln, welche der zur Verfügung stehenden Matrixproteine als Bindungspartner in Frage kamen, wurden die Kandidaten-Proteine bei einer Konzentration von 10 µg/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert.

Der anschließende Blockierungsschritt durch 5 %ige Milchpulverlösung (MP) in TBS diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Kunststoffes. Trotz der komplexen Zusammensetzung des Milchpulvers und seiner hohen Calciumkonzentration wurde es hier als Blockierungsreagenz der reinen BSA-Lösung vorgezogen, da es ein wesentlich geringeres Hintergrundsignal ergab und somit stärkere spezifische Signale zuließ. Matriline enthalten in ihren VWA Domänen ein MIDAS-Motiv (*metal ion dependent adhesion site*), welches divalente Kationen koordinieren kann und eine Präferenz für Mg²⁺-Kationen aufweist (Lee *et al.*, 1995). Um diesen Motiven Rechnung zu tragen, wurden die Versuche in Gegenwart von 2 mM MgCl₂ in allen Lösungen durchgeführt. Nach zweistündiger Blockierung wurden die in der Knorpel-Matrix am häufigsten vorkommenden Matriline 1, 3 und 4 als in Lösung befindliche Liganden (50 nM) zugesetzt und der Bindungsansatz analysiert (Abb. 3.3).

Die Durchmusterung der möglichen Interaktionspartner ergab für alle drei getesteten Matriline eine Reihe von Matrixproteinen, die Bindepotential zeigten (Abb. 3.3). Auffällig ist die Dominanz von *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP), das sowohl gegenüber Matrilin-1 als auch gegenüber Matrilin-3 und -4 das jeweils höchste Bindungssignal aller getesteten Proteine zeigte. Diese Tatsache indiziert eine Konservierung der COMP-Bindung unter allen getesteten Matrilinen. Matrilin-4 zeigte insgesamt die stärksten Bindungssignale zu den immobilisierten Liganden, sowie das breiteste Spektrum an potentiellen Interaktionspartnern.

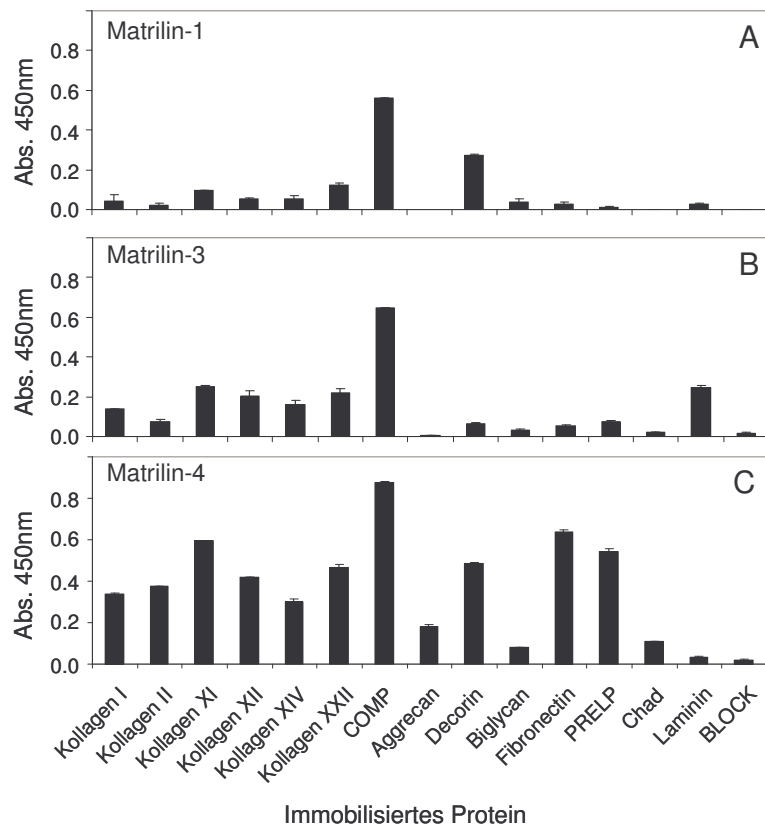


Abb. 3.3: ELISA-ähnlicher Versuch zur Identifikation von Bindungspartnern für Matrilin-1, -3 und -4. Ein Panel von verschiedenen Matrixproteinen und Proteoglykanen wurde auf sein Bindungspotential mit Matrilin-1 (A), -3 (B) und -4 (C) getestet. Die unten aufgeführten Proteine (10µg/ml, Block: 5% Milchpulver in TBS) markieren die immobilisierten Interaktions-Kandidaten. Die Bindung an Matrilin-1, -3 oder -4 (50 nM in TBS, 1h, RT) wurde nach der Inkubation durch Detektion mit spezifischen anti-Matn-1, -3 bzw. -4 Antikörpern nachgewiesen. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Allen Matrilinen ähnlich ist das Verhältnis der Bindefähigkeit innerhalb des Feldes der untersuchten Kollagene. Klare Unterschiede zeigten sich in den restlichen getesteten Proteinen. Matrilin-4 zeigte eine signifikante Bindung an PRELP, Fibronectin, Decorin und Aggrecan, nicht aber an Laminin. Matrilin-1 interagiert hier ausschließlich mit Decorin, Matrilin-3 nur mit Laminin und schwach mit PRELP, Fibronectin und Decorin. Die Matrilin-1 und -3 zeigten nur schwache Bindungen an Biglycan und nur eine geringe bzw. keine Bindung an Chondroadherin (Chad), Matrilin-4 zeigte hier zu beiden Proteinen zwar eine schwache aber signifikante Wechselwirkung.

3.1.3 Gelfiltration von bovinem Knorpelextrakt ²

Knorpelextrakte, die über native sequenzielle Extraktion aus bovinem Knorpel gewonnen wurden, enthalten reichhaltige Mischungen von extrazellulären Matrix-Proteinen (Hauser und Paulsson, 1994; DiCesare *et al.*, 1995, Hauser *et al.*, 1996), die häufig in kationenabhängiger Weise miteinander interagieren. Während der Extraktion enthalten die entsprechenden Extraktionspuffer üblicherweise 10 mM EDTA als divalente Kationen chelatierendes Molekül, welches im Rahmen der Extraktion kationenabhängige Protein-Protein Bindungen löst. Nach der Extraktion kann dem Proteinextrakt durch Dialyse das EDTA entzogen und die Kationenkonzentration durch eine weitere Dialyse gegen einen Kationen enthaltenden Puffer wieder auf annähernd physiologische Verhältnisse gebracht werden. Eine anschließende Passage über eine Gelfiltrationsmatrix (Superose 6), gefolgt von einer Analyse der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE, erlaubte weitergehende Untersuchungen der isolierten Proteine. Zur Identifizierung von Komponenten der extrazellulären Matrix, die in Kationenabhängigkeit miteinander interagieren, wurden die gesammelten Gelfiltrationsfraktionen eines EDTA-enthaltenden Extraktes mit denen eines Knorpelextrakt verglichen, dem vor der Chromatographie wieder divalente Kationen (CaCl_2) zugeführt wurden. Für Proteine, die unter CaCl_2 -beeinflussten Bedingungen ko-eluieren, unter EDTA-beeinflussten Bedingungen aber nicht, dürfen physiologisch signifikante, kationenabhängige Bindungsvorgänge angenommen werden.

In diesem Fall wurden, wie bereits früher beschrieben (Hauser und Paulsson, 1994), Proteine in Gegenwart von 10 mM EDTA aus bovinem Knorpel (adulte Schultergelenke) extrahiert und einer Gelfiltration unterzogen. Vergleichend dazu wurde der Knorpelextrakt gegen EDTA-freien aber CaCl_2 -enthaltenden Extraktionspuffer dialysiert und erst dann über die Gelfiltrationsmatrix gegeben. Die Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte anschließend mit SDS-PAGE und Silberfärbung der Banden (Abb. 3.4 A), Immunoblotting ausgewählter Fraktionen (Abb. 3.4 B) und Identifikation der getrennten Proteine mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) Analyse.

Die reduzierende SDS-PAGE der Fraktionen der Gelfiltration des bovinen Knorpelextraktes zeigte in Gegenwart von 10 mM EDTA eine Protein-Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa ab der Fraktion #10. In Gegenwart von 2 mM CaCl_2 erscheint diese Bande bereits ab der Fraktion #6, wo sie mit einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 100 kDa ko-eluiert (Abb. 3.4 A).

² In Kollaboration durchgeführt mit Dr. Suat Özbek im Labor von Prof. em. Dr. Jürgen Engel, Basel, Schweiz; publiziert unter Mann, HH., Özbek, S. *et al.*, 2004

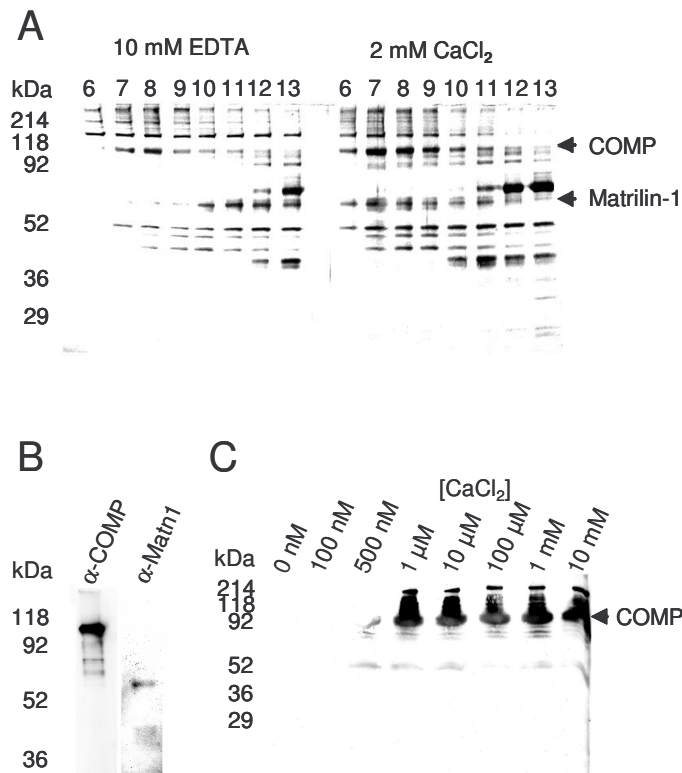


Abb. 3.4: Identifikation von Matrilin-1-COMP Komplexen in Extrakten von bovinem Gelenkknorpel.

A, Gezeigt ist eine Superose 6 Gelfiltration von Matrixproteinen nach der Extraktion aus bovinem Gelenkknorpel mit 10 mM EDTA-enthaltendem Extraktionspuffer (*linkes Panel*) und nach der Dialyse gegen Extraktionspuffer mit 2 mM CaCl₂ (*rechtes Panel*). Die als COMP und Matrilin-1 identifizierte Proteinbanden sind markiert. Die SDS-PAGE wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt und silbergefärbt. B, Immunoblot Analyse der Fraktion #7 aus der Gelfiltration in Gegenwart von Calcium (A, *rechtes Panel*), detektiert mit spezifisch gegen COMP (αCOMP) bzw. Matrilin-1 (αMatrilin-1) gerichteten Antikörpern. C, Ko-Immunopräzipitation von COMP aus Knorpelextrakt. Genutzt wurde ein Matrilin-1 Antikörper, der Versuch wurde bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen durchgeführt. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte mit einem spezifisch gegen COMP gerichteten Antikörper. Die Angaben der Molekulargewichtsstandards sind in kDa.

Mittels der einem In-Gel-Verdau durch Trypsin angeschlossenen MALDI-TOF PMF-Analyse und einer Immunoblot Analyse (Abb. 3.4 B) konnte das 60 kDa Protein als Matrilin-1 und das 100 kDa Protein als COMP identifiziert werden. Des Weiteren fiel auf, dass ausser dem Matrilin-1- auch der COMP-Peak der Gelfiltration in Gegenwart von Calcium früher zu beobachten war, was eine Zunahme der Masse des COMP-enthaltenden Komplexes indiziert. Um die Bildung eines calciumabhängigen Matrilin-1-COMP-Komplexes zu bestätigen, wurde unter ansteigenden Calcium-Konzentrationen eine Immunpräzipitation mit einem Matrilin-1-spezifischen Antikörper durchgeführt. Dabei wurde COMP ko-immunpräzipitiert, was durch die Detektion mit einem

spezifisch gegen COMP gerichteten Antikörper gezeigt werden konnte (Abb. 3.4 C). Die Bindung von Matrilin-1 an COMP wurde bereits bei der Zugabe von 1 μM Calcium beobachtet.

3.1.4 Titration der Bindung zwischen Matrilin-4 und COMP bzw. Decorin

Die vergleichsweise gute Löslichkeit von Matrilin-3 und Matrilin-4 und die daraus folgende problemlose Reinigung mit hohen Ausbeuten, erlaubten intensive Experimente und Versuchsreihen. Daher wurden hauptsächlich diese beiden Matriline für die folgenden, detaillierteren Bindungsstudien in dieser Arbeit verwendet. Die Durchmusterung von potentiellen Bindungspartnern (Abb. 3.4) identifizierte COMP als den stärksten Bindungspartner der getesteten Proteine. Von den getesteten LRR- (*leucine-rich repeat*) Proteinen zeigte Decorin ein starkes Signal für Matrilin-4. Im Folgenden sollte die Bindung zwischen diesen beiden Proteinen und Matrilin-4 weiter untersucht werden. Um die entdeckten Bindungen quantitativ einschätzen zu können, wurde eine Titration nach ELISA-Art durchgeführt. COMP bzw. Decorin wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert und Matrilin-4 als Ligand in Konzentrationen von 0,01 nM bis 100 nM (auf COMP) bzw. 1000 nM (auf Decorin) eingesetzt. Die Detektion von gebundenem Matrilin-4 erfolgte mit spezifisch gegen Matrilin-4 gerichteten Antikörpern in der ELISA-üblichen Art.

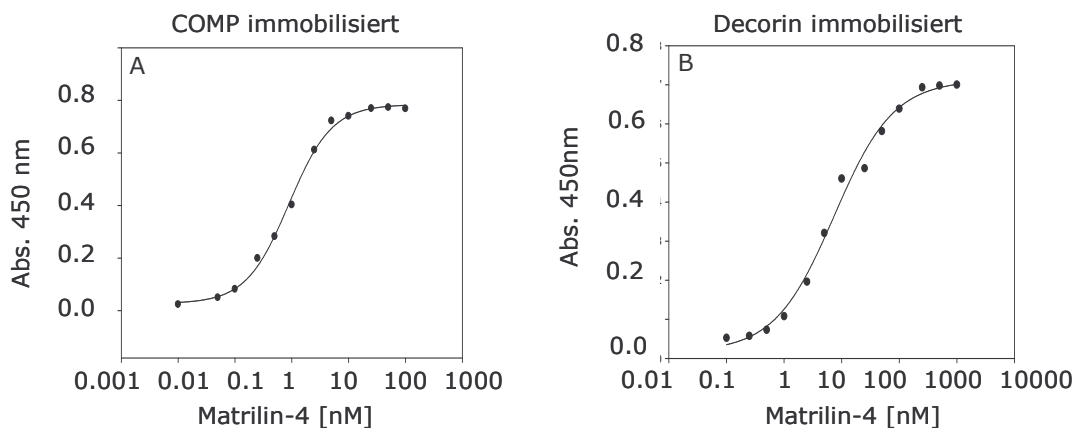


Abb. 3.5: Konzentrationsabhängigkeit der COMP- und Decorin - Matrilin-4 Bindung, ermittelt im ELISA-typischen Liganden-Bindungs Versuch. COMP und Decorin wurden bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf der ELISA-Platte immobilisiert, ansteigende Konzentrationen von Matrilin-4 (0,01 bis 100 nM für COMP, A; 0,1 bis 1000 nM für Decorin, B) wurden in der Gegenwart von 2mM CaCl_2 für eine Stunde bei RT inkubiert. Gebundenes Protein wurde in ELISA-üblicher Art mit spezifisch gegen Matrilin-4 gerichteten Antikörpern detektiert und analysiert. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Die Titration der Bindungen von COMP und Decorin mit Matrilin-4 ergab konzentrationsabhängige, sättigbare Bindungen. Ausgehend von den Konzentrationen, die zu einer halbmaximalen Sättigung der immobilisierten Proteine notwendig waren, konnten durch diese Versuche apparente K_d -Werte von 1 nM für die Matrilin-4–COMP und 10 nM für die Matrilin-4–Decorin Bindung ermittelt werden (Abb. 3.5).

3.1.5 Bestimmung des Einflusses divalenter Kationen auf die Konformation der Matrilin VWA Domäne

Frühere Arbeiten (Lee *et al.*, 1995; Emsley *et al.*, 2000) beschreiben eine wichtige Funktion der MIDAS-Motive in (Integrin-) VWA Domänen bei der Wechselwirkung mit Proteinliganden. Die Gelfiltrationsversuche (Abb. 3.4) indizierten bereits eine signifikante Rolle divalenter Kationen für die Matrilin-1-COMP Bindung. Erste Versuche zur näheren Charakterisierung der Matrilin-4-COMP und –Decorin Bindungen zeigten außerdem, dass in Anwesenheit von 2 mM EDTA diese Wechselwirkungen fast vollständig aufgehoben wurden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte nun auch für die Matrilin-VWA Domäne die Fähigkeit zur Koordination von Kationen, und damit deren potentielle Beteiligung an den Bindungsmechanismen untersucht werden. Dazu wurden rekombinant exprimierte Matrilin-4 VWA1 Domänen verwendet, die in einem größeren Panel von Matrilin-4 und COMP Proteinen hergestellt wurden und unter 3.2.1 näher beschrieben sind.

Die Versuche wurden unter Anwendung der Circular dichroismus- (CD) Spektroskopie durchgeführt, die Messung der Proteinproben erfolgte in einer Quarzküvette bei Wellenlängen zwischen 190 nm und 250 nm. Beginnend mit einer kationfreien Lösung wurde die Messung mehrfach wiederholt und dabei die Konzentration von Mg^{2+} (Abb. 3.6 A) bzw. Ca^{2+} (Abb. 3.6 B) schrittweise erhöht. Die Analysen im Spektrometer fanden nach 15-minütiger Inkubationszeit der Protein-Kationen-Gemische statt.

Zur Analyse der CD-Messungen wurden die gemessenen Werte der Elliptizität im Bereich derjenigen Wellenlänge mit den stärksten Änderungen ausgewertet. Die Zugabe von Kationen erzielte die stärksten Änderungseffekte der gemessenen Elliptizität bei einer Wellenlänge von 208 nm; die Absorptionskoeffizienten des links und rechts zirkular polarisierten Lichts entsprechen in diesem Wellenlängen-Bereich der Protein α -Helix.

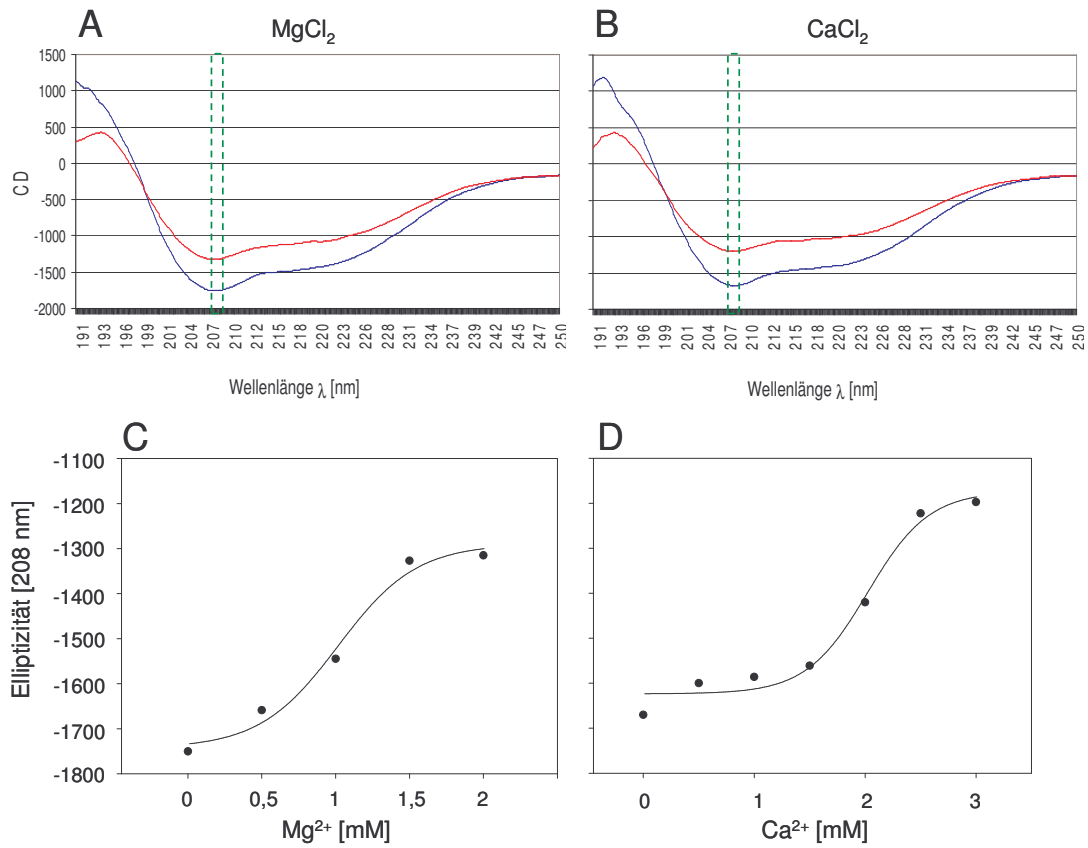


Abb. 3.6: Titration von divalenten Kationen an der Matrilin-4 VWA1 Domäne. Das Protein wurde in einem 5 mM Tris-Puffer, pH 7,4, bei 25 °C und einer Konzentration von 100 µg/ml im CD-Spektrometer gemessen. Die x-Achsen geben die gewählten Konzentrationen zugefügter divalenter Kationen wieder. Die Inkubationszeit zwischen der Zugabe von Kationen und der Messung im Spektrometer betrug jeweils 15 Minuten. A und B zeigen die gemessenen CD-Spektren der VWA Domäne ohne Zugabe von divalenten Kationen (blau) und nach Zugabe der maximalen Kationenkonzentration (rot, 2,5 mM Mg²⁺/ 3 mM Ca²⁺). Grün gestrichelter Rahmen: Wellenlänge bei der die größten Änderungen der Elliptizität gemessen wurden. C und D, zur besseren Visualisierung der Ergebnisse zeigen die Graphen die Entwicklung der Elliptizität bei 208 nm, aufgetragen gegen die entsprechende Kationenkonzentration.

Die Analysen der CD-Messungen zeigten eine sättigbare Zunahme der Elliptizität bei 208 nm für beide untersuchten Kationen und beschrieben damit eine von der Kationenkonzentration abhängige Veränderung der Sekundärstruktur der untersuchten Matrilin-4 VWA Domäne. Die grafische Analyse der Titration lieferte apparente K_D -Werte für die gezeigten Bindungen von Kationen, deren Werte bei ca. 1 mM für Mg²⁺ und 2 mM für Ca²⁺ lagen (Abb. 3.6 C und D). Die abschließende Zugabe von 2 mM EDTA zerstörte die messbaren CD-Spektren irreversibel und ließ keine saubere Messung mehr zu (nicht gezeigt).

3.1.6 Identifikation einer matrillinbindenden Aminosäuresequenz in Kollagen III

Im Rahmen früher publizierter Arbeiten (Siljander *et al.*, 2004) wurden synthetisierte Peptide hergestellt, die überlappend die vollständigen Aminosäuresequenzen von Kollagen III abdecken. Mit diesen Peptiden³ wurden Bindungsstudien durchgeführt, die eine Lokalisation der Matrillin-3-Bindungsstelle im Volllängen-Kollagen erlauben sollten. Die Peptide waren jeweils so gestaltet, dass flankierende, repetitive Aminosäure-tripletts das Kollagen-Peptid in seiner tripelhelikalen Struktur stabilisierten und dabei jeweils 27 Aminosäuren umfassten. Die jeweils ersten und letzten neun AS von jedem Peptid überlappten mit den wiederum jeweils ersten bzw. letzten neun AS des vorhergehenden bzw. darauf folgenden Peptids; die mittleren neun AS waren also für jedes Peptid einzigartig. Kollagen III wurde auf diese Weise in 57 Peptide unterteilt, die in einem Bindungsansatz nach ELISA-Art mit Matrillin-3 als potentielltem Liganden untersucht wurden. Auf diese Weise sollte versucht werden, die bereits beschriebene Bindung von Kollagen III und Matrillin-3 (Nitsche, Dissertation, 2001) auf ein kleines Epitop von neun AS genau zu lokalisieren.

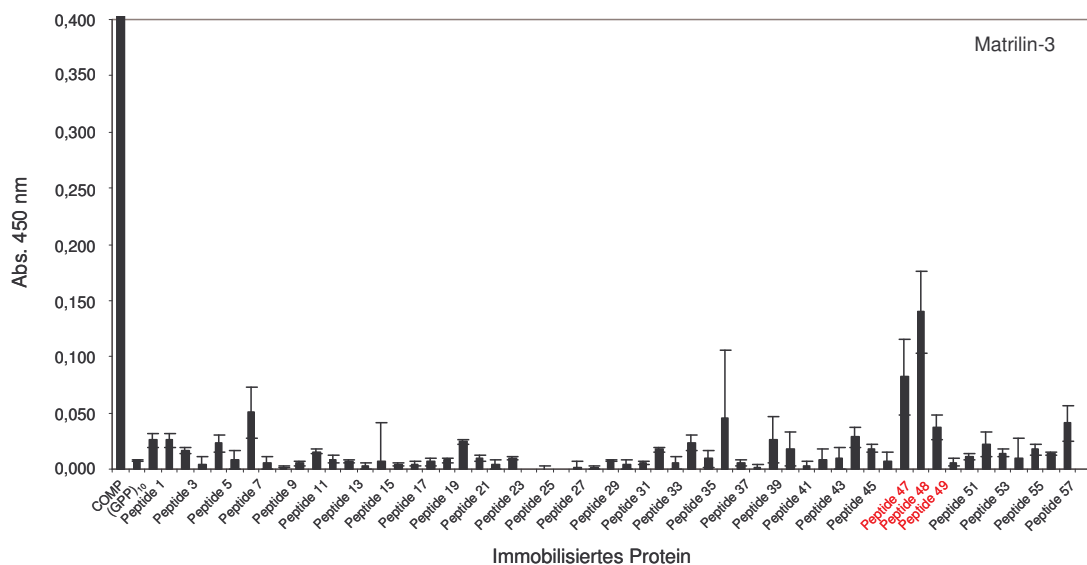


Abb. 3.7: Identifikation von Matrillin-3 bindenden Kollagen III-Peptiden. Für den im ELISA-Stil durchgeführten Versuch wurden 57 verschiedene, die AS-Sequenz von Kollagen III vollständig abdeckende Peptide bei 40 µg/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert (x-Achse). Die Kopplung von COMP und (GPP)₁₀ erfolgten als Positiv- bzw. Negativkontrollen. Nach Blockierung mit 5 % Milchpulver in TBS und Inkubation des frisch gereinigten Matrillin-3 (50 nM) wurde das gebundene Protein mit spezifisch gegen Matrillin-3 gerichteten Antikörpern detektiert und der Bindungsansatz in ELISA-typischer Art analysiert. Drei überlappende Peptide, die signifikante Bindungen erzeugten sind rot markiert. Alle Messungen waren Dreifachbestimmungen. Abs., Absorption.

³ Die Kollagen III Peptide wurden von Prof. Dr. Richard Farndale, Cambridge, England, zur Verfügung gestellt.

Ein Peptid mit der Sequenz GPC (GPP)₁₀ GPC diente als Negativkontrolle (Abb. 3.7), die Funktionalität des ELISA wurde mit immobilisiertem COMP als Positivkontrolle getestet. Nach der Inkubation mit Matrilin-3 erfolgte die Detektion des gebundenen Matrilins mit spezifisch gegen Matrilin-3 gerichteten Antikörpern.

Das ELISA zeigte signifikante Bindungssignale an Matrilin-3 für einige der getesteten Kollagen III-Peptide. Tabelle 3.1 zeigt die Sequenzen der drei benachbarten und überlappenden Peptide #47, #48 und #49 mit dem stärksten Bindungssignal für Peptid #48 (Abb. 3.7). Weitere Peptide zeigten teilweise signifikante, aber schwächere Signale: #1, #2, #7, #57.

Tab. 3.1: Sequenzen der Matrilin-3-bindenden Kollagen III-Peptide

Peptid-#	Aminosäuresequenz
47	GPC (GPP) ₅ – GPQGLOGLA–GTAGEOGRD-GNOGSDGLO – (GPP) ₅ GPC
48	GPC (GPP) ₅ – GNOGSDGLO-GRDGSOGGK-GDRGENGSO – (GPP) ₅ GPC
49	GPC (GPP) ₅ – GDRGENGSO-GAOGAOGHO-GPOGPVGPA – (GPP) ₅ GPC

3.2 Charakterisierung der Matrilin-4 – COMP Bindung

Nach der Identifizierung von COMP als dominantem Matrilin-Liganden war die Aufklärung des Bindungsmechanismus zwischen den beiden Proteinen das Ziel weiterer Experimente. Dies sollte insbesondere hinsichtlich der Bedeutung der Oligomerisierung (und der daraus resultierenden Polyvalenz) und der Rolle der VWA Domänen geschehen. Im Weiteren sollten die einander bindenden Domänen der interagierenden Proteine identifiziert werden, sowohl auf der Matrilin- als auch auf der COMP-Seite. Ähnlich wie die Matrilin ist COMP (TSP-5) ein oligomeres Matrix-Glykoprotein. Es ist Teil der Thrombospondin (TSP) Familie mit einer modularen Struktur, die – wie die der Matrilin – polyvalente Bindungen erlaubt (Oldberg *et al.*, 1992).

Die bisherigen Ergebnisse legten eine Beteiligung der Matrilin-4 VWA Domänen an der Bindung nah. Zur systematischen Fortführung der Bindungsstudien wurden nun sowohl Matrilin-4 als auch COMP nicht nur als Vollängenproteine sondern auch, in ihre Domänen und momomeren Formen zerlegt, als verkürzte Fragmente exprimiert und affinitätsgereinigt, um so die bindenden Domänen eindeutig zu definieren und die Bindung im Detail zu beschreiben.

3.2.1 Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilin-4 und COMP Proteinen

Die verwendeten Proteine wurden über ein *Tag*-System affinitätsgereinigt. Die Generierung und Beschreibung der meisten Proteine erfolgte bereits vor Beginn dieser Arbeit (Klonierungs- und Reinigungsstrategie siehe S. 59):

Tab. 3.2: Übersicht der in 293EBNA Zellen rekombinant exprimierten und gereinigten Matrilin- und COMP Proteine, die zu Beginn der Arbeit bereits vorgelegen haben und für die detaillierten Studien zu den Bindungsmechanismen zwischen Matrilin-3/ -4 und COMP verwendet wurden. Angegeben in Spalten 2 und 3: die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen und die Generierung dieser Proteine.

Protein	Bezeichnung	Generiert von
Matrilin-4 Volllänge	Matn-4 fl	Klatt, Dissertation 2001
Matrilin-4 Monomer *	Matn-4 Δ CT	Mann <i>et al.</i> , 2004
Matrilin-4 VWA1	Matn-4 A1	Mann <i>et al.</i> , 2004
Matrilin-4 VWA2	Matn-4 A2	Mann <i>et al.</i> , 2004
Matrilin-4 <i>coiled-coil</i>	Matn-4 CC	Frank <i>et al.</i> , 2002
Matrilin-3 Volllänge	Matn-3 fl	Ehlen, Diplomarbeit 2002
Matrilin-3 VWA	Matn-3 A	Nitsche, Dissertation 2001
COMP Volllänge	COMP fl	Thur, Dissertation, 2000
COMP Monomer *	COMP mono	Spitznagel, Diplomarbeit, 2002
COMP TSP T3 + TC **	COMP T3+TC	Spitznagel, Diplomarbeit, 2002
COMP TC-Domäne	COMP TC	Spitznagel, Diplomarbeit, 2002
COMP <i>coiled-coil</i>	COMP CC	Efimov <i>et al.</i> , 1996

* = ohne die oligomerisierende coiled-coil Domäne

** = bestehend aus den TSP Typ III Repeats zusammen mit der TC-Domäne

Das COMP Monomer und ein COMP Vollängenprotein mit einer Mutation (D469 Δ) in einem der Calcium-bindenden T3-Repeats wurden freundlicher Weise von F. Zaucke zur Verfügung gestellt. Die D469 Δ -Mutation hat für das betreffende COMP-Protein eine gesenkte Bindungskapazität für Calcium zur Folge und wurde bereits früher beschrieben (Maddox *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001; Schmitz, Dissertation, 2005). Auf Grund der in Abb. 3.4 gezeigten Calciumabhängigkeit der Bindung zwischen COMP und Matrilin-4 war ein COMP Protein mit dieser Mutation von Interesse für die folgenden Versuche.

Im späteren Verlauf und für die Identifikation der wechselwirkenden Domänen zwischen Matrilin-4 und COMP wurden weitere Klonierungen notwendig, um beide Proteine auf Domänenebene vollständig abzudecken. Die noch nicht existierenden, für

die Matn-4 EGF-ähnlichen Domänen (Matn-4 EGF) und die COMP TSP Typ-III Domänen (COMP T3) codierenden Konstrukte, wurden für diese Arbeit neu erzeugt. Wie auch für die in Tabelle 3.1 beschriebenen Matrilin und COMP Proteine wurden dazu die Matrilin-(Maus) bzw. COMP-Sequenzen (Ratte) per PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer beinhalteten jeweils eine Adaptersequenz mit Restriktionsschnittstelle, die eine gerichtete Klonierung des erzeugten Matrilin- bzw. COMP-Inserts in die multiple Klonierungsregion des Vektors pCEP-Pu-BM40-His₆ (N-terminal) ermöglichte. So wurden Plasmide erzeugt, die für hybride Proteine aus dem Signalpeptid des BM-40 mit anschließendem His₆-Motiv und der gewünschten Proteinsequenz kodierten. Nach der Transfektion konnten die klonierten Proteine als N-terminal His₆-markierte Fusionsproteine rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatografie gereinigt werden. Damit waren alle erforderlichen Proteine verfügbar, um im Rahmen der Bindungsstudien von Matrilin-4 und COMP die bindeaktiven Domänen zu identifizieren.

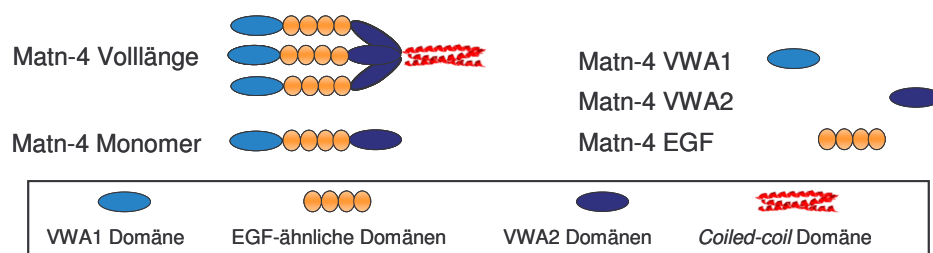


Abb. 3.8: Schematische Übersicht der verwendeten Matrilin-4 Proteine. Die exprimierten Proteine wurden so gewählt, dass ihre Gesamtheit das vollständige Protein auf Domänenebene abdeckte. Zur Analyse der Bedeutung von Oligomerisierung bzw. proteolytischer Prozessierung wurde auch das Monomer von Matrilin-4 exprimiert und gereinigt. Diesem Protein fehlt der für die Oligomerisierung verantwortliche C-terminale *coiled-coil* Bereich.

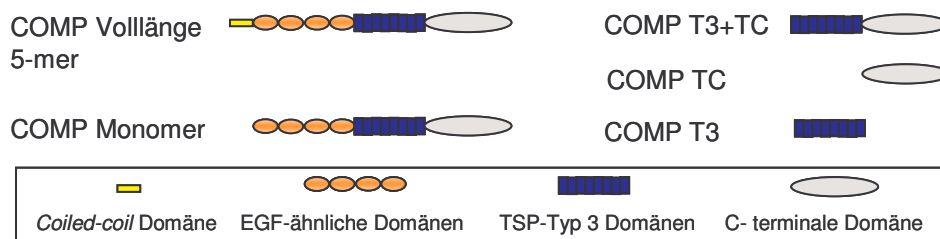


Abb. 3.9: Schematische Übersicht der verwendeten COMP Proteine. Wie für Matrilin-4 wurden die exprimierten Proteine auch hier so gewählt, dass ihre Gesamtheit das vollständige Protein auf Domänenebene möglichst abdeckte. Auf die Expression der COMP EGF-ähnlichen Domänen wurde verzichtet, da die bindungsaktiven Domänen im Bereich der T3 Domänen und/oder der TC Domäne vermutet wurden. Zur Analyse der Bedeutung von Oligomerisierung bzw. proteolytischer Prozessierung wurde auch das Monomer von COMP verwendet (freundliche Gabe von F. Zaucke). Diesem Protein fehlt der für die Oligomerisierung verantwortliche N-terminale *coiled-coil* Bereich.

Die Expansion der stabilen Zelllinien fand in serumhaltigem Medium statt, die Kultivierung der Zellen bis zur Ernte der Überstände erfolgte unter serumfreien Bedingungen. Die rekombinanten Proteine konnten aus dem Zellkultur-Überstand mittels Affinitätschromatografie über eine Talon® Metallionen-Affinitätschromatografie-Matrix (Talon® Super-Flow) aufgereinigt werden. Die Reinheit der Proteine wurde durch eine SDS-PAGE der Eluate mit anschließender Coomassie Blau-Färbung nachgewiesen. Abb. 3.10 zeigt eine zusammenfassende Übersicht über die verwendeten gereinigten Matrilin und COMP Proteine.

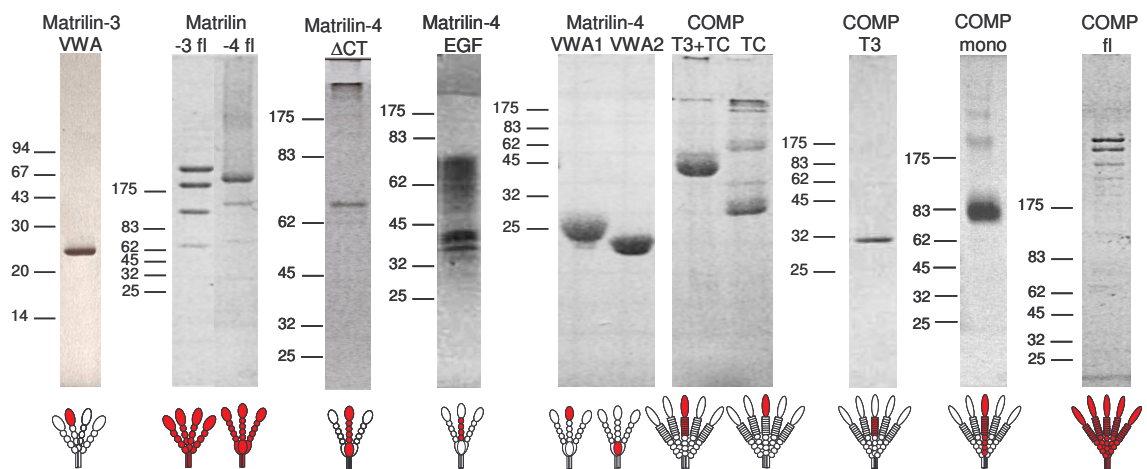


Abb. 3.10: Übersicht aller verwendeter Proteine aus eigener Herstellung. Affinitätschromatografisch gereinigte Proteine aus konditionierten Überständen von 293-EBNA Zellen wurden auf 4-12 %igen (COMP und Matrilin-3 und -4 Volllängenproteine (fl)), 12 %igen (Matrilin-4 Monomer (Δ CT), COMP Monomer (mono)) oder 15 %igen (Matrilin VWA-1 und -2 und EGF Domänen, COMP T3- und T3+TC Domänen) Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Angaben des Molekulargewichtsstandards in kDa. Unterhalb der Gelspuren sind die entsprechenden Molekülschemata angegeben, die zur besseren Orientierung die Position der entsprechenden Domänen im jeweils vollständigen Protein rot hervorheben.

Die Bandenmuster der rekombinant exprimierten und nativ gereinigten Matrilin-3 und -4 Volllängenproteine wiesen, wie schon unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, die erwartete starke Heterogenität auf, wobei die jeweiligen Banden den unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden entsprachen (Abb. 3.10).

Auch Volllängen COMP zeigte in der elektrophoretischen Auftrennung ein Bandenmuster, das die unterschiedlichen Oligomerisierungsgrade repräsentierte (Abb. 3.10). Die beiden dominanten Banden entsprachen dem pentameren, vollständig oligomerisierten Protein (ca. 525 kDa) und dem um eine Untereinheit verkürzten, tetrameren Protein (ca. 420 kDa). Schwach waren noch Banden zu sehen, die geringer oligomerisiertes COMP repräsentierten (Trimer, ca. 315 kDa; Dimer, ca. 210 kDa).

Die Matrilin-4 EGF-ähnlichen Domänen wiesen eine Doppelbande bei apparenten 35 – 40 kDa (theoretisch 17,2 kDa) und eine sehr breite Bande bei ca. 60 kDa auf. Eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen gefolgt von einem Western Blot und einer Immunodetektion mit Matrilin-4-spezifischen Antikörpern zeigte die Matn-4 EGF-Banden als eine Doppelbande etwas unterhalb von 25 kDa (nicht gezeigt). Die mehrfachen Banden lassen sich vermutlich durch Disulfidbrückenumlagerungen und Polymerbildung sowie durch N-Glykosylierungen erklären und wurden für die folgenden Experimente toleriert. Die gereinigten Matrilin-4 VWA1 Domänen zeigten eine starke Bande bei 25 kDa sowie eine zweite, schwache Bande direkt unter der Hauptbande (vermutlich zurückzuführen auf fehlende N-Glykosylierungen), die Bande der Matrilin-4 VWA2 Domänen lief bei ca. 23 kDa. Die Matrilin-3 VWA Domäne zeigte in gereinigtem Zustand eine saubere Bande unterhalb von 25 kDa (theoretisch 22 kDa). Das Matrilin-4 Monomer (Δ CT) bildete eine Bande bei ca. 70 kDa, was auch dem theoretischen Molekulargewicht entsprach, zeigte allerdings auch sehr hochmolekulares, vermutlich aggregiertes Proteinmaterial, welches nicht in das Trenngel hineinlief, sondern sich auch nach Ablauf der Elektrophorese noch in der Phase zwischen Sammel- und Trenngel befand. Des Weiteren zeigten alle Matrilin- und alle ihre kleineren, verkürzten Fragmente starke Neigungen zu Aggregation und Präzipitation, was auch Dimerisierungen der VWA Domänen und die Bildung hochmolekularer Aggregate, wie z.B. im Fall des Matrilin-4 Monomers, zur Folge hatte. Diese größtenteils unspezifisch aggregierten Komplexe wurden vor dem Einsatz in Experimenten durch starke Zentrifugation (15 min, 12000 x g, Eppendorf Tischzentrifuge) aus den Proteinlösungen entfernt.

Das COMP T3+TC Fragment zeigte eine Bande bei apparenten 45 kDa (theoretisch 57 kDa), COMP TC lief bei ca. 30 kDa (theoretisch 28 kDa), zeigte aber auch noch weitere, schwächere Banden im höhermolekularen Bereich. Die COMP T3 Repeats bildeten ebenfalls eine Bande bei ca. 30 kDa, die beinahe dem theoretischen Molekulargewicht von ca. 29 kDa entsprach; die Bande des COMP Monomers wurde dem theoretischen Molekulargewicht entsprechend auf der Höhe von apparenten 83 kDa angefärbt (alles Abb. 3.10).

3.2.2 Bindungsstudien von Volllängen Matrilin-4 und seinen kleineren Fragmente an Volllängen COMP und seine kleineren Fragmente im ELISA-ähnlichen Stil

Zur genauen Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen COMP und Matrilin-4 wurden Bindungsstudien nach ELISA-Art durchgeführt. Der Schwerpunkt lag bei diesen Experimenten auf der Paarung von verkürzten Fragmenten des einen mit Volllängen-Proteinen des jeweils anderen Bindungspartners. Auf diese Weise sollten die kleinstmöglichen Einheiten identifiziert werden, die noch in der Lage waren, eine Bindung zu dem Volllängen-Bindungspartner aufzubauen.

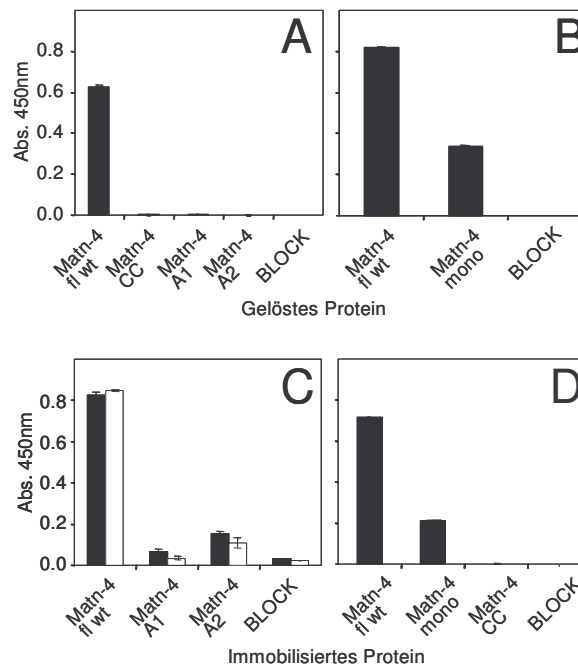


Abb. 3.11: ELISA-ähnlicher Bindungsversuch mit Volllängen Matrilin-4 und kleineren Matrilin-4 Fragmenten, eingesetzt mit immobilisiertem Volllängen COMP und D469Δ COMP. A, Wildtyp Volllängen COMP wurde immobilisiert und nach Blockierung mit 5 % Milchpulver in TBS mit Wildtyp Volllängen Matrilin-4 (Matn-4 fl wt), der Matrilin-4 *coiled-coil Domäne* (Matn-4 CC) und den Matrilin-4 VWA1 (Matn-4 A1) und VWA2 (Matn-4 A2) Domänen inkubiert. B, Wildtyp Volllängen COMP wurde immobilisiert und nach Blockierung mit Matn-4 fl wt und dem Matrilin-4 Monomer (Matn-4 mono) inkubiert. C, Matn-4 fl wt und die Matn-4 A1 und Matn-4 A2 Domänen wurden immobilisiert und nach der Blockierung mit Wildtyp Volllängen COMP (gefüllte Balken) und D469Δ COMP (offene Balken) inkubiert. D, Matn-4 fl wt, Matn-4 mono und Matn-4 CC wurden immobilisiert und mit Wildtyp Volllängen COMP inkubiert. In allen Versuchen wurden die Proteine bei einer Konzentration von 10 µg/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert, die Liganden wurden in 20 nM Lösungen in Gegenwart von 2 mM CaCl₂ eingesetzt. Bindungen von Matrilin-4 oder COMP wurden nach der Inkubation durch Detektion mit spezifischen anti-Matn-4 (A und B) bzw. anti-COMP (C und D) Antikörpern in ELISA-typischer Art nachgewiesen. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Jedes der Proteinfragmente wurde sowohl in der flüssigen als auch in der immobilisierten Phase getestet; so konnten die Wechselwirkungsmechanismen vollständig erfasst und artifizielle oder störende Einflüsse, z.B. bei der Immobilisierung, ausgeschlossen werden. Gebundenes Protein wurde mit spezifisch gegen Matrilin-4 bzw. COMP gerichteten Antikörpern detektiert und der Bindungsansatz in ELISA-typischer Art analysiert. Abbildung 3.11 zeigt den ersten Teil dieser Versuchsserie mit den verschiedenen Matrilin-4 Proteinen im Bindungsansatz mit Vollängen COMP und der COMP-Mutante D469 Δ , die durch eine verminderte Ca²⁺-Bindung gekennzeichnet ist.

Vollängen Matrilin-4 zeigte auf der ELISA-Platte von allen als Liganden getesteten Matrilin-4 Proteinen das stärkste Bindungssignal auf immobilisiertem Vollängen COMP, gefolgt von einer moderaten Bindung an COMP durch das Matrilin-4 Monomer (Abb. 3.11 A und B). Weder die einzelnen VWA Domänen noch die isolierte Matrilin-4 *coiled-coil Domäne* zeigten eine Interaktion. Wurden in dem umgedrehten Versuch die Matrilin-4-Proteine immobilisiert und Vollängen COMP als Ligand eingesetzt (Abb. 3.11 C und D), zeigte Matrilin-4 Volllänge das stärkste Bindungssignal, gefolgt von dem etwa $\frac{1}{3}$ so starken Signal des Matrilin-4 Monomers und dem noch schwächeren aber eindeutigen Signal der Matrilin-4 VWA2 Domäne. Auch das Matrilin-4 VWA1 Protein konnte Vollängen COMP binden, allerdings so schwach, dass die Signifikanz fraglich blieb; die immobilisierte Matn-4 *coiled-coil Domäne* zeigte keine Bindung an COMP. Wurden COMP Wildtyp und D469 Δ COMP vergleichend als Liganden eingesetzt (Abb, 3,11 C), konnten für beide COMP-Proteine Bindungssignale ohne signifikante Differenz sowohl an Vollängen Matrilin-4 als auch an die beiden Matrilin-4 VWA Domänen beobachtet werden, was für einen nur geringen Einfluß der D469 Δ -Mutation auf die Matrilin-4 Bindung spricht.

Im zweiten Teil dieser Versuchsanordnung wurden Vollängen COMP Wildtyp, D469 Δ COMP und die verkürzten COMP Fragmente auf ihr Bindungsverhalten mit Matrilin-4 Volllänge untersucht (Durchführung wie für Abb. 3.11). Abbildung 3.12 zeigt diesen Bindungsansatz mit den verschiedenen, immobilisierten COMP Proteinen im ELISA-ähnlichen Bindungsversuch mit Vollängen Matrilin-4.

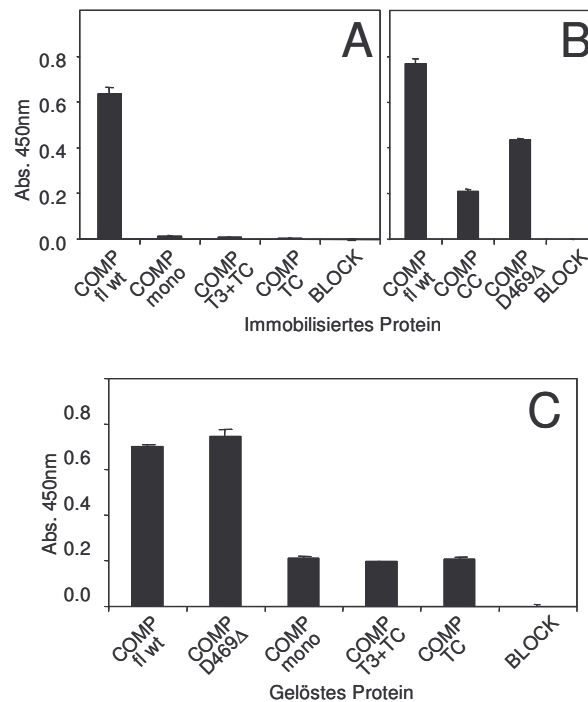


Abb. 3.12: ELISA-ähnlicher Bindungsversuch mit Vollängen COMP, COMP D469Δ und verkürzten COMP Proteinen, eingesetzt mit Vollängen Matrilin-4. A und B, Wildtyp Vollängen COMP (COMP fl wt), monomeres COMP ohne oligomerisierende *coiled-coil* Domäne (COMP mono), verkürztes COMP bestehend aus den TSP Typ III Domänen und der TC Domäne (COMP T3+TC), die COMP TC Domäne, die COMP *coiled-coil* Domäne (COMP CC) und die Vollängen-COMP-Mutante D469Δ wurden mit 10 µg/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert und nach Blockierung mit 5% Milchpulver in TBS mit 20 nM Wildtyp Vollängen-Matrilin-4 (Matn-4 fl wt) inkubiert. C, Matrilin-4 fl wurde mit 10 µg/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert und nach Blockierung mit den verschiedenen COMP-Proteinen (Bezeichnungen wie in Abb. 3.13 A und B) in Konzentrationen von 20nM inkubiert. Alle Versuche wurden in Gegenwart von 2 mM CaCl₂ durchgeführt. Bindungen von Matrilin-4 oder COMP wurden nach der Inkubation durch Detektion mit spezifischen anti-Matn-4 (A und B) bzw. anti-COMP (C) Antikörpern in ELISA-typischer Art nachgewiesen. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Die Entwicklung der ELISA-ähnlichen Versuche mit immobilisierten COMP-Proteinen (Abb. 3.12 A und B) und Vollängen Matrilin-4 als Ligand brachte starke Bindungssignale für das wildtypische und ebenfalls gute Signale für das mutierte Vollängen COMP hervor. Die Bindung der COMP-Mutante fiel dabei deutlich geringer aus und erreichte nur annähernd 60% des Wertes des COMP Wildtyp Proteins. Die isolierte COMP *coiled-coil* Domäne zeigte ein noch schwächeres aber eindeutiges Signal, wohingegen keines der anderen verkürzten oder monomeren COMP Fragmente eine signifikante Bindung mit Matrilin-4 einging. Die Anwesenheit von 2 mM EDTA-Überschuß inhibierte jede Bindung (nicht gezeigt).

In dem umgedrehten Versuch mit immobilisiertem Matrilin-4 (Abb. 3.12 C) banden sowohl Wildtyp als auch mutiertes Volllängen COMP das gelöste Matrilin-4 und produzierten ein etwa gleich starkes Signal. Das COMP Monomer, der COMP T3+TC Komplex und die COMP TC Domäne alleine zeigten ebenfalls eine zwar schwächere aber signifikante Bindung mit dem immobilisierten Matrilin-4. Der Vergleich zwischen einerseits immobilisiertem und andererseits in gelöster Form eingesetztem D469Δ COMP zeigte ein verringertes Bindungspotential für die Mutante, wenn sie immobilisiert wurde (Abb. 3.12 B und C).

3.2.3 Identifikation der interagierenden Domänen von Matrilin-4 und COMP mit Oberflächen Plasma Resonanz (SPR) Technologie

Die ELISA-Versuche zu den Wechselwirkungen zwischen Matrilin-4 und COMP konnten neue Einblicke in die Bindungsmechanismen dieser beiden Proteine vermitteln. Die gewonnenen Ergebnisse sollten nun mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden. Darüber hinaus waren die ELISA-ähnlichen Bindungsstudien zur Identifizierung der kleinstmöglichen Bindungseinheiten nicht sensitiv genug, denn es war bisher nicht eindeutig gelungen, einzelne, bindeaktive Domänen zu definieren. Außerdem sollten die quantitative Bewertung der Bindung und die Ermittlung von K_d -Werten erfolgen.

Um diese Anforderungen zu erfüllen wurde die Technologie der Oberflächen Plasma Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) eingesetzt und ein Gerät der Firma Biacore, das Biacore 2000™, verwendet. Für die Messung wurden die Proteine als Liganden auf CM5-Sensorchips gekoppelt und die möglichen Bindungspartner als Analyten über die Oberfläche geleitet. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit der BIAevaluation 3.0-Software.

3.2.3.1 Kovalente Kopplung von Proteinen auf Biacore® CM5 Chips

In ausführlichen Vortests wurde zunächst überprüft, bei welchem pH-Wert und bei welcher Konzentration das jeweilige Protein auf einer nicht aktivierten CM5-Sensorchip Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen in optimaler Weise aufkonzentriert werden konnte. Es zeigte sich, daß alle Proteine in 10 mM Natriumacetat pH 4.5 und bei einer Konzentration zwischen 20-100 µg/ml für die Kopplung verwendet werden konnten (nicht gezeigt). Die kovalente Protein-Kopplung über primäre Amine erfolgte nach der Aktivierung der CM5 Sensorchip Oberfläche durch die Injektion eines

NHS/EDC-Gemisches. Die Immobilisierung umfasste im Falle der Protein-Protein Bindungsstudien 600 bis 800 Resonanz-Einheiten (*Resonance Units*, RU) für kleine verkürzte Fragmente und bis zu 2000 RU für große Vollängen-Proteine. Im Falle der später durchgeführten Glykosaminoglykan (GAG)-Protein Bindungsstudien wurden die GAGs mit ca. 200 RU immobilisiert. Nachdem die gewünschte Protein-Menge an den Chip gekoppelt war, wurden übriggebliebene freie Bindungsstellen durch eine Injektion von Ethanolamin abgesättigt.

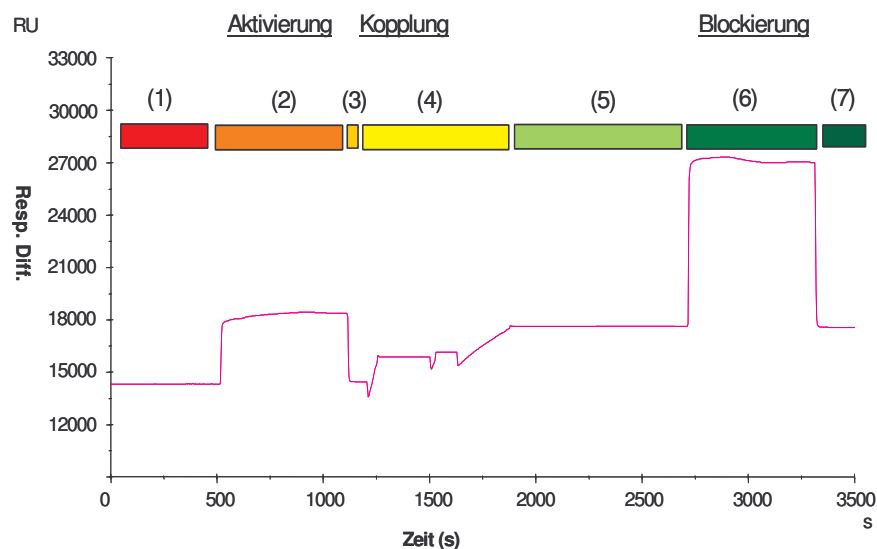


Abb. 3.13: Beispielhaftes Sensorgramm einer Kopplung auf einem CM5-Sensorchip

- (1) Basislinie der nicht modifizierten Sensorchipoberfläche mit Laufpuffer.
- (2) Die Aktivierung der Oberfläche mit EDC/NHS führt zu einem Anstieg des SPR-Signals durch einen veränderten Refraktionsindex der Lösung.
- (3) Die aktivierte Oberfläche verursacht ein geringfügig erhöhtes SPR-Signal der Basislinie (≈ 200 RU).
- (4) Die Injektion des Liganden führt zu dessen Kopplung auf der Sensorchip Oberfläche. Dargestellt sind 3 Injektionen verschiedener Konzentration die verschieden starke Kopplungseffekte erzielen.
- (5) Nach Kopplung beinhaltet das Signal sowohl kovalent als auch ionisch gebundenen Liganden.
- (6) Blockierung von aktivierten Bindungsstellen mit Ethanolamin. Aufgrund der hohen Konzentration und dem daraus resultierenden, hohen Refraktionsindex der Lösung kommt es zu einem starken Anstieg des SPR-Signals. Die Blockierung führt auch zur Entfernung von ionisch gebundenen Liganden von der Oberfläche.
- (7) Basislinie mit kovalent immobilisiertem Liganden (≈ 3000 RU).

3.2.3.2 Messungen von Bindungen verschiedener Matrilin- und COMP- Proteine

Zuerst wurden die Interaktionen der Matrilin-4 VWA Domänen mit den COMP TC und T3+TC Domänen sowie dem Vollängen COMP Protein untersucht. Die Vorbereitung der CM5 Chipoberflächen erfolgte wie oben beschrieben, gefolgt von einer Kopplung von COMP TC, COMP T3+TC und Vollängen COMP auf die Chip-Flußzellen.

Eine Flußzelle wurde aktiviert und mit Ethanolamin blockiert, aber verblieb ohne gekoppeltes Protein, um für die spätere Auswertung als Referenz zu dienen. Nach der Äquilibration des Systems wurden die zu untersuchenden Analyten injiziert (120 µl, 30 µl/min). Nach Abschluß der Dissoziationszeit (350 s) erfolgten den Erfordernissen angepasste Regenerationsschritte mit 1 – 2 M NaCl, um die Sensorgramme wieder zurück auf Basislinienniveau zu bringen und noch nicht abdissoziiertes Protein von der Chipoberfläche zu entfernen. Jede untersuchte Wechselwirkung wurde titriert, indem die Injektionen bei mindestens vier, in der Regel fünf verschiedenen Konzentrationen der Analyten erfolgten (10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 1000 nM). Konnten erst bei Konzentrationen von 1000 nM schwache Reaktionen in den Sensorgrammen beobachtet werden, wurden die Titrations ggfs. angepasst und bei höheren Konzentrationen wiederholt. Versuche, in denen bei einer Analyten-Konzentration von 1000 nM keine Resonanz im Sensorgramm zu beobachten war, wurden als negative Ergebnisse bewertet.

Die Matrilin-4 VWA1 Domäne konnte mit dem immobilisierten COMP TC Fragment alleine keine Bindung eingehen (Abb. 3.14 A), auch die Erhöhung der Signaldifferenz (*response difference*, Bindungssignal) auf der mit COMP T3+TC-gekoppelten Flußzelle war nur marginal und erreichte nicht mehr als ca. 8 RU bei höchster Analytenkonzentration (Abb. 3.14 B). Mit Volllängen COMP zeigte die VWA1 Domäne bei niedrigeren Konzentrationen (Analytenkonzentration bis 100 nM) ein schwaches, aber signifikantes und konzentrationsabhängiges Signal von 20 bis ca. 37 RU; bei der höchsten Konzentration (*C_{max}*) von 1000 nM konnte eine starke und saubere Bindung mit einer maximalen Signaldifferenz (*maximal response*, *R_{max}*) von 85 RU beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Bemerkenswert war hier die Abhängigkeit von einer hohen Konzentration des Analyten, insbesondere verglichen mit der Injektion von Matrilin-4 VWA2 über diese Flußzelle. Matrilin-4 VWA2 zeigte schon in wesentlich geringeren Konzentrationen eine deutlich stärkere Bindung an Volllängen COMP (Abb. 3.14 F). Auch hier war die Bindung klar konzentrationsabhängig und erreichte bei der höchsten Konzentration von 1000 nM beinahe das Gleichgewicht und eine *R_{max}* von ca. 220 RU. Wie die VWA1 Domäne zeigte auch die VWA2 Domäne eine sehr schwache aber etwas stärkere Bindung als VWA1 an dem immobilisierten COMP T3+TC Komplex (ca. 8 RU, Abb. 3.14 E), aber ebenfalls keine Bindung an COMP TC alleine (Abb. 3.14 D).

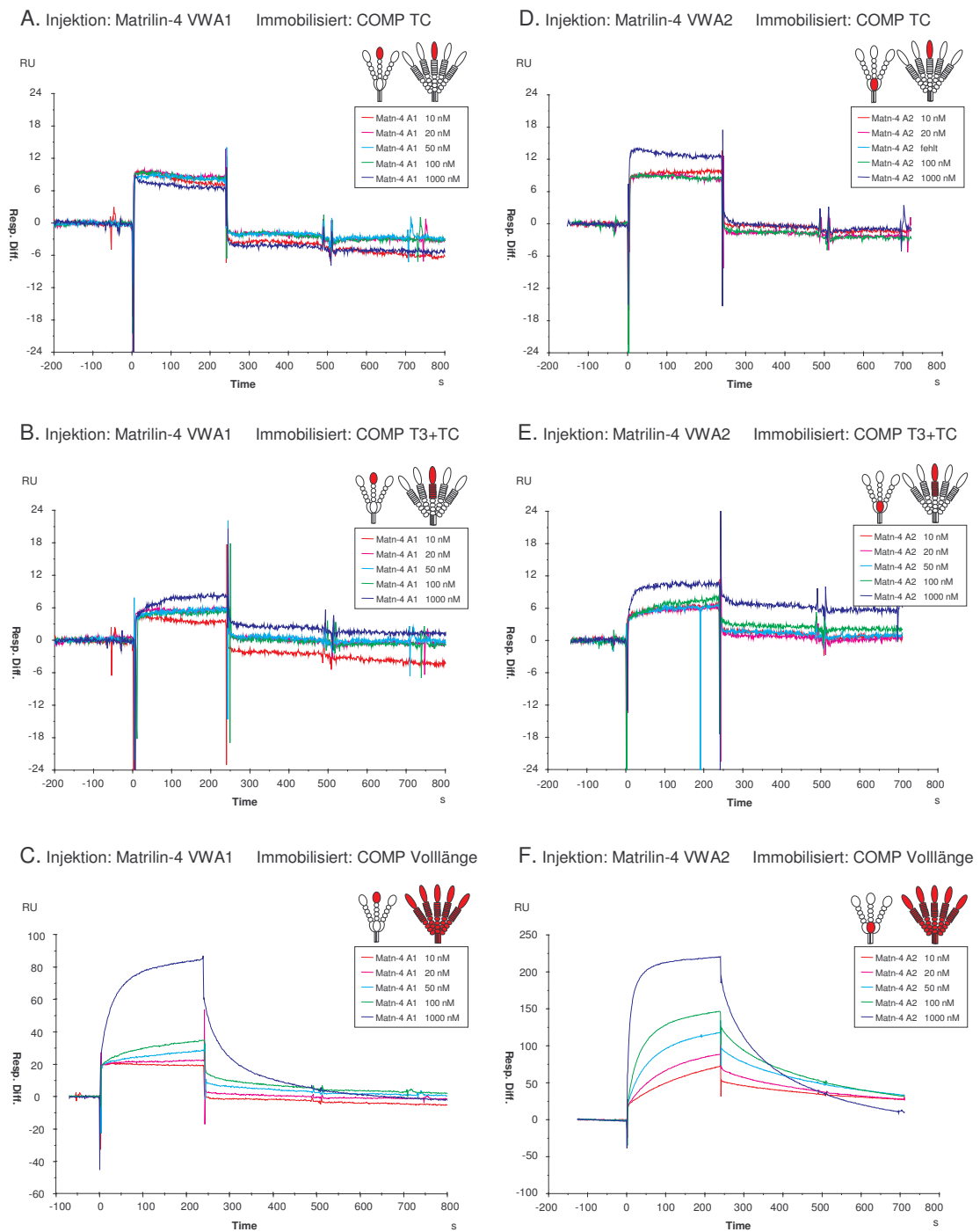


Abb. 3.14: SPR-Bindungsstudien mit Matrilin-4 VWA1 und VWA2 an immobilisiertem COMP TC, COMP T3+TC und Vollängen COMP. A und D, Injektion von Matrilin-4 VWA1 (Matn-4 A1) und VWA2 (Matn-4 A2) über immobilisiertes COMP TC. B und E, Injektion von Matrilin-4 VWA1 und VWA2 über immobilisiertes COMP T3+TC. C und F, Injektion von Matrilin-4 VWA1 und VWA2 über immobilisiertes Vollängen COMP. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in allen Versuchen 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz (zur Referenzflußzelle) nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Vollängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff., *Response* Differenz.

Anschließend erfolgte die Messung der Bindung an die Matrilin-4 EGF-ähnlichen Domänen (Matn-4 EGF), das Matrilin-4 Monomer (Matn-4 Δ CT) und das Matrilin-4 Volllänge Protein (Matn-4 fl). Die Folgeversuche wurden in gleicher Weise durchgeführt wie die in Abb. 3.14 beschriebenen Versuche und der Chip war identisch mit dem in Abb. 3.14 verwendeten Chip. Die Ergebnisse für die Versuche mit Matn-4 EGF und Matn-4 Δ CT sind in Abb. 3.15 (s. S. 70), die Matn-4 fl-Injektionen in Abb. 3.16 (s. S. 71) beschrieben.

Die Injektion der Matrilin-4 EGF-ähnlichen Domänen konnte bei keiner der gewählten Konzentrationen und mit keinem der immobilisierten COMP Proteine eine Erhöhung der Resonanzdifferenz erzeugen (Abb. 3.15 A-C). Das Matrilin-4 Monomer hingegen zeigte bei der Injektion über die immobilisierte COMP TC Domäne ein schwaches Signal von einigen wenigen RU (ca. 12 RU, Abb. 3.15 D). Auch bei der Injektion über den immobilisierten COMP T3+TC Komplex zeigte das Monomer eine schwache Bindung von ca. 6-8 RU bei C_{max} (Abb. 3.15 E), wobei in diesem Fall die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit besser zu sehen war. Die Injektion von Matn-4 Δ CT über das COMP Vollängenprotein (Abb. 3.15 F) rief eine starke, konzentrationsabhängige Resonanz hervor, mit einem R_{max} von ca. 330 RU bei C_{max} und erreichte ca. 115 s nach der Injektion annähernd ein Gleichgewicht, das trotz der kleinen Störung am Ende der Injektion (nach ca. 170 s) zu erkennen ist. Die Dissoziationsphase war in diesem Versuch von einer relativ schwachen Abnahme der Resonanzdifferenz gekennzeichnet. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Regeneration der mit COMP fl gekoppelten Chipoberfläche nach der Injektion von Matn-4 Δ CT sehr viel schwieriger war als nach den Experimenten mit den Matn-4 VWA Domänen (nicht gezeigt) und dass diese erst nach mehrfacher Injektion von Hochsalzlösungen (1,5 – 2 M NaCl) gelang.

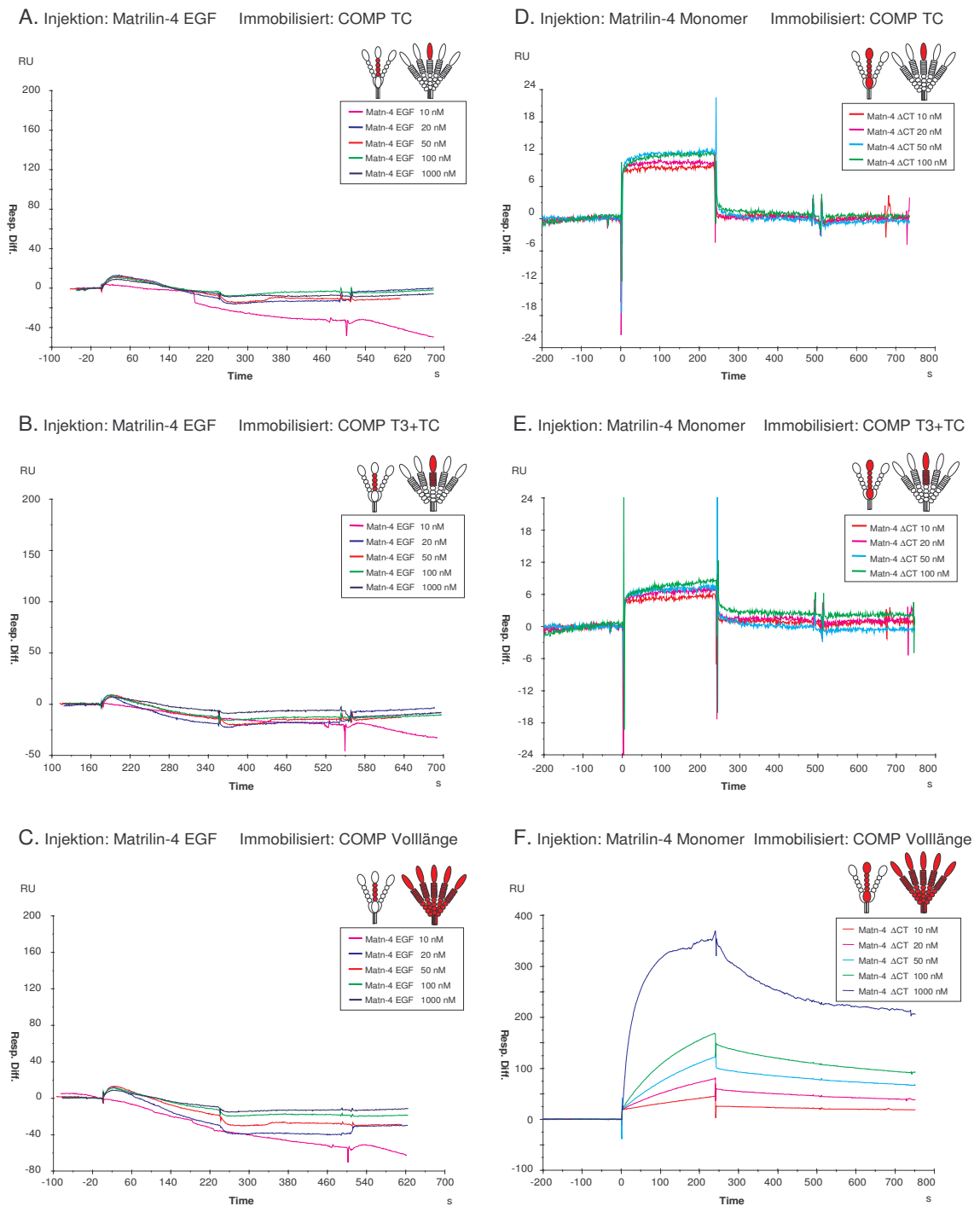


Abb. 3.15: SPR-Bindungsstudien mit Matrilin-4 EGF und Monomer an immobilisiertem COMP TC, COMP T3+TC und Volllänge COMP. A und D, Injektion von Matrilin-4 EGF und Monomer (Δ CT) über immobilisiertes COMP TC. B und E, Injektion von Matrilin-4 EGF und Δ CT über immobilisiertes COMP T3+TC. C und F, Injektion von Matrilin-4 EGF und Δ CT über immobilisiertes Volllänge COMP. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in allen Versuchen 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Volllänge-Proteine rot markiert. Resp. Diff, *Response* Differenz.

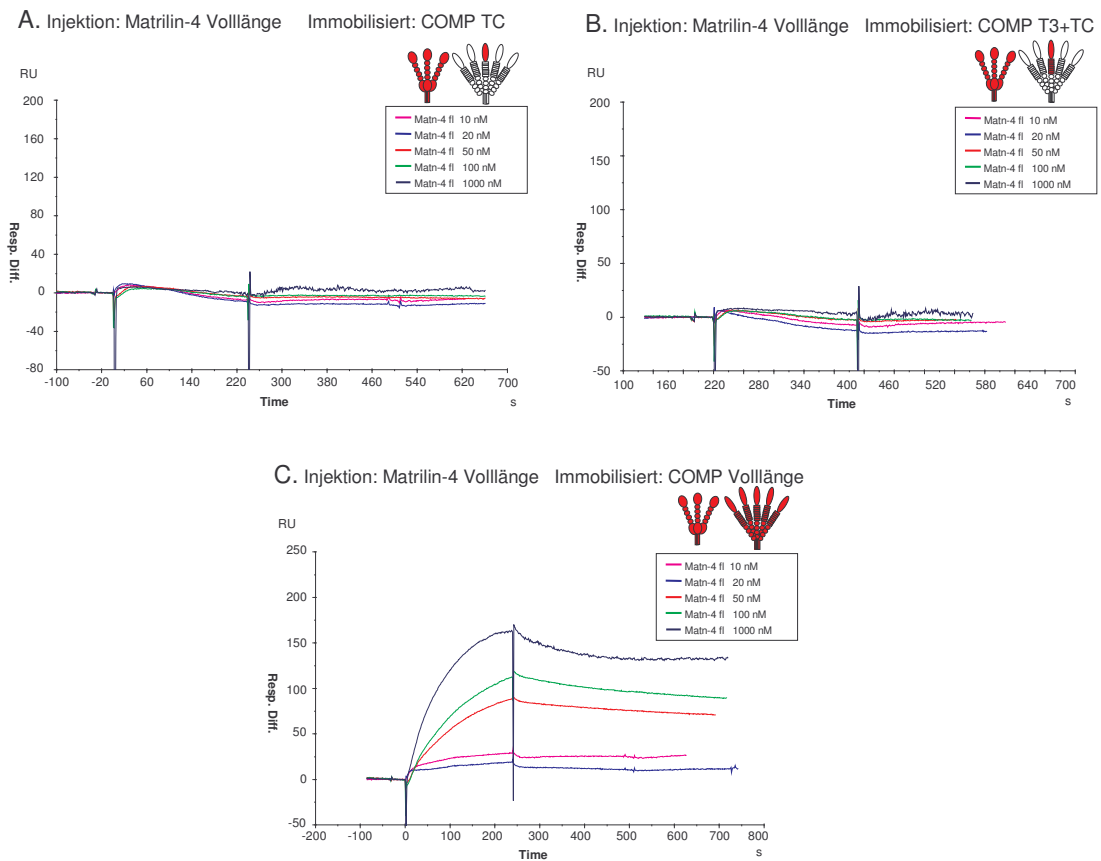


Abb. 3.16: SPR-Bindungsstudien mit Vollängen Matrilin-4 an immobilisiertem COMP TC, COMP T3+TC und Vollängen COMP. A, Injektion von Vollängen Matrilin-4 (Matn-4 fl) über immobilisiertes COMP TC. B, Injektion von Vollängen Matrilin-4 über immobilisiertes COMP T3+TC. C, Injektion von Vollängen Matrilin-4 über immobilisiertes Vollängen COMP. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in allen Versuchen 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Vollängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff, *Response* Differenz.

Die Experimente mit injiziertem Volllänge Matrilin-4 zeigten keine Bindung an das immobilisierte COMP TC Fragment (Abb. 3.16 A) und auch keine Reaktion mit COMP T3+TC (Abb 3.16 B). Bei der Injektion von Matn-4 fl über das immobilisierte COMP fl kam es zu der erwarteten, starken Bindung zwischen diesen beiden Proteinen (Abb. 3.16 C), die eine R_{max} von ca. 160 RU bei C_{max} erreichte, allerdings bei den gewählten Konzentrationen noch nicht ins Gleichgewicht gelangte. Die Dissoziationsphase war von einer nur noch sehr schwachen Abnahme der Response Differenz gekennzeichnet, die Dissoziation fand noch deutlich langsamer statt als die des Matrilin-4 Monomers (Abb. 3.15 F). Bei den beiden geringsten Konzentrationen der Analyten fand sie praktisch gar nicht statt.

Diese Beobachtung indiziert eine sehr stabile Bindung zwischen vollständigem Matrilin-4 und COMP. Ebenso wie bereits für das Matrilin-4 Monomer beobachtet, war auch hier die Regeneration des Chips sehr schwierig und gelang nur durch mehrfache Injektion von 2M NaCl-Lösung.

Eine Immobilisierung von COMP T3 wurde ebenfalls durchgeführt, zeigte aber in den ersten Versuchen keine Bindung an injiziertes Volllänge Matrilin-4 und wurde danach nicht weiter untersucht (nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt erfolgten die SPR-Bindungsstudien in umgekehrter Orientierung, um alle getesteten Proteine sowohl in der löslichen, als auch in der immobilisierten Phase auf ihre Bindungsfähigkeit zu testen. Wie in den unter 3.2.2 beschriebenen ELISA-ähnlichen Versuchen sollten auf diese Weise die Wechselwirkungsmechanismen vollständig erfasst werden, um artifizielle, hindernde oder störende Einflüsse, die z.B. durch die zufällige räumliche Orientierung der Proteine bei der Immobilisierung auf dem Chip ausgelöst werden könnten, auszuschließen.

Für die umgedrehten Versuchsanordnungen erfolgte eine Immobilisierung von Matrilin-4 VWA1, Matrilin-4 VWA2 und Volllänge Matrilin-4 auf den Flusszellen eines neuen CM5-Chips. Eine Flusszelle diente wiederum für die spätere Auswertung als Referenz. Als injizierte Analyten wurden in dieser Versuchsreihe die gereinigten COMP T3, COMP TC und die COMP T3+TC Proteine verwendet. Die Ausführung der Experimente erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei den vorher beschriebenen Versuchen, allerdings wurden bei diesen Messungen teilweise höhere Analytenkonzentrationen verwendet, um auch bei den bereits vermuteten schwachen Bindungen noch Signale messen zu können. Die Konzentrationen der injizierten Analyten betrug für COMP T3 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM (Abb. 3.17 A – C), für COMP TC 160 nM, 333 nM, 1000 nM und 2000 nM (Abb. 3.17 D – F) und für COMP T3+TC 200 nM, 400 nM, 1000 nM, 2000 nM und 4000 nM (Abb. 3.18).

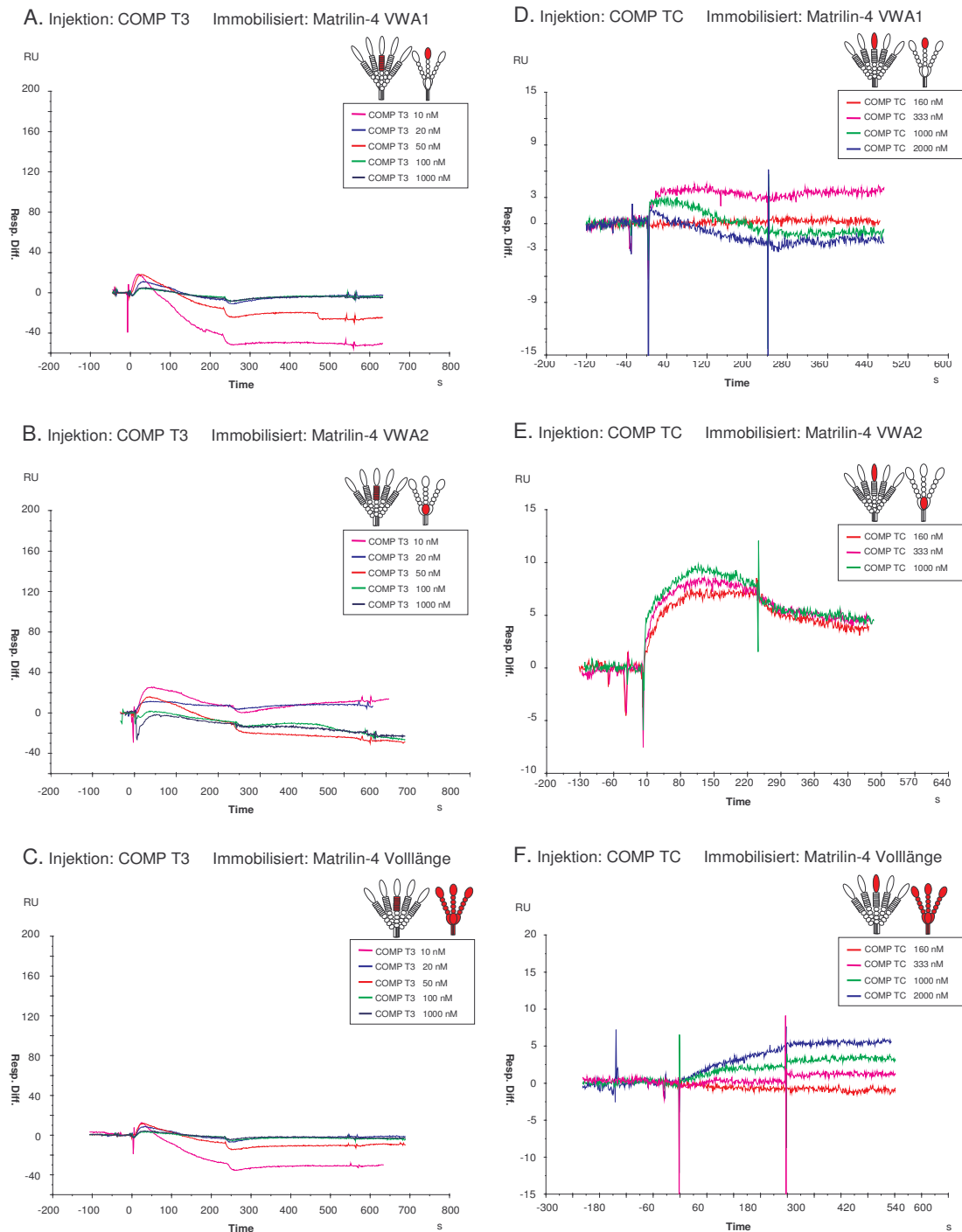


Abb. 3.17: SPR-Bindungsstudien mit COMP T3 und COMP TC an immobilisiertem Matrilin-4 VWA1, VWA2 und Volllänge. A, B, C, Injektion von COMP T3 über immobilisiertes Matrilin-4 VWA1 (A), VWA2 (B) und Volllänge (C). D, E, F, Injektion von COMP TC über immobilisiertes Matrilin-4 VWA1 (D), VWA2 (E) und Volllänge (F). Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in den Versuchen A – C 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM und in den Versuchen D – F 160 nM, 333 nM, 1000 nM und 2000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Volllängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff, *Response* Differenz.

Injiziertes COMP T3 zeigte keine Bindung an Matrilin-4 VWA1 (Abb. 3.17 A), VWA2 (Abb. 3.17 B) oder Volllängen Matrilin-4 (Abb. 3.17 C). Die Injektion von COMP TC zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Die leichten Änderungen der Resonanzdifferenz über der mit Matrilin-4 VWA1-gekoppelten Flußzelle konnten nicht als Signal einer spezifischen Bindung gedeutet werden, da sie teilweise abnahmen und keinen konzentrationsabhängigen oder SPR-typischen Kurvenverlauf zeigten (Abb. 3.17 D). Im Gegensatz dazu indizierten die ebenfalls sehr schwachen Signale von injiziertem COMP TC über immobilisiertem Matrilin-4 VWA2 eine spezifische, wenn auch extrem schwache Bindung dieser beiden Protein-Domänen (Abb. 3.17 E). Im Vergleich zur VWA1 – COMP TC Wechselwirkung konnte hier eine Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung beobachtet werden und die aufgezeichneten Sensorgramme zeigten trotz ihrer sehr geringen R_{max} von ca. 9 RU bei C_{max} den SPR-typischen Kurvenverlauf mit klar unterscheidbaren Phasen der Assoziation und Dissoziation. Über Vollängen Matrilin-4 geleitetes COMP TC zeigte ebenfalls eine sehr schwache und konzentrationsabhängige Bindung an das immobilisierte Matrilin-4 Protein (Abb. 3.17 F). Bemerkenswert war trotz der sehr schwachen Bindung ein charakteristisch unterschiedlicher Kurvenverlauf der Bindungen von COMP TC an Matrilin-4 VWA2 und an das Matrilin-4 Vollängenprotein. Wie schon oben für injizierte COMP-Proteine beschrieben, unterschieden sich auch hier die Kurvenverläufe in den Dissoziationsphasen. Während die gebundenen COMP TC Proteine vom immobilisierten Matrilin-4 VWA2 relativ leicht und mit einem für SPR typischen, hyperbolen Verlauf abdissoziierten, verblieben sie stabil an das gekoppelte Vollängen Matrilin-4 gebunden und dissoziierten nicht ab.

Bei der Injektion von COMP T3+TC Protein (s. S. 75) über immobilisiertes Matrilin-4 VWA1 war keine Interaktion zu beobachten (Abb. 3.18 A). Im Gegensatz dazu zeigte COMP T3+TC aber eine eindeutige und konzentrationsabhängige Bindung an Matrilin-4 VWA2 von ca. 170 RU bei einer Analytenkonzentration von 4 μ M, die in dem durchgeführten Experiment aber nicht zur Sättigung gebracht werden konnte (Abb. 3.18 B). Injiziert über Vollängen Matrilin-4 zeigte COMP T3+TC ebenfalls eine Bindung (Abb. 3.18 C), allerdings entwickelte diese nur eine relativ schwache, aber konzentrationsabhängige und sättigbare Signaldifferenz (ca. 42 RU bei C_{max}).

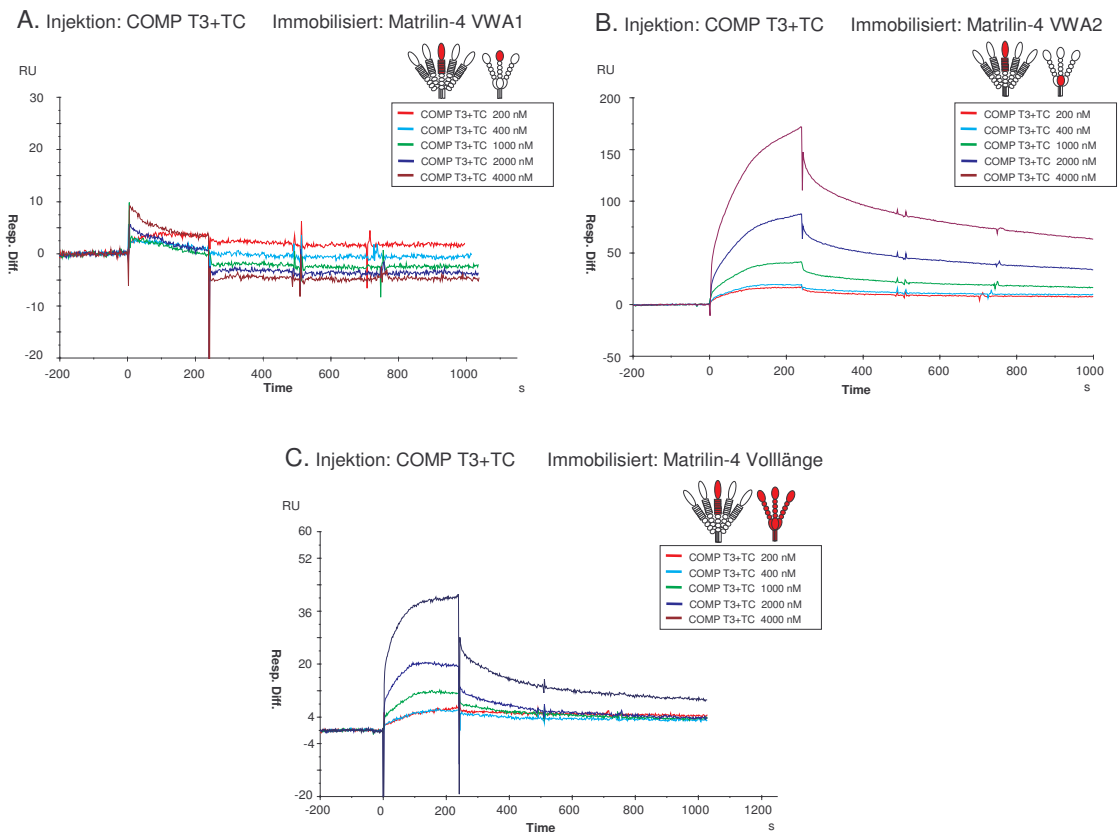


Abb. 3.18: SPR-Bindungsstudien mit COMP T3+TC an immobilisiertem Matrilin-4 VWA1, VWA2 und Volllänge. A, Injektion von COMP T3+TC über immobilisiertes Matrilin-4 VWA1. B, Injektion von COMP T3+TC über immobilisiertes Matrilin-4 VWA2. C, Injektion von COMP T3+TC über immobilisiertes Volllängen Matrilin-4. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in den Versuchen A – C 200 nM, 400 nM, 1000 nM, 2000 nM und 4000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Volllängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff, *Response* Differenz.

Zuletzt wurden die Bindungen zwischen immobilisiertem COMP und Matrilin-3 Volllängenprotein sowie der Matrilin-3 VWA1 Domäne untersucht. Die Experimente wurden nach demselben Protokoll wie die vorhergehenden Versuche durchgeführt. Auf einem neuen CM5-Chip wurde auf einer Flußzelle Volllängen COMP immobilisiert. Um in demselben Versuch Selbstwechselwirkungen zwischen den Matrilinen zu untersuchen, erfolgte auf zwei weiteren Flußzellen eine Immobilisierung von Volllängen Matrilin-3 und -4. Die Injektionen von Matrilin-3 erfolgten bei Konzentrationen von 70 nM, 140 nM, 280 nM, 550 nM und 1,1 µM, die von Matn-3 VWA1 bei 200 nM, 400 nM, 1000 nM und 10 µM.

Das immobilisierte Volllängen COMP reagierte mit einer schnellen und sehr starken Bindung an das eingeleitete Volllängen Matrilin-3, mit einer R_{max} von über 1150 RU bei der höchsten Analytenkonzentration (Abb. 3.19 A). Eine Sättigung der Bindung wurde nicht erreicht. Die in geringerer Konzentration injizierten Proteine (70 nM, 140 nM, 280 nM, 550 nM) zeigten eine sehr langsame Dissoziation, was auf eine stabile Bindung hinwies. Im Vergleich dazu zeigte Matrilin-3 VWA1 eine sehr schwache, aber signifikante Bindung, die allerdings erst bei einer extrem hohen Konzentration (bzw. geringer Verdünnung des gereinigten Proteins) von 10 μ M eine starke Resonanz erzielte (Abb. 3.19 B). Die geringe Verdünnung des injizierten Proteins erklärt den beobachteten starken „Bulk-shift“, eine Reaktion der Sensorgramm-Basislinie, die ausschließlich auf den refraktiven Index der Proteinlösung, der sich von dem des Laufpuffers unterscheidet, zurückzuführen war.

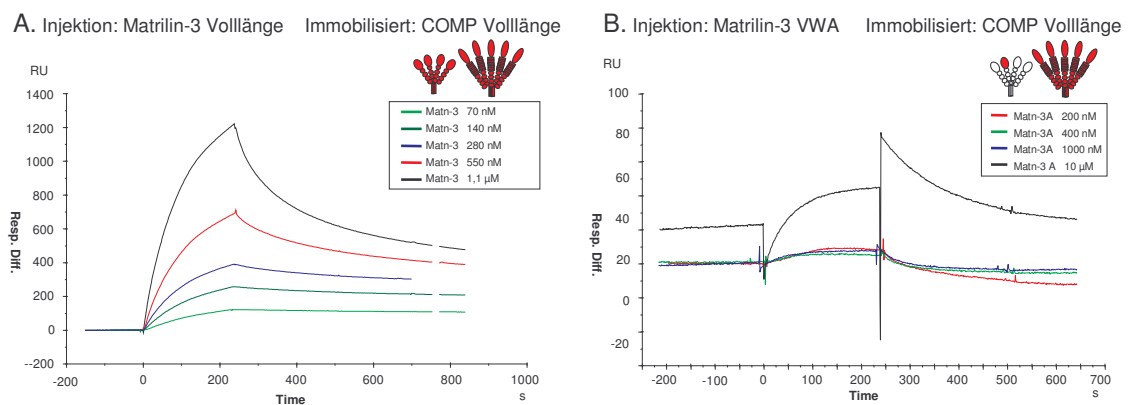


Abb. 3.19: SPR-Bindungsstudien mit Volllängen Matrilin-3 und Matrilin-3 VWA an immobilisiertem Volllängen COMP. A, Injektion von Volllängen Matrilin-3 (Matn-3) über immobilisiertes Volllängen COMP. B, Injektion von Matrilin-3 VWA1 (Matn-3 A) über immobilisiertes Volllängen COMP. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in dem Versuch A 70 nM, 140 nM, 280 nM, 550 nM und 1100 nM, im Versuch B 200 nM, 400 nM, 1000 nM und 10000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Volllängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff., *Response* Differenz.

Die SPR-Analysen möglicher Selbstwechselwirkungen von Matrilin-3 sowie von Matrilin-3 mit Matrilin-4 zeigten starke und konzentrationsabhängige Bindungen. Bei der Injektion von Vollängen Matrilin-3 war die mit Matrilin-3 immobilisierte Chipoberfläche bei der höchsten Analytenkonzentration mit einer R_{max} von ca. 120 RU gesättigt (Abb. 3.20 A).

Das plötzliche, lineare, weitere Ansteigen der Sensorgramme gegen Ende der Injektion (siehe roter Pfeil) ist vermutlich auf eine Selbstwechselwirkung der injizierten Matrilin-3 Proteine mit den bereits gebundenen Matrilin-3 Proteinen zurückzuführen. Die Injektion von Vollängen Matrilin-3 über immobilisiertes Vollängen Matrilin-4 (Abb. 3.20 B) resultierte ebenfalls in einer starken Selbstwechselwirkung mit ähnlichem Kurvenverlauf wie in Abb. 3.20 A gezeigt (siehe ebenfalls roter Pfeil). Hier wurde ein R_{max} von über 700 RU erreicht und auch in diesem Versuch gab es einen signifikanten Anteil an gebundenem Protein, der nur sehr langsam abdissoziierte.

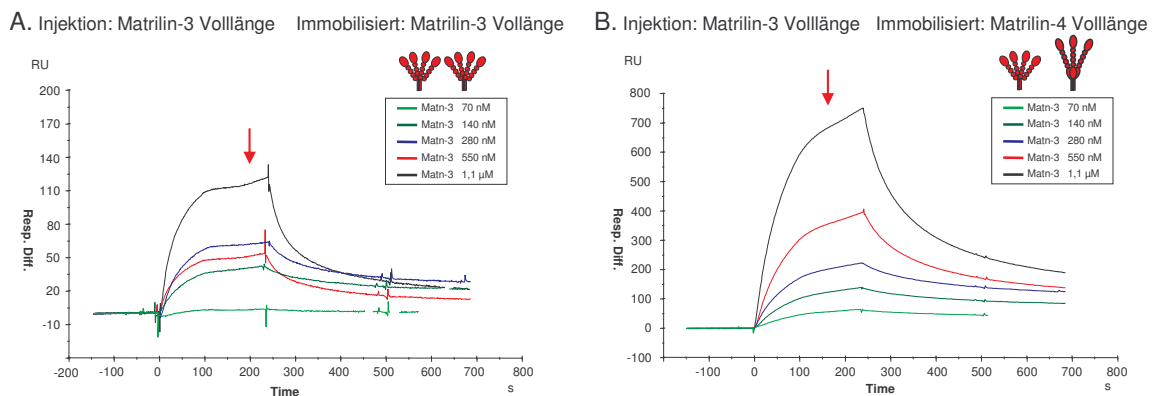


Abb. 3.20: SPR-Bindungsstudien mit Vollängen Matrilin-3 an immobilisiertem Matrilin-3 und Matrilin-4 Volllängeprotein. A, Injektion von Vollängen Matrilin-3 (Matn-3) über immobilisiertes Vollängen Matrilin-3. B, Injektion von Vollängen Matrilin-3 über immobilisiertes Vollängen Matrilin-4. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in beiden Versuchen 70 nM, 140 nM, 280 nM, 550 nM und 1100 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Zur besseren Orientierung sind die bei den Messungen eingesetzten jeweiligen Proteine oder verkürzten Fragmente in den schematischen Zeichnungen als Teile der entsprechenden Vollängen-Proteine rot markiert. Resp. Diff., *Response* Differenz. Der rote Pfeil markiert vermutliche, unspezifische Bindungen.

Tabelle 3.3 fasst die mit SPR gemessenen Bindungen zwischen Matrilinen und COMP und deren verkürzten Fragmenten zusammen (S. 79).

Tab. 3.3: Übersicht über die mit SPR untersuchten Bindungen zwischen Matrilinen und COMP und deren verkürzten Fragmenten.

Injiziertes Protein		Immobilisiertes Protein										
		Matn-3	Matn-4				COMP					
		fl	VWA1	VWA2	EGF	Δ CT	fl	TC	T3+TC	T3	mono	fl
Matn-3	VWA1											+
	fl	+					+++					+++
Matn-4	VWA1						-	(+)				++
	VWA2						-	+				++
	EGF						-	-				-
	Δ CT						+	+				+++
	fl						-	-				+++
COMP	TC	+	-	+			+					
	T3+TC		-	++			++					
	T3		-	-			-					
	mono											
	fl											

Die Farbgebung der Kästchen dokumentiert die subjektive Beurteilung der Affinität zwischen den jeweiligen Bindungspartnern auf Grund der beobachteten Kurvenverläufe und R_{max} . Rot = keine Bindung, dunkler werdende Grüntöne und die aufsteigende Anzahl von Plus-Symbolen dienen dem Vergleich erfolgter Bindungen zwischen unterschiedlichen Paarungen. Matn = Matrilin; fl = Volllänge; Δ CT/mono = Monomer

3.2.4 Quantifizierung der gemessenen Bindungen zwischen Matrilin-4 und COMP Proteinen

Zur quantitativen Bewertung der ermittelten Ergebnisse wurden die Dissoziationskonstanten (K_d -Wert) der dokumentierten Wechselwirkungen berechnet. Die Kalkulation der kinetischen Daten aus den Sensorgrammen erfolgte nach Subtraktion des Signals der Referenzflusszelle mit Hilfe der BIAevaluation 3.0-Software. Die Auswertung beruht auf dem Marquardt-Levenberg Algorithmus (Gleichung 1) welcher die Quadratsumme (S) der Differenzen zwischen gemessenen (r_g) und berechneten (r_b) Datenpunkten minimiert.

Gleichung 1:

$$S = \sum_{i=1}^n (r_b - r_g)^2$$

Für die Berechnung der Datenpunkte wurden die aus der Annahme einer 1:1-Langmuir-Bindung resultierenden Geschwindigkeitsgesetze verwendet. Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Werten wird durch den statistischen Wert X^2 beschrieben. Dieser kann im Fall von Sensorgrammen aufgrund der großen Anzahl von Datenpunkten (n) vereinfacht werden zu:

Gleichung 2:

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_b - r_g)^2}{n}$$

Zur Überprüfung des Bindungsmodells erfolgte eine Anpassung über den gesamten Bereich von Assoziation und Dissoziation. Die Ermittlung der Assoziations- (k_a) und Dissoziationskonstanten (K_d) erfolgte jedoch getrennt in den durch Injektionsstart und –ende, sowie Dissoziationsdauer definierten Zeiträumen. Um statistisch solide Werte zu ermitteln, wurden die Anpassungen immer gleichzeitig durch alle Kurven der jeweiligen Titration einer zu berechnenden Interaktion gelegt. Da für die Ermittlung von K_d -Werten von der Biacore-Software das Modell einer 1:1 Langmuir-Bindung zu Grunde gelegt wurde, erfolgten diese Berechnungen auch nur für diejenigen Versuche, die in ihrem Aufbau diesem Modell entsprachen. Komplexere mathematische Bindungsmodelle sind für diese Arbeit nicht entwickelt worden. Nicht alle durchgeführten Messungen ergaben Sensorgramme, deren Kurven sich zufriedenstellend an ein mathematisches Modell anpassen ließen. Der X^2 -Wert wurde

hierfür als qualitativer Marker genutzt, sein Wert sollte nicht über 2% des beobachteten R_{max} liegen. Zur Verbesserung der Anpassung eines gewählten Modells konnten erweiternde Parameter hinzugezogen werden: so konnte eine instabile Basislinie („drifting baseline“) und eine Limitierung des Massentransportes („mass transport“) berücksichtigt werden. Im Folgenden soll exemplarisch die Ermittlung eines K_D für eine gemessene Bindung dokumentiert werden. Eine Zusammenstellung aller ermittelten K_D -Werte für die Matrilin-4 – COMP-Bindung ist in der Tabelle 3.4 aufgelistet.

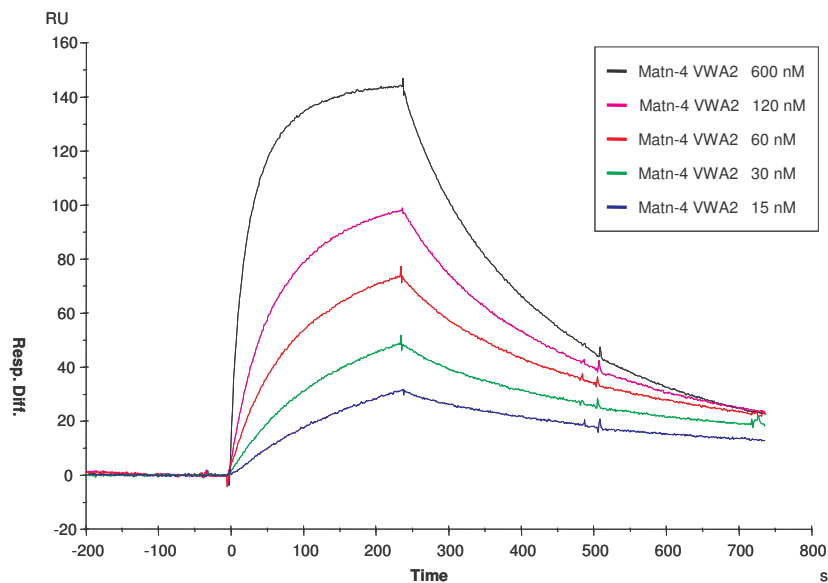


Abb. 3.21: Beispielhaftes SPR-Sensorgramm einer Bindung zwischen Matrilin-4 VWA2 und Volllänge COMP. COMP Volllänge wurde als Ligand auf den Sensorchip gekoppelt (2600 RU) und Matrilin-4 VWA2 wurde bei verschiedenen Konzentrationen (15 nM, 30 nM, 60 nM, 120 nM, 600 nM) über die Oberfläche geleitet.

Da Volllänge COMP auf der Sensorchip-Oberfläche immobilisiert wurde, standen theoretisch alle fünf Untereinheiten des Moleküls frei im Raum und jede Untereinheit konnte ihre Valenz nutzen, um eine Bindung mit injizierten Analyten einzugehen. Das eingeleitete Matrilin-4 VWA2 Protein war definiert als eine Lösung einzelner VWA Domänen, insofern wurde diese Bindung als eine 1:1 Wechselwirkung betrachtet und seine Dissoziationskonstante konnte unter Anwendung des 1:1 Langmuir-Bindungsmodells ermittelt werden. Abb. 3.22 zeigt die mathematische Anpassung für diesen Versuch.

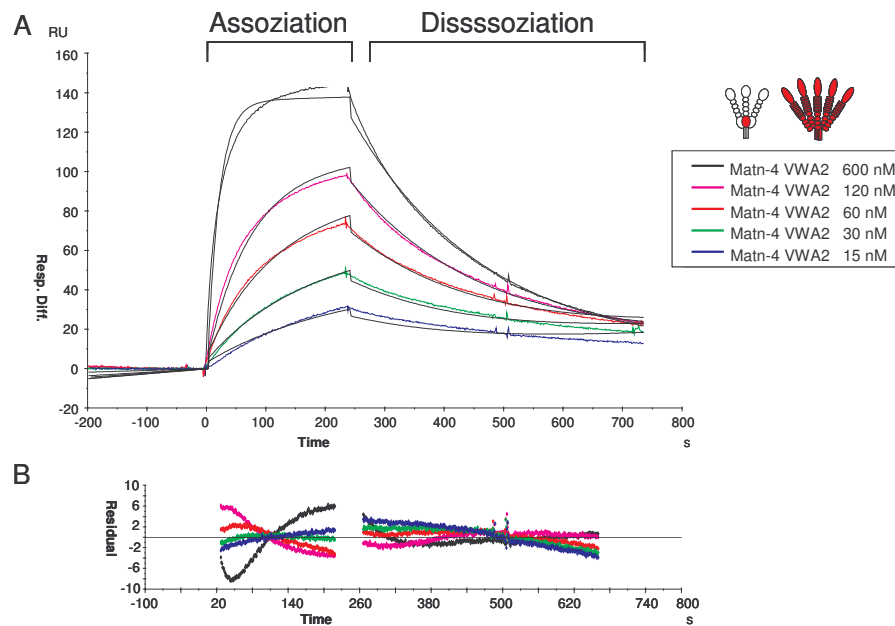


Abb. 3.22: Gemessene (farbig) und berechnete (schwarz) Daten für die Bindung zwischen Vollängen COMP (Ligand) und Matrilin-4 VWA2 (Analyt). A, die Anpassung erfolgte gleichzeitig über den gesamten Bereich von Assoziation und Dissoziation nach dem Modell einer 1:1 Langmuir Bindung mit „drifting Baseline“ als erweiterndem Parameter. B, Die *Residuals* beschreiben die Abweichungen der gemessenen Daten (in RU) von dem genullten, berechneten Kurvenverlauf.

Die Berechnungen der kinetischen Daten lieferten neben dem χ^2 -Wert für jede Wechselwirkungstitration die Raten für Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) sowie die daraus ermittelte Dissoziationskonstante K_d (k_a/k_d). Die errechneten Ergebnisse für alle an die Versuche erfolgreich angepassten kinetischen Interaktionsmodelle sind in der Tabelle 3.4 angegeben.

Tab. 3.4: Bindungskonstanten von Matrilin- und COMP-Wechselwirkungen.

<u>Ligand</u>	<u>Analyt</u>	<u>Modell</u>	<u>Erweiterte Parameter</u>	<u>χ^2</u>	<u>k_a (1/Ms)</u>	<u>k_d (1/s)</u>	<u>K_d (M)</u>
COMP Volllänge	Matrilin-4 VWA1	1:1	Mass Transfer	3,46	4,45e5	0,182	4,09e-7
COMP Volllänge	Matrilin-4 VWA2	1:1	Drifting Baseline	3,0	7,82e4	4,29e-3	5,48e-8
COMP Volllänge	Matrilin-4 Monomer	1:1	Mass Transfer	8,61	1,09e5	1,05e-3	9,58e-9
Matrilin-4 VWA2	COMP T3+TC	1 :1	keine	15	355	1,09e-3	3,07e-6
Matrilin-4 Volllänge	COMP T3+TC	1 :1	ohne/ Local Fit	0,72	5,04e3	1,17e-3	2,32e-7

Angegeben sind das verwendete Modell (1:1 Langmuir-Bindung), die Erweiterung der kinetischen Parameter {*Mass Transfer* (Massentransport-Limitierung, Erläuterung dazu siehe Diskussion), instabile Basislinie (Drifting Baseline), Lokaler Fit}, der χ^2 -Wert, die Raten für Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) und die daraus ermittelte Dissoziationskonstante K_d .

3.3 Studien zur Interaktion von Matrilinen mit zellulären Rezeptoren

Einige VWA-enthaltende Proteine sind an Mechanismen der Zellanhaftung beteiligt. Die Rolle der Matriline als Zellanhaftungsmoleküle war bisher nur wenig untersucht, lediglich eine Wechselwirkung zwischen Matrilin-1 und $\alpha 1\beta 1$ Integrin wurde beschrieben (Makihira *et al.*, 1999). Daher sollten die zellbindenden Eigenschaften der Matriline näher untersucht werden.

3.3.1 Anhaftung von Zellen auf immobilisierten Matrilinen⁴

Für die Durchführung von Zellanhaftungsversuchen wurden native, frisch aufgereinigte Matriline in ansteigenden Konzentrationen über Nacht bei 4°C auf 96-Well Zellkulturplatten immobilisiert. Nach der Blockierung freier Bindestellen wurden die trypsinisierten Zellen in serumfreiem DMEM-Medium auf die Platten gegeben. Als verwendete Zellen wurden die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp, 1988) und die Fibroblasten-Zelllinie Wi26 (ATCC) gewählt, da sie beide zusammen ein sehr breites Spektrum von Integrinen exprimieren ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 5$), die als potentielle Bindungspartner in Frage kamen. Nach 30-minütiger Inkubation, gefolgt von Fixierung und Färbung, erfolgte die Analyse des Versuchsansatzes durch eine Messung der Absorption bei 540nm.

⁴ In Kollaboration durchgeführt mit Dr. Gerhard Sengle im Labor von Prof. Dr. Mats Paulsson, Köln; Manuskript in Vorbereitung: „Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation“ von Mann, H.H., Sengle, S. *et al.*, 2006

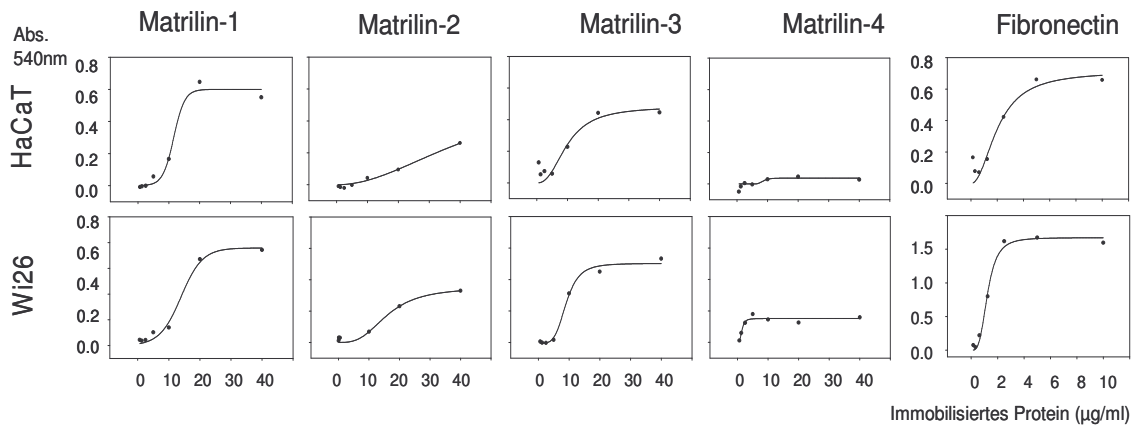


Abb. 3.23: Zellanhaftung von HaCaT und WI26 Zellen auf immobilisierten Matrilinen. Native und frisch gereinigte Matrilin-1, -2, -3 und -4 (Vollängenproteine) wurden jeweils bei Konzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40 µg/ml über Nacht bei RT auf 96-Well Zellkulturplatten immobilisiert. Fibronectin diente als Kontrolle, bei Konzentrationen von 0,2 – 10 µg/ml. Nach Blockierung mit 1% BSA und 30-minütiger Inkubation mit den frisch trypsinisierten Zellen in serumfreiem DMEM wurden die Bindungsansätze fixiert (1 % Glutaraldehyd in PBS) und gefärbt (0,1 % Kristallviolett in H₂O). Die Analyse der Interaktionsansätze erfolgte durch eine Messung der Absorption bei 540 nm in Zelladhäsionsversuch-üblicher Art. Alle Messungen waren Dreifachbestimmungen. Abs., Absorption.

Die Matrilin-1, -2 und -3 vermittelten konzentrationsabhängige Zellanhaftung zu beiden getesteten Zelllinien. Matrilin-4 zeigte nur eine schwache Fähigkeit zur Zell-Adäsion an WI26- und band nicht an die HaCaT-Zellen (Abb. 3.23). Für Matrilin-1 und -3 war die Anhaftung bei einer Konzentration von 20 µg/ml gekoppeltem Protein gesättigt, für Matrilin-2 wurde eine Sättigung erst bei ca. 40 µg/ml für WI26-Zellen erreicht, während für HaCaT-Zellen keine Sättigung erreicht wurde. Die Zellen banden nicht an immobilisierte, verkürzte Matrilinfragmente oder isolierte Matrilin VWA Domänen (nicht gezeigt). Der als Kontrolle durchgeführte Versuch mit immobilisiertem Fibronectin zeigte eine ebenfalls konzentrationsabhängige, aber sehr viel stärkere Haftung der Zellen, die bereits bei 6 µg/ml (HaCaT) bzw. 2 µg/ml (WI26) immobilisiertem Protein gesättigt war.

3.3.2 Bindungen von Matrilinen an $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin Ektodomänen⁵

Um einen tieferen Einblick in die potentielle Rolle der Integrine in der Matrilin-vermittelten Zellanhaftung zu gewinnen, wurden Festphasen-Versuche nach ELISA-Art durchgeführt. Dafür erfolgte eine Immobilisierung der Matrilin auf der ELISA-Platte

⁵ In Kollaboration durchgeführt mit Dr. Johannes Eble, Münster; Manuskript in Vorbereitung: „Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation“ von Mann, H.H., Sengle, S. *et al.*, 2006

und der Blockierung folgend eine Inkubation mit löslichen $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin Ektodomänen (Abb. 3.26). Die Inkubation verlief entweder in Gegenwart von 1 mM Mn^{2+} , von 1 mM Mn^{2+} und 200 nM des integrin-aktivierenden Antikörpers AK 9EG7 (Bazzoni *et al.*, 1995) oder in Gegenwart von 10 mM EDTA. Die Detektion von gebundenem Integrin erfolgte nach Fixierung mit spezifisch gegen die jeweiligen Integrin-Domänen gerichteten Antikörpern (Eble *et al.*, 2001) in ELISA-typischer Art.

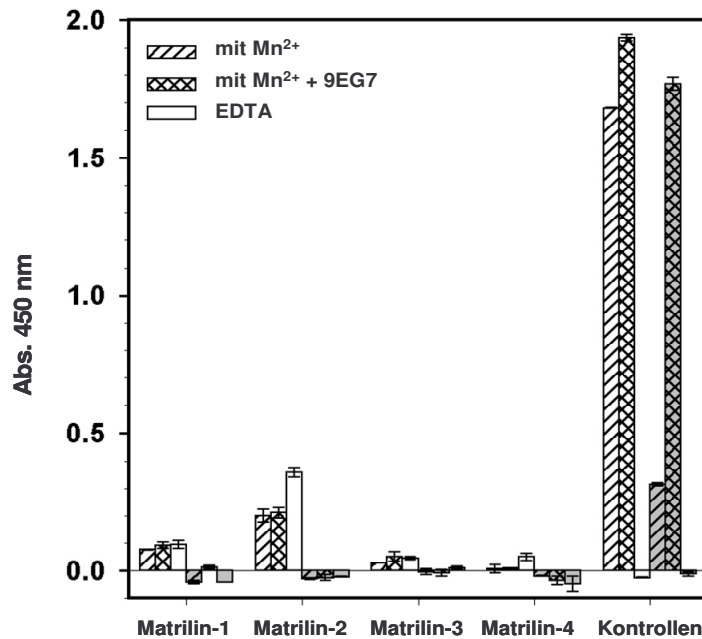


Abb. 3.24: ELISA-ähnliche Bindungsstudien zwischen Matrilinen und $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin Ektodomänen. Auf der x-Achse sind die immobilisierten Proteine (15 $\mu\text{g/ml}$) angegeben, als Kontrollen dienten das humane Kollagen IV Fragment CB3 (10 $\mu\text{g/ml}$) für $\alpha 1\beta 1$ Integrin und bovines Kollagen I (20 $\mu\text{g/ml}$) für $\alpha 2\beta 1$ Integrin. Nach der Blockierung wurden die löslichen $\alpha 1\beta 1$ (50 nM, weiße Balken) und $\alpha 2\beta 1$ (40 nM, graue Balken) Integrin Ektodomänen jeweils in Gegenwart von entweder 1 mM Mn^{2+} , 1 mM Mn^{2+} zusammen mit dem Integrin-aktivierenden Antikörper AK 9EG7 oder mit 10 mM EDTA inkubiert (2 h bei RT). Gebundenes Protein wurde in ELISA-üblicher Art mit spezifisch gegen die entsprechenden Integrin-Domänen gerichteten Antikörpern detektiert und analysiert. Abs., Absorption.

Verglichen mit dem als Positivkontrolle verwendeten Kollagen I bewirkten die immobilisierten Matrilin 1 und 3 nur eine schwache bzw. sehr schwache Bindung mit der $\alpha 1\beta 1$ Integrin Ektodomäne (Abb. 3.24). Matrilin-2 zeigte hier ebenfalls ein relativ schwaches Bindungssignal. Weder die Anwesenheit des durch die Integrin-VWA Domäne koordinierbaren divalenten Kations Mn^{2+} , noch die Zugabe des Antikörpers AK 9EG7 hatten einen Einfluß auf diese schwachen Wechselwirkungen; ebensowenig konnte die Zugabe von EDTA die Bindung aufheben. Im Gegenteil: im Fall von Matrilin-

2 wurde das Signal sogar verstärkt, dennoch war dieses Signal immer noch sehr viel niedriger als das der Positivkontrolle. Matrilin-3 und -4 zeigten keine signifikante Bindung und keines der Matrilin zeigte eine Bindung zu $\alpha 2\beta 1$ Integrin.

3.3.3 Bindungen von Matrilinen an Proteoglykane

Zelloberflächen-Proteoglykane sind ebenfalls an der Vermittlung von Zell-Matrix Kontakten beteiligt (Essner *et al.*, 2006). Als potentielle Matrilin-Bindungspartner auf der Zelloberfläche kamen dabei die Glykosaminoglykane (GAGs) Heparin, Heparansulfat und Chondroitinsulfat in Frage. Zuerst wurden sie als Kompetitoren in Zellanhaftungsversuchen mit Matrilin-1 und HaCaT-Zellen eingesetzt (Abb. 3.27). Dabei fand eine Vorinkubation der mit Matrilin-1 bzw. Fibronectin immobilisierten Kunststoffplatten mit den verschiedenen Proteoglykanen statt, bevor die vorbereiteten Zellen auf die Platte gegeben wurden. Das Inkubationsmedium enthielt dabei weiterhin die entsprechenden Proteoglykankonzentrationen. Um eine kollagenvermittelte Zellanhaftung auszuschließen, wurde eine Fraktion der Zellen vor der Inkubation auf den Platten mit Kollagenase verdaut.

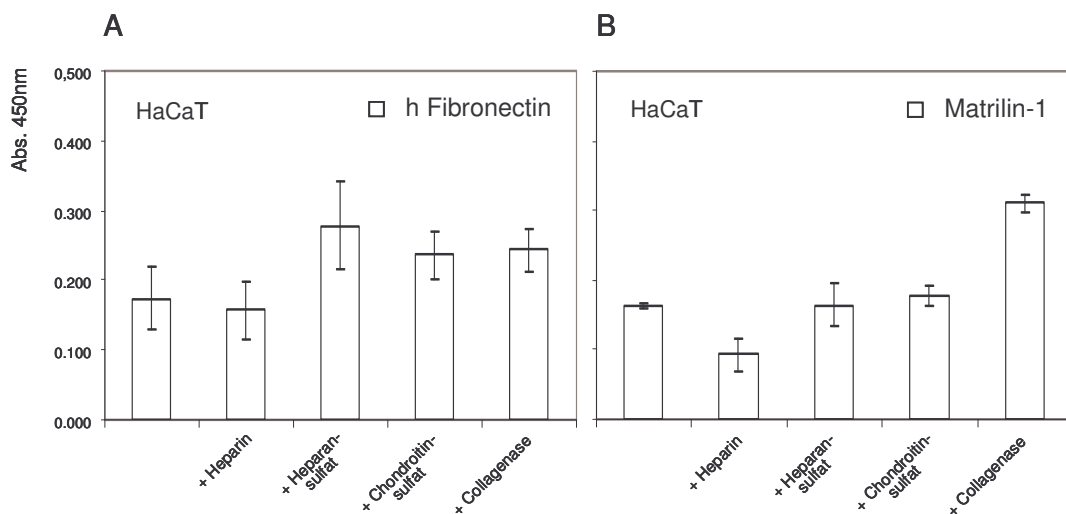


Abb. 3.25: Einfluß von Glykosaminoglykan-Ketten und Kollagen auf die Zellbindung von Matrilin-1. Fibronectin (A) und Matrilin-1 (B) wurden mit 4 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$ über Nacht bei RT immobilisiert. Angegeben sind die in der Vorinkubation (1,5 h bei RT, 100 $\mu\text{g/ml}$) zur Competition der Zellanhaftung verwendeten Proteoglykane bzw. die verwendete Kollagenase (1,5 h bei 37°C, 0,1 U/ml). Nach der Inkubation der HaCaT-Zellen in serumfreiem DMEM wurden die Bindungsansätze durch Färbung und Bestimmung der Absorption bei 450 nm analysiert. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Die Konkurrenz mit Heparin bewirkte eine deutlich reduzierte Zellanhaftung auf Matrilin-1, hatte aber keinen signifikanten Effekt auf Fibronectin. Heparansulfat und Chondroitinsulfat hatten keine inhibierende Wirkung. Die vor der Inkubation auf den Platten mit Kollagenase verdauten Zellen wurden durch den Verdau in ihrem Bindungspotential mit Matrilin und Fibronectin nicht beeinträchtigt, sondern banden, insbesondere im Fall von Matrilin-1, sogar noch stärker an die immobilisierten Proteine, was evtl. auf eine die Zellbindung beeinträchtigende Wirkung des Kollagenetzwerks hinwies (Abb. 3.25).

Im Folgenden wurde mit SPR die direkte Bindung zwischen Matrilin-3 und -4 und Heparin, Heparansulfat und Chondroitinsulfat untersucht. Dazu wurden die Proteoglykane biotinyliert und auf einem mit Streptavidin präimmobilisierten Biacore SA-Chip™ gekoppelt (ca. 200 RU). Anschließend erfolgte die Injektion der Matrilin-Proteine in ansteigenden Konzentrationen (Abb. 3.26, 3.27). Verwendet wurden in diesem Fall His₆-markierte Varianten der bereits früher beschriebenen rekombinant exprimierten Proteine von Matn-3 VWA und Matrilin-3 und -4 Volllängeproteinen.

Sowohl Volllänge Matrilin-3 (Abb. 3.26 A, B) als auch Matrilin-3 VWA (Abb. 3.26 D, E) zeigten starke und konzentrationsabhängige Bindungen an Heparin und Heparansulfat. Volllänge Matrilin-3 erreichte bei der Injektion über Heparin ein maximales Bindungssignal von über 2200 RU, über Heparansulfat von ca. 1200 RU. Die Wechselwirkung zwischen Matrilin-3 VWA und den Proteoglykanen fiel schwächer aus, hier wurden Resonanzdifferenzen von 1200 RU über Heparin und ca. 550 RU über Heparansulfat gemessen. Weder das Matrilin-3 Volllängeprotein noch dessen VWA Domänen banden an Chondroitinsulfat (Abb. 3.26 C und F). Das Signal von Volllänge Matrilin-3 bei 1000 nM über immobilisiertem Chondroitinsulfat war artefiziell, da es ohne Konzentrationsabhängigkeit und ohne Dissoziationsphase keinen spezifischen Verlauf aufwies. Die Injektion von Volllänge Matrilin-4 zeigte sehr ähnliche Ergebnisse mit starken und konzentrationsabhängigen Bindungen an Heparin (R_{max} ca. 1400 RU) und Heparansulfat (R_{max} ca. 470 RU) und fehlender Bindung an Chondroitinsulfat (Abb. 3.27). Alle Matrilin lösten stärkere Resonanzdifferenzen mit Heparin, als mit Heparansulfat aus. In allen Fällen verlief die Dissoziation relativ langsam, die Regeneration konnte nur mit häufigen Injektionen von 2 M NaCl erfolgreich durchgeführt werden. Eine Sättigung wurde nur bei den Injektionen von Matrilin-3 und -4 Volllängeproteinen annähernd erreicht.

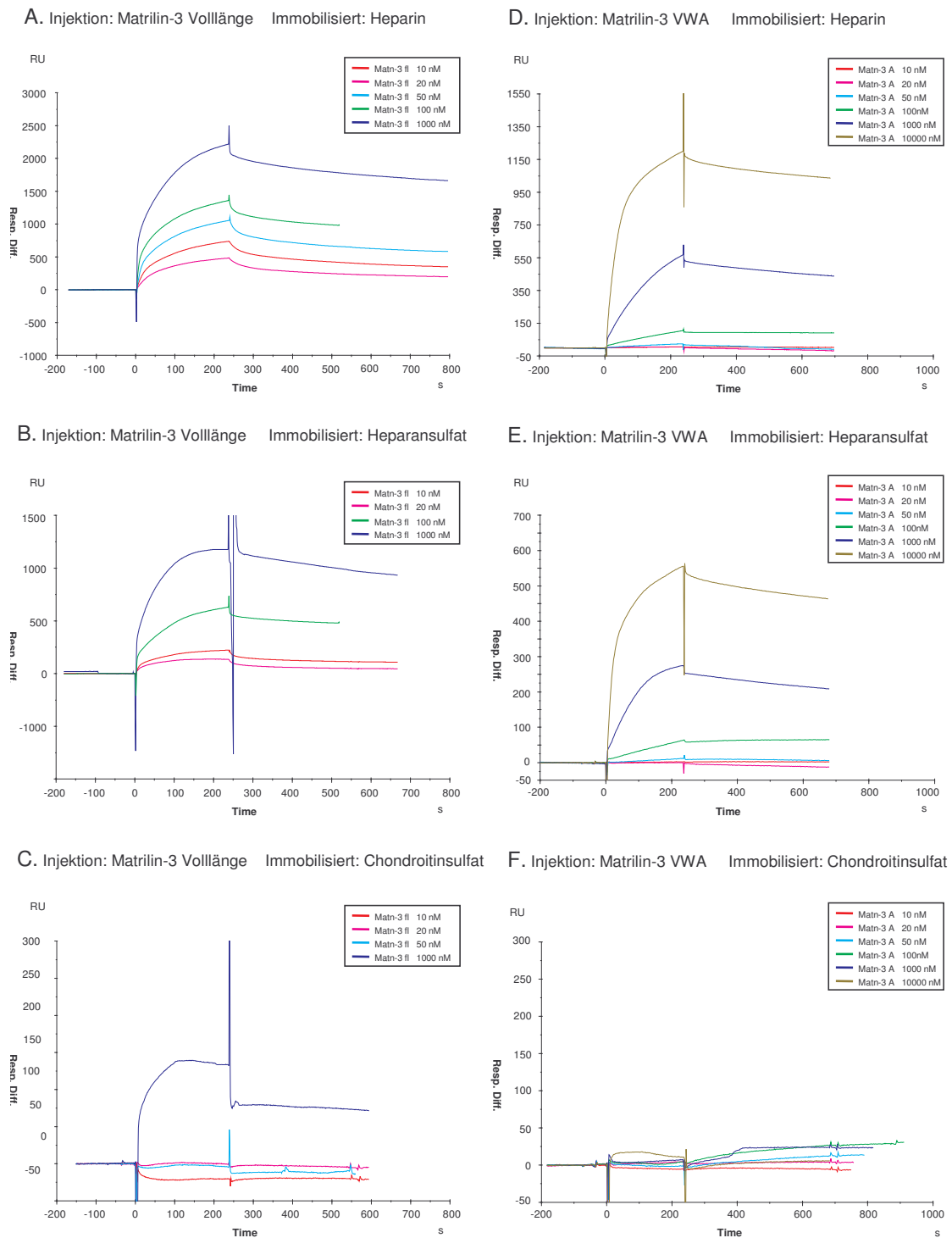


Abb. 3.26: SPR-Bindungsstudien mit Vollängen Matrilin-3 und Matrilin-3 VWA an immobilisierten Glykosaminoglykanen. A und D, Injektion von Matrilin-3 Volllänge (Matn-3 fl) und Matrilin-3 VWA (Matn-3 A) über immobilisiertes Heparin. B und E, Injektion von Matrilin-3 Volllänge und Matrilin-3 VWA über immobilisiertes Heparansulfat. C und F, Injektion von Matrilin-3 Volllänge und Matrilin-3 VWA über immobilisiertes Chondroitinsulfat. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in allen Versuchen 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). *Resp. Diff.*, *Response* Differenz.

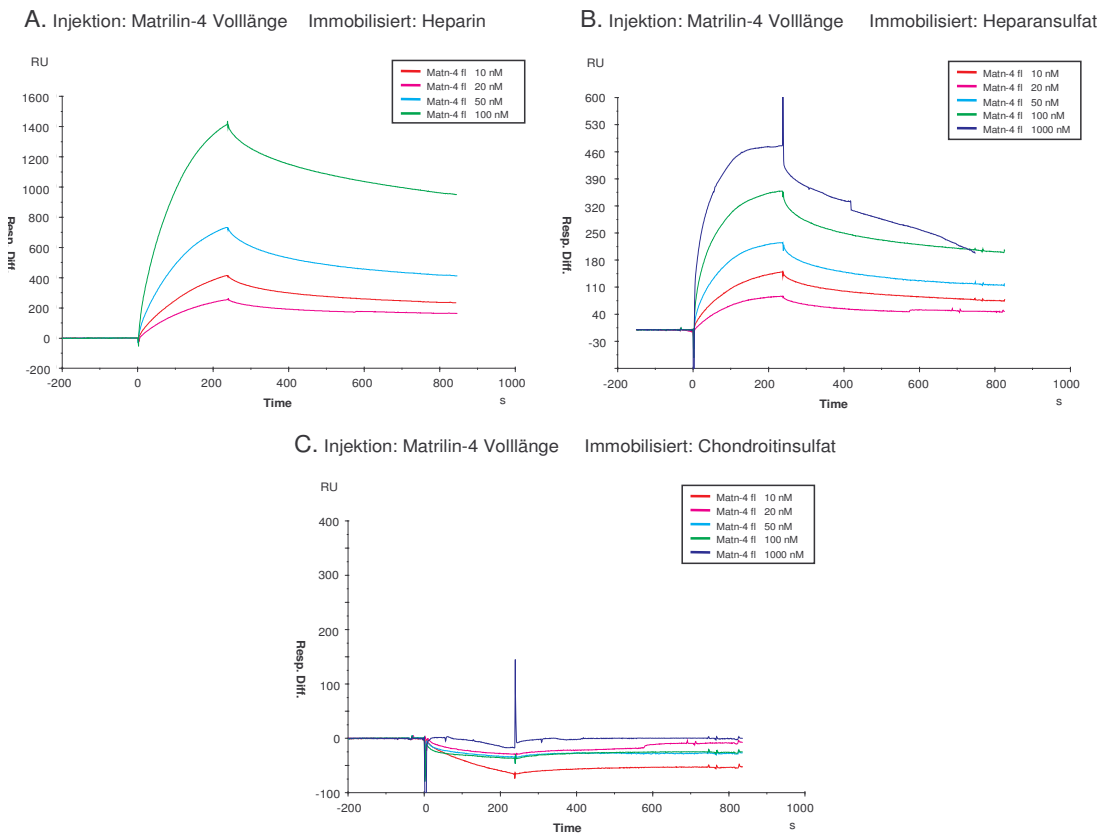


Abb. 3.27: SPR-Bindungsstudien mit Vollängen Matrilin-4 an immobilisierten Glykosaminoglykanen. A Injektion von Vollängen Matrilin-4 (Matn-4 fl) über immobilisiertes Heparin. B, Injektion von Vollängen Matrilin-4 über immobilisiertes Heparansulfat. C, Injektion von Vollängen Matrilin-4 über immobilisiertes Chondroitinsulfat. Die Konzentration der injizierten Analyten betrug in allen Versuchen 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM und 1000 nM. Wiedergegeben ist jeweils die *Response* Differenz nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit (s). Resp. Diff, *Response* Differenz.

Mit Hilfe der BIAevaluation 3.0-Software wurden auch hier kinetische Analysen durchgeführt. Berechnet wurden die kinetischen Werte für jeweils das Sensorgramm der Matrilin-3 VWA Injektion, das der Konzentration von 1000 nM Analyt entsprach.

Tab. 3.5: Bindungskonstanten für die Matrilin-3 VWA – Proteoglykan Wechselwirkungen.

<u>Ligand</u>	<u>Analyt</u>	<u>Modell</u>	<u>Erweiterte Parameter</u>	<u>Chi²</u>	<u>ka (1/Ms)</u>	<u>kd (1/s)</u>	<u>K_d (M)</u>
Heparin	Matn-3 VWA	1:1	kein	3,21	5,21e3	4,03e-4	7,72e-8
Heparansulfat	Matn-3 VWA	1:1	kein	4,03	1e4	4,58e-4	4,58e-8

Angegeben sind das verwendete Modell (1:1 Langmuir-Bindung), die Erweiterung der kinetischen Parameter {Massentransport-Limitierung (Mass Transfer), instabile Basislinie (Drifting Baseline), Lokaler Fit}, der X²-Wert, die Raten für Assoziation (ka) und Dissoziation (kd) und die daraus ermittelte Dissoziationskonstante K_d.

3.3.4 Interaktionen von β 1-Integrin und Glykosaminoglykan defizienten Zelllinien mit Matrilin-3

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Zellanhaftungsmechanismen auf Matrilin-gekoppelten Oberflächen war die vergleichende Durchführung von Zellanhaftungs- (*cell adhesion*) Versuchen mit Oberflächenrezeptordefizienten Zelllinien. Für die folgenden Versuche wurden einerseits murine GD25 Fibroblasten verwendet, in denen entweder das Gen für die Integrin β 1-Untereinheit inaktiviert (GD25) oder in denen das inaktivierte Gen wiederhergestellt war (β 1 res) (Wennerberg *et al.*, 1996). Andererseits fanden CHO-745-Zellen Verwendung (ATCC CRL-2242), die defizient für ein Enzym der Glykosaminoglykan- (GAG) Synthese sind (Xylosyltransferase) und denen daher die Oberflächen-Proteoglykane fehlen (Esko *et al.*, 1985). Als Kontrolle dienten wildtypische CHO-Zellen (CHO-K1, ATCC). Für die Versuche wurden Titrationen mit ansteigenden Konzentrationen von immobilisiertem Matrilin-3 durchgeführt, Fibronectin diente als Positivkontrolle (Abb. 3.30). Matrilin-3 wurde im Folgenden verwendet, da es im Gegensatz zu Matrilin-1 rekombinant herstellbar ist und ebenso in den vorhergehenden SPR-Studien eine sehr starke Bindung an Proteoglykane gezeigt hatte.

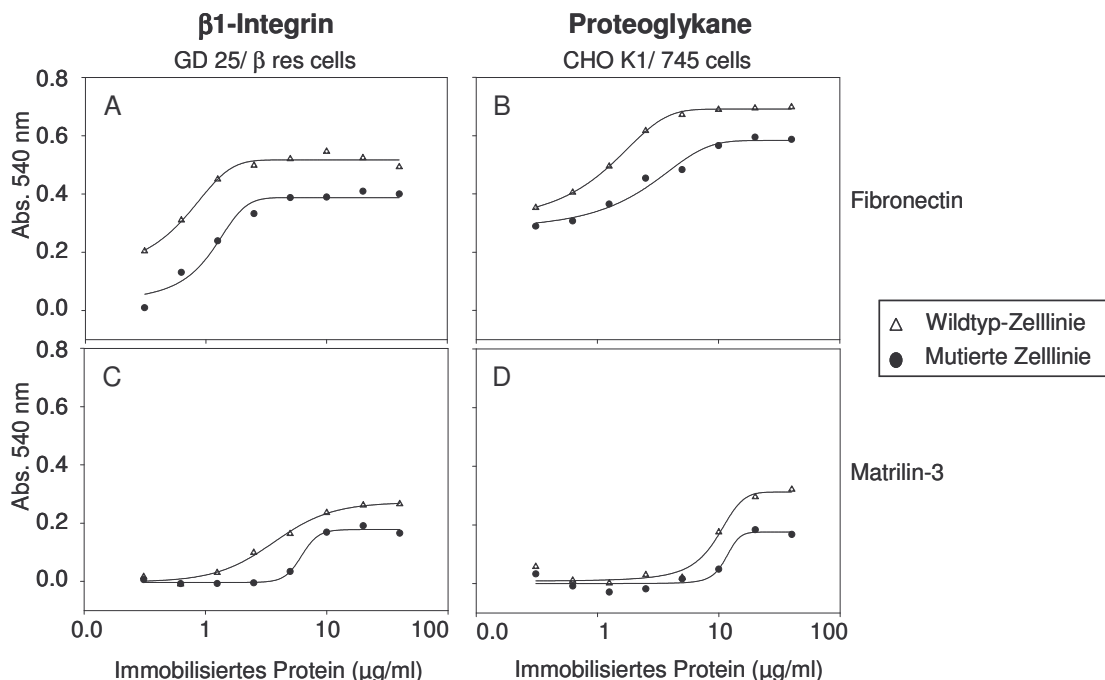


Abb. 3.28: Zellanhaftungsversuche von Glykosaminoglykan und β 1-Integrin defizienten Zellen auf Matrilin-3. Auf der x-Achse sind die für die Immobilisierung des frisch gereinigten Matrilin-3 verwendeten Konzentrationen (0,31, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 μ g/ml). Nach der Inkubation mit den jeweiligen Zellen in serumfreiem DMEM wurden die Bindungsansätze durch Färbung und Bestimmung der Absorption analysiert. Alle Messungen waren Doppelbestimmungen. Abs., Absorption.

Sowohl die murinen β 1-Integrin exprimierenden als auch die β 1-Integrin defizienten GD25 Fibroblasten banden an das immobilisierte Matrilin-3 in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 3.28 C), wenn auch sehr viel schwächer als an immobilisiertes Fibronectin (Abb. 3.28 A). Bei Immobilisierungskonzentrationen ab 10 μ g/ml war die Bindung der GD25-Zellen an Matrilin-3 gesättigt und erreichte dabei ca. 60-70 % des Bindungssignals das die β 1-Integrin exprimierenden Zellen erzielten. Dies deutete auf eine eher untergeordnete Rolle der β 1-Integrine bei der Vermittlung von Zellanhaftung an Matrilinen hin. Die Zellanhaftung war etwas stärker reduziert bei den Glykosaminoglykan defizienten CHO-745-Zellen im Vergleich mit den wildtypischen CHO-K1-Zellen (Abb. 3.28 D). Hier erreichten die Glykosaminoglykan-defizienten Zellen nur etwa 50-60 % des Bindungssignals von den Wildtyp-CHO-Zellen. Auch in diesem Teilversuch war die Bindung der Zellen an immobilisiertes Fibronectin wesentlich stärker als an Matrilin-3. Sowohl β 1-Integrin defiziente Zellen als auch Glykosaminoglykan defiziente Zellen zeigten auch auf Fibronectin schwächere Bindungen als ihre wildtypischen Homologen (Abb. 3.28 B).

In einem letzten Schritt sollte die Ausbildung von fokalen Kontakten (*focal adhesions*) in β 1-Integrin und Glykosaminoglykan defizienten Zelllinien nach Bindung an Matrilin-3 untersucht werden. Fokale Kontakte entstehen bei klassischer Integrin-vermittelter Zellanhaftung (Singer *et al.*, 1987; Wozniak *et al.*, 2004). Für die dazu durchgeführten Zellanhaftungsversuche erfolgte die Immobilisierung von Matrilin-3 und Fibronectin als Kontrolle bei 20 μ g/ml. Nach der Inkubation haftende Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Fokale Kontakte konnten dann mit spezifisch gegen Vinculin gerichteten, monoklonalen Maus-Antikörpern (5-10 μ l/ml, Sigma) detektiert werden (Abb. 3.29). Die Visualisierung des Vinculins erfolgte mit einem anti-Maus-Cy3-konjugierten Antikörper, die des Cytoskeletts mittels der Markierung der Actinfasern mit FITC-konjugiertem Phalloidin.

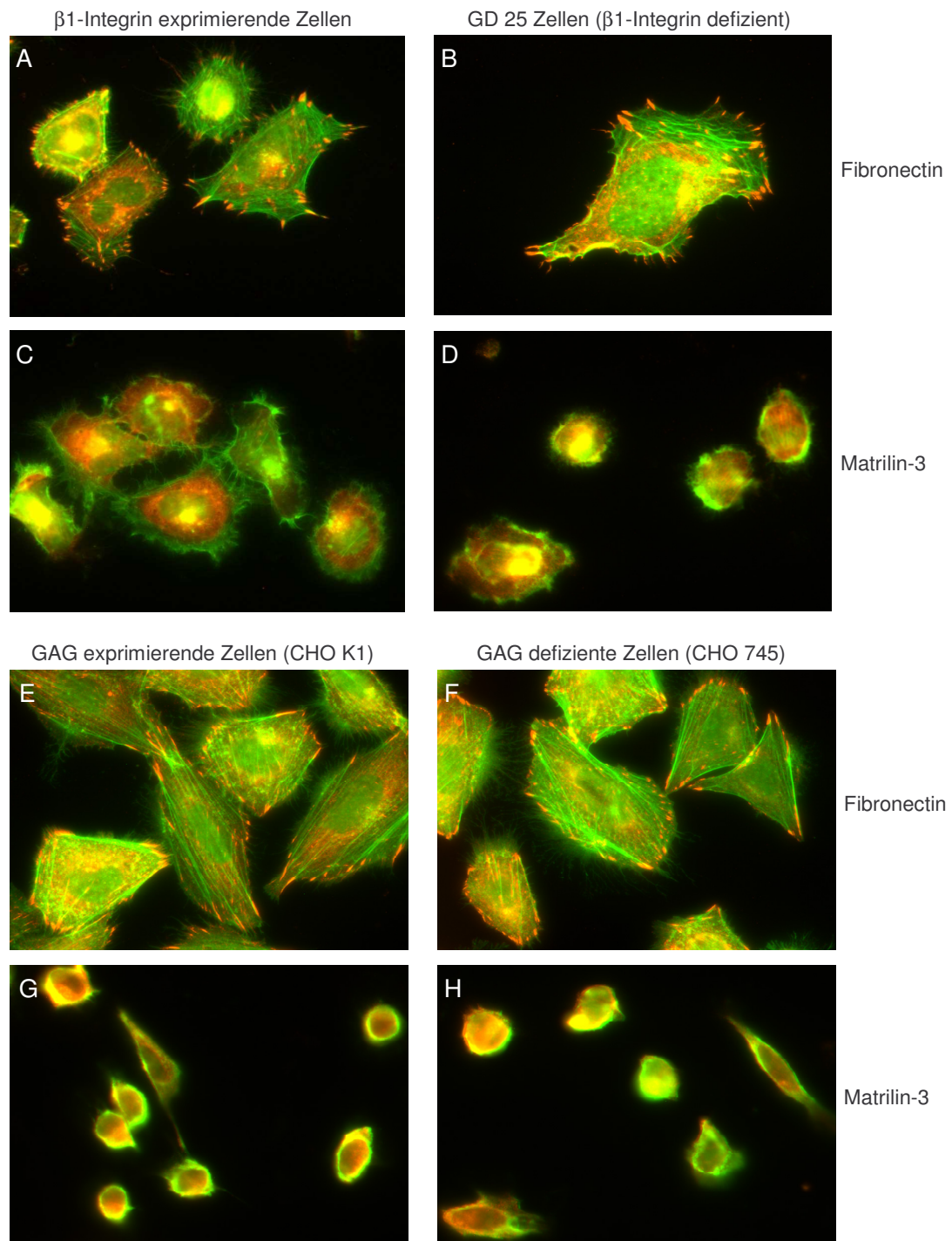


Abb. 3.29: Immunofluoreszenzfärbung von Vinculin und Phalloidin-Färbung von F-Actin in $\beta 1$ -Integrin- und Glykosaminoglykan-Synthese defizienten Zellen. $\beta 1$ -Integrin exprimierende GD25-Zellen (A und C) bzw. $\beta 1$ -Integrin defiziente GD25-Zellen (B und D) und Glykosaminoglykan exprimierende CHO K1-Zellen (E und G) bzw. Glykosaminoglykan defiziente CHO 745-Zellen (F und H) wurden auf Matrilin-3- und Fibronectin-gekoppelten (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Objektträgern kultiviert. Zur Visualisierung der fokalen Kontakte bzw. des Actin-Skeletts wurden die fixierten Zellen entweder mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Vinculin gefolgt von einem Cy3TM-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt (rot) oder mit FITC-markiertem Phalloidin gefärbt (grün).

Immunohistochemisch konnte der vollständige Verlust von fokalen Kontakten sowohl bei GD25 β 1-Integrin defizienten als auch exprimierenden Zellen gezeigt werden, wenn Matrilin-3 an Stelle von Fibronectin als Adhäsionssubstrat eingesetzt wurde (Abb. 3.29 A-D). Die auf Fibronectin haftenden Zellen (sowohl GD25 β 1-Integrin defiziente als auch β 1-Integrin exprimierende Zellen) wiesen klar strukturierte Netzwerke von Actin-Fasern und eine große Anzahl klar definierter fokaler Kontakte auf (Abb. 3.29 A und B). Im Gegensatz dazu waren die Zellen auf Matrilin-3 hauptsächlich von runder, weniger definierter Form und von geringerer Größe (Abb. 3.29 C und D). Im direkten Vergleich der auf Matrilin-3 haftenden β 1-Integrin defizienten und β 1-Integrin exprimierenden Zellen fielen dennoch Unterschiede auf: demnach zeigten die β 1-rekonstituierten Zellen ein etwas besser aufgebautes Zytoskelett und sichtbare Actin-Fasern, für einige der Zellen konnte auch die Fähigkeit, sich auszubreiten beobachtet werden (Abb. 3.29 C+D). Die Ergebnisse der Versuche, die mit den Glykosaminoglykan defizienten bzw. Wildtyp CHO-Zellen durchgeführt wurden, ähnelten denen der mit GD25-Zellen durchgeführten Versuche. Auf Fibronectin sind sowohl die wildtypischen als auch die Glykosaminoglykan defizienten CHO-Zellen in der Lage zu binden, sowie komplexe Actinfaser-Netzwerke und fokale Kontakte auszubilden (Abb. 3.29 E+F); zwischen beiden Zelltypen ist kein Unterschied zu sehen. Auf immobilisiertem Matrilin-3 hingegen können beide Zelltypen zwar binden, sind aber beide nicht in der Lage, fokale Kontakte auszubilden oder sich auszudehnen, sie erscheinen nur als kleine, runde Zellkörper ohne definiertes Cytoskelett oder Actinfaser-Netzwerk (Abb. 3.29 G+H).

4 Diskussion

Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Matriline eine Rolle als Adapterproteine in der extrazellulären Matrix spielen. Matrilin-1 liegt in der Matrix gebunden an Aggrecan (Hauser *et al.*, 1996) vor und Matriline wurden zusammen mit Biglycan und Decorin in Komplexen identifiziert, die wiederum Kollagen VI Mikrofibrillen mit Kollagen II und Aggrecan verbinden (Wiberg *et al.*, 2003). Für Matrilin-2 wurden Bindungen an Kollagen I und IV, Fibrillin und Fibronectin gezeigt (Piecha *et al.*, 2002), für Matrilin-3 eine Bindung an Kollagen IX (Budde *et al.*, 2005) und sowohl für Matrilin-3 als auch Matrilin-4 eine Bindung an Fibronectin und die Kollagene I – V (Nitsche, Dissertation, 2001). In dieser Arbeit wurde versucht, weitere Bindungspartner zu identifizieren und die Wechselwirkungen näher zu charakterisieren.

4.1 Identifizierung von Matrilin-Bindungspartnern

In ELISA-ähnlichen Bindungstests zeigten Matrilin-1, -3 und -4 Bindungen an die Proteoglykane Decorin und Biglycan (Abb. 3.3), ebenso konnte eine Wechselwirkung von Aggrecan mit Matrilin-4 gezeigt werden. Die im Festphasenversuch teilweise sehr geringen Bindungssignale der Matriline an Aggrecan und Biglycan sind vermutlich auf deren hohe Glykosylierungen zurückzuführen, die eine effiziente Immobilisierung auf den ELISA-Platten stark beeinträchtigen könnten; das weniger stark glykosylierte Decorin kann wahrscheinlich wesentlich besser immobilisiert werden. Die Bindung zwischen Matrilinen und Proteoglykanen erfolgt vermutlich an den Proteoglykan-Kernproteinen, denn mit Oberflächen Plasma Resonanz- (SPR-) Versuchen konnte gezeigt werden, dass weder Matrilin-3 noch -4 die von Decorin, Biglycan und Aggrecan getragenen Chondroitinsulfatketten binden (Abb. 3.26 C und 3.27 C). Die Titration der Wechselwirkung zwischen Matrilin-4 und Decorin im ELISA-ähnlichen Versuch ergab einen apparenten K_D von 10 nM (Abb. 3.5) und weist damit auf eine relativ starke Bindung zwischen diesen beiden Proteinen hin. Die zuvor mittels EM gezeigte Wechselwirkung (Wiberg *et al.*, 2003) konnte so biochemisch näher bestimmt werden. Darüber hinaus werden in der vorliegenden Arbeit erstmalig Bindungen von Matrilin-1, -3 und -4 an die Kollagene XI, XII, XIV und XXII gezeigt (Abb. 3.3), bereits früher wurden Wechselwirkungen von Matrilin-1, -3 und -4 mit den beiden fibrillären Kollagenen I und II (Wiberg, *et al.*, 2003; Piecha *et al.*, 2002; Nitsche, Dissertation, 2001, Winterbottom *et al.*, 1992) beschrieben. Die Kollagene XII, XIV und XXII gehören

zur Familie der fibrillenassoziierten FACIT-Kollagene (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*) (van der Rest *et al.*, 1991; Watt *et al.*, 1992; Yamagata *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 2004). FACIT-Kollagene kommen häufig in kollagenen Suprastrukturen vor und können z.B. mit Kollagen I, II oder XI kopolymerisieren und Interaktionen zwischen Fibrillen und umgebenden Proteinen vermitteln (Oxford *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1995; Blaschke *et al.*, 2000; Tuckwell, 2002). Eine Bindung des FACIT-Kollagens IX (Shaw *et al.*, 1991) an Matrilin-3 wurde kürzlich gezeigt (Budde *et al.*, 2005). Die Bindung von Matrilinen an FACIT-Kollagene könnte auf eine Rolle der Matriline bei der Vernetzung von fibrillären und nicht-fibrillären Komponenten der extrazellulären Matrix hinweisen. Möglicherweise sind die Matriline auch an der Kollagenfibrillogenese beteiligt. Diese Annahme wird durch die Bindung von Matrilin-3 und -4 an Kollagen III unterstützt (Nitsche, Dissertation, 2001), einem fibrillären Kollagen, das wichtig für die Kollagen I Fibrillogenese ist (Moriyama *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte die Sequenz eines Matrilin-3 bindenden Kollagen III-Peptids (GNOGSDGLOGRDGSOGGK-GDRGENGSO) identifiziert werden (Abb. 3.7). *In silico*-Analysen ergaben, dass diese Peptidsequenz nur in Kollagen III vorkommt (nicht gezeigt), was evtl. die Spezifität dieses Bindungsmotivs erklärt.

Außer den genannten Proteoglykanen wurde auch eine Anzahl weiterer, nicht-kollagener Proteine auf ihre Bindung an Matrilin-1, -3 und -4 untersucht. Neben der bereits bekannten Bindung an Fibronectin (Nitsche, Dissertation, 2001) wurde eine Bindung des SLRP- (*small leucine rich protein*) Proteins PRELP (*proline- and arginine-rich end leucine-rich repeat protein*) an Matrilin-4 (und Matrilin-3) hier erstmals gezeigt. PRELP bindet an Kollagen I und II und interagiert außerdem mittels Heparansulfat-Proteoglykanen mit Fibroblasten und ist auf diese Weise an der Bildung von Zell-Matrix- und Matrix-Basallamina-Kontakten beteiligt (Bengtsson *et al.*, 2002, 2000). Eine physiologische Relevanz von Fibronectin und PRELP als Bindungspartner der Matriline könnte darin liegen, dass diese Proteine gemeinsam an der Bildung von Kollagen-enthaltenden und Kollagen-unabhängigen Netzwerken zwischen Zellen beteiligt sind, wie sie bereits früher für Matriline beschrieben wurden (Klatt *et al.*, 2000; Piecha *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1995). Mit Laminin wurde ein wichtiges Basalmembranprotein als möglicher Matrilin-3-Bindungspartner identifiziert; die von Matrilin-3 abweichende Gewebeverteilung stellt jedoch die physiologische Relevanz dieser Bindung in Frage.

Besonders auffallend ist die erstmalig gezeigte Bindung von Matrilinen an das nicht-kollagene Glykoprotein *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) (Abb. 3.3). COMP (auch: Thrombospondin-5, TSP-5) ist ein in der Knorpelmatrix stark exprimiertes Mitglied der Thrombospondin-Familie. Die Tatsache, dass COMP sowohl für Matrilin-1, als auch für Matrilin-3 und -4, das mit Abstand jeweils höchste Bindungssignal zeigt, weist auf eine Konservierung der COMP-Bindung unter den Matrilinen hin. Die physiologische Signifikanz der Matrilin-COMP Wechselwirkung wird durch die unter nativen Bedingungen und in Anwesenheit von CaCl_2 gelungene Ko-Elution von Matrilin-1 und COMP aus Knorpelextrakten unterstrichen (Abb. 3.4). Die im ELISA-ähnlichen Bindungsversuch näher untersuchte Wechselwirkung zwischen Matrilin-4 und COMP erwies sich als konzentrationsabhängig und sättigbar (Abb. 3.5). Der ermittelte K_d von 1 nM zeigte eine zehnfach höhere Affinität von Matrilin-4 zu COMP als von Matrilin-4 zu Decorin. Die Matrilin-COMP Bindung ist von besonderem Interesse, da für beide Proteine eine vermittelnde Rolle im Aufbau und in der Struktur der extrazellulären Matrix angenommen wird. Wie die Matriline, assoziiert auch COMP in kationenabhängiger Weise mit Kollagen I, II und IX (Winterbottom *et al.*, 1992; Rosenberg *et al.*, 1998; Holden *et al.*, 2001; Thur *et al.*, 2001) und ebenfalls mit Fibronectin (Di Cesare *et al.*, 2002).

Die Calciumabhängigkeit der Matrilin-1 COMP-Bindung warf die Frage auf, ob neben der bekannten Fähigkeit von COMP, Ca^{2+} -Ionen zu binden (Thur *et al.*, 2001, Maddox *et al.*, 2000), auch auf Seiten der Matriline die Fähigkeit zur Bindung von zweiwertigen Kationen besteht. Diese Bindung konnte zumindest für die Matrilin-4 VWA1 Domäne durch die im CD-Spektrometer gemessene Konformationsänderung nach der Zugabe von divalenten Kationen gezeigt werden (Abb. 3.6). Die Bindung der Kationen könnte dabei an den MIDAS-Motiven innerhalb der VWA Domänen erfolgen. Deren Fähigkeit, zweiwertige Kationen zu koordinieren und damit eine wichtige Rolle bei der Interaktion von VWA Domänen mit Proteinliganden zu spielen, wurde bereits früher gezeigt (Lee *et al.*, 1995; Emsley *et al.*, 2000). Es ist allerdings unklar, ob die nach der Titration ermittelten, apparenten K_d -Werte von ca. 1 mM für Mg^{2+} und ca. 2 mM für Ca^{2+} (Abb. 3.6 C und D) tatsächlich eine Bindung der Kationen an das MIDAS-Motiv beschreiben. Die leicht erhöhte Affinität der VWA Domäne zu Mg^{2+} könnte in Übereinstimmung mit der Präferenz des MIDAS-Motivs für dieses Kation sein (Lee *et al.*, 1995). Die Zugabe von EDTA verhindert nicht nur die Bindung von Matrilin-4 an COMP, sondern auch die Bindung von Matrilin-4 an Decorin, sodass auch auf Seiten der Matriline die Kationenbindung einen Einfluß auf die Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern haben könnte.

4.2 Charakterisierung der Matrilin – COMP Bindung

Die oligomere, modulare Struktur der Matriline erlaubt polyvalente Bindungen mit anderen Matrixproteinen. Die unterschiedlichen Oligomerisierungsgrade der Matriline gehen auf eine proteolytische Prozessierung der oligomeren Vollängen-Proteine zurück (Ehlen, Dissertation, 2005; Klatt *et al.*, 2001; Klatt *et al.*, 2000; Piecha *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle bei den Interaktionen könnten die VWA Domänen spielen, gut untersuchte Proteindomänen, die z.B. in Proteinen der extrazellulären Matrix und Integrinrezeptoren weit verbreitet sind (Whittaker & Hynes, 2002) und die in der Lage sind, Wechselwirkungen mit vielen, strukturell unterschiedlichen Proteinen einzugehen (Colombatti und Bonaldo, 1991).

Charakterisierung der bindenden Untereinheiten von Matrilin-4 und COMP

Die ELISA-ähnlichen Wechselwirkungsversuche mit Matrilin-4 und COMP Proteinen (Abb. 3.11 und 3.12) zeigen stets die stärksten Bindungssignale, wenn die vollständig oligomerisierten Volllänge-Proteine beteiligt sind. Vollängen COMP bindet in hohem Ausmass an Vollängen Matrilin-4, das Signal der Bindung an das Matrilin-4 Monomer ohne die oligomerisierende *coiled-coil Domäne* ist jedoch weniger als halb so hoch. Dabei ist es unerheblich, ob die Matrilin-4 Proteine immobilisiert oder in der löslichen Phase eingesetzt werden (Abb. 3.11 A, B und D). Die hochaffine Bindung zwischen den Volllänge-Proteinen von Matrilin-4 und COMP (Abb. 3.5) konnte in den Festphasenversuchen mit den verkürzten Matrilin-Fragmenten in Lösung nicht gezeigt werden (Abb. 3.11 A und B). Die isolierten Matrilin-4 VWA Domänen zeigen aber eine schwache Restaffinität zu Vollängen COMP wenn sie immobilisiert werden, wobei die COMP-Bindung an die VWA2 Domäne etwas stärker erscheint als die an die VWA1 Domäne (Abb. 3.11 C).

Diese Beobachtungen konnten mit den sensitiveren SPR-Studien eindeutig bestätigt werden. Beide Matrilin-4 VWA Domänen zeigen signifikante und konzentrationsabhängige Bindungen an Vollängen COMP (Abb. 3.14 C und F) und in beiden Fällen zeigen die Bindungskurven die charakteristischen, hyperbolen Formen der SPR mit den erkennbaren Phasen von Assoziation, Sättigung und Dissoziation. Bei identischen Konzentrationen erzeugt die injizierte VWA2 Domäne immer ein höheres Bindungssignal als die VWA1 Domäne. Da die Höhe der Signaldifferenz (*response*, Bindungssignal) von der gegenseitigen Affinität der getesteten Analyten und Liganden abhängig ist, indiziert dies eine deutlich höhere Affinität von Matrilin-4 VWA2 zu Vollängen COMP als von VWA1. Dies wird durch die Ermittlung der K_D -Werte bestätigt

(Tab. 3.4). Demnach verläuft die Bindung der VWA1 Domäne an COMP mit einem K_D von ca. 0,4 μM , die Bindung der VWA2 Domäne aber mit einem K_D von ca. 55 nM. Die Affinität der Matrilin-4 Monomere zu Volllängen COMP ist wesentlich höher als die der jeweils einzelnen VWA Domänen (Abb. 3.15 F). Dies wird einerseits durch die mathematische Ermittlung der Dissoziationskonstante gezeigt (Tab. 3.4), die einen K_D von ca. 9,6 nM ergibt (statt 0,4 μM für Matrilin-4 VWA1 und 55 nM für VWA2), andererseits aber auch durch das wesentlich höhere Bindungssignal und die sehr viel langsamere Dissoziation (Abb. 3.15 F); das Monomer ist hier so fest gebunden, dass es sich auch bei der Injektion von Hochsalzlösungen nur langsam ablöst. Das Matrilin-4 Volllängeprotein schließlich bindet so stark an das immobilisierte Volllängen COMP, dass es kaum noch Dissoziation zeigt (Abb. 3.16 C). Für diese Reaktion konnte mittels SPR kein K_D ermittelt werden, die Titration im ELISA-ähnlichen Versuch ergab aber bereits einen apparenten K_D von ca. 1 nM.

Die deutlich stärkere Bindung des Matrilin-4 Monomers an Volllängen COMP verglichen mit der Bindung der einzelnen VWA Domänen (Abb. 3.11, 3.14, 3.15), zeigt schon innerhalb des Matrilin-4 Monomers einen additiven oder kooperativen Effekt. Die Bindung der VWA2 Domäne an COMP wird dabei vielleicht von der an dasselbe COMP Protein bindenden VWA1 Domäne unterstützt. Danach stünden im trimeren Volllängenprotein nach der COMP-Bindung durch eine Matrilinuntereinheit noch zwei weitere Matrilinuntereinheiten für entweder weitere Bindungen an andere Untereinheiten desselben COMP Proteins oder für Bindungen an andere Proteine zur Verfügung. Die Matrilin-4 VWA1 Domäne selbst kann außerdem, mit geringerer Affinität, sowohl ebenfalls an COMP als auch, mit möglicherweise höherer Affinität, an ein anderes Protein der extrazellulären Matrix binden. Die beschriebene Verlangsamung der Abläufe in den Dissoziationsphasen (Vgl. Abb. 3.14 C und F, 3.15 F, 3.16 C) und die Abhängigkeit der Bindungsstärken vom Grad der Vollständigkeit der interagierenden Proteinfragmente (Abb. 3.11 – 3.16) zeigen die ansteigende Avidität der Bindung. Matrilin-4 muß für die optimale Bindung in vollständig oligomerisierter Form vorliegen, wobei die einzelnen Untereinheiten eine „Blumenstrauß“-ähnliche Struktur bilden. Die räumliche Nähe der Untereinheiten könnte dann zusätzliche additive Effekte zwischen den einzelnen VWA Domänen ermöglichen, die die starke Bindung des Volllängen Matrilin-4 an COMP bewirken.

Die Matrilin-4 EGF-ähnlichen Domänen binden an keines der COMP Fragmente (Abb. 3.15 A – C) und sind daher an der Matrilin-COMP Bindung nicht beteiligt. Ihre spezifische Funktion ist bis *dato* unbekannt. Möglicherweise haben diese Domänen in Matrilinen nur eine Funktion als Verbindungsdomänen zwischen den VWA Domänen.

Diese Vermutung wird durch das Vorkommen von Spleißvarianten beim Zebrafisch, die keine EGF Domänen enthalten (Ko *et al.*, 2005), unterstützt.

ELISA-ähnliche Festphasenversuche zeigen, dass außer dem Volllängen COMP-Protein sowohl das COMP Monomer als auch die beiden kürzeren COMP Fragmente an Volllängen Matrilin-4 binden können, wenn sie in der löslichen Phase vorliegen (Abb. 3.12). Die Bindungssignale aller drei verkürzten COMP Fragmente sind allerdings deutlich schwächer als die des Volllängen COMP. Da die Bindungen von COMP T3+TC und COMP TC sich kaum von der des COMP Monomers unterscheiden, ist es anzunehmen, dass die Bindung an Matrilin-4 von der COMP TC Domäne ausgeht.

Diese Vermutung konnte mit den SPR-Versuchen bestätigt werden. Eine Bindung von COMP TC an die immobilisierte Matrilin-4 VWA1 Domäne konnte hier zwar nicht eindeutig gezeigt werden (Abb. 3.17 D), allerdings eine Bindung an die immobilisierte VWA2 Domäne (Abb. 3.17 E). Die Affinität der Bindung ist sehr gering, das Bindungssignal zeigt aber den SPR-typischen, hyperbolen Kurvenverlauf mit eindeutigen Phasen der Assoziation und Dissoziation. Damit sind erstmals die kleinstmöglichen Fragmente von COMP und Matrilin-4 identifiziert, die noch miteinander interagieren können, ein K_d -Wert konnte aber für diese schwache Wechselwirkung nicht ermittelt werden. Wie erwartet zeigt injiziertes COMP TC auch eine Bindung an das immobilisierte Matrilin-4 fl (Abb. 3.17 F), allerdings mit einem extrem schwachen aber dennoch konzentrationsabhängigen Bindungssignal. Dies könnte mit der generell schlechten Eignung von sowohl Matrilin-4 als auch COMP Volllängeproteinen für SPR-Versuche zusammenhängen, die während der durchgeführten Arbeiten häufig beobachtet wurde und vielleicht auf der komplexen, sperrigen Struktur der vollständig oligomerisierten Proteine beruht.

Das nächstgrößere COMP T3+TC Fragment zeigte in den SPR-Versuchen ebenfalls keine Bindung an immobilisiertes Matrilin-4 VWA1 (Abb. 3.18 A) aber, wie COMP TC, eine eindeutige und konzentrationsabhängige Bindung mit hoher Signaldifferenz an VWA2 (Abb. 3.18 B). Diese Beobachtung bestätigt die im Vergleich zu Matrilin-4 VWA1 deutlich höhere Affinität von Matrilin-4 VWA2 zu COMP (Abb. 3.15). Die Wechselwirkung zwischen VWA2 und COMP T3+TC ist mit einem ermittelten K_d von ca. 3 μM , wie erwartet, verhältnismäßig schwach (Tab. 3.4). Das hohe Bindungssignal ist hier auf die sehr hohen Analytenkonzentrationen über dem dicht immobilisierten Chip zurückzuführen.

Das COMP T3+TC Fragment kann auch an immobilisiertes Volllängen Matrilin-4 binden (Abb. 3.18 C). Diese Bindung zeigte eine höhere Signaldifferenz als die des

kleineren COMP TC Fragments. Die Bindung ist konzentrationsabhängig und zeigt die charakteristischen Phasen von Assoziation und Dissoziation, erreicht aber eine wesentlich geringere Signaldifferenz, als die Bindung von COMP T3+TC an Matrilin-4 VWA2 (Abb. 3.18 B). Der ermittelte K_D von ca. 0,23 μM für diese Bindung (Tab.3.4) zeigt aber, wie erwartet, eine höhere Affinität des COMP T3+TC Proteins an Matrilin-4 fl als an die VWA2 Domäne (3 μM). Dieser Effekt könnte damit zu erklären sein, dass Matrilin-4 vermutlich in der Lage sind, an sich selbst zu binden. Wird Volllänge Matrilin-4 immobilisiert, könnte es sein, dass auf Grund der vollständig oligomerisierten Form die VWA Domänen einzelner Volllänge-Proteine untereinander mit hoher Affinität wechselwirken und nur noch ein begrenztes Angebot an Bindungsstellen für COMP T3+TC bieten. So könnte die beobachtete Bindung von COMP geringer ausfallen, als erwartet.

Das Bindungsverhalten der COMP Fragmente zeigt eindeutig eine Abhängigkeit von der Domänenzusammensetzung. Das TC Fragment alleine kann zwar Matrilin-4 VWA2 binden, erlangt aber erst zusammen mit der T3 Domäne eine wesentlich höhere Affinität. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da im nativen, dem COMP homologen Thrombospondin-1 Protein die TC Domäne zu den T3 Domänen zurückgefaltet ist und dies wahrscheinlich auch für COMP gilt (Kvansakul *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2006). Dabei steht die TC Domäne mit den T3 Domänen sechs, sieben und acht in sehr engem Kontakt und bildet eine Disulfidbrücke zwischen den T3 und der TC Domäne aus. Wahrscheinlich besitzt COMP TC eine Matrilin-4 VWA2 Bindestelle, die aber erst durch die Komplexierung der COMP TC und T3 Domänen ihre volle Affinität für Matrilin-4 entfalten kann. Dies könnte auch erklären, warum die D469 Δ -Mutation in der siebten T3 Domäne von COMP die Bindungsfähigkeit des mutierten COMP zu Matrilin-4 leicht senkt (Abb. 3.12 B). Durch die Faltungseinheit des COMP T3-TC Fragments kann eine Mutation in einer der T3 Domänen die gesamte Struktur des COMP T3+TC Fragments beeinflussen. Dies würde den negativen Einfluß dieser Mutation auf die Bindung an Matrilin-4 erklären, allerdings bleibt dieser Effekt gering.

Die COMP TSP Typ-III Domänen alleine binden nicht an immobilisierte Matrilin-4 VWA1, VWA2 oder Volllänge Proteine und scheiden als direkt an der Bindung zu Matrilin-4 beteiligte COMP Fragmente aus (Abb. 3.17 A – C).

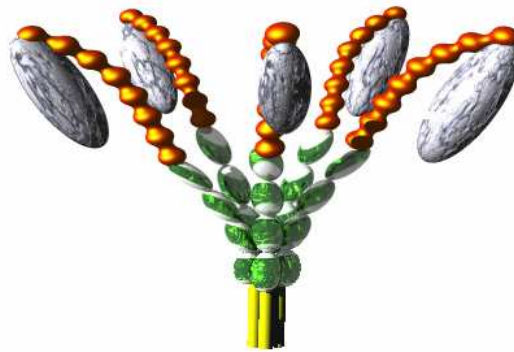


Abb. 4.1: Modellhafte Darstellung eines pentameren COMP Proteins.

Wie auf Seiten von Matrilin-4 liegt auch auf Seiten von COMP eine von Multivalenz beeinflusste Bindung von Matrilin-4 und COMP vor. Während die Bindung bei Matrilin-4 von der VWA2 Domäne ausgeht, geht die Bindung im vollständig oligomerisierten COMP von dem fünffach vorliegenden T3-TC Fragment aus, wobei die eigentliche Bindungsstelle auf dem TC Fragment liegt. Für eine endgültige Aufklärung der bindenden Proteinoberflächen wäre die Ermittlung der Kristallstruktur beider einander gebundener Proteinfragmente wünschenswert.

Die Multivalenz der Matrilin-COMP Bindung ist von besonderem Interesse, da sowohl Matrilin als auch COMP *in vivo* einer proteolytischen Prozessierung unterworfen sind (Neidhart *et al.*, 1997; Klatt *et al.*, 2001; Ehlen, Dissertation, 2005). Diese Prozessierung führt zum Verlust einzelner Arme der oligomeren Moleküle. Im Fall von murinem Matrilin-4 gibt es außerdem alternative Spleißvarianten denen die VWA1 Domäne fehlt (Wagener *et al.*, 1998). Mittels gesteuerter, limitierter Proteolyse und alternativer Spleißvarianten könnte möglicherweise die Avidität exprimierter Matrilinvarianten zu ihren Bindungspartnern reguliert werden. Auch Prozesse des Um- und Wiederaufbaus der Matrix (engl.: *remodelling*, z.B. bei arthritischen Erkrankungen) könnten unter Beteiligung der Matrilin stattfinden (Pullig *et al.*, 2002). Dabei könnte eine gesteuerte Regulierung der Bindung von Matrilinen an ihre Bindungspartner relevant sein.

Weitere Aspekte des heterogenen Erscheinungsbildes der Matrilin sind die gezeigte Bildung von Matrilin-1/-3 Heterooligomeren (Klatt *et al.*, 2000) und die theoretische Möglichkeit zur Bildung weiterer Heterooligomere (Matrilin-1/2, -1/4, -1/2/4 und -2/4, Frank *et al.*, 2002). Auf Grund der unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen Matrilin zu ihren Bindungspartnern könnte die gesteuerte Heterooligomerisierung ebenfalls der Regulation von Matrilin-Bindungsstärken dienen. Alternativ ist auch eine Erweiterung der adaptiven Möglichkeiten der Matrilin durch die Bildung von

Heterooligomeren denkbar. Während z.B. die homooligomeren Formen von Matrilin-1 und -3 entweder gute Bindungen an Decorin oder Laminin zeigen, könnte ein Heterooligomer aus Matrilin-1 und -3 sowohl Decorin als auch Laminin binden.

Matrilin-3 – COMP Wechselwirkungen

Ähnlich wie bei Matrilin-4 (Abb. 3.14 C) zeigte auch bei Matrilin-3 die VWA1 Domäne alleine nur ein sehr geringes Bindungssignal an COMP (Abb. 3.19 B), was vielleicht auf eine generell geringere Affinität der VWA1 Domänen für COMP hinweist. Volllängen Matrilin-3 hingegen bindet mit hoher Signaldifferenz an das immobilisierte COMP (Abb. 3.19 A). Dies zeigt, dass auch ein Matrilin mit nur einer einzelnen VWA1 Domäne, ohne die Unterstützung durch die VWA2 Domäne wie bei Matrilin-4, eine Bindung zu COMP eingehen kann. Dass die Bindung zwischen Volllängen Matrilin-3 und COMP trotz der geringen COMP-Affinität der VWA1 Domäne relativ stark ausfällt, wird vermutlich durch die hohe Valenz des vollständig oligomerisierten, tetrameren Matrilin-3 ermöglicht. Die Anpassung der Modellkurven an die gemessenen Daten war weder für Volllängen Matrilin-3 noch für Matrilin-3 VWA1 erfolgreich, daher konnte kein K_D für diese Bindungen ermittelt werden. Dies ist vermutlich auf mehr oder weniger unspezifische Selbstwechselwirkungen von Matrilin-3 zurückzuführen, die die Kurvenverläufe von den theoretischen Kurvenverläufen der Modelle zu weit abweichen lassen, um realistische Konstanten berechnen zu können.

Matrilin – Selbstwechselwirkungen

Volllängen Matrilin-3 bindet mit hohen, konzentrationsabhängigen Bindungssignalen sowohl an sich selbst als auch an Volllängen Matrilin-4 (Abb. 3.20 A und B). Eine starke Selbstwechselwirkung, wie für Matrilin-3, wurde auch schon für Matrilin-2 gezeigt (Piecha *et al.*, 2002) und könnte eine Grundlage für die Bildung matrilinenthaltender, kollagenunabhängiger Netzwerke sein (Winterbottom *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995, 1999; Klatt *et al.*, 2000, 2001). Die Tatsache, dass Matrilin an sich selbst binden können, muß nicht unbedingt die Bildung reiner Matrilinnetzwerke ermöglichen, sondern kann auch zur Erweiterung der adaptiven Möglichkeiten dienen. Die Bindung an sich selbst kann sowohl „verlängernd“, als auch stabilisierend auf das gesamte Netzwerk wirken. Die physiologische Funktion von matrilinenthaltenden Netzwerken bleibt zu untersuchen. Die Zusammensetzung der perizellulären Netzwerke der extrazellulären Matrix wurde bisher nicht untersucht, daher ist nicht bekannt, welche anderen Matrixproteine außer den Matrilinen in diesen Bereichen integriert sind. Es stellt sich jedoch die Frage, wie ein gezielter Einbau der Matrilin in der Matrix bei derartig stark ausgeprägten Selbstwechselwirkungen reguliert werden

kann, zumal davon auszugehen ist, dass die proteolytische Prozessierung bereits intrazellulär stattfindet (Ehlen, Dissertation, 2005), also nach der Sezernierung keine Regulierung mehr erfolgen kann.

Eine Selbstwechselwirkung der Analyten und/ oder Liganden ist für jede Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten ein beträchtliches Problem und war auch hier der Grund für zahlreiche unspezifische Signale in den SPR-Versuchen. Wie in diesen Versuchen zu sehen (Abb. 3.20), bindet immer mehr Vollängen Matrilin-3 aus der Lösung an bereits gebundenes Matrilin-3 auf der mit COMP präparierten Chipoberfläche und steigert so die gemessene Signaldifferenz (Abb. 3.20). In manchen Fällen ist dies gegen Ende der Injektionen an dem plötzlichen, linearen Ansteigen der Resonanzdifferenz zu erkennen.

4.2.1 Bewertung der kinetischen Analysen der Matrilin-4 – COMP Bindung

Um die gezeigten Bindungen zwischen Matrilin-4 und COMP quantitativ zu bewerten, wurden die Dissoziationskonstanten der gemessenen Bindungen berechnet. Für die Ermittlung dieser Konstanten wurden die modellhaften Kurven mathematischer Bindungsmodelle mit der Biacore™ Evaluationssoftware 3.0 über die gemessenen Kurven gelegt und angepasst. Liegt der statistische Durchschnitt der Abweichungen aller Meßpunkte (χ^2 , X^2) der realen Kurve von der bestmöglich angepassten Modellkurve innerhalb eines bestimmten Rahmens (<2% von R_{max}), so können die von dem Programm berechneten Werte als realistisch betrachtet werden. Bei der Evaluierung der Messungen der vorliegenden Arbeit wurde der Grenzwert oft überschritten, der X^2 -Wert war oft deutlich zu hoch und indizierte damit eine nur ungenügend berechnete Anpassung. Dies ist durch die starken Tendenzen aller eingesetzten Protein-Proben zu unspezifischer Aggregation zu erklären, außerdem lagen die Vollängenproteine als inhomogene Proteingemische aus den unterschiedlichen Oligomeren vor. Die qualitative Aussage einer gemessenen Bindung wird aber deshalb nicht in Frage gestellt, die störenden Einflüsse sind in aller Regel im Kurvenverlauf zu erkennen; die Quantifizierung wird aber sehr wohl erschwert. Eine perfekte Messung (Abb. 3.22, auch 3.15 F) der Bindung von Matrilin-4 VWA2 an immobilisiertes Vollängen COMP zeigt eine von störenden Einflüssen völlig freie Assoziation und Dissoziation, eine Sättigung, Konzentrationsabhängigkeit und keinerlei Selbstwechselwirkungen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die injizierten VWA Domänen auf immobilisiertes Vollängen COMP treffen und von diesem mit hoher Affinität gebunden werden. Alleine sind sie auf Grund des fehlenden Restmoleküls aber nicht in der Lage, störende Selbstwechselwirkungen einzugehen.

Ein weiterer Grund für die Schwierigkeiten, die gemessenen Bindungen zu quantifizieren, war das verwendete mathematische Bindungsmodell. Von den Bindungsmodellen für die Protein-Protein Wechselwirkungen wie sie hier durchgeführt wurden, kam von den durch die Biacore-Evaluationssoftware bereitgestellten Modellen nur das 1:1-Langmuir-Bindungsmodell in Frage. Allerdings wurden in den wenigsten Fällen auch tatsächlich 1:1-Bindungen gemessen, weil Vollängenproteine mit mehreren Untereinheiten eingesetzt wurden. Im Falle von immobilisierten Vollängen Matrillin-4- oder COMP Proteinen liegen theoretisch die an den Bindungen beteiligten Domänen frei in den Raum ragend, quasi „einzeln“ vor, daher konnte in diesen Fällen das 1:1-Langmuir-Bindungsmodell genutzt werden, wenn monomere Proteinfragmente injiziert wurden. In allen anderen Versuchen lagen *de facto* wahrscheinlich nicht immer reine 1:1-Interaktionen vor. Dies erklärt die Abweichungen der angepassten Modelle von den gemessenen Kurven, mindert aber nicht die Aussagen der Experimente hinsichtlich Spezifität und beobachteter Affinität.

Innerhalb einer gewissen Bandbreite ließ sich bei der Anpassung der Modelle durch eine Erweiterung einiger Parameter der χ^2 -Wert signifikant senken, so wurde z.B. in einigen Fällen die Massen-Transport-Limitierung (*mass transfer*) berücksichtigt. Das eigentliche Experiment findet in einer sehr kleinen Flußzelle statt, in der eine laminare, also völlig turbulenzfreie Strömung herrscht, der Puffer strömt in Schichten, die sich nicht vermischen und die Flußgeschwindigkeit wird geringer, je weiter man sich von Zentrum der Kavität wegbewegt. Am äußeren Rand der Flußzelle, also genau über dem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Protein (Abb. 4.2), findet nur noch Diffusion statt.

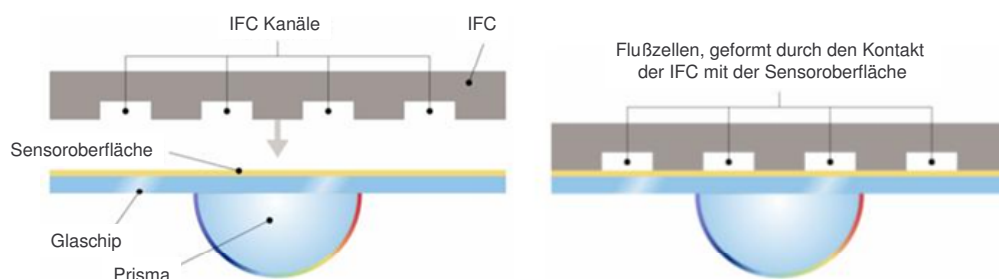


Abb. 4.2: Querschnitt durch die interne Flußzelleneinheit (IFC) des Biacore 2000. Die Flußzellen werden geformt, wenn die Flußzelleneinheit mit den IFC Kanälen auf die Sensorchipoberfläche gepresst wird. Das Protein ist auf der goldbeschichteten Glasoberfläche immobilisiert. Abbildung von www.biacore.de.

Ist die Bindung so schnell, dass das gesamte in Lösung befindliche Analytenprotein vollständig gebunden wird, bevor neues nachdiffundieren kann, so weicht die gemessene Resonanz von dem theoretischen (im mathematischen Modell vorgegebenen) Verlauf ab. In diesem Fall spricht man von Massen-Transport-Limitierung. Legt man die beobachteten, vermutlich hohen Affinitäten der Matrilin-COMP-Bindung zu Grunde, so ist es wahrscheinlich, dass dieses Phänomen bei den durchgeführten Messungen vorlag. Um bessere mathematische Anpassungen an Kurven mit derartigen Abweichungen zu erlauben, ist es möglich, die für die Anpassung benutzten Modelle weniger stringent zu halten und Parametererweiterungen in die Anpassung einzubeziehen (Tab. 3.4).

4.2.2 Vergleich der Bindungsprofile kollagener und nicht-kollagener Matrilin-Bindungspartner

Während sich die Bindungsprofile der Matrilin bei den getesteten Kollagenen ähneln, treten bei den nicht-kollagenen Proteinen (mit Ausnahme von COMP) deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Matrilinen zu Tage (Abb. 3.3). Das am weitesten verbreitete Matrilin-4 ist der universellste Bindungspartner des getesteten Panels von Matrixproteinen und zeigte im Vergleich zu den anderen Matrilinen mit allen untersuchten Bindungspartnern jeweils das höchste Bindungssignal. Matrilin-1 und -3 diskriminieren deutlich stärker zwischen den potentiellen Liganden, für beide tritt im ELISA-ähnlichen Versuch jeweils nur eines der nicht-kollagenen Proteine als stärkster Bindungspartner (nach COMP) hervor (Matrilin-1: Decorin, Matrilin-3: Laminin). Auch bei Berücksichtigung der vermutlich niedrigeren Kopplungseffizienz von Biglycan und Aggrecan, beschreibt dies eine ausgeprägtere Liganden-Spezifität von Matrilin-1 und -3 als von Matrilin-4. Dies und die generell höher scheinende Affinität von Matrilin-4 zu seinen Bindungspartnern könnten auf eine universellere Funktion dieses Matrilins als Adapterprotein hinweisen. Diese Hypothese wird weiter unterstützt durch die im Gegensatz zu Matrilin-1 und -3 wesentlich breitere Gewebeverteilung des Matrilin-4.

Die starken Überlappungen beim Bindungsverhalten der Matrilin können das Fehlen von Phänotypen bei Matrilin Knockout Mäusen erklären. Weder bei Matrilin-1, -2, -3 oder -4 Knockout Mäusen noch bei Matrilin-1/ -3 Doppelknockout und Matrilin-1/ -2/ -3 Tripelknockout Mäusen wurde ein offensichtlicher Phänotyp beobachtet (Aszódi *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Mátés *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004; A. Aszódi, pers. Mitteilung). Da die Matrilin ähnliche Bindungspartner aufweisen, muß vermutet werden,

dass der Ausfall eines oder mehrerer Matriline durch andere Matriline kompensiert wird. Das breite Repertoire von Bindungspartnern könnte Matrilin-4 eine besondere Rolle zuweisen, so dass erst bei einem mehrfachen Knockout unter Beteiligung von Matrilin-4 ein offensichtlicher Phänotyp zu erwarten ist.

4.2.3 Rolle der Matrilin-3 – COMP Wechselwirkung bei der Entstehung von MED

Mutationen in den Genen von Matrilin-3, COMP und Kollagen IX sind alle mit der milden Form einer Chondrodysplasie assoziiert, der multiplen epiphysären Dysplasie (MED). Matrilin-3 ist bisher das einzige Matrilin, für das eine Assoziation mit MED beschrieben ist. Mutationen im Matrilin-3 Gen führen zu einer Retention von Matrilin-3 im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) (Otten *et al.*, 2005, Cotteril *et al.*, 2005). Nur für COMP sind Mutationen beschrieben (z.B. D469 Δ), die an der Entstehung der stärker ausgeprägten Pseudoachondrodysplasie (PSACH) beteiligt sind (Briggs *et al.*, 2002). Auch die D469 Δ -Mutation bewirkt eine Blockade der Sezernierung des mutierten Proteins. Sowohl in Zellen von PSACH-Patienten, die die D469 Δ COMP Mutation tragen, als auch in Zellkulturmodellen wurde eine Retention und Anreicherung von mutiertem COMP im rauen rER gezeigt (Maddox *et al.*, 2000; Dinser *et al.*, 2002). Der direkte Einfluß der Retentionen von Matrilin-3 und COMP im rER auf die Entwicklung von MED und PSACH ist unbekannt. Es wird aber vermutet, dass die Anreicherung von fehlgefaltetem COMP im ER mit einer verlängerten Assoziation mit Chaperonen zusammenhängt und diese zelluläre Dysfunktion schließlich zu einem vermehrten Absterben von Chondrozyten in den Wachstumsfugen führt, was wiederum das gestörte Wachstum der Patienten verursachen kann. Ein dominanter Einfluß mutierter Proteine auf die Kollagenfaser- und Matrix-Assemblierung könnte zudem zu den Abnormalitäten in der Matrix von Knorpel und Sehnen beitragen (Dinser *et al.*, 2002).

Die D469 Δ COMP-Mutation liegt im siebten der acht TSP Typ III Domänen und führt zu einem partiellen Verlust von Calciumbindungsstellen. Das mutierte COMP zeigt in der Gegenwart von Ca²⁺ im EM eine weniger kompakte Form als das wildtypische Protein, ist ansonsten aber weder in seiner Assemblierung noch in der Sekundärstruktur signifikant verändert. Die kritischen, direkt an den Wechselwirkungen beteiligten Bereiche bleiben vermutlich trotz der Mutation zumindest teilweise erhalten, da die D469 Δ Mutation die Affinität von COMP zu den Kollagenen I, II und IX nur leicht verringert (Thur *et al.*, 2001). Die verbleibende Anzahl von Ca²⁺-Bindungsstellen reicht offenbar aus, um eine bindungsaktive Struktur zu gewährleisten. Auch die Bindung zwischen Matrilin-4 und COMP wird durch die D469 Δ -Mutation nur relativ wenig

beeinflusst (Abb. 3.11 und 3.12). Im ELISA-ähnlichen Versuch war die Bindung der mutierten COMP Varianten zu immobilisiertem Matrilin-4 mit der Bindung der wildtypischen Varianten vergleichbar oder nur mäßig reduziert. Die Bindung zwischen COMP und Matrilin-3 ist vermutlich auch in Mäusen mit transgenem D469 Δ -COMP nur wenig beeinträchtigt, da weder ein offensichtlicher Phänotyp vorliegt, noch die Präsenz von Matrilin-3 im Gewebe beeinträchtigt wird (Schmitz, Dissertation, 2005). Da also auch mutiertes COMP noch in der Lage ist, Matrilin zu binden, ist es wahrscheinlich, dass mutiertes, im rER zurückgehaltenes COMP dort an Matrilin bindet und deren Sekretion ebenfalls verhindert.

Eine kürzlich publizierte Arbeit beschreibt die Wechselwirkungen von Matrilin-3 und COMP mit dem FACIT-Kollagen IX (Budde *et al.*, 2005). Anhand von Kollagen IX-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Integration von Matrilin-3 in Kollagenfibrillen sowohl über eine - präferierte - direkte Kollagen IX-Matrilin-3 Bindung als auch eine indirekte Bindung mit COMP als Adapter verläuft. Die Bindung von Matrilin-3 an Kollagen IX ist mit einem geschätzten K_D von ca. 2,5 nM als sehr stark einzuschätzen (Budde *et al.*, 2005) und liegt im Bereich der Matrilin-4 COMP Bindung. Ihre physiologische Signifikanz wird durch die Tatsache verstärkt, dass Matrilin-3 in Kollagen IX-defizienten Kollagenfibrillen nicht mehr und COMP nur in geringerem Maße nachgewiesen werden kann. COMP-defiziente Kollagenfibrillen hingegen zeigten im Vergleich mit wildtypischen Kollagenfibrillen kaum Veränderungen bezüglich der Kollagen IX und Matrilin-3 Verteilung.

4.3 Wechselwirkungen von Matrilinen mit zellulären Rezeptoren

Viele Matrixproteine binden nicht nur untereinander, sondern auch an zelluläre Rezeptoren. Durch diese Zell-Matrix Kontakte werden wichtige zelluläre Funktionen wie Zytoskelettorganisation oder Signalübertragungen reguliert (Adams *et al.*, 2001). Matrilin binden an Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Matrix-Proteine und können auf diese Weise verschiedene makromolekulare Netzwerke miteinander verbinden (Budde *et al.*, 2005; Wiberg *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 1996), die Interaktionsmodule sind dabei die Matrilin-VWA Domänen. Generell können diese Domänen nicht nur an Matrix-Matrix, sondern auch Zell-Matrix Interaktionen beteiligt sein (Whittaker und Hynes, 2002). Ob auch die Matrilin an zelluläre Rezeptoren binden können, ist bisher kaum untersucht. Lediglich eine Veröffentlichung beschreibt eine Interaktion zwischen Matrilin-1 und $\alpha 1\beta 1$ Integrin und eine Ausbreitung von Chondrozyten und Fibroblasten auf immobilisiertem Matrilin-1 (Makihira *et al.*, 1999).

Sowohl HaCaT-Keratinocyten als auch Wi26-Fibroblasten binden in sättigbarer und konzentrationsabhängiger Weise an Matrilin-1, -2 und -3 (Abb. 3.23), was die bereits beschriebene Zellanhaftung von Fibroblasten auf Matrilin-1 bestätigt (Makihira *et al.*, 1999); nur Wi26-Zellen, aber nicht HaCaT-Zellen binden schwach an Matrilin-4 (Abb. 3.23). Unter optimalen Bedingungen können HaCaT-Zellen mit ähnlicher Effizienz an Matrilin-1 und an Fibronectin binden, benötigen auf Matrilin-1 aber eine fünffach höher konzentrierte Beschichtungslösung zur Anhaftung. Die Bindung der Wi26-Zellen an Matrilin-1 ist wesentlich schwächer als die an Fibronectin.

Integrine sind wichtige und gut untersuchte zelluläre Rezeptoren für die Zelladhäsion (Singer *et al.*, 1987; Wozniak *et al.*, 2004) und wurden hier als zelluläre Rezeptoren zuerst in Betracht gezogen, allerdings ergaben sich keine klaren Beweise für eine wichtige Rolle der Integrine bei der Zellanhaftung auf Matrilinen. Es wurde zwar eine Bindung von Matrilin-1 über $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an Chondrozyten publiziert (Makihira *et al.*, 1999), aber die Ergebnisse der ELISA-ähnlichen Bindungsversuche konnten eine starke Bindung zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und Matrilin-1 nicht bestätigen (Abb. 3.24). Verglichen mit den Positivkontrollen kann Matrilin-1 nur schwach an die $\alpha 1\beta 1$ -Ektodomäne binden. Auch Matrilin-2 bindet nur relativ schwach an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, keines der getesteten Matrilin zeigt eine Bindung an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (Abb. 3.24). Weder die Matrilin-1- noch die Matrilin-2-Bindung an die Integrin Ektodomänen konnte durch den Integrin-aktivierenden Antikörper AK 9EG7 (Bazzoni *et al.*, 1995) verstärkt werden. Die Interaktionen waren zudem auch nicht abhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen, wie es eigentlich für eine klassische Bindung an aktiviertes Integrin zu erwarten gewesen wäre.

Zellanhaftungsversuche mit $\beta 1$ -Integrin defizienten Fibroblasten auf Matrilin-3 zeigten trotz einer, verglichen mit Fibronectin, stark verringerten Anhaftung, immer noch eine Bindung an immobilisiertes Matrilin-3 (Abb. 3.28 A und C). Allerdings konnten weder die auf Matrilin-3 anhaftenden, $\beta 1$ -Integrin defizienten noch die $\beta 1$ -Integrin exprimierenden Zellen fokale Kontakte ausbilden (Abb. 3.29 C und D). Die Integrin exprimierenden Zellen breiten sich auf Matrilin-3 nur wenig aus und zeigen nur eine schwache Ausbildung von Actin-Netzwerken. Die $\beta 1$ -Integrin defizienten Zellen zeigen auf Matrilin-3 keine Actin-Netzwerkbildung mehr, sondern bleiben rund. Auf Fibronectin hingegen bilden beide Fibroblastenzelllinien während der Zellanhaftung zahlreiche fokale Kontakte aus, ein klassisches Bild für Integrin-vermittelte Zelladhäsion (Singer et al., 1987). Zusammengenommen zeigen diese Beobachtungen, dass es noch alternative Matrilin-Rezeptoren außer Integrinen auf der Zelloberfläche geben muß.

Zelloberflächen Proteoglykane wie z.B. die Syndecane (Woods et al., 1998, 2000; Essner et al., 2006) sind ebenfalls an der Vermittlung von Zell-Matrix Kontakten beteiligt. Daher wurden sie hier als alternative Matrilinrezeptoren in Betracht gezogen. Auf immobilisiertem Fibronectin hatte, wie erwartet, keines der zugegebenen Glykosaminoglykane einen Einfluß auf die Zellanhaftung. Auf immobilisiertem Matrilin-1 hingegen konnte die Zugabe von Heparin tatsächlich die Zellanhaftung verringern (Abb. 3.25), wohingegen die Zugaben von Chondroitinsulfat und Heparansulfat keinen Effekt hatten. Xylosyltransferase- und damit Glykosaminoglykan defiziente Zellen können immer noch auf Matrilin-3 haften, obwohl ihre Haftungseffizienz, verglichen mit Fibronectin, stark verringert ist (Abb. 3.28 B und D).

Die Immunfluoreszenzfärbung der anhaftenden Glykosaminoglykan exprimierenden und -defizienten Zellen auf Matrilin-3 bestätigt diese Beobachtungen (Abb. 3.29 G und H). Im Gegensatz zum Anhaften auf Fibronectin (Abb. 3.29 E und F) kann sich keine der beiden Zelllinien nach der schwachen Anhaftung auf Matrilin-3 ausbreiten und ein Actin-Netzwerk oder fokale Kontakte ausbilden. Die Zellen erscheinen nur klein und rund. Wie die Integrine zeigen auch Zelloberflächen-Proteoglykane einen schwachen Beitrag zur Matrilin-vermittelten Zellanhaftung, die physiologische Relevanz ist jedoch auch hier zweifelhaft.

Die Bindung von Glykosaminoglykanen an Matrilin wurde mit SPR-Messungen weiter untersucht. Volllängen Matrilin-3 und -4, sowie die Matrilin-3 VWA Domäne binden an Heparin und Heparansulfat, aber nicht an Chondroitinsulfat, damit wird das Ergebnis aus den Kompetitionsversuchen bestätigt (Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Die für die Matrilin-3 VWA Domäne ermittelten K_D -Werte von ca. 77 nM für Heparin und ca. 46 nM für Heparansulfat weisen auf eine Präferenz für das im Knorpel vorkommende

Heparansulfat hin. Heparin liegt in den intrazellulären Granula der Mastzellen, aber nicht im Knorpel vor.

Die hier diskutierten Ergebnisse können keine starke Rolle der Matrilin bei der Zellanhaftung belegen und die Ergebnisse von Makihira *et al.* (1999) auch hinsichtlich der Matrilin-vermittelten Zellausbreitung nicht bestätigen. Zum Teil kann dies dadurch erklärt werden, dass das dort verwendete Matrilin-1 unter denaturierenden Bedingungen extrahiert wurde (4M Guanidinium Hydrochlorid) und es unklar ist, ob eine korrekte Renaturierung zur nativen Form stattgefunden hat. Die Zellanhaftung auf Matrilinen wird weder ausschließlich durch β 1-Integrine, noch ausschließlich durch Zelloberflächen Proteoglykane vermittelt, möglich wäre eine gemeinsame Funktion der Integrine und der Proteoglykane. Die Ergebnisse zeigen, dass Matrilin keine Zellanhaftungsproteine im klassischen Sinne sind. Sie erlauben eine schwache Zellanhaftung aber keine typischen Folgereaktionen wie Ausbreitung, Formierung des Actin-Zytoskeletts oder die Formierung von fokalen Kontakten. Ihre zahlreichen Bindungspartner in der extrazellulären Matrix könnten hingegen eine indirekte Beteiligung der Matrilin an Zell-Matrix Kontakten erlauben.

4.4 Übersicht über die Quervernetzung der Matrixkomponenten durch die Matriline

Die diskutierten Ergebnisse sowie neuere Veröffentlichungen ergeben ein komplexer werdendes Modell der Wechselwirkungen in der extrazellulären Matrix (Abb. 4.3).

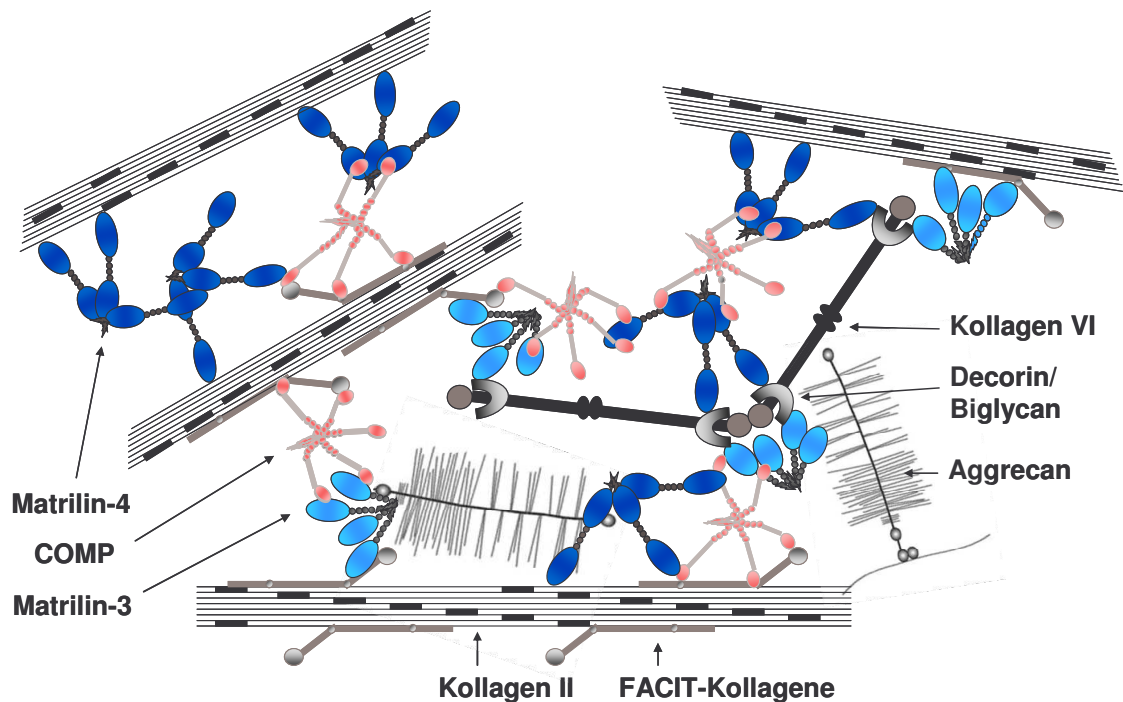


Abb. 4.3: Modell der supramolekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unter Beteiligung der Matriline⁶. Die Abbildung zeigt nur einen kleinen Teil der beteiligten Proteine und möglichen Wechselwirkungen. Die dargestellten Größenverhältnisse sind an die Grafik angepasst und nicht maßstabsgetreu.

Matriline sind an der Bildung kollagenabhängiger und interzellulärer Netzwerke direkt beteiligt. Sie bilden außerdem, möglicherweise unter Beteiligung von Fibronectin, auch kollagenunabhängige, perizelluläre Netzwerke in direkter Nähe um einzelne Zellen herum (Wagener *et al.*, 2005; Klatt *et al.*, 2001; Klatt *et al.*, 2000; Piecha *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1995). Mit ihrer Beteiligung an diesen Netzwerken üben die Matriline vielleicht eine Mittlerfunktion zwischen der kollagenreichen, extrazellulären Matrix und den „primären“ Proteinen der Zelladhäsion z.B. Fibronectin und PRELP, aus.

⁶ Abbildung verändert übernommen aus Budde *et al.*, 2005

Darüberhinaus haben Matrilin vermutlich auch eine Funktion bei der Organisation der perizellulären Netzwerke und beeinflussen als Adapterproteine möglicherweise deren Vernetzungsgrad. Diese Annahme wird bestärkt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Knorpelmatrix von Matrilin-1/-3-defizienten Mäusen. Diese zeigen Kollagenfibrillen, die üblicherweise extraterritorial lokalisiert sind, im perizellulären Raum und außerdem Kollagenfibrillen mit signifikant vergrößerten Durchmessern (A. Aszódi, persönliche Mitteilung).

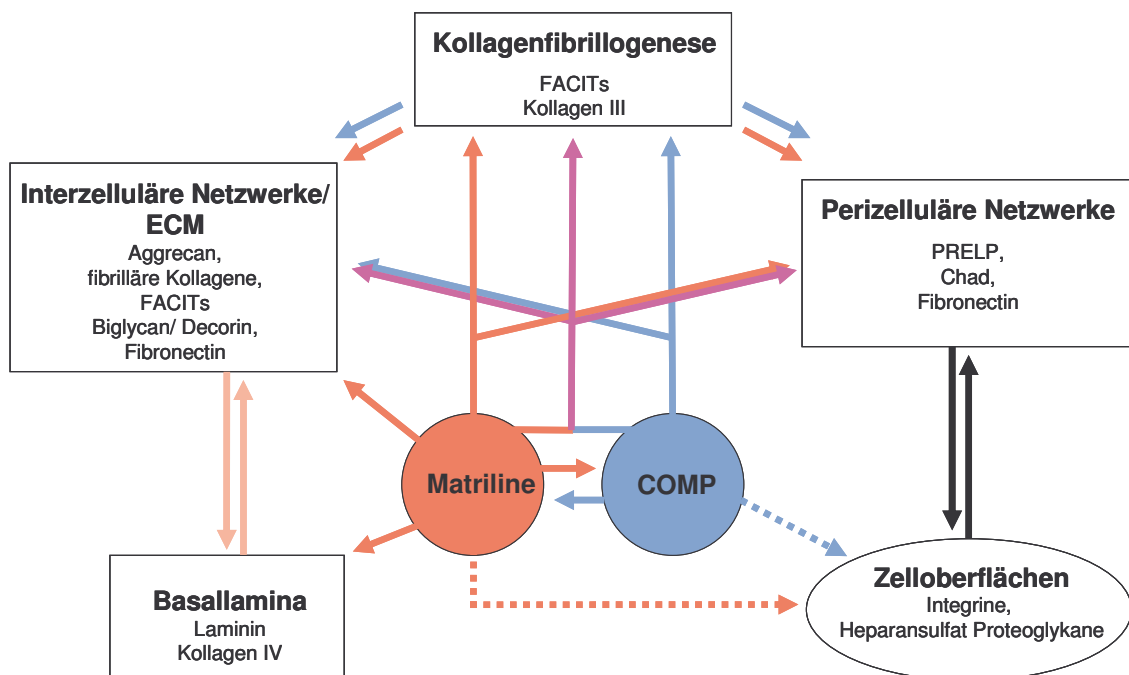


Abb. 4.4: Schematische Übersicht der Beteiligungen von Matrilinen und COMP in Netzwerken der extrazellulären Matrix. Gezeigte funktionelle Beteiligungen der Matriline sind rot markiert, funktionelle Beteiligungen von COMP in blau. Interaktionen, die möglicherweise in direkter Wechselwirkung von Matrilin(-4) und COMP stattfinden, sind violett gefärbt. Die z.B. durch Matrilin-1/-3 Heterooligomere vermittelbare Verbindung zwischen der Basallamina und den interzellulären Netzwerken der extrazellulären Matrix ist mit einem rosafarbenen Pfeil gekennzeichnet. Schwache Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet, anderweitig vermittelte Kontakte sind schwarz markiert oder nicht eingezeichnet.

Die oligomeren Erscheinungsformen und daraus resultierenden Polyvalenzen von Matrilinen und COMP erlauben Wechselwirkungen mit mehreren Liganden gleichzeitig und erhöhen damit die Möglichkeiten der Quervernetzung der Matrixkomponenten. Die gezeigten Bindungen der Matriline an Biglycan, Decorin, die fibrillären Kollagene I, II, III, IV, V, VI (indirekt), XI und die fibrillenassoziierten Kollagene IX, XII, XIV und XXII ermöglichen ein genaueres Modell der supramolekularen Zusammensetzung der

extrazellulären Matrix unter Beteiligung der Matriline. Die Tatsache, dass die Matriline einen Teil ihrer Bindungspartner (zumindest Kollagen I und II, IX und Fibronectin) mit ihrem stärksten Liganden (COMP) teilen, deutet auf eine gemeinsame Rolle der Matriline und COMP als Adapterproteine bei der Vernetzung der extrazellulären Matrix hin (Abb. 4.4).

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren die VWA Domänen als bindende Module der Matriline. Zukünftige Arbeiten werden diese Erkenntnisse detaillierter untersuchen. Der nächstliegende Ansatz ist die genaue Lokalisierung der bindenden Oberflächen von Matrilin VWA Domänen und COMP T3+TC und die Identifizierung der beteiligten Aminosäuren. Dies könnte durch die gezielte Einführung von Mutationen an Stellen, die für Interaktionen der beiden Fragmente in Frage kommen könnten (z.B. die VWA-Oberflächen und mit den MIDAS-Motiven assoziierte Aminosäuren) geschehen und mit dem Vergleich der Mutanten in Hinblick auf ihre Affinitäten zu ihren Bindungspartnern mittels SPR-Versuchen analysiert werden.

Um die Auswahl zu mutierender Aminosäuren möglichst präzise treffen zu können, wird der erste Schritt die Kristallisierung der VWA Domänen und die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur sein, um so diejenigen Aminosäuren identifizieren zu können, die an der Oberfläche der VWA Domänen liegen oder assoziiert mit den MIDAS-Motiven sind. Für die Kristallisation bietet sich die Matrilin-4 VWA2 Domäne an, da ihre Bindungsfähigkeit gezeigt wurde. Bereits durchgeführte Kristallisationsversuche mit der rekombinant in Säugerzellen hergestellten Matrilin-3 VWA Domäne waren bisher erfolglos. Ein neuer Ansatz könnte die Strukturermittlung mit Hilfe von NMR sein. Die Expression der VWA Domänen muß dann aber wegen der dann notwendigen Isotopenmarkierung in Bakterien durchgeführt werden.

Weitergehende Versuche können außerdem auf andere Bindungspartner der Matriline fokussieren. Neben der untersuchten Matrilin-4 – COMP Bindung sind auch weitere Bindungspartner der Matriline identifiziert worden. Bisher ist wenig über die Wechselwirkungen der Matriline mit Decorin, Biglycan, den fibrillären Kollagenen und den FACIT-Kollagenen bekannt. Die weitere Analyse dieser Wechselwirkungen mittels SPR-Versuchen und die Bestimmung der Affinitäten aller bisher identifizierten Matrilin-Bindungspartner ist hier die Fortsetzung der beschriebenen Versuche, um einen umfassenden Überblick über die Bindungsverhältnisse der Matriline zu ihren Bindungspartnern zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

Die Matriline repräsentieren eine Familie von vier nicht-kollagenen Multidomänen-Proteinen der extrazellulären Matrix und oligomerisieren zu trimeren und tetrameren Homo- und Heterooligomeren. Matriline spielen eine Rolle als Adapterproteine in der extrazellulären Matrix; durch ihre Bindungen an sowohl kollagene als auch nicht-kollagene Matrixkomponenten können sie verschiedene, extrazelluläre Netzwerke miteinander verbinden.

In dieser Arbeit wurde ein Panel von Proteinen der extrazellulären Matrix auf seine Bindungsfähigkeit an Matrilin-1, -3 und -4 getestet. Dabei konnte eine Reihe von Matrixproteinen erstmalig als Matrilin-Bindungspartner identifiziert werden, darunter das Proteoglykan PRELP, die Kollagene XI, XII, XIV und XXII und das pentamere Glykoprotein COMP (TSP-5). Die Bindung von Matrilin-4 an COMP wurde als kationenabhängig identifiziert, detailliert mittels ELISA-ähnlichen und SPR-Bindungsstudien untersucht und als ein beidseitig von Multivalenz und entweder additiven oder kooperativen Mechanismen geprägter Vorgang charakterisiert. Die für beide Proteinfamilien beschriebene proteolytische Prozessierung könnte einer proteolytischen Regulation ihrer Avidität dienen und so die Fähigkeit der Matriline (und COMP) regulieren, Komponenten der extrazellulären Matrix miteinander zu verbinden. Die Bindung zwischen Matrilin-4 und COMP wird hauptsächlich von der Matrilin-4 VWA2 Domäne und der COMP T3+TC-Domäne vermittelt. Die Matrilin-4 VWA1 Domäne ist mit geringerer Affinität ebenfalls in der Lage, an COMP zu binden und ist daher entweder additiv oder kooperativ an der COMP-Bindung beteiligt oder vermittelt die Bindung zu einem weiteren Protein der extrazellulären Matrix.

Eine starke Rolle bei der Zellanhaftung konnte für die Matriline nicht nachgewiesen werden. Verglichen mit einem klassischen Zellanhaftungsprotein (Fibronectin) sind für Zellbindungen auf Matrilinen wesentlich höhere Beschichtungskonzentrationen nötig und die beobachteten Bindungen laufen ohne die klassischen Merkmale der Zellanhaftung, wie fokale Kontakte und Umorganisation des Zytoskeletts ab. Die geringfügige Beteiligung dieser Proteine an der Zellhaftung wird weder ausschließlich durch die Zelloberflächenrezeptoren vom Typ der Proteoglykane noch vom Typ der Integrine vermittelt, obwohl augenscheinlich beide an den beobachteten Anhaftungen beteiligt sind.

6 Abstract

The matrilins form a four-member family of non-collagenous, modular proteins in the extracellular matrix, which oligomerize into homo- and heterooligomeric trimers and tetramers. Matrilins play a role as adaptor proteins by participating in the interconnection of different collagen networks with each other and with other matrix proteins and thus play a role in the organization of extracellular networks.

In this present study a panel of extracellular matrix proteins was tested for binding to matrilin-1, -3 and -4. Among proteins in this panel, identified as novel matrilin binding partners, were PRELP, the collagens XI, XII, XIV and XXII and the pentameric glycoprotein COMP, which showed the most prominent interaction with matrilins. The matrilin-4–COMP binding is divalent cation-dependent and detailed studies using ELISA-style and SPR-assays showed that it is influenced by multivalency, indicating additive or cooperative mechanisms of the interactions of the individual subunits and domains. Both matrilins and COMP are subject to proteolytic processing and their adaptor functions may be physiologically modulated by proteolytic loss of single subunits, resulting in decreased binding avidity. The interaction between matrilin-4 and COMP is primarily mediated by a binding of the matrilin-4 VWA2 domain to the COMP domains represented by the C-terminal T3+TC fragment. However, the matrilin-4 VWA1 domain also binds to COMP, but with a lower affinity. Thus, each matrilin-4 VWA domain may either participate in COMP interactions or mediate binding to other proteins of the extracellular matrix.

Although matrilins are able to mediate weak cell attachment, as compared to classical cell attachment proteins, like fibronectin, much higher concentrations are required to reach plateau values and the binding does not lead to the formation of focal contacts and the reorganization of the actin cytoskeleton. Cell attachment on matrilins is not exclusively mediated by either integrins or cell surface proteoglykans, although both receptor types are involved in promoting the cell adhesion.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C., Watt F. M. *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix.* (1993) *Development* **117**: 1183-98. Review.
- Adams, J. C. *Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions.* (2001) *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**: 25-51. Review.
- Aszódi, A., Hauser, N., Studer, D., Paulsson, M., Hiripi, L. und Bösze, Z. (1996) *Cloning, sequencing and expression analysis of mouse cartilage matrix protein cDNA.* *Eur J Biochem* **236**: 970-977
- Aszódi, A., Bateman, J. F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E. B., Hauser, N., Bösze, Z. und Fässler, R. (1999) *Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: Redundant function of matrilins in cartilage.* *Mol Cell Biol* **19**: 7841-7845
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., Fox, J. W. (1993) *Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components.* *Kidney Int.* **43**: 7-12.
- Bazzoni G., Shih, D. T., Buck, C. A., Hemler, M. E. *Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium.* (1995) *J Biol Chem.* **270**: 25570-7.
- Bengtsson, E., Aspberg, A., Heinegård, D., Sommarin, Y., Spillmann, D. *The amino-terminal part of PRELP binds to heparin and heparan sulfate.* (2000) *J Biol Chem.* **275**: 40695-702.
- Bengtsson, E., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegård, D., Aspberg, A. *The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor.* (2002) *J Biol Chem.* **277**: 15061-8.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., Lose, E. J. *Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate Proteoglykans.* (1992) *Annu Rev Cell Biol.* **8**: 365-93. Review.
- Belluoccio, D. und Trueb, B. (1997) *Matrilin-3 from chicken cartilage.* *FEBS Letters* **415**: 212-216
- Biacore, Technologie Handbuch, 1999
- Birk, D. E., Silver, F. H., Trelstad, R. L. (1991) *Matrix assembly in cell biology of extracellular matrix* (E. D. Hay ed.) 2nd Ed., 221-254. New york, Plenum Press
- Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J., Galla, H. J., Bruckner, P. *Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils.* (2000) *J Biol Chem.* **275**: 10370-8.
- Borochowitz, Z. U., Scheffer, D., Adir, V., Dagoneau, N., Munnich, A. und Cormier-Daire, V. (2004) *Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin-3 type: Homozygot matrilin-3 mutation in a novel form of SEMD.* *J Med Genet* **41**: 366-372
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* (1988) *J Cell Biol.* **106**: 761-71.
- Briggs, M. D., Hoffman, S. M., King, L. M., Olsen, A. S., Mohrenweiser, H., Leroy, J. G., Mortier, G. R., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., Gaines, E. S. *et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene.* (1995) *Nat Genet.* **10**: 330-6.
- Briggs, M. D., Chapman, K. L. *Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations.* (2002) *Hum Mutat.* **19**: 465-78. Review.

- Brown, R. J.. *Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies.* (1997) *Ann Rev Med*; **48**: 457–66.
- Budde, B. Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H. W. A., Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P. und Grässel, S. (2005) *Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX.* *Mol Cell Biol* **25**: 10465-10478
- Bundle, D. R., Sigurskjold, B. W. *Determination of accurate thermodynamics of binding by titration microcalorimetry.* (1994) *Methods Enzymol.* **247**: 288-305.
- Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinmann, H., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J. *et al.* *A new nomenclature for the laminins.* (1994) *Matrix Biol.* **14**: 209-11.
- Cavaldesi, M., Macchia, G., Barca, S., Defilippi, P., Tarone, G., Petrucci, T. C. (1999) *Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction.* *J Neurochem.* **72**: 1648-55.
- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J. H., Jepsen, K. J., LaMantia, C., Carroll, H. (1998) *Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican.* *J Cell Biol.* **141**: 1277-86.
- Chapman, K. L., Mortier, G., R., Chapman, K., Loughlin, J., Grant, M. E. und Briggs, M. D. (2001) *Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of Matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia.* *Nat Genet* **28**: 393-396
- Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Tondravi, M. M. und Goetinck, P. F. (1995) *Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: Analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system.* *Mol Biol Cell* **6**: 1743-1753
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D. M. und Goetinck, P. F. (1999) *Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains.* *Mol Biol Cell* **10**: 2149-2162
- Colombatti, A. und Bonaldo, P. (1991) *The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms.* *Blood.* **77**: 2305-15. Review.
- Cotterill, S. L., Jackson, G. C., Leighton, M. P., Wagener, R., Mäkitie, O., Cole, W. G. und Briggs, M. D. (2005) *Multiple epiphyseal dysplasia mutations in MATN3 cause misfolding of the A-domain and prevent secretion of mutant matrilin-3.* *Hum Mut* **26**: 557-565
- Couchman, J. R., Woods, A. (1999) *Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion.* *J. Cell Sci.* **112**: 3415-3420.
- Czarny-Ratajczak, M., Lohiniva, J., Rogala, P., Kozłowski, K., Perala, M., Carter, L., Spector, TD., Kolodziej, L., Seppanen, U., Glazar, R., Krolewski, J., Latos-Bielenska, A., Ala-Kokko, L. (2001) *A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity.* *Am J Hum Genet.* **69**: 969-80.
- Dames, S. A., Kammerer, R. A., Wiltschek, R., Engel, J. und Alexandrescu, A. T. (1998) *NMR structure of a parallel homotrimeric coiled-coil.* *Nat Struct Biol* **5**: 687-691
- Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E., Iozzo, R. V. (1997) *Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.* *J Cell Biol.* **136**: 729-43.
- Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulsson, M. und Kiss, I. (1997) *Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type-A module superfamily.* *J Biol Chem* **272**: 9268-9274
- Di Cesare, P. E., Morgelin, M., Carlson, C. S., Pasumarti, S., Paulsson, M. (1995) *Cartilage oligomeric matrix protein: isolation and characterization from human articular cartilage.* *J Orthop Res.* **13**: 422-8.

- Di Cesare, P. E., Chen, F. S., Moergelin, M., Carlson, C. S., Leslie, M. P., Perris, R., Fang, C. (2002) *Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin*. Matrix Biol. **21**: 461-70.
- Dinser, R., Zaucke, F., Kreppel, F., Hultenby, K., Kochanek, S., Paulsson, M., Maurer, P. (2002) *Pseudoachondroplasia is caused through both intra- and extracellular pathogenic pathways*. J Clin Invest. **110**: 505-13.
- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. und Paulsson, M. (1999) *The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins*. Matrix Biol **18**: 55-66
- Doyle, M. L. (1997) *Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry*. Curr Opin Biotechnol. **8**: 31-5.
- Eble, J. A. (2001) *The molecular basis of integrin-extracellular matrix interactions*. Osteoarthritis Cartilage.; 9 Suppl A: S131-40. Review.
- Ehlen, H. W. A. (2002) Untersuchungen der potentiellen Proteaseschnittstelle im C-terminalen Bereich der Matriline mittels *site-directed-mutagenesis*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Ehlen, H. W. A. (2005) Charakterisierung der proteolytischen Prozessierung der Matriline. Dissertation, Universität zu Köln
- Ekblom, P., Ekblom, M., Fecker, L., Klein, G., Zhang, H. Y., Kadoya, Y., Chu, M. L., Mayer, U., Timpl, R. (1994) *Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro*. Development. **120**: 2003-14.
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., Liddington, R. C. (2000) *Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1*. Cell. **101**: 47-56.
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., Campbell K. P. (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature. **345**: 315-9.
- Esko, J. D., Stewart, T. E., Taylor, W. H. (1985) *Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. **82**: 3197-201.
- Essner, J. J., Chen, E., Ekker, S. C. (2006) *Syndecan-2*. Int J Biochem Cell Biol. **38**: 152-6.
- Siljander, P. R. Hamaia, S., Peachey, A. R., Slatter, D. A., Smethurst, P. A., Ouwehand, W. H., Knight, C. G., Farndale, R. W. (2004) *Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens*. J Biol Chem. **279**: 47763-72.
- Fisher, H. F., Singh, N. (1995) *Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions*. Methods Enzymol. **259**: 194-221.
- Flaumenhaft, R., Abe, M., Mignatti, P., Rifkin, D. B. (1992) *Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity*. J Cell Biol. **118**: 901-9.
- Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Mini, T., Jenö, P., Engel, J. und Kammerer, R. A. (2002) *Characterization of the matrilin coiled-coil domains reveals seven novel isoforms*. J Biol Chem **277**: 19071-17079
- Giancotti, F. G., Ruoslahti, E. (1999) *Integrin signaling*. Science. **285**: 1028-32. Review.
- Handford, P. A., Mayhew, M., Baron, M., Winship, P. R., Campbell, D. I. und Brownlee, G. G. (1991), *Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains*. Nature **351**: 164-167
- Hauser, N. und Paulsson, M. (1994) *Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil α -helix*. J Biol Chem **269**: 25747-25753
- Hauser, N., Di Cesare, P. E., Paulsson, M. (1995) *The spatial and temporal expression of cartilage matrix protein illustrates the molecular heterogeneity of cartilage*. Acta Orthop Scand Suppl. **266**: 19-21.
- Hauser, N., Paulsson, M., Heinegård, D. und Mörgelin, M. (1996) *Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation*. J Biol Chem **271**: 32247-32252

- Hay, E. D. (1991) *Cell biology of extracellular matrix* 2nd Ed., 221-254. New York, Plenum Press
- Hay, E. D. (1993) *Extracellular matrix alters epithelial differentiation*. *Curr Opin Cell Biol.* **5**: 1029-35. Review.
- Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa-Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., Heinegård, D. (1992) *Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage*. *J Biol Chem.* **267**: 6132-6.
- Holden, P., Meadows, R. S., Chapman, K. L., Grant, M. E., Kadler, K. E., Briggs, M. D. (2001) *Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family*. *J Biol Chem.* **276**: 6046-55.
- Huang, X., Birk, D. E. & Goetinck, P. F. (1999) *Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization*. *Dev Dyn* **216**: 434-441
- Hynes, R. O. (1986) *Fibronectins*. *Sci Am.* **254**: 42-51. Review.
- Hynes, R. O. (2002) *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. *Cell.* **110**: 673-87. Review.
- Iozzo, R. V. (1999) *The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins*. *J Biol Chem.* **274**: 18843-6. Review.
- Iozzo, R. V. (2005) *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 646-56. Review.
- Jackson, R. L., Busch, S. J., Cardin, A. D. (1991) *Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological process*. *Physiol. Rev.* **71**: 481-539
- Jackson, G. C., Barker, F. S., Jakkula, E., Czarny-Ratajczak, M., Makitie, O., Cole, W. G., Wright, M. J., Smithson, S. F., Suri, M., Rogala, P., Mortier, G. R., Baldock, C., Wallace, A., Elles, R., Ala-Kokko, L. und Briggs, M. D. (2004) *Missense mutations in the β strands of the single A-domain of matrilin-3 result in multiple epiphyseal dysplasia*. *J Med Genet* **41**: 52-59
- Jelesarov, I., Bosshard, H. R. (1999) *Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition*. *J Mol Recognit.* **12**: 3-18. Review.
- Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., Chapman, J. A. (1996) *Collagen fibril formation*. *Biochem J.* **316**: 1-11. Review.
- Kemeny, D. M. (1994) *Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Kiss, I., Deák, F., Holloway, R. G. jr., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W. S., Tsonis, P. A., Winterbottom, N. und Goetinck, P. F. (1989) *Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix: exon/intron organization, unusual splice sites, and relations to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor* *J Biol Chem* **264**: 8126-8134
- Klatt, A. R., Nitsche, P. D., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M. und Wagener, R. (2000) *Molecular structure and tissue distribution of Matrilin-3, a filament forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development*. *J Biol Chem* **275**: 3999-4006
- Klatt, A. R. (2001) *Struktur, Prozessierung und Gewebeverteilung von Matrilin-3 und Matrilin-4*. Dissertation, Universität zu Köln
- Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Macht, M., Paulsson, M. und Wagener, R. (2001) *Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4*. *J Biol Chem* **276**: 17267-17275
- Klatt A. R., Paulsson, M. und Wagener, R. (2002) *Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues*. *Matrix Biol* **21**: 289-296

- Kleemann-Fischer, D., Kleemann, G. R., Engel, D., Yates, J. R. 3rd, Wu, J. J. und Eyre, D. R. (2001) *Molecular properties of matrilin-3 isolated from human growth cartilage*. Arch Biochem Biophys **387**: 209-215
- Ko, Y. P., Kobbe, B., Nicolae, C., Miosge, N., Paulsson, M., Wagener, R. und Aszódi, A. (2004) *Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development*. Mol Cell Biol **24**: 1691-1699
- Ko, Y. P., Kobbe, B., Paulsson, M. und Wagener, R. (2005) *Zebrafish (Danio rerio) Matrilins: shared and divergent characteristics with their mammalian counterparts*. Biochem J **386**: 367-379
- Koch, M., Bohrmann, B., Matthison, M., Hagios, C., Trueb, B., Chiquet, M. (1995) *Large and small splice variants of collagen XII: differential expression and ligand binding*. J Cell Biol. **130**: 1005-14.
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D. R., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., Bruckner, P., Bruckner-Tuderman, L. (2004) *A novel marker of tissue junctions, collagen XXII*. J Biol Chem. **279**: 22514-21.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. (1997) *Properties of the extracellular calcium binding module of the Proteoglykan testican*. FEBS Lett **414**: 557-561
- Kvansakul, M., Adams, J. C., Hohenester, E. (2004) *Structure of a thrombospondin C-terminal fragment reveals a novel calcium core in the type 3 repeats*. EMBO J. **23**: 1223-33..
- Laemmli, U. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680-685
- Laue, T. M. (1995) *Sedimentation equilibrium as thermodynamic tool*. Methods Enzymol. **259**: 427-52.
- Leavitt, S., Freire, E.. (2001) *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*. Curr Opin Struct Biol. **11**: 560-6. Review.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. und Liddington R. (1995) *Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)*. Cell **80**: 631-638
- Lin, C. Q., Bissell, M. J. (1993) *Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix*. FASEB J. **7**: 737-43. Review.
- Luque, I., Freire, E. (1998) *Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands*. Methods Enzymol. **295**: 100-27.
- Mabuchi, A., Haga, N., Maeda, K., Nakashima, E., Manabe, N., Hiraoka, H., Kitoh, H., Kosaki, R., Nishimura, G., Ohashi, H. und Ikegawa, S. (2004) *Novel and recurrent mutations clustered in the von Willebrand factor A domain of MATN3 in multiple epiphyseal dysplasia*. Hum Mutat **24**: 439-440
- Maddox, B. K., Mokashi, A., Keene, D. R., Bachinger, H. P. (2000) *A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structural and functional properties of the type 3 domain*. J Biol Chem. **275**: 11412-7.
- Makihira, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T., Kato, Y. (1999) *Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1*. J Biol Chem. **274**: 11417-23.
- Malby, S., Pickering, R., Saha, S., Smallbridge, R., Linse, S. und Downing, A. K. (2001) *The first epidermal growth factor-like domain of the low-density lipoprotein receptor contains a noncanonical calcium binding site*. Biochemistry **40**: 2555-2563
- Mann, H. H., Özbeck, S., Engel, J., Paulsson, M. und Wagener, R. (2004) *Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and pathogenesis of chondrodysplasias*. J Biol Chem **279**: 25294-25298
- Mariyama, M., Leinonen, A., Mochizuki, T., Tryggvason, K., Reeders, S. T. (1994) *Complete primary structure of the human alpha 3(IV) collagen chain. Coexpression of the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen chains in human tissues*. J Biol Chem. **269**: 23013-7.

- Martin, G. R., Timpl, R.. (1987) Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol.* **3**: 57-85. Review.
- Mátés, L., Nicolae, C., Mörgelin, M., Deák, F., Kiss, I. und Aszódi, A. (2004) *Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities.* *Matrix Biol* **23**: 195-204
- Min, J. L., Meulenbelt, I., Riyazi, N., Kloppenburg, M., Houwing-Duistermaat, J. J., Seymour, A. B., van Duijn, C. M., Slagboom, P. E. (2006) *Association of matrilin-3 polymorphisms with spinal disc degeneration and with osteoarthritis of the CMC1 joint of the hand.* *Ann Rheum Dis.* 2006 Jan 5, elektronisch veröffentlicht
- Morton, T. A., Myszka, D. G. (1998) Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol.* **295**: 268-94.
- Mostert, A. K., Dijkstra, P. F., Jansen, B. R., van Horn, J. R., de Graaf, B., Heutink, P. und Lindhout, D. (2003) *Familial multiple epiphyseal dysplasia due to a matrilin-3 mutation: Further delineation of the phenotype including 40 years follow-up.* *Am J Med Genet A* **120**: 490-497
- Mundlos, S. und Zabel, B. (1994) *Developmental expression of human cartilage matrix protein.* *Dev Dyn* **199**: 241-252
- Muratoglu, S., Krysan, K., Balász, M., Sheng, H., Zákány, R., Módis, L., Kiss, I. und Deák, F. (2000) *Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the MATN2 gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes.* *Cyt Cell Gen* **90**: 323-327
- Muragaki, Y., Mariman, E. C., van Beersum, S. E., Perala, M., van Mourik, J. B., Warman, M. L., Hamel, B. C., Olsen, B. R. (1996) *A mutation in COL9A2 causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2).* *Ann N Y Acad Sci.* **785**: 303-6.
- Myszka, D. G. (1997) *Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors.* *Curr Opin Biotechnol.* **8**: 50-7.
- Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P. E., Michel, B. A., Hauselmann, H. J. (1997) *Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation.* *Br J Rheumatol.* **36**: 1151-60.
- Nice, E. C., Catimel, B. (1999) *Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions.* *Bioessays.* **21**: 339-52. Review.
- Nitsche, D. P. (2001) *Strukturen und Wechselwirkungen von Matrilinen und von Thrombospondinen - multimere nichtkollagene Proteine der extrazellulären Matrix.* Dissertation, Universität zu Köln
- Otten, C., Wagener, R., Paulsson, M. und Zaucke, F. (2005) *Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not.* *J Med Genet* **42**: 774-779
- Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K., Heinegard, D. (1992) *COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins.* *J Biol Chem.* **267**: 22346-50.
- Oxford, J. T., Doege, K. J., Horton, W. E. Jr, Morris, N. P. (1994) *Characterization of type II and type XI collagen synthesis by an immortalized rat chondrocyte cell line (IRC) having a low level of type II collagen mRNA expression.* *Exp Cell Res.* **213**: 28-36.
- Paasilta, P., Lohiniva, J., Annunen, S., Bonaventure, J., Le Merrer, M., Pai, L., Ala-Kokko, L. (1999) *COL9A3: A third locus for multiple epiphyseal dysplasia.* *Am J Hum Genet.* **64**: 1036-44.
- Paulsson, M. und Heinegård, D. (1979) *Matrix proteins bound to associatively prepared Proteoglykans from bovine cartilage.* *Biochem J* **183**: 539-545
- Paulsson, M. und Heinegård, D. (1981) *Purification and structural characterisation of a cartilage matrix protein.* *Biochem J* **197**: 367-375
- Piecha, D., Muratoglu, S., Mörgelin, M., Hauser, N., Studeri, D., Kiss, I., Paulsson, M. und Deák, F. (1999) *Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks.* *J Biol Chem* **274**: 13353-13361

- Piecha, D., Wiberg, C., Mörgelin, M., Reinhardt, D. P., Deák, F., Maurer, P. und Paulsson, M. (2002) *Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins*. *Biochem J* **367**: 715-721
- Pullig, O., Weseloh, G., Klatt, A. R., Wagener, R. und Swoboda, B. (2002) *Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage* **10**: 253–263.
- Rao, Z., Handford, P., Mayhew, M., Knott, V., Brownlee, G. G., und Stuart, D. (1995) *The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions*. *Cell* **82**: 131-141
- Rehm, H. (2000). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Reinhardt, D., Mann, K., Nischt, R., Fox, J. W., Chu, M. L., Krieg, T., Timpl, R. (1993) *Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate Proteoglykan, and zinc*. *J Biol Chem*. **268**: 10881-7.
- Rivas, G., Minton, A. P. (1993) *New developments in the study of biomolecular associations via sedimentation equilibrium*. *Trends Biochem Sci*. **18**: 284-7. Review.
- Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M., Heinegård, D. (1998) *Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen*. *J Biol Chem*. **273**: 20397-403.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory
- Schmitz, M. (2005) *Etablierung und Charakterisierung von transgenen Mauslinien zur Untersuchung der Pathogenese von Chondrodysplasien*, Dissertation, Universität zu Köln
- Schuck, P. (1997) *Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors*. *Curr Opin Biotechnol*. **8**: 498-502. Review.
- Schuster, T. M., Toedt, J. M. (1996) *New revolutions in the evolution of analytical ultracentrifugation*. *Curr Opin Struct Biol*. **6**: 650-8. Review.
- Scott, G., Ryan, D. H., McCarthy, J. B. (1992) *Molecular mechanisms of human melanocyte attachment to fibronectin*. *J Invest Dermatol*. **99**: 787-94.
- Segat, D., Frie, C., Nitsche, D. P., Klatt, A. R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M. und Smyth, N. (2000) *Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart*. *Matrix Biol* **19**: 649-655
- Shaw, L. M., Olsen, B. R. (1991) *FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices*. *Trends Biochem Sci*. **16**: 191-4. Review.
- Singer, I. I., Kawka, D. W., Scott, S., Mumford, R. A., Lark, M. W. (1987) *The fibronectin cell attachment sequence Arg-Gly-Asp-Ser promotes focal contact formation during early fibroblast attachment and spreading*. *J Cell Biol*. **104**: 573-84.
- Stefansson, S. E., Jonsson, H., Ingvarsson, T., Manulescu, I., Jonsson, H. H., Olafsdottir, G., Palsdottir, E., Stefansdottir, G., Sveinbjornsdottir, G., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R. und Stefansson, K. (2003) *Genomewide scan for hand osteoarthritis: A novel mutation in matrilin-3*. *Am J Hum Genet* **72**: 1448-1459
- Stirpe, N. S. und Goetinck, P.F. (1989) *Gene regulation during cartilage differentiation: Temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb*. *Development* **107**: 23-33
- Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F. P., Fassler, R., Heinegård, D., Oldberg, A. (1999) *Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon*. *J Biol Chem*. **274**: 9636-47.
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J. H., Zhang, R., Joachimiak, A., Wang, J. H., Lawler, J. (2006) *The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin*. *Structure*. **14**: 33-42.

- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D. P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (2001) *Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX.* J Biol Chem. **276**: 6083-92.
- Timpl, R., Brown, J. C. (1994) *The laminins.* Matrix Biol. **14**: 275-81. Review.
- Turner, C. E. (2000) *Paxillin and focal adhesion signalling.* Nat Cell Biol. **2**: E231-6. Review.
- Tuckwell, D. (2002) *Identification and analysis of collagen alpha 1(XXI), a novel member of the FACIT collagen family.* Matrix Biol. **21**: 63-6.
- van der Rest, M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., and Olsen, B.R. (1985). *The structure of type IX collagen.* J Biol Chem **260**, 220-225.
- van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). *Collagen family of proteins.* Faseb J **5**: 2814-2823.
- van der Rest, M., Aubert-Foucher, E., Dublet, B., Eichenberger, D., Font, B., and Goldschmidt, D. (1991). *Structure and function of the fibril-associated collagens.* Biochem Soc Trans **19**: 820-824.
- Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F., Pawson, T. (1997) *The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen.* Mol Cell. **1**:13-23.
- Wagener, R., Kobbe, B., und Paulsson, M. (1997) *Primary structure of matrilin-3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin-1) and von Willebrand factor.* FEBS Lett **413**: 129-134
- Wagener, R., Kobbe, B. und Paulsson, M. (1998a) *Matrilin-4, a new member of the matrilin family of extracellular proteins.* FEBS Lett **436**: 123-127
- Wagener, R., Kobbe, B. und Paulsson, M. (1998b). *Genomic organisation, alternative splicing and primary structure of human matrilin-4.* FEBS Lett **438**: 165-170
- Wagener, R., Kobbe, B., Aszódi, A., Liu, Z., Beier, D.R., und Paulsson, M. (2000) *Structure and mapping of the mouse matrilin-3 gene (Matn3), a member of a gene family containing a U12-type AT-AC intron.* Mamm. Genome **11**: 85-90
- Wagener, R., Ehlen, H. W. A., Ko, Y. P., Kobbe, B., Mann, H. H., Sengle, G. und Paulsson, M. (2005) *The matrilins - adaptor proteins in the extracellular matrix.* FEBS Lett **579**: 3323-3329
- Watt, S. L., Lunstrum, G. P., McDonough, A. M., Keene, D. R., Burgeson, R. E., Morris, N. P. (1992) *Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage.* J Biol Chem. **267**:20093-9.
- Wennerberg, K., Lohikangas, L., Gullberg, D., Pfaff, M., Johansson, S., Fassler, R. (1996) *Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin.* J Cell Biol. **132**:227-38.
- Whittaker, C. A. und Hynes, R. O. (2002) *Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: Widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere.* Mol Biol Cell **13**: 3369-3387
- Wiberg, C., Klatt, A. R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J. F., Heinegård, D. und Mörgelin, M. (2003) *Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan.* J Biol Chem **278**: 37698-37704
- Wight, T. N., Kinsella, M. G., Qwarnstrom, E. E. (1992) *The role of Proteoglykans in cell adhesion, migration and proliferation.* Curr Opin Cell Biol. **5**:793-801. Review.
- Winder, S. J. (1997) *The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin.* J Muscle Res Cell Motil. **18**: 617-29. Review.
- Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M. und Goetinck, P. F. (1992) *Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage.* Dev Dyn **193**: 266-276
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., Keely, P. J. (2004) *Focal adhesion regulation of cell behavior.* Biochim Biophys Acta **1692**, 103-19. Review.

- Woods, A., Longley, R.L., Tumova, S., Couchman, J.R. (2000) *Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts*. Arch. Biochem. Biophys. **374**: 66-72.
- Woods, A., Oh, E.S., Couchman, J.R. (1998) *Syndecan Proteoglykans and cell adhesion*. Matrix Biol. **17**: 477-483.
- Wu, J. J. und Eyre, D. R. (1998) *Matrilin-3 forms disulfide-linked oligomers with matrilin-1 in bovine epiphyseal cartilage*. J Biol Chem **273**: 17433-17438
- Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G., Young, M. F. (1998) *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nat Genet. **20**: 78-82.
- Yamagata, M., Kimata, K.. (1992) *Chimeric collagens: functional modulators for major collagen fibrils*. Seikagaku. **64**: 26-32.
- Yurchenco, P. D., Schittny, J. C. (1990) *Molecular architecture of basement membranes*. FASEB J. **4**: 1577-90. Review.

Danksagung

Mein erster Dank an dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. Mats Paulsson für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, für das interessante Thema, die umfassende Förderung und die wirklich nette Unterstützung!

Direkt daran anschließend gilt mein Dank meinem direkten Betreuer Dr. Raimund Wagener für sein jederzeit offenes Ohr, die vielen nützlichen Diskussionen, die Förderung und Forderung, seine Hilfsbereitschaft und Geduld und alles weitere, was ich bei ihm lernen konnte!

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. W. Klein und Herrn Prof. Dr. T. Langer für die freundliche Übernahme des Coreferats und des Prüfungsvorsitz.

Ein Dankeschön geht außerdem auch an Prof. Dr. Sylvie Ricard-Blum, Lyon, für ihre unschätzbare Biacore-Lehrstunde und zahlreiche Biacore-Tipps!

Danke auch an unsere TA Birgit und die anderen TAs und Mitarbeiter, die immer wieder wertvolle Hilfen waren und so eine nette Arbeitsatmosphäre möglich machen.

Danke auch an die restlichen Wageners: Harry, unseren Ex-Wagener Sebastian, unsere Exil-Zaucke Christiane, Jan, Gerhard, Andreas und Patrick und natürlich den ganzen Kreis von tollen Kollegen der BC II für eine großartige Zeit mit toller Atmosphäre, für die Hilfen und Diskussionen, die gemütlichen Runden und die lustigen Parties.

An letzter aber wichtigster Stelle bedanke ich mich bei meiner kleinen Familie: bei Ruth für ihre Stärke und die Kraft, die sie mir gibt, und dafür, dass sie einfach da ist und dass wir all die vielen Schönen Sachen erleben dürfen. Und bei meinem kleinen Söhnchen, dafür, dass er mir schon jetzt, wo er noch so winzig klein ist, so viel gibt!

Zu guter Schluß sage ich meinen Eltern ein herzlichen Dankeschön für ihre Förderung und Unterstützung und ihr An-mich-glauben bei meinen Versuchen, zu erreichen, was ich will.

Teilpublikationen

Publikationen

Wagener R, Ehlen HW, Ko YP, Kobbe B, **Mann HH**, Sengle G, Paulsson M. *The matrilins -- adaptor proteins in the extracellular matrix*. FEBS Lett. 2005 Jun 13;579 (15):3323-9

Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. *Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias*. J Biol Chem. 2004 Jun 11;279(24):25294-8

Eingereichte

Publikationen

Mann HH, Sengle G, Eble J, Paulsson M, Wagener R. *Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation* Matrix Biol. März 2006

Vorträge

Mann, HH. *The Matrilins – A family of non-collagenous extracellular matrix proteins*. Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, Frankreich, April 2005

Poster

Mann, HH, Sengle G, Paulsson M, Wagener R. *Identification of Matrilin Interaction Partners* Symposium: Extracellular Matrix – A Bridge to Scandinavia, Münster, Deutschland

Mann, HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R. *Identification of Matrilin Interaction Partners* First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, März 2005, Köln, Deutschland

Mann, HH, Sengle G, Paulsson M, Wagener R. *Identification of Matrilin Interaction Partners* XIXth Meeting of the Federation of European Connective Tissue Societies, Juli 2004, Giardini Naxos/ Taormina, Italien

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. med. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, den

(Henning Mann)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Henning Mann

Geb.: 29.08.1974, Leverkusen

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Nationalität: deutsch

Anschrift: Konradstraße 3, 50937 Köln

Promotion

Seit 12/01

Zentrum für Biochemie der medizinischen Fakultät der
Universität zu Köln; Labor: Prof. Dr. M. Paulsson

*Identifizierung und Charakterisierung von
Interaktionspartnern der Matriline*

Diplomarbeit

11/00 – 10/01

Fred-Hutchinson-Cancer-Research-Center, Seattle,
Washington State, USA; Labor: Dr. Thomas Spies
*Studies on Expression of the N2DL Ligand of the
NKG2D-Receptor and their Function in Natural Killer
Cell Activation*

Hochschulbildung

10/95 – 10/01

Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Schwerpunkte: Genetik, Biochemie, Pharmakologie
Abschluss: Diplom Biologe

Praktika

4/99 – 9/99

Fred-Hutchinson-Cancer-Research-Center, Seattle,
Washington State, USA; Labor: Dr. Thomas Spies
*Isolation, Cloning and Sequencing of MIC-Gene from
various Mammal-DNA*

Zivildienst

8/94 – 10/95

Schreinerei in der Werkstatt für Behinderte, Leverkusen

Schulbildung

1985 – 1994

Landrat-Lucas-Gymnasium, Opladen, Leverkusen
Abschluss: Abitur

1981 – 1985

Grundschule Bergisch-Neukirchen, Leverkusen

Köln, 30.03.2006