

Zusammenfassung

VWA-Domänen sind eigenständige Faltungseinheiten mit einer Länge von etwa 200 Aminosäuren und kommen in einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Proteinen vor, wo sie hauptsächlich Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Eine in vielen VWA-Domänen konservierte Metallionen-abhängige Bindungsstelle, das MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) Motiv, ist häufig an der Bindung von Liganden beteiligt. Zwar wurden die dreidimensionalen Strukturen der VWA-Domänen einiger Proteine bereits gelöst, doch konnte vom phylogenetischen Zweig der Matrilin- und Kollagene bisher keine Struktur einer VWA-Domäne bestimmt werden. Matrilin und Kollagen VI sind VWA-Domänen enthaltende Proteine, die in der extrazellulären Matrix an der Organisation perizellulärer Netzwerke beteiligt sind, ihre VWA-Domänen vermitteln dabei Wechselwirkungen mit anderen Matrixproteinen.

Zur Strukturbestimmung einer Matrilin VWA-Domäne wurden verschiedene Konstrukte, Expressionsbedingungen und stabilisierende Agenzien zur Löslichkeitserhöhung getestet. Dabei zeigte sich eine erhöhte Löslichkeit der Matrilin-4 VWA2-Domäne bei Verwendung des One-STrEP-tags statt eines His-tags bei gleichzeitiger Zugabe von N-Ethylmaleimid zur Proteinklösung. Die Matrilin-4 VWA2-Domäne des Zebrafisches war außerdem deutlich stabiler als alle murinen Matrilin VWA-Domänen. Eukaryotisch exprimierte Matrilin VWA-Domänen wiesen trotz ähnlicher Circular dichroismus (CD) Spektren eine höhere Stabilität und unterschiedliche Bindungseigenschaften als die bakteriell exprimierten Proteindomänen auf. Dennoch war es nicht möglich, die Struktur einer Matrilin VWA-Domäne mittels NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenkristallographie zu bestimmen. Alternativ wurden Homologiemodelle der Matrilin-4 VWA2-Domäne erstellt, die als Grundlage für zukünftige Experimente zur Lokalisierung der Bindungsfläche dienen können.

Die Strukturen der Matrilin VWA-Domänen, die alle ein MIDAS-Motiv besitzen, zeigten eine Abhängigkeit zur Bindung von divalenten Kationen. In CD-Spektroskopie-Messungen wirkten sich Ca^{2+} und Zn^{2+} destabilisierend auf die thermische Stabilität aus, Mg^{2+} und Mn^{2+} hatten dagegen einen stabilisierenden Effekt. Ein ausgeprägter Konformationsunterschied nach Kationenbindung, wie er bei Integrin I-Domänen zu beobachten ist, konnte für die Matrilin-4 VWA2-Domäne in NMR-Messungen nicht festgestellt werden. Ein destabilisierender Effekt von Zn^{2+} zeigte sich auch bei der Kollagen VI $\alpha 3\text{N5}$ -Domäne, die kein MIDAS-Motiv besitzt, womit dieser Effekt vermutlich auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Bis auf Matrilin-2 VWA2 wiesen alle Matrilin VWA-Domänen in Oberflächenplasmonresonanz-Messungen eine Bindung an COMP auf.

Die Matrilin-1 VWA2-Domäne wies die höchste Assoziationsrate auf, während alle Matrilin VWA-Domänen ähnliche Dissoziationsraten bei der Bindung an COMP zeigten. Die N5-Domäne der $\alpha 3$ -Kette von Kollagen VI war deutlich stabiler als alle Matrilin VWA-Domänen, wies einen um 10-15°C erhöhten Schmelzpunkt auf und erzeugte ein qualitativ gutes NMR-Spektrum. Die Struktur dieser VWA-Domäne wurde mittels Röntgenkristallographie bestimmt. Zudem konnte die Struktur der R1064Q-Mutante der Kollagen VI $\alpha 3$ N5-Domäne gelöst werden, die eine muskuläre Dystrophie verursacht. Die Struktur der mutierten VWA-Domäne zeigte die gleiche Faltung zur N5-Domäne. Die mutierte Aminosäure nahm aber eine veränderte Orientierung im Kristall ein. Diese Struktur kann bei der Analyse des krankheitsverursachenden Mechanismus helfen. Die Sekretion der mutierten VWA-Domäne wurde nicht beeinträchtigt und in anfänglichen Interaktionsstudien konnten keine spezifischen Bindungspartner der N5-Domäne identifiziert werden. Die Struktur der N5-Domäne kann für ein verbessertes Modell der N-terminalen Region der $\alpha 3$ -Kette und als ein verbessertes Template für die Homologiemodellierung von Matrilin VWA-Domänen genutzt werden.