

AUS DEM
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MOLEKULARBIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
DIREKTOR: PROF. DR. RER. NAT. P. K. MÜLLER

**KOLLAGEN XVII:
EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG
REKOMBINANTER FRAGMENTE**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
- AUS DER TECHNISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT -

VORGELEGT VON
JANINE KORN
AUS WOLFSBURG

LÜBECK 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Notbohm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2007

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann
Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Struktur der Haut.....	1
1.1.1	Basalmembran.....	3
1.1.2	Hemidesmosomen.....	3
1.1.3	Die extrazelluläre Matrix.....	5
1.2	Die Protein-Familie der Kollagene.....	6
1.2.1	Transmembran-(TM-)Kollagene und kollagene TM-Proteine.....	6
1.3	Kollagen XVII.....	9
1.3.1	Primärsequenz.....	9
1.3.2	Struktur.....	10
1.3.3	Funktionale Analyse.....	12
1.3.4	Shedding.....	14
1.4	Pathologie.....	17
1.4.1	Kollagen XVII bei autoimmunen Erkrankungen.....	17
1.4.2	Kollagen XVII bei Erbkrankheiten.....	18
1.4.3	Kollagen XVII bei malignen Neoplasien.....	19
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	22
	Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte.....	22
2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
	Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
2.1.3	Reinigung der PCR-Produkte.....	24
2.1.4	Herstellung rekombinanter DNA.....	24
	Verwendete Vektoren.....	24
	Restriktionsenzym-Analysen.....	25
	Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase.....	25
	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
	Ligation.....	25
	Transformation kompetenter E.coli.....	26

2.1.5	Kultivierung prokaryotischer Zellen.....	26
	Herstellung von Agarplatten.....	26
	Flüssigkulturen von E.coli.....	27
	Anlegen eines Bakterien-Gefrierstocks	27
2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA	27
	Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA.....	28
2.1.7	Sequenzierungen	28
2.2	Zellkultur	28
2.2.1	Nährmedien, Additive und Chemikalien für die Zellkultur	28
2.2.2	Zellkulturtechniken	29
	Kultivierung eingefrorener Zellen.....	29
	Ablösen der Zellen zum Splitten/Passagieren oder Einfrieren.....	30
	Kryokonservierung von Zellen.....	30
	Zellzahl-Bestimmung.....	30
2.2.3	Transfektion von 293-EBNA-Zellen	30
2.2.4	Kultivierung von Zellen für die RT-PCR.....	31
2.2.5	Kultivierung von Zellen für Immunfluoreszenz-Färbungen.....	31
2.2.6	Sammeln von Kultivierungsmedium	31
2.2.7	Triton-Extrakt.....	32
2.3	RNA-Isolierung und RT-PCR	32
2.3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte.....	32
2.3.2	Gesamt-RNA-Isolierung	32
2.3.3	Reverse Transkription	33
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	33
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.4	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung	34
2.5	Aufreinigung der rekombinanten Proteine	36
2.5.1	Konzentration des Mediums / Ultrafiltration	36
2.5.2	Dialyse.....	36
2.5.3	Proteinreinigung mit Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC).....	37
	Gerät und Säulen.....	37
	Ionenaustausch-Chromatographie.....	37
	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie.....	38
	Gelfiltration.....	39

2.6	Proteinbiochemische Methoden	39
2.6.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
	Gesamtproteinkonzentration.....	39
	Konzentration eines (rekombinanten) Proteins	40
2.6.2	TCA-Fällung	40
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.6.4	Western-Blotting.....	43
	Nachweis von Proteinen nach Western-Blotting mit Antikörpern (Immunoblot).....	44
	Strippen von Blotmembranen.....	44
2.6.5	Analyse durch Trypsin-vermittelten Proteinabbau (Trypsin-Verdau)	45
2.7	Biophysikalische Analyse	46
2.7.1	Ultrastrukturelle Analyse: Rotations-Schrägbedampfung für nachfolgende Elektronenmikroskopie.....	46
2.7.2	CD-Spektroskopie	48
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Klonierung der rekombinanten Kollagen XVII-Expressions- Konstrukte und Transfektion der Zellen	50
3.1.1	Der Vektor pCEP-Pu und das BM40-Signalpeptid	50
3.1.2	Klonierung der Kollagen XVII-Konstrukte	51
3.1.3	Erzeugung transfizierter Zelllinien	56
3.2	Kontrolle der Zellen.....	57
3.2.1	Transfektion der Zellen: Nachweis der RNA mittels RT-PCR.....	57
3.2.2	Translation der rekombinanten Proteine: Triton-Extrakte und TCA- Fällung	59
3.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen: Kollagen XVII.....	61
3.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen: Integrine	63
3.4	Aufreinigung des konditionierten Mediums der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente	65
3.4.1	rColXVII-F	65
3.4.2	rColXVII-fd	65
3.4.3	rColXVII-ed	70
	Konzentrat.....	71
	Pellet.....	71
3.4.4	rColXVII-VL.....	78
3.4.5	rColXVII-E.....	79

3.5	Charakterisierung der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente	81
3.5.1	Trypsin-vermittelter Proteinabbau (Trypsin-Verdau)	81
3.5.2	Analyse durch CD-Spektroskopie.....	84
3.5.3	Ultrastrukturelle Analyse mit Elektronenmikroskopie nach Rotations-Schrägbedampfung.....	91
4	DISKUSSION.....	94
4.1	Entwurf, Klonierung, Expression und Aufreinigung der verschiedenen rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptide	95
4.2	Charakterisierung der rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptide	96
4.2.1	Untersuchung der Struktur und Bestimmung des Schmelzbereiches mit Trypsin-vermitteltem Proteinabbau (Trypsin-Verdau)	96
4.2.2	Untersuchung der Struktur und Bestimmung des Schmelzpunktes (T _m -Wert) mit spektraler und thermaler CD-Spektroskopie.....	98
4.2.3	Vergleich der gemessenen T _m -Werte mit der Literatur	99
4.2.4	Untersuchung der Strukturen mit Elektronenmikroskopie nach Rotations-Schrägbedampfung	101
4.3	Bedeutung der Coiled-Coil-Strukturen.....	103
4.4	Übersicht der Ergebnisse	104
4.5	Voruntersuchung für die Bindungsstudien.....	105
4.6	Schlußfolgerung	105
4.7	Ausblick	105
4.7.1	Bindungsstudien.....	106
	Zellbindungsstudien.....	106
	Protein-Protein-Interaktionen	107
	Untersuchungen zur Signaltransduktion	107
4.7.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Rotationsschrägbedampfung.....	107
4.7.3	Bestimmung der T _m -Werte von rekombinanten Kollagen XVII-Fragmenten mit intrazellulärem und transmembranem Anteil	107
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	109

6 ANHANG	111
6.1 Zirkulardichroismus	111
6.1.1 Polarisation von Licht	111
6.1.2 Optische Rotation und Zirkulardichroismus	115
Optische Rotationsdispersion (ORD).....	115
Zirkulardichroismus (CD).....	116
6.1.3 CD-Spektrometer	118
7 LITERATUR	119
8 ABBILDUNGEN	126
9 TABELLEN.....	128

Abkürzungen

AA	Amino acid (Aminosäuren, AS)
Abb.	Abbildung
ADAMs	A Disintegrin And Metalloproteinase
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
as	Antisense
bar	Einheit des Druckes
BBS	BES buffered saline (BES-gepufferte Salzlösung)
BCC	basal cell carcinoma (Basalzellkarzinom)
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BJ	Blue juice
BM	Basalmembran
bp	Base pairs (Basenpaare)
BP	Bullöses Pemphigoid
BPAG	Bullous pemphigoid antigen (Bullöses Pemphigoid-Antigen)
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Kollagen
C3	Complement 3 (Komplement 3)
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Circular dichroism (Zirkulardichroismus)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CIP	Calf intestine alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
CLAC-P	Collagen-like Alzheimer amyloid plaque component (kollagen-ähnliche Alzheimer amyloide Plaque-Komponente); Kollagen XXV
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalie Virus (Zytomegalie-Virus)
COL	Collagen (Kollagen)
CP	Cicatricial pemphigoid (vernarbendes Pemphigoid)
Cy3	Indocarbocyanin
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure, DNS)
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escheria coli
EB	Epidermolysis bullosa

EBNA	Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen (Epstein-Barr-Virus-spezifisches nukleäres Antigen)
ECL	Enhanced Chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
ECM	Extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop (hier: Transmissions-Elektronenmikroskop)
EtOH	Ethanol
FACIT	Fibril associated collagens with interrupted triplehelices (fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices)
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABEB	Generalisierte atrophische benigne Epidermolysis bullosa
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunden
HEK-Zellen	Human embryonic kidney (humane embryonale Nieren-) Zellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HRP	Horseradish-Peroxydase (Meerrettich-Peroxydase)
IEC	Ion exchange chromatography (Ionenaustausch-Chromatographie)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JEB	Junktionale Epidermolysis bullosa
JEB-H	JEB Herlitz
JEB-I	JEB inversa
JEB-lo	JEB late onset
JEB-nH	JEB non-Herlitz
JEB-PA	JEB mit pylorischer Atresie
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LAD	Lineare IgA-Dermatose
LB	Luria Broth
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar
mA	Milliampere
MACIT	Membrane associated collagens with interrupted triplehelices (Membranassoziierte Kollagen mit unterbrochenen Tripelhelices)

MAP-Kinase	Mitogen activated protein Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)
mdeg	Milligrad
mg	Mikrogramm
ml	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nichtkollagen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PA	Pylorische Atresie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PG	Pemphigoid gestationis
rColXVII-	Rekombinantes Kollagen XVII
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure, RNS)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sense
s, sec	Sekunde
SAPK	Stress activated protein kinase (Stress-aktivierte Protein-Kinase)
SCC	Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumina
Tab.	Tabelle
TACE	TNF-alpha converting enzyme
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered saline with Tween (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)
TCA	Trichloracetat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop/-mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelzpunkt
TM	Transmembran
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Trp	Tryptophan
TV	Trypsin-Verdau
Tyr	Tyrosin
u	Unit
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol
λ	Wellenlänge
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur der Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Körpers dar und dient sowohl als Barriere gegen Umgebung und äußere Einflüsse als auch zur Aufrechterhaltung der physikalischen Unversehrtheit des Körpers.

Die Haut schützt den Körper vor chemischen, mechanischen und thermischen Schäden, vor zahlreichen Krankheitserregern und vor verschiedenen Strahlen. Sie dient der Regulation von Temperatur und Wasserhaushalt und ist ein Teil des Immunsystems. Durch nervöse Strukturen ist die Wahrnehmung von Druck, Schmerz und Temperatur möglich [SCHIEBLER 1999; JUNG 2002].

Die beiden Hauptgewebe der Haut sind die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut), die fest miteinander verbunden sind (**Abb. 1.1**).

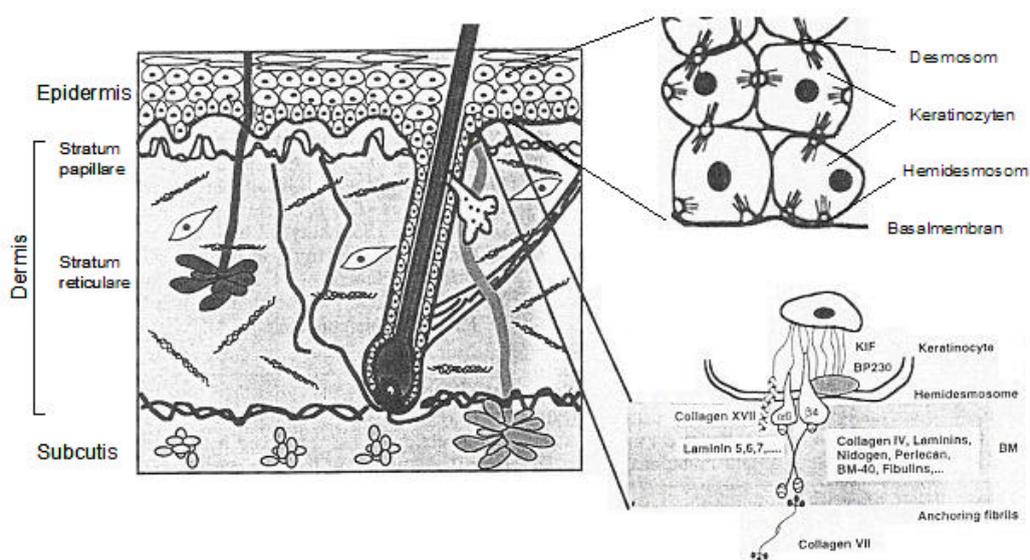


Abb. 1.1: Schematische Übersicht der Haut

Auf der linken Seite ist die Struktur der Haut, bestehend aus Epidermis und Dermis, zu sehen, die von der Basalmembran separiert werden.

Die Epidermis und die Basalmembranzone mit Desmosomen zwischen den einzelnen Keratinozyten und Hemidesmosomen zwischen Keratinozyten und Basalmembran sind auf der rechten Seite vergrößert dargestellt [nach KORGE UND KRIEG 1996].

Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem verhorntem Plattenepithel, welches die unterliegende Dermis bedeckt. Der primär vorkommende Zelltyp der Epidermis sind die Keratinozyten, die über Desmosomen (Zell-Zell-Verbindungen) mit den Keratinozyten der anderen Zellagen und über Hemidesmosomen (Zell-Matrix-Verbindungen) an die

Basalmembran und die extrazelluläre Matrix angeheftet sind [UITTO UND CHRISTIANO 1992; CHRISTIANO UND UITTO 1996A, 1996B; KIRFEL UND HERZOG 2004]. Als weitere Zellen findet man die für die Produktion des Pigmentes Melanin zuständigen Melanozyten, die Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen als Mechanorezeptoren sowie Lymphozyten (Immunabwehr) vor (Abb. 1.2) [SCHIEBLER 1999].

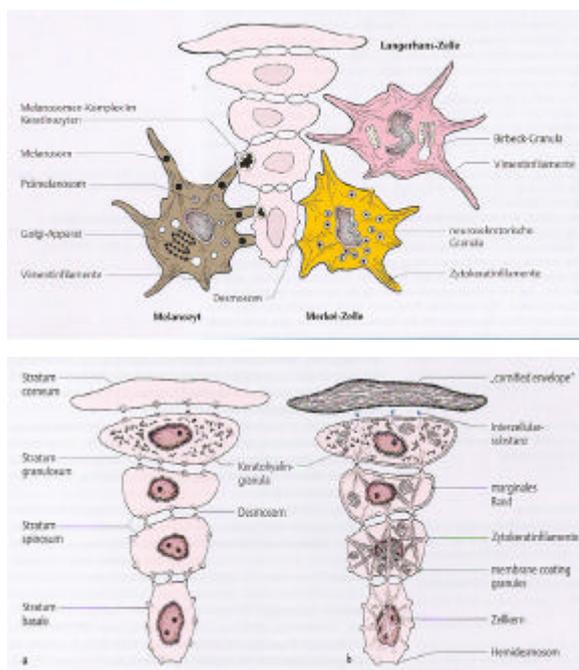


Abb. 1.2: Zellen der Epidermis

Oben: Schematische elektronenmikroskopische Darstellung der Keratinozyten und der dendritischen epidermalen Zellen (Melanozyten, Merkel- und Langerhans-Zellen). Keratinozyten sind miteinander und mit Merkel-Zellen über Desmosomen verbunden [Jung 2002].

Unten: Schematische mikroskopische Darstellung der Keratinozyten in den Hautschichten. a: lichtmikroskopisch, b: elektronenmikroskopisch [JUNG 2002].

Die Dermis dagegen besteht aus kompaktem, fibroelastischem Bindegewebe, in das ein komplexes Netzwerk aus Gefäßen, Nerven, sekretierenden und exkretierenden Drüsen und keratinisierten epidermalen Anhängen und Fortsätzen wie Haar und Nägel integriert ist.

Die Neubildung von Epithelzellen erfolgt in der untersten Zellage. Von hier gelangen die Zellen zur Oberfläche, wobei es in mittleren Epithellagen zur Verhornung kommt. Schließlich bilden sich oberflächlich Hornschuppen, die abgestoßen werden. Die Regeneration erfolgt über Epithelzellverbände, welche einer fortlaufenden physiologischen Erneuerung unterliegen. Diese kann unterschiedlich schnell ablaufen (Epidermis ca. 30 Tage) [JUNG 2002].

Für die Befestigung der Epidermis an der Dermis spielt die Basalmembran, die dicht unter den basalen Epithelzellen liegt, eine wichtige Rolle.

Die dermo-epidermale Verbindung der beiden Gewebe wird durch Hemidesmosomen an basalen Keratinozyten und Ankerfasern aus dem Stratum papillare, der oberen Schicht der Dermis gewährleistet [SCHIEBLER 1999; JUNG 2002].

1.1.1 Basalmembran

Die Basalmembran grenzt das Epithel gegen das daruntergelegene Gewebe ab. Sie ist eine 20-200 nm dicke, extrazellulär gelegene Struktur, an der die Epithelzellen durch transmembrane Verbindungen befestigt sind [SCHIEBLER 1999].

Im Elektronenmikroskop erkennt man drei morphologisch unterscheidbare Schichten. Die elektronendurchlässige *Lamina lucida* (oder *Lamina rara*) liegt unmittelbar an der zellulären Plasmamembran an und enthält Kollagen XVII und das Integrin $\alpha 6\beta 4$. Darunter befindet sich die elektronendichte *Lamina densa*, zu deren Hauptbestandteilen die Glykoproteine Laminin und Nidogen sowie das nicht-fibrillenbildende Kollagen IV gehören, das der Basalmembran wichtige mechanische Eigenschaften wie Stabilität und Flexibilität verleiht. Die dritte Schicht bildet die *Lamina fibroreticulares*, die über Verankerungsfibrillen und -plaques von dem darunterliegenden Bindegewebe abgetrennt ist. Diese Verankerungsfibrillen sind aus Kollagen VII aufgebaut.

Weitere Bestandteile der Basalmembran sind das Glykoprotein Fibronectin, Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat und Heparansulfat sowie Proteoglykane (z.B. Perlecan oder Decorin) [SCHIEBLER 1999; JUNG 2002].

1.1.2 Hemidesmosomen

Hemidesmosomen (**Abb. 1.3**) sind komplexe molekulare Verbindungen, die entlang der basalen Schicht der Epithelzellen lokalisiert sind und die Adhäsion der Keratinozyten zur unterliegenden Basalmembran durch Ankerproteine vermitteln (**Abb. 1.4**). Hemidesmosomen haben die charakteristische Struktur eines Desmosoms (umschriebene Zellkontakte zwischen zwei Zellen), allerdings weisen sie nur auf einer Seite eine Kontaktzone der Epithelzelle mit der extrazellulären Matrix auf. Sie sind aus einem intrazellulären Plaque und einer Transmembrankomponente zusammengesetzt, die sich in die *Lamina lucida* der dermo-epidermalen Basalmembran ausdehnt (**Abb. 1.3**) [GARROD 1993]. Hemidesmosomen sind assoziiert mit subbasalen dichten Plaques in der *Lamina lucida* und sind mit feinen, fadenartigen Ankerfilamenten mit der *Lamina densa* verbunden, wo sie mit dickeren Ankerfibrillen in Kontakt treten und eine Verbindung zu darunterliegenden Kollagenfibrillen des Bindegewebes herstellen [BORRADORI UND SONNENBERG 1999].

Der innere hemidesmosomale Plaque besteht aus zwei Proteinen der Plakin-Familie, HD1/Plektin und BP230/BPAG1, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Intermediärfilament-Netzwerkes (z.B. Keratine) am Hemidesmosom spielen [UITTO UND PULKKINEN 1996].

HD1/Plektin ist ein großes, zytoskelett-assoziiertes Phosphoprotein von etwa 500 kD, das in einer Vielzahl von einfachen und geschichteten Epithelien exprimiert wird, wo es als multifunktionaler zytoskeletaler Linker fungiert [WICHE ET AL. 1998]. Es konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Domäne von Plektin Keratine, Neurofilamente und Vimentin *in vitro* bindet. Die N-terminale Domäne enthält Sequenzen, die mit dem zytoplasmatischen Ende des $\beta 4$ -Integrin interagieren [REZNICZEK ET AL. 1998].

BP230 ist ein intrazelluläres, nichtkollagenes, 230 kD großes Protein, das am inneren hemidesmosomalen Plaque lokalisiert und vermutlich an der Adhäsion von Keratinen an

den Hemidesmosomen beteiligt ist [SAWAMURA ET AL. 1991]. Die C-terminale Domäne von BP230 kann mit Intermediärfilamenten assoziieren, was seine Rolle im Attachment der Keratin-Intermediärfilamente zum hemidesmosomalen Plaque zeigt [YANG ET AL. 1996].

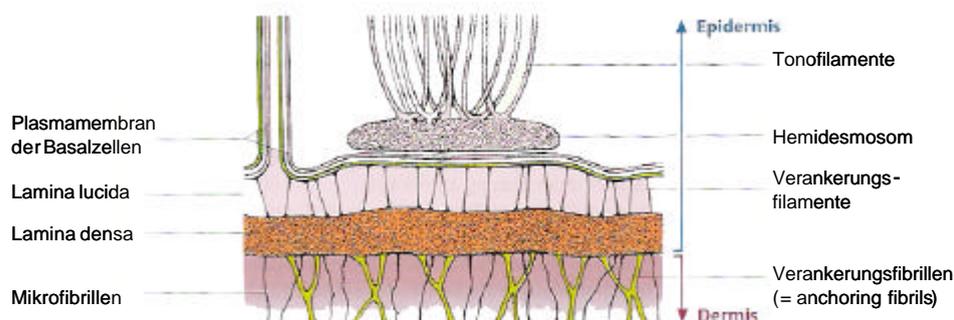


Abb. 1.3: Schema der dermo-epidermalen Junctionszone

Die basalen Keratinozyten sind über Hemidesmosomen, die die Adhäsion durch Ankerproteine vermitteln, mit der Basalmembran (Lamina lucida und Lamina densa) verbunden [Jung 2002].

Die transmembrane Komponente der Hemidesmosomen besteht aus dem epidermalen Integrin $\alpha 6\beta 4$ [HOGERVORST ET AL. 1990; TAMURA ET AL. 1990; KOSTER ET AL. 2003] und Kollagen XVII, auch als BP180, BPAG2 oder HD4 bezeichnet [DIAZ ET AL. 1990].

Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist begrenzt auf die ventrale Oberfläche, die der Basalmembran gegenüberliegt, was die Beteiligung an der Zell-Matrix-Adhäsion unterstreicht [CARTER ET AL. 1990]. Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist ein heterodimeres Transmembranprotein, bekannt als Rezeptor für verschiedene Laminin-Isoformen inklusive Laminin 5 [HIRAKO UND OWARIBE 1998]. Die intrazelluläre Domäne bildet eine stabile Verbindung mit Plektin, und dieser Komplex fungiert als initialer Kern bei der Bildung des Ankerkomplexes [NIESSEN ET AL. 1996]. Dieses Integrin kann auch Signale von der extrazellulären Matrix in die Zelle übertragen, welche Genexpression und Zellwachstum regulieren [JONES ET AL. 1991; GREEN UND JONES 1996; GIANCOTTI 1996].

Die andere Komponente ist Kollagen XVII, das weiter unten in einem separaten Kapitel (1.3) im Detail beschrieben wird.

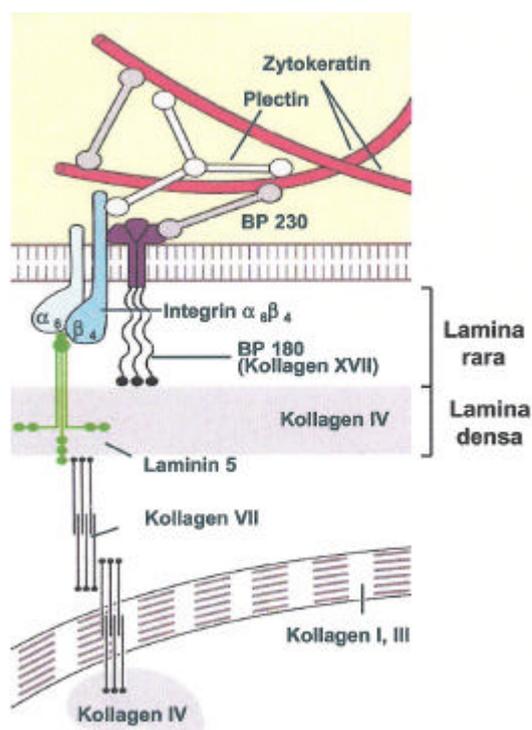


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Zell-Matrix-Kontakte

Im inneren hemidesmosomalen Plaques sind Plectin (HD1) und BP230 über Zytokeratin verankert. Die transmembranäre Komponente des Hemidesmosoms wird durch Integrin $\alpha_6\beta_4$ und Kollagen XVII gebildet und verbindet den Proteinkomplex über Laminin 5 und Kollagen IV an das darunterliegende Gewebe.

1.1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist aus einer Vielzahl unlöslicher Fasern, Mikrofibrillen, löslichen Proteinen und Glykoproteinen zusammengesetzt. Sie ist für die mechanische Stabilität von Geweben und deren physiochemische Eigenschaften und für die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen verantwortlich und dient zudem als Substrat für spezifische Zelladhäsion und -migration [ADAMS UND WATT 1993]. Desweiteren übt die extrazelluläre Matrix über ihre Zusammensetzung und Struktur auch eine regulierende Rolle bei der Förderung und Aufrechterhaltung der zellulären Differenzierung und phänotypischen Expression aus, wodurch eine spezifische und lokalisierte Signaltransduktion an die Zellen erlaubt ist [BISELL UND BARCELLOS-HOFF 1987].

Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix bilden die Mitglieder der Familie der Kollagene. Diese vielfältige Proteinfamilie formt das Hauptstrukturelement des Bindegewebes. Viele weitere Proteine tragen zusätzlich zur einmaligen funktionellen und biologischen Charakteristik von Gewebe bei, wie z.B. Proteoglykane und Glykoproteine, elastische Proteine und Glykosaminoglykane.

1.2 Die Protein-Familie der Kollagene

Kollagene sind definiert als tripelhelikale Proteine mit sich wiederholender Gly-X-Y-Aminosäuresequenz. Die Familie der Kollagene beinhaltet derzeit 27 Kollagene (Tab. 1.1), die aus über 40 spezifischen α -Ketten zusammengesetzt sind [ENGEL UND BÄCHINGER 2005].

Aufgrund ihrer strukturellen Charakteristik können die Kollagene in zwei Gruppen aufgeteilt werden, die der fibrillenbildenden und der nicht-fibrillenbildenden Kollagene [PROCKOP UND KIVIRIKKO 1995].

Die Kollagene der ersten Gruppe (Typen I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) fügen sich zu auffälligen fibrillären Strukturen in vielen kollagen-enthaltenden Geweben zusammen. Diese strukturell homologen Moleküle sind charakterisiert durch eine lange, ununterbrochene kollagene Tripelhelix.

Die Kollagene der anderen Gruppe sind nicht in der Lage, Fibrillen zu bilden und zeigen eine beachtliche Diversität in Struktur, makromolekularer Organisation, Gewebeverteilung und Funktion. Ein gemeinsames besonderes Merkmal der nicht-fibrillenbildenden Kollagene sind eine oder mehrere Unterbrechungen der kollagenen Gly-X-Y-Sequenz. Man unterscheidet verschiedene Unterfamilien:

- die Netzwerk-formenden Kollagene Typ IV (Basalmembrankollagen) und Typen VIII und X (short chain collagens),
- die fibrillen-assoziierten Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT: **f**ibril **a**ssociated **c**ollagens with **i**nterrupted **t**riple **h**elices) Typen IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX und XXI),
- das "aufgefädelt" Filament-bildende Kollagen Typ VI,
- das Ankerfibrillenkollagen Typ VII,
- die Multiplexine (multiple **t**riple **h**elix domains and **i**nterruptions) Typen XV und XVIII
- und die Transmembran- (TM-) Kollagene (MACIT: **m**embrane **a**ssociated **c**ollagens with **i**nterrupted **t**riple **h**elices) Typen XIII, XVII, XXIII und XXV/CLAC-P mit einer Transmembran-Domäne [ENGEL UND BÄCHINGER 2005].

Tripelhelix-formende Gly-X-Y-Repeats finden sich auch in Proteinen, die nicht zu den Kollagenen gezählt werden, z.B. Makrophagen Scavenger Rezeptor A, MARCO Rezeptor, Ektodysplasmin A (alles *membrane collagen-like proteins*, den MACITs entsprechend), Komplement Protein C1q, Lungen Surfactant Proteine A und D, Mannose Bindungsprotein, Fikoline u.a. [ENGEL UND BÄCHINGER 2005].

1.2.1 Transmembran-(TM-)Kollagene und kollagene TM-Proteine

Die TM-Kollagene unterscheiden sich von den anderen nichtfibrillären Kollagenen, da sie nicht in voller Länge in die extrazelluläre Matrix sekretiert [PIHLAJANIEMI UND REHN 1995], sondern mit ihrer TM-Region in die Zellmembran eingebaut werden [HÄGG ET AL. 1998]. Die vier Mitglieder dieser Gruppe sind bis auf die allen gemeinsame TM-Region nahe dem N-Terminus strukturell nicht homolog.

Tab. 1.1: Kollagene

Die zurzeit bekannten 27 Kollagen-Typen, die aus 42 verschiedenen Polypeptidketten zusammengesetzt sind, aufgeführt mit Informationen zu Kettenzusammensetzung, molekularer Zusammensetzung, Unterfamilien, Gewebeverteilung und Pathologie [nach BRINCKMANN 2005].

Type	Chain composition	Molecules	Subfamily	Tissue distribution (selection)	Pathology
I	a1(I), a2(I)	[a1(I)] ₂ a2(I) ; [a1(I)] ₃	Fibrillar	Widespread: skin, bone, tendon, ligament, cornea	Osteogenesis imperfecta I-IV, Arthrochalatic type of Ehlers-Danlos syndrome (VIIA, VIIB), Classical type of Ehlers-Danlos syndrome
II	a1(II)	[a1(II)] ₃	Fibrillar	Cartilage, vitreous	Achondrogenesis II, Hypochondrogenesis, Spondyloepiphyseal dysplasia congenita, Kniest dysplasia, Late onset Spondyloepiphyseal dysplasia, Stickler dysplasia
III	a1(III)	[a1(III)] ₃	Fibrillar	Skin, vessel, intestine, uterus	Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome, Hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome (rare), familial aortic aneurysm
IV	a1(IV), a2(IV), a3(IV), a4(IV), a5(IV), a6(IV)	[a1(IV)] ₂ a2(IV) ; a3(IV) a4(IV) a5(IV) ; [a5(IV)] ₂ a6(IV)	Network	Basement membranes	Alport syndrome, Benign familial hematuria
V	a1(V), a2(V), a3(V), a4(V) (rat)	[a1(V)] ₂ a2(V) ; [a1(V)] ₃ ; a1(V) a2(V) a3(V)	Fibrillar	Widespread: Bone, skin, cornea, placenta, Schwann cell (rat)	Classical type of Ehlers-Danlos syndrome
VI	a1(VI), a2(VI), a3(VI)	a1(VI) a2(VI) a3(VI)	Network (also: microfibrils, broad banded structures)	Widespread: Bone, cartilage, cornea, skin, vessel	Bethlem myopathy, Ullrich congenital muscular dystrophy
VII	a1(VII)	[a1(VII)] ₃	Anchoring fibrils	Skin, bladder, oral mucosa, umbilical cord, amnion	Epidermolysis bullosa dystrophica
VIII	a1(VIII), a2(VIII)	[a1(VIII)] ₂ a2(VIII) ; [a1(VIII)] ₃ ; [a2(VIII)] ₃	Network	Widespread: Descemet's membrane, vessel, bone, brain, heart, kidney, skin, cartilage	Fuchs endothelial corneal dystrophy
IX	a1(IX), a2(IX), a3(IX)	a1(IX) a2(IX) a3(IX)	FACIT*	Cartilage, cornea, vitreous	Multiple epiphyseal dysplasia
X	a1(X)	[a1(X)] ₃	Network	Hypertrophic cartilage	Schmid metaphyseal chondrodysplasia
XI	a1(XI), a2(XI), a3(XI)	a1(XI) a2(XI) a3(XI)	Fibrillar	Cartilage, intervertebral disc	Stickler syndrome type II, Marshall syndrome
XII	a1(XII)	[a1(XII)] ₃	FACIT*	Skin, tendon, cartilage	?
XIII	a1(XIII)	Homotrimer ?	Transmembrane	Endothelial cells, skin, eye, heart, skeletal muscle	?
XIV	a1(XIV)	[a1(XIV)] ₃	FACIT*	Widespread: vessel, bone, skin, cartilage, eye, nerve, tendon, uterus	?
XV	a1(XV)	Homotrimer ?	MULTIPLEXIN*	Capillaries, skin placenta, kidney, heart, ovary, testis	?
XVI	a1(XVI)	Homotrimer ?	FACIT*	Heart, kidney, smooth muscle, kin	?
XVII	a1(XVII)	[a1(XVII)] ₃	Transmembrane	Hemidesmosomes in epithelia	Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa, junctional epidermolysis bullosa localisata
XVIII	a1(XVIII)	Homotrimer ?	MULTIPLEXIN*	Perivascular basement membrane, kidney, liver, lung	Knobloch syndrome
XIX	a1(XIX)	Homotrimer ?	FACIT*	Basement membrane zone in skeletal muscle, spleen, prostate, kidney, liver, placenta, colon, skin	?
XX	a1(XX) , (chick)	Homotrimer ?	FACIT*	Corneal epithelium (chick)	?

Type	Chain composition	Molecules	Subfamily	Tissue distribution (selection)	Pathology
XXI	a1 (XXI)	Homotrimer ?	FACIT*	Vessel, heart, stomach, kidney, skeletal muscle, placenta	?
XXII	a1 (XXII)	Homotrimer ?	FACIT*	Tissue junctions (myotendinous junction in skeletal and heart muscle, articular cartilage-synovial fluid junction, border between the anagen hair follicle and the dermis in the skin)	?
XXIII	a1 (XXIII)	Homotrimer ?	Transmembrane	Heart, retina, metastatic cancer cells	?
XXIV	a1 (XXIV)	Homotrimer ?	Fibrillar	Bone, cornea	?
XXV (CLAC-P***)	a1 (XXV)	Homotrimer ?	Transmembrane	Brain, heart, testis, eye	?
XXVI	a1 (XXVI)	Homotrimer ?	?	Testis, ovary	?
XXVII	a1 (XXVII)	Homotrimer ?	Fibrillar	Cartilage	?

* Fibril associated collagens with interrupted triplehelices.

** Multiple triple helix and interruptions.

*** Collagen-like Alzheimer amyloid component precursor.

Kollagene TM-Proteine sind eine herausragende Gruppe von biologisch vielseitigen Molekülen, die als Zelloberflächen-Rezeptoren und als Matrix-Moleküle fungieren. Die Gruppe der kollagenen TM-Proteine enthält gegenwärtig sieben Mitglieder, die in einer großen Varietät von Geweben vorkommen: die eng verwandten TM-Kollagene XIII, XVII, XXIII (wahrscheinlich in Zelladhäsion involviert) und XXV/CLAC-Precursor (hirnspezifisch, eine Komponente von amyloiden Alzheimer-Plaques) und die weitläufiger verwandten Proteine Ektodysplasin A, Klasse A Makrophagen Scavenger Rezeptor und MARCO [PIHLAJANIEMI UND REHN 1995; TENNER 1999; SNELLMAN ET AL. 2000; CHEN ET AL. 2001; FRANZKE ET AL. 2003].

Diese sieben Gruppen-Mitglieder haben interessante strukturelle Ähnlichkeiten. Sie sind integrale Membran-Proteine in Typ II Orientierung - eine seltene Orientierung, die nur in 5% der gesamten Membran-Proteine vorkommt - und haben eine oder mehrere kollagene Domänen im extrazellulären C-Terminus, durchsetzt mit nichtkollagenen Strecken, die der Ektodomäne strukturelle Flexibilität verleihen. Alle Membrankollagene enthalten eine hydrophobe TM-Domäne [TENNER 1999] und mindestens eine konservierte Coiled-coil-Sequenz (Linkerdomäne), die direkt an die extrazelluläre Oberseite der Zellmembran angrenzt und vermutlich eine essentielle Rolle bei der Trimerisierung und Tripelhelix-Faltung spielt [RICARD-BLUM ET AL. 2005; SNELLMAN ET AL. 2000; LATVANLEHTO ET AL. 2003; MCALINDEN ET AL. 2003]. Die Ektodomänen von zumindest einigen dieser Moleküle werden durch Proteinase selektiv von der Zelloberfläche freigesetzt (Shedding), was eine kürzere Form des Kollagens in der extrazellulären Matrix ergibt. Diese löslichen Matrixmoleküle liegen nach Ihrer Freisetzung in den extrazellulären Raum als Trimere vor [SCHÄCKE ET AL 1998; FRANZKE ET AL. 2002]. Diese gesheddeten Ektodomänen der Membrankollagene können strukturelle und regulatorische Aufgaben haben und sind für Bindungen an andere ECM-Komponenten verantwortlich [NYKVIST ET AL. 2000; NYKVIST ET AL. 2001].

Die kollagenen TM-Proteine werden in vielen verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert und sind in ein breites Spektrum von biologischen Funktionen eingebunden, die von Epithel- und Neural-Zell-Adhäsion und epithelial-mesenchymalen Interaktionen während der Morphogenese bis zu Wirtabwehr gegen mikrobielle Einflüsse reichen. Verschiedene Gruppenmitglieder sind auch in die molekulare Pathologie von genetischen und erworbenen Krankheiten wie Epidermolysis bullosa, Ektodermale Dysplasie, Bullöses Pemphigoid oder Alzheimer involviert. Ein umfassend untersuchtes Mitglied ist Kollagen XVII, ein Keratinozyten-Oberflächen-Protein, das die Epidermis an die Basalmembran anheftet.

1.3 Kollagen XVII

Kollagen XVII, auch BP180 oder BPAG2 genannt, wurde erstmals als durch Autoantikörper gebundenes Autoantigen von Patienten mit Bullösem Pemphigoid erkannt, einer subepidermalen blasenbildenden Hauterkrankung, die typischerweise in älteren Patienten auftritt. Inzwischen ist Kollagen XVII auch als Teil der Autoantikörper von Patienten mit anderen immunobullösen Erkrankungen bekannt. Eine gegen Kollagen XVII-Antigene gerichtete autoimmune Antwort ist mit verschiedenen bullösen Erkrankungen assoziiert: Bullöses Pemphigoid, Vernarbendes Pemphigoid, Schwangerschaftspemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Lineare IgA-Dermatose und Lichen Planus Pemphigoid [VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003], die in Kap. 1.4.1 näher beschrieben werden.

Zusätzlich zu seiner Rolle in diesen erworbenen Autoimmun-Hauterkrankungen konnte gezeigt werden, daß Defekte im Gen *COL17A1*, das für Kollagen XVII codiert, verantwortlich für verschiedene Formen von Junktionaler Epidermolysis Bullosa sind, bei der die Ankerkomplexe inkomplett geformt sind (siehe Kap. 1.4.2) [VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003].

Kollagen XVII befindet sich im Hemidesmosom-Ankerfilament-Komplex, wo es mit den hemidesmosomalen Komponenten BP230, Plektin und Integrin $\alpha 6\beta 4$ (**Abb. 1.4**) interagiert [KOSTER ET AL. 2003] und eine wichtige Funktion beim Attachment der basalen Keratinozyten an die unterliegende epidermale Basalmembran einnimmt [FRANZKE ET AL. 2003; VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003]. Außerdem gehört Kollagen XVII zu den biologisch wichtigen Transmembranmolekülen, die durch Shedding von der Zelloberfläche freigesetzt werden, um ihre Funktionen zu regulieren. Nicht zuletzt stellt die lösliche Ektodomäne von Kollagen XVII ein zusätzliches Autoantigen dar, das eine Rolle bei den bullösen Autoimmunerkrankungen spielt.

1.3.1 Primärsequenz

Kollagen XVII ist ein 180 kD großes, integrales, transmembranes Typ II-Glykoprotein. Es besteht aus 1497 Aminosäuren (aa) und besitzt eine aminoterminal intrazelluläre Domäne (466 aa), eine hydrophobe transmembrane Domäne (23 aa) und eine carboxyterminale extrazelluläre Domäne (1008 aa) [GIUDICE ET AL. 1992]. Diese C-terminale Ekto-

domäne enthält 15 kollagene Untereinheiten (COL1-15), die von 16 kurzen, nicht-kollagenen Sequenzen durchsetzt sind (NC1-16) und die kollagen-ähnliche Tripelhelices bilden [GIUDICE ET AL. 1992; HOPKINSON ET AL. 1992; LI ET AL. 1993; NISHIZAWA ET AL. 1993; FRANZKE ET AL. 2003]. Aufgrund seiner Strukturmerkmale wurde das Protein später den Kollagenen zugeordnet, der ursprüngliche Name Bullöses Pemphigoid-Antigen 2 (BPAG2) bzw. BP180 in Kollagen XVII umgeändert und das zugehörige Polypeptid als $\alpha 1$ (XVII)-Kette bezeichnet.

Chromosomale in situ-Hybridisierung zeigte, daß das $\alpha 1$ (XVII)-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 10 am Locus 10q24.3 lokalisiert ist [LI ET AL. 1991]. Das Gen besitzt 56 ausgeprägte Exons, die von 27 bis 390 bp variieren und von denen 17 Exons für die kollagenen Domänen codieren [LI ET AL. 1991; LI ET AL. 1993].

1.3.2 Struktur

Kollagen XVII wurde erstmals aus Rinderhaut aufgereinigt [HIRAKO ET AL. 1996] und nach Rotationsbedampfung im Elektronenmikroskop (EM) abgebildet. Die EM-Bilder zeigen ein Molekül, das, ähnlich einer Musiknote, aus einem globulären Kopf, einem zentralen Stab und einem flexiblen Schwanz besteht (**Abb. 1.5**). Diese Domänen wurden mit der Primärsequenz korreliert. Man geht davon aus, daß der globuläre Kopf ca. 25-35 nm im Durchmesser beträgt und der zytoplasmatischen Region entspricht. Das zentrale Stäbchen, das ca. 60-70 nm lang ist, korrespondiert mit der größten kollagenen Domäne C15, während der flexible Schwanz mit ca. 100-130 nm Länge mit den unterbrochenen kollagenen Domänen der extrazellulären Region übereinstimmt (siehe **Abb. 1.5**) [HIRAKO ET AL. 1996].

Diese Annahmen wurden durch die Analyse der 120 kD großen Ektodomäne gestützt. Dieses Fragment besteht aus einem zentralen Stäbchen und einem flexiblen Schwanz, der globuläre Kopf jedoch fehlt [HIRAKO ET AL. 1998]. Daraus läßt sich schließen, daß der globuläre Kopf dem zytoplasmatischen Anteil des Moleküls entspricht.

In der menschlichen Haut findet man Kollagen XVII in zwei molekularen Formen [SCHÄCKE ET AL. 1998]. Die Vollängen-Form von Kollagen XVII liegt als homotrimeres trans-membranes Molekül aus drei 180 kD- $\alpha 1$ (XVII)-Ketten vor. Die gescheddete Form ist ein 120 kD-Polypeptid, das der Ektodomäne entspricht [SCHÄCKE ET AL. 1998]. Diese lösliche Ektodomäne wird aus der membrangebundenen Vollängen-Form freigesetzt. Dieser als Shedding bezeichnete Vorgang erfolgt durch Proteinasen der ADAMs-Familie (**A** Disintegrin **And** **M**etalloproteinase) und weiter unten ausführlicher beschrieben (siehe Kap. 1.3.4).

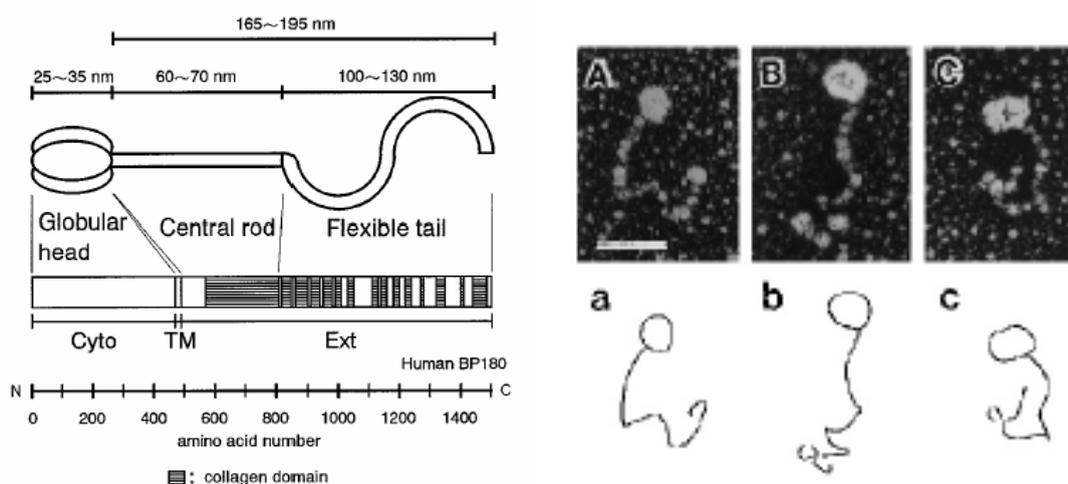


Abb. 1.5: Kollagen XVII

Links: Schematische Darstellung von Kollagen XVII. Form und Abmessungen des Modells (oben) basieren auf den elektronenmikroskopischen Bildern. Die schematische Domänen-Organisation von humanem Kollagen XVII (unten) stützt sich auf die primären strukturellen Analysen von GIUDICE ET AL. [1992]. Cyto: zytoplasmatischer, TM: transmembraner und Ext: extrazellulärer Anteil [HIRAKO ET AL. 1996].

Rechts: Kollagen XVII nach Rotationsbedampfung im Elektronenmikroskop. Die Abbildung zeigt drei repräsentative Moleküle (A, B, C) und ihre Interpretation in gezeichneten Linien (a, b, c) [HIRAKO ET AL. 1996].

In verschiedenen Studien wurde die Konformation der Kollagen XVII-Ektodomäne untersucht [SCHÄCKE ET AL. 1998; BALDING ET AL. 1997; TASANEN ET AL. 2000A]. Dabei wurde gezeigt, daß eine tripelhelikale Struktur vorliegt und daß - im Gegensatz zu fibrillenbildenden Kollagenen - keine Propeptide für die Faltung von Kollagen XVII erforderlich sind. Korrekte Tripelhelixbildung von Fibrillen-assoziierten Kollagenen mit unterbrochenen Tripelhelices (FACITs) findet sogar statt, wenn nichthelikale Enden am C-Terminus von rekombinant produzierten kollagenen Molekülen entfernt werden, wie für Kollagen XII gezeigt werden konnte [MAZZORANA ET AL. 1995]. Bei membrangebundenen Kollagenen wie Kollagen XIII und XVII wurde gezeigt, daß die Tripelhelixbildung vom N- zum C-terminalen Ende stattfindet [AREIDA ET AL. 2001; SNELLMAN ET AL. 2000].

Verschiedene Untersuchungen der Kollagen XVII-Ektodomäne zeigen, daß die Topologie von Kollagen XVII im perizellulären Raum noch nicht abschließend geklärt ist. Immunogold-Labeling zeigte die Ko-Lokalisation des C-terminalen Endes der Kollagen XVII-Ektodomäne mit Laminin 5, was vermutlich auf eine (erweiterte) räumliche Ausdehnung der Ektodomäne in die Lamina densa-Region der Basalmembran hindeutet [BEDANE ET AL. 1997]. Im Gegensatz dazu weist die Kennzeichnung mit domänen-spezifischen monoklonalen Antikörpern auf eine ringförmige Struktur des C-terminalen Endes der Ektodomäne in der Lamina lucida hin [NONAKA ET AL. 2000].

1.3.3 Funktionale Analyse

Aufgrund seiner transmembranen Lokalisation kann angenommen werden, daß Kollagen XVII als Anker für basale Epithelzellen an die Basalmembran dient und für die Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen intra- und extrazellulären strukturellen Elementen und in der Verankerung des Epithels mit der unterliegenden Basalmembran zuständig ist. Diese Aussage wird durch Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen und von Patienten mit blasenbildenden Hauterkrankungen gestützt [BRUCKNER-TUDERMAN UND BRUCKNER 1998]. Die Gesamtstruktur der Ektodomäne ähnelt der eines flexiblen Stäbchens, dessen extrazellulären Liganden $\alpha 6$ -Integrin und Laminin 5 [HOPKINSON ET AL. 1995; BORRADORI ET AL. 1997] und dessen intrazellulären Liganden $\beta 4$ -Integrin, Plektin und BP230 im hemidesmosomalen Plaue beinhalten [KOSTER ET AL. 2003; NIEVERS ET AL. 1999].

Untersuchungen des intrazellulären Domäne von Kollagen XVII ergaben, daß dieser Bereich mit der $\beta 4$ -Integrin-Untereinheit interagiert und essentiell für den Einbau in die Hemidesmosomen ist [BORRADORI ET AL. 1997; SCHAAPVELD ET AL. 1998], und daß der N-Terminus von Kollagen XVII direkt mit der N-terminalen Domäne des hemidesmosomalen Proteins BP230 wechselwirkt [HOPKINSON UND JONES 2000]. Überexprimiert man die N-terminale Domäne von BP230 in Zellen, die Hemidesmosomen ausbilden, so ist die Verteilung von Kollagen XVII in den transfizierten Zellen gestört [HOPKINSON UND JONES 2000]. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, daß die Interaktion zwischen Kollagen XVII und BP230 wichtig für den Einbau von Kollagen XVII in die Hemidesmosomen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der N-terminale Bereich des Moleküls die Polarisation von Kollagen XVII festlegt [HOPKINSON ET AL. 1995].

Die extrazelluläre juxtamembranöse Teilstrecke bildet die 'Linkerregion' zwischen der Plasmamembran und der ersten tripelhelikalen kollagenen Domäne C15. Ein charakteristisches Merkmal dieser Linkerregion sind zwei Coiled-Coil-Strukturen, von denen vermutet wird, daß sie als Nukleus für Trimerisierung und nachfolgender Tripelhelix-Faltung der kollagenen Domänen dienen [ENGEL UND KAMMERER 2000; SNELLMAN ET AL. 2000; LATVANLEHTO ET AL. 2003; MCALINDEN ET AL. 2003].

Coiled-Coil-Strukturen sind häufig vorkommende Oligomerisierungsdomänen, die in der Lage sind, höchst spezifische Wechselwirkungen zu vermitteln [LUPAS ET AL. 1996; KAMMERER ET AL. 1997]. Sie bestehen aus zwei bis fünf α -Helices, die umeinander gewunden eine linksgedrehte Supercoil bilden. Die Sequenz eines Coiled-Coil-Motivs zeichnet sich durch die Wiederholung eines konservierten Musters von sieben Resten (a-b-c-d-e-f-g)_n aus. Die erste (a) und die vierte (d) Position bilden die Interaktionsfläche zwischen den Helices und bestehen in der Regel aus hydrophoben (apolaren) Aminosäuren. Die anderen Aminosäuren sind vorwiegend polar oder geladen und können inter- und intrahelikale Interaktionen ausbilden, die zur Stabilität und Spezifität der Komplexbildung beitragen.

Die Linkerregion verbirgt auch die Stelle, an welcher die Ektodomäne von Kollagen XVII proteolytisch gespalten wird, was eine kürzere lösliche Form des Kollagens zur Folge hat [SCHÄCKE ET AL. 1998; FRANZKE ET AL. 2002] (siehe Kap. 1.3.4).

Untersuchungen der Region, die direkt hinter der membranumspannenden Domäne liegt, legt die Vermutung nahe, daß die nichtkollagene Domäne NC16a der Ektodomäne in die Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen den hemidesmosomalen Proteinen involviert ist [HOPKINSON ET AL. 1995]. Es konnte auch gezeigt werden, daß die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit mit der extrazellulären NC16a-Domäne interagiert [HOPKINSON ET AL. 1998]. Die funktionellen Konsequenzen sind jedoch noch nicht bekannt.

Neben diesen funktionellen Analysen auf molekularer Ebene konnten weitere Erkenntnisse in der Funktion von Kollagen XVII aus pathologischen Zuständen gewonnen werden. Daher wird die Beteiligung von Kollagen XVII in autoimmunen und angeborenen/vererbten Krankheiten in einem separaten Kapitel (Kap. 1.4) genauer beschrieben.

Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, daß Kollagen XVII als membranständiges Protein auch in transmembrane Signaltransduktion involviert ist, da die Sequenz der intrazellulären Domäne mehrere Tyrosin-Reste enthält, die phosphoryliert werden können [KITAJIMA ET AL. 1999; SUZUKI ET AL. 1996; SUZUKI ET AL. 2002]. BP-assoziierte Autoantikörper der humanen Kollagen XVII-Ektodomäne triggern einen Vorgang der Signaltransduktion, was zur Freisetzung von Interleukin-6 und -8 aus humanen Keratinozyten führt [SCHMIDT ET AL. 2000]. Diese Zellantwort bedingt die de-novo-Synthese der beiden Interleukine und zeigt eine Abhängigkeit sowohl von der Konzentration als auch von der Dauer der Antikörper-Behandlung. Diese Resultate stützen die Hypothese, daß die Interaktion der extrazellulären Domäne von Kollagen XVII mit einem Antikörper (und vielleicht einem extrazellulären Liganden) eine Signaltransduktion auslöst.

Desweiteren könnte die Erzeugung einer löslichen Form eines Proteins mit nahezu identischen oder nur gering von der membranständigen Form abweichenden Eigenschaften ein Weg für feinregulierte Signaltransduktion und/oder Zellattachement während Proliferation und Differenzierung sein. Folglich könnte der Prozeß des Ektodomänenshedding die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung in multipler Art und Weise beeinflussen.

Auch wenn bis jetzt noch nicht alle Bindungspartner bekannt sind, so ist klar, daß Kollagen XVII in der Aufrechterhaltung der epithelialen Zelladhäsion durch multiple Protein-Protein-Interaktionen involviert ist. Seine zentrale Rolle dabei ist durch genetische und erworbene Hautkrankheiten demonstriert, bei denen das Fehlen oder der Verlust der Funktion von Kollagen XVII zu verminderter epidermaler Adhäsion und Blasenbildung der Haut führt [MCGRATH ET AL. 1995; FLOETH ET AL. 1998; SCHUMANN ET AL. 1997, 2000].

Zusammenfassend werfen diese Beobachtungen noch viele ungeklärte Fragen auf, die weiterführende Untersuchungen benötigen.

1.3.4 Shedding

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß eine große Vielfalt von biologisch aktiven Proteinen, darunter auch Zelladhäsionsmoleküle, in zwei verschiedenen Formen existiert: als Transmembran-Proteine und als kürzere lösliche Moleküle. Sie werden zunächst als integrale Typ I oder II TM-Proteine synthetisiert. Die lösliche Form entsteht dann durch selektive posttranslationale Proteolyse von der Zelloberfläche [HOOPER ET AL. 1997]. Die Spaltung ereignet sich allgemein nahe der extrazellulären Oberseite der Membran (**Abb. 1.6**), ergibt eine physiologisch aktive Ektodomäne und ist katalysiert durch eine Gruppe von Enzymen, die kollektiv als Sheddasen bezeichnet werden. Dieses Shedding der Ektodomäne generiert somit lösliche Matrixmoleküle und kann die Fähigkeit der Zellen, bestimmte Liganden zu binden, regulieren [BLACK AND WHITE 1998].



Abb. 1.6: Shedding von Zelloberflächen-Kollagenen

Die schematische Darstellung verdeutlicht den Angriffspunkt der Sheddasen nahe der extrazellulären Oberseite der Zellmembran [GREENSPAN 2005].

Die Ektodomänen von mindestens vier kollagenen TM-Proteinen (Kollagen XIII, XVII, XXV und Ektodysplasine A) werden von der Zelloberfläche freigesetzt. Derzeit ist nicht geklärt, ob die gleichen Sheddasen bei allen vier Proteinen beteiligt sind. Für Kollagen XVII wurde gezeigt, daß Proteinasen der ADAMs Familie (**A** Disintegrin **A**nd **M**etalloproteinase), die durch Furin aktiviert werden, die biologisch aktiven Sheddasen sind [FRANZKE ET AL. 2002].

ADAMs gehören zu Enzymen, die zusammen als Sekretasen oder Sheddasen bezeichnet werden. Sie sind selbst integrale Membranproteine, die nach der Aktivierung nahe der extrazellulären Oberfläche der Membran wirken und viele lösliche Formen von Typ I oder II TM-Proteinen freisetzen [HOOPER ET AL. 1997; BLACK AND WHITE 1998; PESCHON ET AL. 1998]. Die Übereinstimmung der letzten Studien zeigt, daß der Precursor generell keine Sequenzspezifität für die Spaltung braucht. Statt dessen spielen strukturelle Beschaffenheit und Zugänglichkeit der Spaltungs-Site und die Entfernung der extrazellulären Oberfläche der Membran eine wichtige Rolle [SCHLÖNDORFF UND BLOBEL 1999].

Kollagen XVII war das erste Kollagen, für das gezeigt werden konnte, daß es durch Furin-vermittelte proteolytische Prozessierung von der Zelloberfläche gesheddet wird (**Abb. 1.7**), wodurch eine kürzere lösliche Form des Moleküls entsteht [HIRAKO ET AL. 1998; SCHÄCKE ET AL. 1998]. Domänenspezifische Antikörper zeigen, daß das Shedding-Produkt die gesamte Ektodomäne umspannt, was darauf hinweist, daß die Spaltung extrazellulär der Plasma-Membran in der NC16a-Linkerregion stattfindet. Analysen mit einer Vielzahl

von Inhibitoren, rekombinanten Enzymen und Substraten sowie enzymdefiziente Zellen zeigen, daß Kollagen XVII von Proteinasen der ADAMs Familie gesheddet wird. ADAM-10, ADAM-9 und die Prototyp-Sheddase TACE (TNF-alpha converting enzyme oder ADAM-17), die alle in Keratinozyten exprimiert werden, wirken am Shedding von Kollagen XVII mit, aber Inhibitions- und Stimulationsprofile deuten auf TACE als Hauptprotease hin [BECHERER UND BLOBEL 2003; FRANZKE ET AL. 2003]. Verschiedene Experimente konnten zeigen, daß die durch Shedding mittels TACE erhaltenen Fragmente identisch mit den von Zellen produzierten Fragmenten sind. Außerdem zeigen Keratinozyten von Knock-out-Mäusen eine merkliche Abnahme in Kollagen XVII-Shedding [FRANZKE ET AL. 2002].

Da der Proteinkinase C-Aktivatoren PMA (ein Phorbolster) das Shedding von Kollagen XVII stimuliert, ist anzunehmen, daß dieser Prozeß intrazellulär über bestimmte Signaltransduktionswege gesteuert wird [BLUMER UND JOHNSON 1994]. Dies erfolgt entweder über den MAP-Kinase-Weg (mitogen activated protein kinase), der z.B. über Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TNF- α und IL-1 aktiviert wird, oder über den SAPK-Weg (stress activated protein kinase), der durch Zellstreßwirkung wie z.B. UV-Strahlung ausgelöst werden kann [BLUMER UND JOHNSON 1994].

Die Spaltungs-Stelle in Kollagen XVII konnte bisher nicht identifiziert werden. Epitop-Mapping lokalisiert die Site in die NC16a-Domäne, aber eine Bestimmung der gespaltenen Peptidbindung wurde bisher verhindert, da der neu generierte N-Terminus blockiert und für Sequenzierung nicht zugänglich ist [FRANZKE ET AL. 2002]. Um die für das Shedding benötigte Sequenz zu lokalisieren, wurden COS-Zellen mit cDNA für Vollängen-Kollagen XVII mit verschiedenen Deletionsmutanten in der NC16A-Domäne transfiziert. Die Analyse der verschiedenen kleinen Deletionen entlang der NC16A-Sequenz weist darauf hin, daß die ADAMs-Spaltungs-Site in die Region der aa 528 bis 547 liegt [FRANZKE ET AL. 2004].

Die funktionelle Konsequenz des Shedding von Kollagen XVII ist noch nicht klar. Es ist anzunehmen, daß die Abspaltung der Ektodomäne die Ablösung, die Differenzierung und die Beweglichkeit von Keratinozyten beeinflusst [NYKVIST ET AL. 2001]. Die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne scheint hierbei mit der Ablösung der Keratinozyten zu korrelieren und ist auch mit veränderter Beweglichkeit der Keratinozyten *in vitro* assoziiert [CHARVAT ET AL. 1999; SCHUMANN ET AL. 2000; FRANZKE ET AL. 2002]. Diese Prozesse sind komplex und beziehen eine Vielzahl von Rezeptoren und Liganden mit ein, abhängig von räumlichem und zeitlichem biologischen Kontext [BORRADORI UND SONNENBERG 1999]. Wahrscheinlich setzt die Spaltung von Kollagen XVII Zellen von einigen ihrer Bindungspartnern frei und erlaubt ihnen so, andere Funktionen zu übernehmen. Shedding kann auch neue Bindungsstellen generieren. Die lösliche Domäne von Kollagen XVII stellt interessanterweise ein eigenständiges Autoantigen dar. Inzwischen konnte die Übereinstimmung mit dem 120 kD Lineare-IgA-Dermatitis-Antigen bestätigt werden [ZONE ET AL. 1998; ZILLIKENS ET AL. 1999; SCHUMANN ET AL. 2000]. Es sind jedoch

detailliertere zellbiologische Analysen erforderlich, um die Rolle des Shedding von Kollagen XVII für Epithelzelladhäsion weiter zu analysieren.

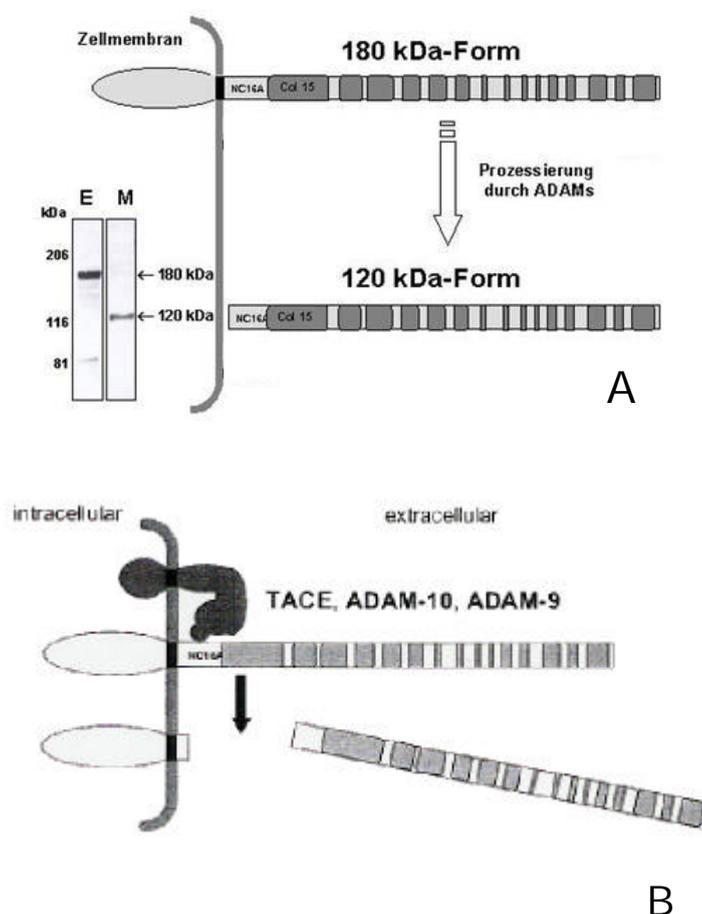


Abb. 1.7: Shedding von Kollagen XVII

A: Schematische Darstellung der zwei Formen von Kollagen XVII. Das Vollängen-Protein wird in der NC16a-Domäne gespalten, was eine kürzere, lösliche Ektodomäne ergibt. Links im Bild: Immunoblot einer Keratinozyten-Zellschicht (E) und Kulturmedium (M) mit Antikörpern gegen NC16a und den C-Terminus. Die Zellen enthalten das 180 kD-Vollängen-Protein, das Medium nur die gesheddete 120 kD-Ektodomäne [FRANZKE ET AL. 2003].

B: Die Ektodomäne von Kollagen XVII wird von der Zelloberfläche von Enzymen der Familie der Disintegrin-Metalloproteinasen (ADAMs) gesheddert. Die Proteinase TACE, ADAM-9 und ADAM-10 sind selbst membrangebunden, spalten Kollagen XVII in der juxtamembranen NC16a-Domäne und führen zur Freisetzung der Ektodomäne in den extracellulären Raum [FRANZKE ET AL. 2003].

1.4 Pathologie

1.4.1 Kollagen XVII bei autoimmunen Erkrankungen

Bullöses Pemphigoid (BP) ist eine autoimmune blasenbildende Hauterkrankung (**Abb. 1.8**), die durch Ablagerung von Immunglobulin IgG und Komplement C3 in die kutane Basalmembranzone, Infiltration der oberen Dermis durch inflammatorische Zellen und Ablösung der basalen epidermalen Schicht von der unterliegenden Dermis gekennzeichnet ist [VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003; YANCEY 2005]. Außerdem sind die Zytokine L-6 und IL-8 am Krankheitsprozeß beteiligt, sowohl bei humanem als auch bei experimentellem murinen BP [SCHMIDT ET AL. 2000].

Es wurde beobachtet, daß Patienten mit Bullösem Pemphigoid Autoantikörper produzieren, die gegen Antigene in der kutanen Basalmembranzone gerichtet sind. Ultrastrukturelle Lokalisierungsstudien konnten zeigen, daß zirkulierende BP-Autoantikörper spezifisch den epidermalen Ankerkomplex binden [MUTASIM ET AL. 1985; WESTGATE ET AL. 1985; KLATTE ET AL. 1989].

Das transmembrane Protein Kollagen XVII konnte als Hauptantigen der BP-Autoantikörper mittels Immunopräzipitation und Western Blotting identifiziert werden [LABIB ET AL. 1986; STANLEY ET AL. 1981, 1984]. Um die antigenen Sites zu bestimmen, wurden Epitop-Mapping-Studien mit rekombinanten Formen von Kollagen XVII durchgeführt.



Abb. 1.8: Bullöses Pemphigoid

Pralle Blasen unterschiedlicher Größe und Erytheme

Das erste krankheits-assoziierte Epitop wurde 1993 in der NC16a-Domäne lokalisiert [GIUDICE ET AL. 1993]. Später konnte gezeigt werden, daß die NC16a Domäne insgesamt 4 BP-assoziierte Epitope in einem 45 AA langen Bereich nahe der TM-Region enthält [ZILLIKENS ET AL. 1997]. Über 90% der Seren von Patienten mit BP reagieren mit dieser Region [MATSUMURA ET AL. 1996], jedoch sind noch weitere Antigene auf der extrazellulären Domäne zu finden.

Autoantikörper gegen Kollagen XVII sind neben BP noch in verschiedenen anderen Formen blasenbildender Hautkrankheiten involviert.

Kollagen XVII ist auch ein Zielmolekül im vernarbenden Pemphigoid (cicatricial pemphigoid, CP), einer autoimmunen subepidermalen Erkrankung, die durch die primäre Beteiligung von oralen und okularen mukösen Membranen mit nachfolgender Narbenbildung charakterisiert ist [BERNARD ET AL. 1990; DOMLOGE-HULTSCH ET AL. 1992]. CP-Autoantikörper erkennen die Lamina densa der Basalmembran ebenso wie die Lamina lucida und verursachen eine Spaltung des Gewebes in der Lamina densa. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen finden sich Epitope auf der C-terminalen Ektodomäne von Kollagen XVII zusätzlich zu der bekannten Region der NC16a-Domäne als Ziel von Autoantikörpern [BALDING ET AL. 1996; BEDANE ET AL. 1997]. Beim verwandten Schleimhautpemphigoid (mucous membrane pemphigoid, MMP) konnte Reaktivität gegen alle Bereiche inklusive der intrazellulären Domäne beobachtet werden [GIUDICE ET AL. 1993; MURAKAMI ET AL. 1998; DI ZENZO ET AL. 2004].

In anderen blasenbildenden Erkrankungen wie linearer IgA-Dermatose (LAD), Schwangerschaftspemphigoid (Pemphigoid gestationis) und chronischer bullöser Dermatose der Kindheit zielen die IgA-Autoantikörper effizienter auf die lösliche Kollagen XVII-Ektodomäne als auf das Vollängen-Protein [SCHUMANN ET AL. 2000]. Bei Patienten mit Lichen Planus Pemphigoid wurden auch IgG-Autoantikörper gegen Kollagen XVII entdeckt [HSU ET AL. 2000].

Epitop-Mapping-Studien mit prokaryotischen und eukaryotischen rekombinanten Fragmenten zeigen, daß immunodominante Epitope in der NC16a-Domäne lokalisiert sind [ZILLIKENS 2002], obwohl auch andere Epitope in der Ektodomäne identifiziert werden konnten [PERRIARD ET AL. 1999; NIE UND HASHIMOTO 1999; SCHUMANN ET AL. 2000]. Die geschedete Ektodomäne von humanem Kollagen XVII ist auch Zielstruktur von IgG- und IgA-Autoantikörpern in blasenbildenden Hauterkrankungen. In Patienten mit LAD sind die IgA-Autoantikörper direkt gegen die lösliche Ektodomäne gerichtet [ZONE ET AL. 1998; NIE UND HASHIMOTO 1999; SCHUMANN ET AL. 2000]. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß das Shedding von Kollagen XVII konformelle Änderungen im neu geschaffenen N-Terminus der Ektodomäne induziert und so Neoepitope generiert werden.

Der molekulare Pathomechanismus von Autoantikörper-induzierter Blasenbildung der Haut bleibt zur gegenwärtigen Zeit noch schwer faßbar.

1.4.2 Kollagen XVII bei Erbkrankheiten

Neben seiner Rolle in erworbenen autoimmunen Hauterkrankungen konnten verschiedene Studien zeigen, daß Mutationen im Gen *COL17A1*, welches für Kollagen XVII kodiert, für eine bestimmte Form der junctionalen Epidermolysis Bullosa (JEB), der JEB non-Herlitz (JEB-nH; früher Generalisierte Atrophische Benigne Epidermolysis Bullosa (GABEB)), und eine seltene Subform der Epidermolysis Bullosa (EB) simplex verantwortlich sind [VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003]. Interessanterweise haben die meisten dieser Patienten Null-Mutationen in *COL17A1*-Allelen und infolgedessen fehlt das Protein komplett in der epidermalen Basalmembran. Der Ausfall von Kollagen XVII resultiert in einem Krankheitsphänotyp, der von subepidermaler Blasenbildung gekennzeichnet wird [VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003].

Epidermolysis bullosa (EB) ist eine heterogene Gruppe von Genodermatosen, die durch Fragilität und Blasenbildung der Haut charakterisiert ist und autosomal rezessiv vererbt wird. Dabei kommt es zu Mutationen in einer Vielzahl von Proteinen der kutanen Basalmembran-Zone [PULKKINEN UND UITTO 1999]. Beispielsweise verursachen u.a. Mutationen im Gen für Kollagen XVII, verschiedenen Laminin 5-Genen, Genen für $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrine oder für Plektin die verschiedenen Formen von EB [UITTO UND RICHARD 2004].

Die hemidesmosomale Variante von EB manifestiert sich klinisch in den Formen der junctionalen EB non-Herlitz (JEB-nH; bisher: generalisierte atrophische benigne EB (GABEB)), der JEB Herlitz (JEB-H), der EB mit pylorischer Atresie (JEB-PA), der EB mit spät einsetzender Entstehung von muskulärer Dystrophie (JEB late onset, JEB-lo) und der JEB inversa (JEB-I) [FINE ET AL. 2000; HINTNER UND WOLFF 1982; HASHIMOTO ET AL. 1976].

Tab. 1.2: Formen der junctionalen Epidermolysis bullosa [aus FINE ET AL. 2000]

JEB-Unterform	involviertes Protein oder Gen	Kollagen XVII
JEB-nH (non-Herlitz)	Laminin 5, Kollagen XVII	reduziert oder fehlend
JEB-H (Herlitz)	Laminin 5	normal oder reduziert
JEB-PA (pylorische Atresie)	$\alpha 6\beta 4$ -Integrin	normal oder reduziert
JEB-I (inversa)	Laminin 5	nicht bekannt
JEB-lo (late onset)	unbekannt	nicht bekannt

JEB-nH ist charakterisiert durch lebenslange Blasenbildung der Haut, assoziiert mit Nageldystrophie, Hypoplasie des Zahnschmelzes und lokalisierter Alopezie der Augenlider.

Inzwischen wurden bei JEB-nH-Patienten mehrere Mutationen im Gen für Kollagen XVII identifiziert [TASANEN ET AL. 2000B; PULKKINEN UND UITTO 1998]. Die Mehrheit dieser Mutationen führt zu vorzeitigen Stop-Codons für die Translation durch Nonsense-Mutationen. Auch eine heterogene Mutation im Kollagen XVII-Gen wurde in einem Patienten mit einer Variante der JEB identifiziert [FLOETH ET AL. 1998].

1.4.3 Kollagen XVII bei malignen Neoplasien

Immunfluoreszenz-Studien mit Kollagen XVII-spezifischen Antikörpern haben demonstriert, daß Basalzellkarzinome (basal cell carcinoma, BCC) der Haut eine schwächere oder keine Färbung des Tumor-Stroma-Übergangs aufweisen, verglichen mit der beobachteten Färbung in der angrenzenden normalen Epidermis [FAIRLEY ET AL. 1995; YAMADA ET AL. 1996]. Weil auch die Expression von BP230 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in BCC vermindert ist [FAIRLEY ET AL. 1995; CHOPRA ET AL. 1998], indiziert dies einen generalisierten Defekt in Hemidesmosomen, eine Schädigung des Ankerkomplexes oder auch beides in

bestimmten Karzinomen. Eine Verminderung der Kollagen XVII-Expression wurde in gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen der Haut (squamous cell carcinoma, SCC) beobachtet [FAIRLEY ET AL. 1995; YAMADA ET AL. 1996].

Andere SCC-Typen, sowohl in der Haut als auch in anderen Geweben, und bestimmte präkanzeröse Gewebe weisen eine veränderte Expression und abnormale Verteilung von Kollagen XVII auf [YAMADA ET AL. 1996]. Diese Untersuchungen zeigten auch, daß Kollagen XVII in verschiedenen SCC-Zelllinien phosphoryliert vorliegt.

Die Untersuchung der Expression von Kollagen XVII bei zwei häufigen epithelialen Tumoren, Ameloblastom und Basalzellkarzinom, konnte zeigen, daß der Verlust der Kollagen XVII-Bildung mit progressivem Tumorwachstum und Infiltration korreliert [PARIKKA ET AL. 2001].

Die Aufdeckung des Bindungsmechanismus von Kollagen XVII im hemidesmosomalen Komplex und Erkenntnisse über den Vorgang der Signaltransduktion können zum Verständnis dieser pathologischen Situationen beitragen.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Kollagen XVII ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran und als Interaktionspartner für hemidesmosomale und extrazelluläre Matrixproteine wie Integrin $\alpha 6\beta 4$ und Laminin 5 bekannt. Es ist jedoch noch nicht geklärt, welche Regionen von Kollagen XVII für die Bindung zuständig ist und welcher Bindungsmechanismus vorliegt. Auch über eine mögliche Signaltransduktion von Kollagen XVII wurden bisher keine Kenntnisse erworben. Im Bereich der ersten nichtkollagenen Domäne NC16a befinden sich zwei Coiled-Coil-Strukturen, für die eine essentielle Rolle bei der Tripelhelixbildung angenommen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zum einen die Bedeutung der Coiled-Coil-Domänen für die Oligomerisierung von Einzelketten ohne tripelhelikale Strukturen untersucht werden. Desweiteren soll die Grundlagen für Bindungsstudien gelegt werden, die dazu beitragen, Auskunft über den Bindungsmechanismus und die räumliche Identifizierung der verantwortlichen Regionen sowie über die Signaltransduktion von Kollagen XVII zu erhalten.

Für diese Untersuchungen werden Konstrukte mit den für die Bindung interessanten Regionen der Ektodomäne (Coiled-Coil-Region/NC16a, C15 und das C-terminale Ende) entworfen, in die dafür benötigten Expressionsplasmide konstruiert und in Säugerzellen transfiziert. Diese Konstrukte enthalten erstmals sowohl große Anteile der Ektodomäne zusammen mit der Transmembranregion und einem Anteil der intrazellulären Domäne. Nach der Expression der rekombinanten Polypeptide ins Zellkulturmedium und deren Aufreinigung aus dem konditionierten Medium sollen die Proteine mit biophysikalischen (CD-Spektroskopie), biochemischen (Trypsin-vermittelter Proteinabbau) und ultrastrukturellen Methoden (Elektronenmikroskopie nach Rotations-schrägbedampfung) charakterisiert werden.

Dabei werden die Zellen mit den rekombinanten Transmembranproteinen auch auf ihre mögliche Verwendung in Zellbindungsassays untersucht.

Abschließend soll geklärt werden, ob Kollagen XVII ohne tripelhelikale Struktur, aber mit der Coiled-Coil-Region oligomerisiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in Reinstform von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Als Wasser (Aqua dest.) wurde gefiltertes deionisiertes Wasser benutzt (Purelab Plus).

Die Prozentangaben bei Puffern stehen für Masse pro Volumen ([w/v]) bei Feststoffen und für Volumenprozent ([v/v]) bei Flüssigkeiten.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

10 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Gibco-Life Technologies (Eggenstein)
Vent _R [®] -Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
10x Thermopol-Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Primer	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
	Eurogentec (Seraing, Belgien),
	MWG Biotech (Ebersberg)
PCR-Cycler	Biometra (Göttingen)
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech (Freiburg)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden gezielt bestimmte Abschnitte einer DNA unter Zuhilfenahme von Oligonukleotiden (Primern), einer DNA-Polymerase und einem bestimmten Temperaturprogramm vervielfältigt (ca. 10^6 - 10^7 -fach). Die Oligonukleotide (Primer) wurden so synthetisiert, daß während der PCR am 3'- und 5'-Ende definierte Restriktionsschnittstellen eingebaut wurden, um später das Klonieren der Fragmente in ein Plasmid zu ermöglichen (**Tab. 2.1**).

Tab. 2.1: Primerpaare mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen

(s: sense, a: antisense)

Fragment	Primersequenzen
rColXVII-d	<p>s 5'- CCA CCT <u>CTA GAC</u> CCA GGC AAT GTG TGG TCC AGC ATC - 3' <i>XbaI</i></p> <p>as 5'- <u>GGA TCC</u> TCA CGG CTT GAC AGC AAT ACT TCT TC -3' <i>BamHI</i></p>
rColXVII-e	<p>s 5'- GTC GTA <u>GC TAG CAG ATA TCC</u> ACA GCT ACA GCA GCA GTG -3' <i>NheI</i> <i>EcoRV</i></p> <p>as 5'- TTA G<u>GT CGA C TC TAG A</u> ACC GAT CTT GCC TGG AGC TCC TGG -3' <i>SalI</i> <i>XbaI</i></p>
rColXVII-f	<p>s 5'- GTC GTA <u>GC TAG CAG ATA TCC</u> ACA GCT ACA GCA GCA GTG -3' <i>NheI</i> <i>EcoRV</i></p> <p>as 5'- TTA G<u>GT CGA C TC TAG A</u> ACC TCG GAG ATT TCC ATT TTC CTG TTC C -3' <i>SalI</i> <i>XbaI</i></p>

Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR wurde die Vent[®]-Polymerase eingesetzt, da sie im Vergleich zu anderen Polymerasen wegen der fehlerkorrigierenden 3' - 5' Exonuklease-Aktivität eine geringere Fehlerrate (ca. 2.7×10^{-6}) bei der Amplifikation aufweist.

Die PCR-Ansätze (50 µl) wurden auf Eis pipettiert:

30 ng Template-DNA pCEP-Pu-BM40-rColXVII-VL
 1x Polymerase-Puffer
 400 µM dNTP-Mix
 0.5 µM sense (s) Primer
 0.5 µM antisense (as) Primer
 2 u Vent_R[®]-Polymerase

In der Negativkontrolle wurde die Menge an DNA durch Aqua dest. ersetzt.

Die PCR-Reaktion wurde im Personal-Cycler (Biometra) entsprechend der Programme (Tab. 2.2) durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 µl-Aliquots der PCR-Amplifikate in einem Agarosegel zur Kontrolle aufgetrennt.

Tab. 2.2: PCR-Programme

	rColXVII-d		rColXVII-e		rColXVII-f	
	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
1 Denaturierung	95°C	2'	95°C	2'	95°C	2'
2 Denaturierung	94°C	40"	94°C	1'	94°C	1'
3 Annealing	59°C	40"	64°C	1'	64°C	1'
4 Elongation	72°C	1'10"	74°C	1'10"	74°C	27"
Anzahl Zyklen (2 - 4)	30		30		30	
5 verlängerte Elongationszeit	72°C	8'	72°C	8'	72°C	8'
6	25°C	1'	25°C	1'	25°C	1'

2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer und Lösungen

50x TAE

1 M Tris base
 2 M Essigsäure
 0.5 M EDTA
 pH 8.3

10x TBE

1 M Tris base
800 mM Borsäure
25 mM EDTA
pH 8.3

5x BJ-Auftragspuffer (für die Agarose-Gelelektrophorese), sterilfiltriert

15 % Ficoll
100 mM LiCl
0.05 % Bromphenolblau
100 mM EDTA

Agarose-Gelsysteme dienen zur Trennung und Analyse als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Flachbettgelen in den entsprechenden Apparaturen (Agagel Mini, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Der Nachweis der DNA erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in der DNA interkaliert und bei einer Wellenlänge von 254 - 300 nm auf dem UV-Kasten detektiert werden konnte.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Agarosegele in Konzentrationen von 0.7 - 2.0 % verwendet.

Agarosepulver (Gibco-Life Technologies, Eggenstein) wurde in 1x TBE-Puffer zur Analyse bzw. in 1x TAE-Puffer zur DNA-Isolierung unter Hitze gelöst und mit 30 ng/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt. Die Proben wurden mit BJ-Auftragspuffer (Endkonzentration 1x) versetzt, in die Geltaschen einpipettiert und die Elektrophorese in 1x TBE- bzw. 1x TAE-Puffer bei 60 - 80 V für ca. 1 h durchgeführt.

Als Längenstandard wurde bei jeder Elektrophorese der 1kB-Marker der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M.) aufgetragen.

2.1.3 Reinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Fragmente in die Plasmide einfügen zu können, wurden diese zuerst über das 'Wizard DNA Purification System' von Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die Konzentration der in dieser Weise gereinigten und in ca. 50 µl Aqua dest. vorliegenden DNA wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Ort) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.4 Herstellung rekombinanter DNA

Verwendete Vektoren

pCEP-Pu-BM40 [KOHLEFELDT ET AL. 1997]
pGEM2 (Invitrogen, Karlsruhe)

Restriktionsenzym-Analysen

In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firmen MBI Fermentas (St.Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt a.M.) verwendet. Alle Restriktionsenzym-Analysen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt. Als Standardreaktion wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1 u Enzym für 1 h bei 37°C verdaut.

Die Restriktion einer DNA-Probe mit mehreren verschiedenen Restriktionsenzymen wurde simultan durchgeführt, wenn alle Enzyme in einem gemeinsamen Puffer ausreichende Aktivität aufwiesen. War dies nicht möglich, so wurde die DNA zuerst mit einem Enzym unter den optimalen Bedingungen geschnitten, mit dem 'Wizard DNA Purification System' (Promega, Mannheim) wie unter 2.1.3 beschrieben aufgereinigt und dann mit dem nächsten Enzym unter den empfohlenen Bedingungen geschnitten.

Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase

Durch die Dephosphorylierung wird die endständige 5'-Phosphat-Gruppe linearer doppelsträngiger DNA entfernt. Als Enzym wurde die 'calf intestine alkaline Phosphatase' (CIP, MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Dieses Enzym spaltet im alkalischen Milieu (pH 9.5 - 10) unspezifisch die 5'-Phosphatgruppen von DNA ab. Die internen Phosphodiester-Brückenbindungen sind gegen das Enzym resistent. Die CIP kann durch Erhitzen auf 85°C deaktiviert werden.

Eine Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um eine Religation linearisierter Vektoren nach dem Restriktionsverdau zu verhindern.

Dazu wurden dem Restriktionsverdau (30 µl) 1 u Alkalische Phosphatase (CIP) und Reaction Buffer in einfacher Endkonzentration zugefügt. Dieser Reaktionsansatz wurde dann 30 min bei 37°C und anschließend 30 min bei 56°C inkubiert.

Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine abschließende Inkubation des Reaktionsansatzes für 15 min bei 85°C oder eine Aufreinigung mit dem 'Wizard DNA Purification System' (Promega, Mannheim) vor der weiteren Verwendung.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer Spaltung durch Restriktionsenzyme im präparativen Maßstab und Trennung im Agarosegel konnte das gewünschte Fragment auf dem UV-Kasten detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die feste Agarose wurde dann durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 5 min in einem Glaswolle-Reaktionsgefäß gelöst. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem 'Wizard DNA Purification System' der Firma Promega (Mannheim) wie unter 2.1.3 beschrieben.

Ligation

Zum Einbau von DNA-Fragmenten (Inserts) in extrachromosomale Plasmid-DNA (Vektor) wurde das 'Rapid DNA Ligation Kit' der Firma Roche (Penzberg) nach Herstellerangaben verwendet.

Vektor und Insert wurden nach der Aufreinigung im Verhältnis 1:20 bis 1:50 eingesetzt.

Der Ligationsansatz mit Vektor und Insert wurde auf 20 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und bei RT für 20 min inkubiert.

Transformation kompetenter E.coli

Verwendeter E.coli-Stamm: OneShot INV 110 Competente Cells (Invitrogen, Karlsruhe)

Im Anschluß an die Ligation wurden die Plasmide zur Vermehrung in kompetente Bakterienzellen eingeschleust (Transformation).

200 µl einer kompetenten E.coli-Suspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl eines 20 µl-Ligationsansatzes vermischt. Die Bakterien wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann folgte ein 'Hitzeschock' bei 42°C für 30 - 45 sec. Dieser Suspension wurden dann 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt und das Gemisch für 1 h bei 225 rpm und 37°C kultiviert. 100 µl dieses Ansatzes wurden im Anschluß mit einem Drzygalski-Spatel auf eine Agar-Platte mit geeigneten Antibiotika ausgestrichen. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank mit dem Deckel nach unten inkubiert. Die Plattenkulturen konnten auf dem Deckel liegend bei 4°C bis zu einem Monat gelagert werden.

Aufgrund einer Plasmid-codierten Ampicillin-Resistenz vermehrten sich nur erfolgreich transformierte, d.h. Plasmid-tragende Bakterien auf den ampicillinhaltigen Agar-Nährböden.

Zur Identifizierung der Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne Kolonien von der Agarplatte gepickt und eine 3.5-ml-üN-Kultur angeimpft. Die Klone wurden am nächsten Tag nach einer Mini-Präparation (wie unter 2.1.6 beschrieben), einer Restriktionsenzym-Analyse mit entsprechenden Restriktionsenzymen und der anschließenden Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert.

2.1.5 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Die Arbeiten mit Bakterien wurden in einem S1-Labor unter semisterilen Bedingungen neben der Flamme eines Bunsenbrenners mit sterilen Glas- bzw. Plastikartikeln durchgeführt.

Zum Ausplattieren von Bakterien wurde ein Drzygalski-Spatel durch Eintauchen in 100 % EtOH und Abflammen sterilisiert.

Herstellung von Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 40 g/l des LB-Mediums Luria Agar (Miller's LB-Agar) (Sigma, Taufkirchen) in Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden die Selektionsantibiotika (Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml und Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml) dazugegeben und die Lösung auf Petrischalen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die nunmehr festen Agarplatten durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt und bei 4°C auf dem Deckel liegend gelagert.

Flüssigkulturen von E.coli

Als Nährlösung für die Anzucht von E.coli diente das LB-Medium Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) (Gibco-Life Technologies, Eggenstein). 25 g/l des Pulvers wurden in Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Bis zur Verwendung wurde das LB-Medium bei 4°C gelagert.

Flüssigkulturen dienten dazu, Bakterien in größeren Mengen für die Isolierung von Plasmiden zu erhalten. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in 15 ml-Zentrifugen-Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) oder Erlenmeyerkolben. Das Volumen an Nährmedium, das angeimpft wurde, richtete sich nach dem Verwendungszweck der Kultur: für Minipräparationen und Glycerinkulturen wurden 3.5 ml, für Vorkulturen von Midipräparationen wurden 20 ml und für Midipräparationen 80 ml LB-Medium eingesetzt. Die 3.5 ml-Kulturen wurden mit Material aus einem Glycerin-Stock durch eine 10 µl-Impföse (Nunc, Wiesbaden), mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte durch eine autoklavierte 100 µl-Pipettenspitze oder mit 100 µl einer Flüssigkultur angeimpft. Die 20 ml-Vorkultur wurde mit 1.5 ml einer 3.5 ml-Kultur und die 80 ml-Kultur aus 5 ml der Vorkultur angeimpft.

Zur Vermehrung wurden die Bakterienkulturen über Nacht (Vorkultur: über Tag) in einem Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 37°C und 225 rpm inkubiert (üN-Kultur). Dem Medium wurden dabei 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Tetracyclin als Antibiotika zur Selektion zugegeben.

Anlegen eines Bakterien-Gefrierstocks

Um transformierte Bakterienklone auf Dauer zu lagern und bei Bedarf daraus neue Kulturen anlegen zu können, wurden von allen klonierten Bakterien Glycerin-Stocks angelegt. Dabei wurden 500 µl einer 3.5 ml-üN-Kultur in ein 1 ml-Kryoröhrchen überführt, mit 500 µl 87 % Glycerin (autoklaviert; Merck, Darmstadt) versetzt und sorgfältig vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die erneute Animpfung einer Flüssigkultur wurde mit einer 10 µl-Impföse (Nunc, Wiesbaden) Material aus dem Glycerinstock entnommen.

2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder aus einer 3.5 ml-üN-Kultur (Mini-Präparation) oder aus einer 80 ml-üN-Kultur (Midi-Präparation), die aus einer 20 ml-Vorkultur angeimpft wurde, isoliert. Dazu wurden die beiden Kits 'NucleoSpin Plasmid' (Mini-Präp.) und 'NucleoBond AX 100' (Midi-Präp.) der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben verwendet.

Das Verfahren der Mini-Präparation wurde angewandt, um schnell und effizient Plasmid-DNA aus 1 ml einer üN-Kultur für die Identifizierung positiver Klone zu erhalten.

Um Plasmid-DNA der positiven Klone in ausreichender Menge für die Sequenzierung und die Transfektion von eukaryotischen Zellen zu gewinnen, wurde das Verfahren der Midi-Präparation verwendet. Dabei wurden 80 ml einer üN-Kultur bei 5000 g und 4°C für

10 min pelletiert (Beckmann-Zentrifuge J2-21M/E; Beckmann, München), nach dem empfohlenen Protokoll verarbeitet und das entstandene Plasmid-DNA-Präzipitat mit 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation bei 25 000 rpm und 4°C für 10 min), getrocknet und in Aqua dest. resuspendiert.

Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte mit einem Photometer (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg), indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Aqua dest. als Referenzwert gemessen wurde.

2.1.7 Sequenzierungen

Zur Kontrolle der Sequenzen und der korrekten in-frame-Insertion wurden DNA-Sequenzierungen aller Konstrukte von der Firma Agowa GmbH Sequenzier-Service (Berlin) durchgeführt.

2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, alle verwendeten Geräte wurden autoklaviert oder sterilisiert. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator (Binder, Tuttlingen und Heraeus, Hannover) unter 5 % CO₂-Begasung bei 37°C kultiviert.

Gebräuchliche Zellkultur-Plastikmaterialien wie Gewebekulturschalen und -flaschen, Zentrifugen- und Kryoröhrchen, Sterilfiltriereinheiten und Einwegpipetten wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz), NUNC (Wiesbaden), Nalgene (Hamburg) und Fisher Scientific (Schwerte) bezogen.

2.2.1 Nährmedien, Additive und Chemikalien für die Zellkultur

DMEM E15-011 (Glucose 4.5 g/l, Natriumpyruvat 110 mg/l)	PAA (Cölbe)
DMEM E15-808 (Glucose 1.0 g/l, HEPES 25 mM, L-Glutamin 4 mM)	PAA (Cölbe)
FKS	Sigma (Taufkirchen), Biochrom (Berlin)
L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin), PAA (Cölbe)
L-Ascorbinsäure	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin	Biochrom (Berlin), PAA (Cölbe)
EDTA	Biochrom (Berlin), PAA (Cölbe)
DMSO	Sigma (Taufkirchen)
G418-Sulfat (Neomycin)	PAA (Cölbe), Calbiochem (Schwalbach)
Puromycin-Dihydrochlorid	Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen)

Kultivierungsmedium für 293-EBNA-Zellen

1x DMEM E15-011 versetzt mit
 10 % FKS
 10 mM L-Glutamin
 0.1 mg/ml Penicillin/Streptomycin
 50 µg/ml L-Ascorbinsäure
 0.25 mg/ml G418-Sulfat
 1.0 µg/ml Puromycin (bei transfizierten Zellen)

Kultivierungsmedium für Keratinozyten und NH-Zellen

1x DMEM E15-808 versetzt mit
 10 % FKS
 10 mM L-Glutamin
 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin
 50 µg/ml L-Ascorbinsäure

Einfriermedium

10 % DMSO in FK

Trypsin/EDTA-Gemisch

0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA in PBS

1x PBS, autoklaviert

137 mM NaCl
 3 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
 1 mM KH₂PO₄
 pH 7.3

Verwendete Zellen

293-EBNA-Zellen	HEK-(human embryonic kidney-)Zellen mit stabiler Expression des Epstein-Barr-Virus EBNA1-Gens (Invitrogen, Karlsruhe) [GRAHAM ET AL. 1977]
Keratinozyten	humane Keratinozyten (PD Dr. Brinckmann, Inst. f. Med. Molekularbiologie, Univ. Lübeck)

Das Kultivierungsmedium für 293-EBNA-Zellen wurde mit G418 (Neomycin) versetzt. Bei den transfizierten 293-EBNA-Zellen wurde dem Medium zusätzlich Puromycin beigefügt, um die Vermehrung nichttransfizierter Zellen zu unterdrücken.

2.2.2 Zellkulturtechniken*Kultivierung eingefrorener Zellen*

Die eingefrorenen Zell-Aliquots wurden direkt aus dem Stickstoff im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut war und in mit vorgewärmtem Medium gefüllte Zentrifugenröhrchen überführt.

Mit der nachfolgenden Zentrifugation bei 200 g für 5 min (GPR-Zentrifuge; Beckmann, München) wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in eine mit Medium befüllte Zellkultur-Flasche überführt. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Ablösen der Zellen zum Splitten/Passagieren oder Einfrieren

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die konfluent gewachsenen Zellen einmal mit PBS gespült, danach wurde die Trypsin/EDTA-Lösung aufgebracht. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C im Brutschrank konnten die abgelösten Zellen mit Medium vom Boden der Zellkulturflasche gespült werden. Die Keratinozyten wurden vor Aufbringen der Trypsin/EDTA-Lösung mit 0.05 % EDTA-Lösung für ca. 20 min vorinkubiert, um die Desmosomen zu lösen.

Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet konnte dann zum Splitten/Passagieren in Medium bzw. zum Einfrieren in Einfriermedium resuspendiert werden.

Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin von der Kulturflasche abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 1.0 ml eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag konnte das Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt werden.

Zellzahl-Bestimmung

Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 1ml Medium wurden 100 µl dieser Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die unter dem Mikroskop sichtbaren Zellen, die sich auf den 16 Quadranten der Zählkammer verteilen, ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach der Formel

$$(\text{Anzahl der gezählten Zellen}) / 64 \times 10^6 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

2.2.3 Transfektion von 293-EBNA-Zellen

Zur Transfektion wurden ca. 5×10^5 293-EBNA-Zellen auf eine Zellkulturschale (Durchmesser 10 cm) ausgebracht und für etwa 24 h in 10 ml Zellkulturmedium inkubiert.

Präzipitationsansatz [CHEN UND OKAYAMA 1987]:

20 - 30 µg	Plasmid-DNA
50 µl	0.25 M CaCl ₂
500 µl	2x BBS pH 6.99 (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄)

Der Ansatz wurde auf ein Endvolumen von 1 ml mit autoklaviertem Aqua dest. aufgefüllt, bei RT für 20 min inkubiert und dann der Zellkulturschale zugegeben.

4 - 12 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch frisches Nährmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit Zugabe von 1.5 µg/µl Puromycin.

Am 3. Tag nach der Transfektion wurde die Zugabe von Puromycin auf 1.0 µg/µl als Erhaltungsdosis reduziert. Diese Erhaltungsdosis wurde von diesem Zeitpunkt aus immer dem Medium beigefügt.

Nach etwa 4 Wochen waren auf der Zellkulturschale mehrere Kolonien gewachsen, die dann trypsinisiert, pelletiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden konnten.

Die Zellkulturflasche war nach weiteren 4- 5 Tagen konfluent bewachsen. Diese Zellen wurden dann passagiert, kryokonserviert und für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.4 Kultivierung von Zellen für die RT-PCR

Zum Nachweis positiv transfizierter Klone wurden die Zellen auf kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) semikonfluent angezüchtet. Nach dem Spülen mit PBS wurden sie trypsinisiert und pelletiert. Das Pellet wurde dann in RLT-Puffer unter Zugabe von β-Mercaptoethanol (1 %) aufgenommen und wie unter 2.3 beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.5 Kultivierung von Zellen für Immunfluoreszenz-Färbungen

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Zellen auf Chamber Slides kultiviert. Chamber Slides sind Objektträger mit aufgesetzten Kultivierungskammern.

Transfizierte und Wildtyp-293-EBNA-Zellen sowie Keratinozyten wurden auf 150 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen einer konfluent bewachsenen Flasche wurden trypsinisiert und pelletiert. Pro Kammer eines 8-well-Chamber Slides wurden dann ca. 5×10^3 Zellen in 250 µl Medium, pro Kammer eines 2-well-Chamber Slides ca. 2.5×10^4 Zellen in 1 ml Medium ausgesät und für ein bis drei Tage inkubiert. Die Chamber Slides wurden dann wie unter 2.4 beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.6 Sammeln von Kultivierungsmedium

Transfizierte 293-EBNA-Zellen wurden auf 150 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen von 9 konfluent bewachsenen Flaschen wurden trypsinisiert, pelletiert und auf 9 Triple-Layer-Flaschen (500 cm²) ausgebracht. Nach zwei Tagen waren die Flaschen konfluent bewachsen. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 60 ml serumfreiem Zellkulturmedium mit frisch zugesetzter L-Ascorbinsäure pro Triple-Layer-Flasche gleichmäßig bedeckt.

Das serumfreie Medium mit frisch zugesetzter L-Ascorbinsäure wurde alle 48 h gewechselt. Das so gewonnene Medium wurde bei 2000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge J2-21M/E; Beckmann, München). Der Überstand wurde mit Proteinase-Inhibitor versetzt (1 mM Pefablock (Roth, Karlsruhe) oder 1 mM PMSF (Fluka, Taufkirchen)) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Mit dem Medium wurde wie unter 2.5 beschrieben weiter verfahren.

Zusätzlich wurden 1 ml-Aliquots für die Kontrolle abgenommen und bis zur Proteinfällung (siehe Kap. 2.6.2) ebenfalls bei -20°C gelagert.

2.2.7 Triton-Extrakt

Zur Gewinnung von Proteinen aus Zellmembranen und Zellen wurde ein Triton-Extrakt der Zellen bereitet. Dafür wurden die 293-EBNA-Zellen konfluent auf 75 cm²-Zellkulturflaschen angezüchtet. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden 12 ml FKS-freies Medium auf die Zellen gegeben.

Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, mit Pefablock versetzt und für eine TCA-Fällung (siehe Kap. 2.6.2) aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Der Zellrasen wurde in 10 ml PBS mit 1 mM Pefablock aufgenommen und bei 600 g für 15 min zentrifugiert (GPR-Zentrifuge; Beckmann, München), um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Extraktions-Puffer (0.3 M NaCl, 0.07 M Tris, 0.2 % Triton X-100) aufgenommen und bei 4°C für 30 min unter ständiger Rotation resuspendiert. Mit einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 600 g für 5 min wurde die Abtrennung der Zell-Reste von den Proteinen erreicht, die in Lösung bleiben. Der so gewonnene Protein-Triton-Extrakt wurde dann aliquotiert und bei -20°C gelagert, bis er für eine SDS-PAGE (siehe Kap. 2.6.3) eingesetzt wurde.

2.3 RNA-Isolierung und RT-PCR

Durch Reverse Transkription wird die bei einer Gesamt-RNA-Isolierung erhaltene mRNA in cDNA umgeschrieben.

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die gezielte Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.

2.3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	Gibco-Life Technologies (Eggenstein)
First Strand Buffer	Gibco-Life Technologies (Eggenstein)
0.1 M DTT	Gibco-Life Technologies (Eggenstein)
10 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superscript TM II RNase H ⁻ Transcriptase	Gibco-Life Technologies (Eggenstein)
Vent _R [®] -Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
10x Thermopol-Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Primer	Eurogentec (Seraing, Belgien), MWG Biotech (Ebersberg)
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech (Freiburg)
PCR-Cycler	Biometra (Göttingen)

2.3.2 Gesamt-RNA-Isolierung

Zur Präparation der Gesamt-RNA aus den transfizierten 293-EBNA-Zellen wurde das 'RNeasy Mini Kit' der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Ort), auf Eis für die Reverse Transkription eingesetzt oder für die weitere Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 Reverse Transkription

Während der reversen Transkription werden die mRNA-Transkripte aus der Gesamt-RNA mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben, wobei ein RNA-DNA-Hybrid von jedem Transkript erzeugt wird.

Um mit der Synthese beginnen zu können, benötigt die Reverse Transkriptase ein Stück doppelsträngige Nukleinsäure. Das Reaktionsgemisch enthält daher Desoxythymidin-Oligonukleotide (Oligo(dT)) als Startmoleküle: die Oligo(dT)-Primer hybridisieren mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle und bilden so die Startpunkte für die cDNA-Synthese. Auf diese Weise werden nur mRNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben und so von der übrigen Zell-RNA getrennt.

500 ng der isolierten RNA wurden mit 500 ng 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ in einem Reaktionsgefäß auf Eis zusammengefügt, mit Aqua dest. auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe auf Eis gestellt und 7 µl Mastermix hinzugegeben (1x First Strand Buffer, 10 mM DTT, 500 µM dNTP-Mix). Nach einer Inkubation bei 42°C für 2 min werden 20 u SuperscriptTMII RNase H Transcriptase zugefügt. Die Probe wird dann bei 42°C für 50 min inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wird das Enzym durch eine Inkubation bei 95°C für 5 min inaktiviert. Die Probe wurde dann auf Eis gestellt und sofort für die PCR genutzt oder für die weitere Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Bei den durchgeführten Reaktionen wurde durch Reverse Transkription gewonnene cDNA als DNA-Template eingesetzt.

Die PCR wurde wie unter 2.1.1 beschrieben durchgeführt.

Auf Eis wurde ein 50 µl- Reaktionsansatz mit 500 ng cDNA (revers transkribierte mRNA), 1x Polymerase-Puffer, 400 µM dNTP-Mix, 0.5 µM sense Primer, 0.5 µM antisense Primer und 2 u Vent[®]-Polymerase angesetzt. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz die Menge an cDNA durch Aqua dest. ersetzt. Die Temperaturprogramme wurden für jedes Primerpaar (**Tab. 2.3**) optimiert und sind in **Tab. 2.4** angegeben.

Um den Erfolg der Reversen Transkription zu kontrollieren, wurde zuerst jeweils eine PCR mit Primern für das Housekeeping-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase) [FOSS ET AL. 1998] durchgeführt. Dann wurden die PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren für die gewünschten Fragmente von Kollagen XVII angeschlossen.

Tab. 2.3: Primerpaare

Gen	Primers equenzen	Länge d. amplif. Fragm.
GAPDH	s 5'- GGA TTT GGT CGT ATT GGG C -3'	1.1 kb
	as 5'- TGA GCT TGA CAA AGT GGT CG -3' [FOSS ET AL. 1998]	
rColXVII-d	s 5'- CCA CCT CTA GAC CCA GGC AAT GTG TGG TCC AGC ATC -3'	926 bp
	as 5'- GGA TCC TCA CGG CTT GAC AGC AAT ACT TCT TC -3'	
rColXVII-f	s 5'- GTC GTA GGC TAG CAG ATA TCC ACA GCT ACA GCA GCA GTG -3'	432 bp
	as 5'- TTA GGT CGA CTC TAG ACC TCG GAG ATT TCC ATT TTC CTG TTC C -3'	

Tab. 2.4: PCR-Programme

	GAPDH		rColXVII-d		rColXVII-f	
	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
1 Denaturierung	95°C	2'	95°C	2'	95°C	2'
2 Denaturierung	95°C	2'	94°C	40"	94°C	1'
3 Annealing	55°C	30"	59°C	40"	64°C	1'
4 Elongation	72°C	1'10"	72°C	1'10"	74°C	27"
Anzahl Zyklen (2 - 4)	31		30		30	
5 verlängerte Elongationszeit	72°C	8'	72°C	8'	72°C	8'
6	4°C	10'	25°C	1'	25°C	1'

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die bei der RT-PCR amplifizierte cDNA wurde, wie unter 2.1.2 beschrieben, in 0.8 - 2.0 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt, durch die Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA unter UV-Licht detektiert und für die Auswertung fotografiert. Aufnahmen wurden mit der Software 'Gel-Pro Analyzer' (IPS, North Reading, USA) und einer 'Cellcam'-Kamera (Phase, Lübeck) gemacht.

2.4 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

1x PBS, autoklaviert

137 mM NaCl
 3 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
 1 mM KH₂PO₄
 pH 7.3

Mit der indirekten Immunfärbung lassen sich Proteine (hier Kollagen XVII, Integrin α6 und Integrin β4) in fixierten Zellen nachweisen. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.2.5 beschrieben, auf Chamber Slides gezüchtet.

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, für 10 min mit 100 % Aceton fixiert und danach erneut in PBS gewaschen. Die so fixierten Zellen wurden für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer mit 10 % Ziegenerum (DAKO, Hamburg) in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper aufgebracht (siehe **Tab. 2.5**). Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT in der feuchten Kammer. Nach dem Waschen in PBS erfolgte die Applikation des sekundären Antikörpers (siehe **Tab. 2.6**) in einer Verdünnung von 1:400 in PBS und die erneute Inkubation in der feuchten Kammer für wiederum 1 h bei RT. Die Zellen wurden danach nochmals mit PBS gewaschen. Die aufgesetzten Kammern konnten entfernt werden, die Zellen wurden abschließend mit Aqua dest. gespült und mit dem Einbettungsmedium Vectashield Mounting Medium H-1000 (Alexis, Grünberg) überschichtet, um eine schnelle Reduzierung der Fluoreszenzsignale zu verhindern. Das Präparat wurde dann mit einem Deckglas bedeckt, mit Nagellack luftdicht eingeschlossen und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Als Negativkontrolle wurde bei jeder Immunfluoreszenzfärbung eine Inkubation ohne Erstantikörper durchgeführt.

Zum Mikroskopieren der gefärbten Zellen wurde das Axioplan 2-Mikroskop der Fa. Zeiss (Jena) mit der entsprechenden Software Axiovision (Zeiss, Göttingen) benutzt.

Tab. 2.5: Verwendete Primär-Antikörper

Antigen	Name	Verdünnung
Kollagen XVII	anti-NC16a (5649 IV)	1:500 in PBS
Integrin α 6	CBL 458 anti-Human CD49f (Cymbus Biotechnology, Southampton, UK)	1:100 in PBS
Integrin β 4	MAB 1964 anti-Human β 4 (Chemicon, Hofheim)	1:200 in PBS

Der Antikörper anti-NC16A (5649 IV) wurde mir freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Leena Bruckner-Tuderman, Universitäts-Hautklinik des Universitätsklinikums Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.6: Verwendete Sekundär-Antikörper

	Name	Markierung	Verdünnung
für anti-NC16a	Ziege-antiKaninchen IgG (Dianova, Hamburg)	Cy3-konjugiert	1:400 in PBS
für Integrine	Ziege-antiMaus IgG (Dianova, Hamburg)	Cy3-konjugiert	1:400 in PBS

2.5 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Um die von den transfizierten Zellen in das Zellkulturmedium exprimierten Proteine zu reinigen, wurden verschiedene chromatographische Verfahren benutzt. In Abhängigkeit von ihren individuellen Eigenschaften wie Ladung, Größe oder Hydrophobizität binden Proteine unterschiedlich stark an die verschiedenen Matrices und können durch eine geeignete Kombination verschiedener Methoden zur Homogenität gereinigt werden.

2.5.1 Konzentration des Mediums / Ultrafiltration

Wie unter 2.2.6 beschrieben, wurden jeweils 3.5 - 4.5 l serumfreies Kultivierungsmedium mit rekombinanten Proteinen pro Konstrukt und Kultivierung gesammelt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen bei 4°C wurde das Medium filtriert (Porengröße 3.0 µm; Millipore, Eschborn), um Verunreinigungen zu entfernen.

Die Konzentration des Mediums auf ca. 50 ml wurde mittels Ultrafiltration durchgeführt.

Für das Medium der Zellen mit dem Konstrukt rColXVII-F wurden Amicon-Rührzellen (Millipore, Eschborn) mit einer Ultrafiltrationsmembran mit 5 kD-Cutoff (Millipore, Eschborn) benutzt. Die Membran wurde vor Gebrauch für 1h bei RT in Aqua dest. gewaschen. Die Filtration wurde bei 4°C und einem Druck von etwa 4.0 bar durchgeführt.

Für die Medien der übrigen Konstrukte wurde das 'Labscale TFF System' (Millipore, Eschborn) mit Pellicon XL-Filtereinheiten mit einem Cutoff von 30 kD (Millipore, Eschborn) bei 4°C verwendet.

2.5.2 Dialyse

Das konzentrierte Medium mit den rekombinanten Proteinen wurde vor den Reinigungsschritten mit verschiedenen chromatographischen Verfahren in Dialyseschläuchen mit 3.5 kD Cutoff (Spectrapor; Roth, Karlsruhe) für rColXVII-F bzw. 12 - 16 kD Cutoff (Biomol, Hamburg) für die übrigen Konstrukte gegen 5 l Puffer dialysiert. Die Membrane wurden vor ihrer Benutzung für 30 min bei RT in Aqua dest. gewaschen. Die verschiedenen Dialyse-Puffer sind in **Tab. 2.7** angegeben.

Im Anschluß wurde das Dialysat bei 7000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wurde dann für die Chromatographie verwendet.

Tab. 2.7: Dialysepuffer der verschiedenen Medien

Konstrukt	Molekulargewicht MW [kD]	Cutoff Dialyseschlauch [kD]	isoel. Punkt	Dialyse-Puffer
rCoIXVII-F	15.6	3	6.15	IEC: 2 mM Tris-HCl pH 8.8
rCoIXVII-fd	46.7	12 - 16	6.4	IEC: 20 mM Tris-HCl pH 8.8
rCoIXVII-ed	69.9	12 - 16	8.7	IEC: 50 mM NaAc pH 4.8
		12 - 16		HIC: 50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.0
		12 - 16		IEC: 20 mM Tris-HCl pH 10.0
rCoIXVII-VL	180	12 - 16	8.9	IEC: 50 mM HEPES pH 7.6

IEC: Ionenaustausch-Chromatographie

HIC: Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

2.5.3 Proteinreinigung mit Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

Nach der Konzentration und Dialyse des Mediums wurden die rekombinant erzeugten Proteinfragmente durch verschiedene Chromatographieverfahren gereinigt.

Gerät und Säulen

(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Äkta Purifier System, incl. Software Unicorn

Anionentauschersäule:

HiTrap Q Sepharose HP, 5 ml

Kationentauschersäule:

HiTrap SP Sepharose HP, 5 ml

Hydrophobe Interaktionssäule:

HiTrap Butyl Sepharose 4 FF, 5 ml

Gelfiltrationssäule:

Superose 12 HR 10/30, 24 ml

Sämtliche Laufmittel und Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0.2 µm; Millipore, Eschborn) und entgast. Die Säulen wurden nach der Benutzung gespült und in 20 % Ethanol gelagert. Die direkte Umpufferung der Säulen von 20 % Ethanol zu einem salzhaltigen Eluenten oder umgekehrt wurde durch das Spülen mit Aqua dest. (ebenfalls filtriert und entgast) vermieden. Durch sorgfältiges Verbinden der Anschlüsse 'drop to drop' wurde das Eindringen von Luft in das System vermieden. Die Flußraten und Drücke waren immer im Toleranzbereich nach Herstellerangaben. Das Eluat wurde in silikonisierten 1.7 ml-Reaktionsgefäßen (Sigma-Aldrich, Steinheim) gesammelt.

Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie (Ion Exchange Chromatography, IEC) beruht die Trennung auf elektrostatischen Interaktionen zwischen den Proteinen und den funktionellen Gruppen des Säulenmaterials: geladenen Gruppen auf der Oberfläche der Proteine (geladene Proteinseitenketten) treten mit entgegengesetzt geladenen Gruppen auf der Austauschmatrix in Wechselwirkung und führen so zu einer Bindung an die Säule, wobei die Bindungsstärke von den individuellen Ladungseigenschaften der einzelnen Polypeptide abhängt. Die Elution erfolgt durch die Erhöhung der Ionenstärke, die zu einer

Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Protein und Gelmaterial erfolgt (steigender Salzgradient).

Der Vorteil einer großen Bindungskapazität auch bei kleinen Matrixmengen macht die Ionentauscher zur ersten Wahl, um eine Proteinreinigung zu beginnen.

Als Säulen wurden HiTrap Q (Anionentauscher) und HiTrap SP (Kationentauscher) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

Die Säule wird zur Vorbereitung mit 6 Säulenvolumina (SV) Auftragungspuffer A (Niedrigsalzpuffer) gespült und auf die Startbedingungen äquilibriert. Die in Puffer A dialysierte Probe wurde unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule aufgetragen und mit einem linear ansteigenden Salzgradienten (Puffer B) eluiert (siehe **Tab. 2.8**). Die Flußrate beim Auftragen der Probe betrug 1.0 ml/min, die Elutionsrate 1.0 ml/min bei einer Fraktionsgröße von 1.4 ml.

Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Das Prinzip der hydrophoben Interaktions-Chromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) basiert auf der Wechselwirkung hydrophiler Proteinbereiche mit hydrophobem Säulenmaterial. Durch die Auftragung der Proteine in einem Puffer mit hoher Ionenstärke entstehen starke Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Oberflächenbereichen der Polypeptide und den hydrophoben Liganden der Säulenmatrix. Treibende Kraft für diese Wechselwirkung ist die Entropie, die durch die Aggregation unpolarer Gruppen und polarer Umgebung zunimmt. Die Elution erfolgt durch eine Verringerung der Polarität des Puffers (Reduzierung der Ionenstärke).

Vor Auftragung der Probe wurde die Säule mit 6 SV des Auftragungspuffers A auf Hochsalzbedingungen äquilibriert. Die Probe muß sich ebenfalls in einem Milieu hoher Ionenstärke befinden. Dazu wurde sie mit 1M Ammoniumsulfat versetzt, wobei darauf zu achten war, daß ein Aussalzen des Proteins durch lokale Überkonzentrierung vermieden wird (langsame Zugabe des Ammoniumsulfates unter ständigem Rühren). Die Elution erfolgte im absteigenden Salzgradienten mit Niedrigsalzpuffer A in Stufen von 0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % für jeweils 3 SV bei einer Flußrate von 1 ml/min und einer Fraktionsgröße von 1.4 ml, wobei mit Aqua dest. nacheluiert wurde, um auch stark hydrophobe Proteine wieder von der Säule zu lösen.

Tab. 2.8: Säulen und Puffer für die FPLC

Konstrukt	MW [kD]	isoel. Punkt	Verf.	Säule	Auftragungspuffer A	Elutionspuffer B	pH	
rColXVII-F	15.6	6.15	IEC	A	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl	8.8	
rColXVII-fd	46.7	6.4	IEC	A	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl	8.8	
rColXVII-ed	69.9	8.7	IEC	K	50 mM NaAc	50 mM NaAc, 1 M NaCl	4.8	
				HIC	H	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM Na ₂ HPO ₄	7.0
				IEC	A	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl	10.0
rColXVII-VL	180	8.9	IEC	K	50 mM HEPES	50 mM HEPES,	7.6	

A: Anionentauscher-Säule Q

K: Kationentauscher-Säule SP

H: Hydrophobe Interaktions-Säule Butyl

Gelfiltration

Bei der nicht-adsorptiven Methode der präparativen Gelfiltration werden Proteine aufgrund eines unterschiedlichen hydrodynamischen Volumens getrennt. Je kleiner das hydrodynamische Volumen eines Proteins ist, umso langsamer passiert es die Säule. Größeren Molekülen steht ein vergleichsweise kleines Verteilungsvolumen in der Gelmatrix zur Verfügung, so daß sie früher als kleinere Proteine eluieren.

Für die Gelfiltration wurden die im Westernblot (siehe Kap. 2.6.4) positiven Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, gepoolt und mit einer Amicon Ultra-4 Zentrifugal-Filtereinheit mit 10 kD (rColXVII-F) bzw. 30 kD Cutoff (übrige Konstrukte) (Millipore, Eschenbach) bei 2 000 g (Sepatech Varifuge 3.0 R; Heraeus, Hannover) auf ein Volumen kleiner 250 µl eingeeengt.

Vor dem Auftragen der Probe wurde die Superose 12-Gelfiltrationssäule mit 3 SV TBS-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) gespült. Die Probe wurde dann mit einer Flußrate von 0.5 ml/min und einer Fraktionsgröße von 0.5 ml aufgetrennt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde mit der Methode nach BRADFORD [1976] durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer photometrisch meßbaren Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffes an Proteinen (MW > 3 kD). Der Farbwechsel erfolgt jedoch nicht linear, daher muß zunächst eine Eichkurve erstellt werden, anhand derer die Konzentrationsbestimmung erfolgte.

Färbelösung (Bradford-Reagenz)

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
25 ml Methanol
50 ml 85% Phosphorsäure
ad 500 ml Aqua dest., filtrieren.

1 µl Probe und 99 µl Aqua dest. wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Extinktion der Lösung nach 5 min bei 595 nm gegen den Leerwert (100 µl Aqua dest. mit 1 ml Bradford-Reagenz) in Doppelbestimmung gemessen. Für die Messungen wurden Kunststoff-Einmalküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Bei jeder Messung wurden definierte Verdünnungsreihen an Rinderserumalbumin (BSA) als Standard mitgeführt (erstellte Eichkurven), mit denen die Proteinkonzentration der Probe bestimmt wurde.

Konzentration eines (rekombinanten) Proteins

Die Bestimmung der Konzentration eines bestimmten Proteins in den aufkonzentrierten Medienproben wurde mit einem Guanidin-HCl-Verfahren und der Bestimmung des Wertes ϵ nach Edelhoch durchgeführt (Tab. 2.9) [PACE ET AL. 1995].

Dabei wurde die Absorption einer proteinhaltigen Probe bei 280 nm gemessen und die Konzentration eines Proteins nach der folgenden Formel berechnet:

$$c \text{ [g/l]} = \text{MW [kD]} \times \text{OD}_{280} / \epsilon(280)$$

mit $\epsilon(280) \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5\,685 \times \text{Anzahl Trp} + 1\,285 \times \text{Anzahl Tyr} + 125 \times \text{Anzahl Cys}$

50 μl der zu vermessenden Probe wurden mit 375 μl 8 M Guanidin-HCl in TBS (pH 7.4) und 75 μl TBS (pH 7.4) vermischt. Für den Leerwert wurden 375 μl 8 M Guanidin-HCl in TBS (pH 7.4) und 125 μl TBS (pH 7.4) angesetzt. Beide Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert. Die Messung der OD bei 280 nm wurde in Präzisions-Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) im Photometer Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Tab. 2.9: Werte für $\epsilon(280)$ für die einzelnen Konstrukte

Konstrukt	MW [kD]	# Trp	# Tyr	# Cys	$\epsilon(280)$
rColXVII-F	15.6	7	2	4	42 865
rColXVII-fd	46.6	8	14	4	63 970
rColXVII-ed	69.9	8	14	4	63 970
rColXVII-VL	180	10	36	7	103 985

2.6.2 TCA-Fällung

Zur Konzentrierung von Proteinen aus geringen Volumina, z.B. aus Aliquots des gesammelten Kultivierungsmediums, wurde die TCA- (Trichloroacetic-Acid-) Fällung angewandt.

1 ml der zu fällenden Probe wurde mit 252 μl 55 % TCA (Endkonz. 10 %) und 139 μl 1 % Triton-X100 (Endkonz. 0.1 %) versetzt, gut vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proteine in der Lösung bei 13 000 rpm und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 μl 100 % Aceton gemischt und erneut bei 13 000 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert. Das Aceton wurde dekantiert und das Pellet sofort in reduzierendem Auftragspuffer (2x) (siehe Kap. 2.6.3) aufgenommen, resuspendiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die gefällten Proteine konnten dann durch SDS-PAGE und anschließenden immunologischen Nachweis im Western-Blot (siehe Kap. 2.6.4) analysiert werden.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verwendete Puffer, Materialien und Geräte

Mini-Protean II Elektrophorese-System	BioRad (München)
PowerPac 300 Power Supply	BioRad (München)
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder Längenstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck (Darmstadt)
GelAir Cellophane Support	BioRad (München)
GelAir Drying System	BioRad (München)

1x Laufpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0.1 %	SDS

2x Auftragspuffer

0.5 M	Tris-HCl (pH 6.8)
20 %	Glycerin
4 %	SDS
10 %	β-Mercaptoethanol
0.05 %	Bromphenolblau

Färbelösung Coomassieblau

0.2 %	Coomassie Brilliant Blue G-250
10 %	Essigsäure
40 %	Methanol

Entfärbelösung Coomassieblau

40 %	Methanol
10 %	Essigsäure

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte als denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI [1970]. Durch Erhitzen der Proben auf 95°C in SDS-haltigem Ladepuffer werden Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen abgesättigt, so daß die Eigenladungen vernachlässigbar und die Wanderungseigenschaften der Proteine während der Gelelektrophorese vorrangig durch das Molekulargewicht bestimmt werden.

Das Gel für die Elektrophorese besteht aus zwei Teilgelen. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Dazu wurden die in **Tab. 2.10** angegebenen Agenzien vermischt, wobei TEMED und APS erst zum Schluß zugegeben wurden, um den Vorgang der Polymerisierung zu starten. Die Gellösung wurde dann sofort in die vorbereitete Gelgießkammer (Mini-Protean II, BioRad, München) gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Butanol dekantiert, das Sammelgel (4 %) zubereitet und über das Trenngel geschichtet. Zur Ausformung von Ladetaschen wurde vor der Polymerisation ein Kunststoffkamm in das Sammelgel eingesetzt.

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel mit den Glasplatten in die Gelkammer eingesetzt, die Kammer mit Laufpuffer befüllt, der Kamm vorsichtig entfernt und die ausgebildeten Taschen mit dem Laufpuffer gespült.

Tab. 2.10: Zusammensetzungen der SDS-Gele für die verschiedenen Konstrukte, 10 ml total

Trenngel	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %
Konstrukt	rColXVII-VL	rColXVII-ed	rColXVII-fd	rColXVII-F
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
30 % Acrylamid				
0.8 % Bisacrylamid	2.5 ml	3.3 ml	4.2 ml	5.3 ml
Aqua dest.	4.7 ml	3.9 ml	3.0 ml	1.9 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Sammelgel	4 %
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
30 % Acrylamid	
0.8 % Bisacrylamid	1.34 ml
Aqua dest.	7.0 ml
0.25 % Bromphenolblau	50 µl
10 % SDS	200 µl
TEMED	24 µl
10 % APS	150 µl

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit reduzierendem Auftragspuffer (2x) versetzt und der Ansatz bei 95°C für 5 min denaturiert.

Das Gel wurde dann mit den Proben beladen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde bei jedem Gel eine Tasche mit einem definierten Protein-Längenstandard (Invitrogen, Karlsruhe) befüllt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40 mA.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Die im Trenngel aufgetrennten Proteine konnten dann je nach Verwendungszweck auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (siehe Kap. 2.6.4) oder mit Coomassielösung gefärbt werden. Dazu wurde das Trenngel für 15 min in Coomassie-Färbelösung bei RT geschüttelt, anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und der nicht an Proteine gebundene Farbstoff durch mehrfachen Wechsel der Entfärbelösung entfernt. Nach dem Entfärben wurden die Gele luftblasenfrei auf Zellophan-Papier aufgebracht und für 2 h in einem Geltrockner getrocknet.

2.6.4 Western-Blotting

Verwendete Puffer, Materialien und Geräte

Mini Trans-Blot Cell Tank-Blotting-Apparatur	BioRad (München)
PowerPac 300 Power Supply	BioRad (München)
Fiber Pads	BioRad (München)
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Transfer-Medium Nitrocellulose-Membran	BioRad (München)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Naturaflor Magermilchpulver	Töpfer (Dietmannsried)
1.AK anti-NC16a	L. Bruckner-Tuderman (Uni Münster)
2.AK Schwein-AntiKaninchen, HRP-konjugiert	DakoCytomation (Hamburg)
ECL Detection System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Medical X-ray Film Super RX Röntgenfilm	Fuji Photo Film (Düsseldorf)
Röntgen-Entwickler LX24	Kodak (Stuttgart)
Röntgen Fixierbad AL4	Kodak (Stuttgart)

Blotpuffer

20 mM Borax

Ponceau S-Färbelösung

0.2 % Ponceau S in 3 % TCA
1:5 mit 10 % Essigsäure verdünnen

1x TBST

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM NaCl
0.05 % Triton-X 100

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver in TBST

Antikörper-Inkubationslösung

0.1 % BSA in TBST

Stripping Puffer

62.5 mM Tris
2 % SDS
100 mM β -Mercaptoethanol

Im Western-Blotting werden Proteine nach deren elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamid-Gelen auf eine Membran mit Proteinbindungseigenschaften übertragen, auf der die immobilisierten Proteine angefärbt und mittels Antikörper detektiert werden können. Der Proteintransfer erfolgte in einer elektrophoretischen Blotapparatur im kontinuierlichen Puffersystem (Tank-Blotting-Verfahren).

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel aus der Apparatur gespannt, eine Glasplatte abgenommen und das Sammelgel entfernt. Nitrocellulose-Membran und Blotting-Papier wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran, das Blotting-Papier und die Fiber Pads wurden in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei zu einem 'Blot-Sandwich' zusammengefügt, das dann in die Blotkammer eingespannt wurde.

Der Proteintransfer wurde mit einer konstanten Stromstärke von 400 mA bei 4°C für 1 h durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die auf die Membran transferierten Proteine mit

Ponceau S angefärbt, der Hintergrund mit 10 % Essigsäure entfärbt und die sichtbar gewordenen Proteinbanden mit Hilfe eines Scanners und geeigneter Software gespeichert (Umax, Hsinchu, Taiwan). Die Proteinbanden wurden danach mit 1x TBST entfärbt. Der Blot kann direkt im Anschluß für den immunologischen Nachweis von Proteinen vorbereitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Um den Erfolg des Blotting-Vorgangs zu kontrollieren, wurden die Gele wie unter 2.6.3 beschrieben mit Coomassie angefärbt.

Nachweis von Proteinen nach Western-Blotting mit Antikörpern (Immunoblot)

Auf der Membran lassen sich einzelne Proteine mit Hilfe eines spezifischen Erstantikörpers nachweisen. Um den an das Protein gebundenen, primären Antikörper sichtbar zu machen, wird ein zweiter Antikörper benötigt, der den primären Antikörper detektiert. An diesen sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxydase (Horseradish-Peroxydase, HRP) gekoppelt. Die HRP spaltet H_2O_2 , die dabei frei werdenden Sauerstoffradikale können zur Oxidation anderer Substrate benutzt werden. Das verwendete 'ECL Detection System' (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nutzt Luminol als Substrat, welches unter alkalischen Bedingungen und Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert. Bei dieser Reaktion wird das Luminol kurzfristig in einen angeregten Zustand versetzt; bei der Rückkehr in den energiearmen Zustand wird die freiwerdende Energie in Form von Lichtquanten ($\lambda_{max} = 428 \text{ nm}$) emittiert. Diese Lichtquanten können dazu benutzt werden, einen aufgelegten Röntgenfilm zu schwärzen.

Der Western-Blot wurde zunächst in Blockpuffer bei 4°C üN inkubiert, um die proteinfreien Bereiche der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu verhindern. Nachdem die Membran 3x für 5min in TBST gewaschen wurde, konnte der Erstantikörper aufgebracht werden. Dazu wurde die Membran mit dem Erstantikörper (Anti-NC16a, 1:2000 in TBST mit 0.1 % BSA) in Folie eingeschweißt und bei RT für 2 h geschüttelt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut 3x für 5min in TBST gewaschen. Für die Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde wie bei der Hybridisierung des primären Antikörpers verfahren (Schwein-antiKaninchen, HRP-konjugiert, 1:1000 in TBST mit 0.1 % BSA). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran für 1min mit 2ml ECL Detection-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) behandelt und in Plastikfolie eingelegt. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit des aufgelegten Films richtete sich nach der Intensität der Chemilumineszenz (2 - 5 min).

Der so belichtete Röntgenfilm wurde dann für 5min in das Entwicklerbad getaucht, in Aqua dest. gewaschen und anschließend im Fixierbad fixiert. Nach einem letzten Waschschrift in Aqua dest. konnte der Film getrocknet und ausgewertet werden.

Strippen von Blotmembranen

Das Stripping bewirkt das Entfernen des aufgebrauchten Antikörpers durch dessen Reduktion und Denaturierung. Dadurch wird die erneute Detektion des Proteins auf einer Membran ermöglicht.

Die Blotmembran wurde dafür in 50 ml Stripping Puffer bei 60°C für 90 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde die Membran 3x für 5 min bei RT in 1x TBST gewaschen und konnte dann bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder für die erneute Antikörperbehandlung blockiert werden.

2.6.5 Analyse durch Trypsin-vermittelten Proteinabbau (Trypsin-Verdau)

Verwendete Puffer und Lösungen

TV-Puffer

100 mM Tris-HCl
400 mM NaCl
pH 7.4

Trypsin-Lösung

Typ II-S (aus Schweine-Pancreas; Sigma, Taufkirchen)
1 mg/ml in TV-Puffer
(wurde frisch angesetzt und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert)

Trypsin-Inhibitor-Lösung

Typ I-S (aus Sojabohnen; Sigma, Taufkirchen)
5 mg/ml in TV-Puffer
(wurde frisch angesetzt und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert)

5x Auftragspuffer mit DTT

315 M Tris-HCl pH 6.8
50 % Glycerol
10 % SDS
0.05 % Bromphenolblau
100 mM DTT

Nach der Aufreinigung der rekombinanten Polypeptide wurde mit einem Trypsin-Verdau der Abbau der tripelhelikalen Bereiche der Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht [BRUCKNER UND PROCKOP 1981]. Mit dieser Methode konnte der T_m-Wert mit den Ergebnissen aus der CD-Spektroskopie (siehe Kap. 2.7.2) verglichen werden.

Die Proben mit den aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurden vor dem Trypsin-Verdau in Dialyseschläuchen mit 3.5 kD Cutoff (Spectrapor; Roth, Karlsruhe) für rColXVII-F bzw. 12 - 16 kD Cutoff (Biomol, Hamburg) für die übrigen Konstrukte üN bei 4°C gegen 1 l TV-Puffer dialysiert. Für Mengen kleiner 500 µl wurde die Probe in einem 2.0 µl-Reaktionsgefäß dialysiert, wobei ein Stück des entsprechenden Dialyseschlauches als Membran in eine Öffnung im Deckel eingepaßt wurde.

Für den Trypsin-Verdau wurden jeweils 30 µl Probe für jede Zieltemperatur in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert (Tab. 2.11). Die Probe wurde dann für 30 s auf Eis gestellt. Anschließend wurden 10 µl Trypsinlösung zur Probe pipettiert, gut vermischt und für 2 min im Wasserbad bei RT inkubiert. Zur Inhibition der Trypsin-Wirkung wurden dann 10 µl Trypsin-Inhibitor dazupipettiert und wiederum gut vermischt. Sofort im Anschluß wurde die Probe mit 5x Auftragspuffer mit DTT versetzt und bis zur SDS-PAGE auf Eis gestellt bzw. bei -20°C gelagert.

Als Vergleich wurde bei jedem Gel eine unverdaute Probe mitaufgetragen. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde ein Immunoblot durchgeführt und der belichtete Röntgenfilm eingescannt (Umax, Hsinchu, Taiwan).

Tab. 2.11: Thermale Inkubationsgradienten der Trypsin-Verdaus

Konstrukt	Temperaturen
rColXVII-F	30 - 32 - 34 - 36 - 38 - 40 - 42 - 44 - 46 - 48 - 50 - 55 - 60 - 65 - 70 - 75 - 80 °C
rColXVII-ed, fd, VL	30 - 34 - 38 - 42 - 46 - 50 - 60 - 70 °C

2.7 Biophysikalische Analyse

2.7.1 Ultrastrukturelle Analyse: Rotations-Schrägbedampfung für nachfolgende Elektronenmikroskopie

Das Verfahren der Rotations-Schrägbedampfung (Rotary Shadowing, RS) (Abb. 2.1) wurde als Probenvorbereitung zur Darstellung der Proteinmoleküle mit Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt.

Bei dieser Technik wird die abzubildende Probe im Hochvakuum auf einem rotierenden Teller in einem Winkel von 5° mit einem dünnen Film eines Schwermetalls (Platin) bedampft. Durch die Rotation erreicht man eine auf allen Seiten gleichmäßige Darstellung der Umgebung der Probe, unabhängig von der Orientierung der Moleküle. Es entsteht so eine Kontrastierung durch 'Schattenguß'. Die Stabilisierung der Platin-Bedampfung wird durch eine nachfolgende Kohlebedampfung bei einem Winkel von 90° erreicht (Abb. 2.2). Diese Methode gewährleistet einen hochauflösenden Kontrast im TEM.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit den aufgereinigten rekombinanten Polypeptiden in Dialyseschläuchen mit 3.5 kD Cutoff (Spectrapor; Roth, Karlsruhe) für rColXVII-F bzw. 12 - 16 kD Cutoff (Biomol, Hamburg) für die übrigen Konstrukte üN bei 4°C gegen 1 l 0.05 % Essigsäure dialysiert. Für Mengen kleiner 500 µl wurde die Probe in einem 2.0 µl-Reaktionsgefäß dialysiert, wobei ein Stück des entsprechenden Dialyseschlauches als Membran in eine Öffnung im Deckel eingepaßt wurde.

40 µl einer vorbereiteten Probe wurden im Verhältnis 1:1 mit Glycerol (Merck, Darmstadt) vermischt und mit einer handelsüblichen Airbrush-Apparatur auf die saubere Oberfläche von frisch gepaltem Glimmer aufgesprüht. Der Sprühfilm wurde dann auf dem Probenteller der Bedampfungsanlage Auto 306 (BOC Edwards, Kirchheim) bei RT und $9 \cdot 10^{-6}$ bar für 2 h getrocknet.

Die auf dem Glimmer getrocknete Probe wurde bei einer Rotation des Probentellers von etwa 120 rpm in einem 5°-Winkel für 15 s mit 50 mA bei 2.5 kV aus einer Entfernung von 12 cm mit Platin bedampft. Anschließend wurde der Teller auf 90° gedreht und die Kohlebedampfung für 2 s mit 100 mA bei 2.5 kV aufgebracht.

Der so entstandene Film wurde auf eine saubere Aqua dest.-Oberfläche abgefloated. Mit Kupfergrids (400 Maschen; Plano, Wetzlar) wurden Teile des Films von der Oberfläche aufgenommen (Abb. 2.2) und nach dem Lufttrocknen im TEM (EM 109; Zeiss, Oberkochen) untersucht und mit MegaView II (Soft Imaging System, Münster) fotografiert. Die aufgenommenen Bilder konnten mit dem Programm AnalySIS (Soft Imaging System, Münster) dargestellt und die Moleküle vermessen werden.

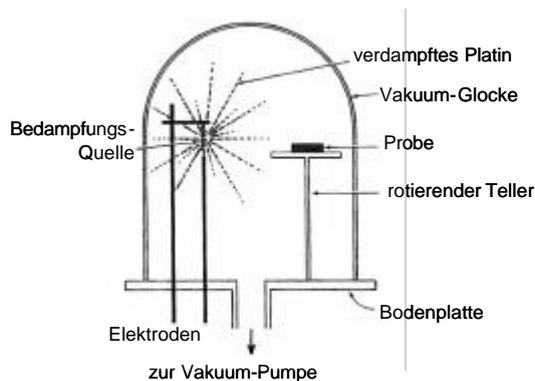


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Bedampfungsanlage

Die Probe wird auf einem rotierenden Teller im Hochvakuum nacheinander mit einem Platin- und einem Kohlefilm bedampft

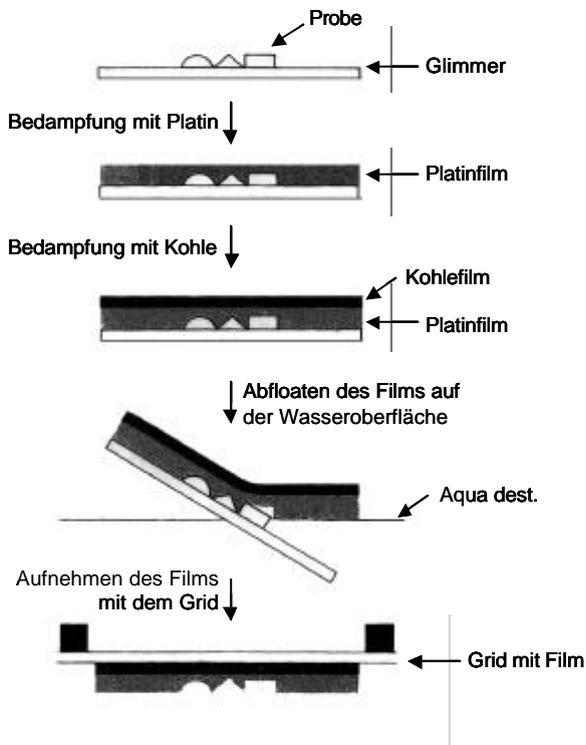


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Rotations-Schrägbedampfung

Nach Aufsprühen und Trocknen der Probe auf frisch gespaltenem Glimmer wird die Probe zunächst mit Platin bedampft, anschließend wird die stabilisierende Kohlebedampfung aufgebracht. Der Film wird nach Abfloaten auf eine Wasseroberfläche mit Kupfergrids aufgenommen und kann nach dem Lufttrocknen im Elektronenmikroskop untersucht werden.

2.7.2 CD-Spektroskopie

Zur weiteren Untersuchung konformeller Aspekte wurden die rekombinanten Proteine durch spektrale und thermale CD-Analyse analysiert.

Unter Zirkulardichroismus (circular dichroism, CD; siehe auch Kap. 6.1) versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht durch eine Probe im UV/Vis-Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Zirkulardichroismus wird bei der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit chiralen Molekülen beobachtet. Proteine besitzen viele chirale Zentren und eignen sich deshalb gut für CD-Untersuchungen in wässriger Lösung.

Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines rechts und eines links zirkular polarisierten Lichtstrahls beschrieben werden. Optisch aktive Substanzen absorbieren rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich, was dazu führt, daß zirkular polarisiertes Licht elliptisch polarisiert wird. Die molare Elliptizität Θ ist ein Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchtritt durch die chirale Verbindung. Jeder Sekundärstrukturanteil bringt einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum eines Proteins ein.

Unter Verwendung verschiedener Algorithmen kann man aus der molaren Elliptizität die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt, Schleifen und ungeordneter Struktur (random coil) eines Proteins abschätzen. Darüber hinaus kann man konformelle Übergänge eines Proteins verfolgen.

Die CD-Spektren von Proteinen im Peptidbereich unterhalb von 250 nm sind besonders empfindlich für die Detektion von Sekundärstruktur. Dies gilt im speziellen für die Charakterisierung von α -helikalen Anteilen.

Die Proben mit den aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurden vor der Messung in Dialyseschläuchen mit 3.5 kD Cutoff (Spectrapor; Roth, Karlsruhe) für rColXVII-F bzw. 12 - 16 kD Cutoff (Biomol, Hamburg) für die übrigen Konstrukte μ N bei 4°C gegen 1 l 0.05 % Essigsäure dialysiert. Für Mengen kleiner 500 μ l wurde die Probe in einem 2.0 μ l-Reaktionsgefäß dialysiert, wobei ein Stück des entsprechenden Dialyseschlauches als Membran in eine Öffnung im Deckel eingepaßt wurde.

Alle CD-Messungen wurden auf einem Jasco 715-A CD-Spektrometer mit Temperaturkontroller (Jasco, Tokio, Japan) in Präzisions-Quarzküvetten (Quarzglas; Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1.0 mm im fernen UV-Licht durchgeführt. Die Parameter für die Messungen sind in **Tab. 2.12** aufgeführt. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden bei der Aufzeichnung der CD-Spektren je drei Messungen akkumuliert.

Tab. 2.12: Parameter für die Messungen der CD-Spektren und die Schmelzpunktbestimmungen (T_m-Werte)

	CD-Spektren	T _m -Werte
Wellenlänge	190 - 300 nm	221 nm
Temperatur	20°C bzw. 100°C	20 - 100°C
Geschwindigkeit	200 nm/min	30°C/h
Response-Zeit	1 s	1 s
Auflösung	0.1 nm	0.2°C
Bandbreite	1.0 nm	1.0 nm
Empfindlichkeit	200 mdeg	100 mdeg

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der rekombinanten Kollagen XVII-Expressions-Konstrukte und Transfektion der Zellen

Zur weiteren biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung von Kollagen XVII und zur Vorbereitung der Zellbindungsstudien sollten zunächst verschiedene Kollagen XVII-Fragmente kloniert und rekombinant exprimiert werden, die neben der Transmembranregion auch das C-terminale Ende enthalten (siehe **Abb. 3.2**) Hierzu wurde ein eukaryotisches System verwendet, da die Faltung und die posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in Prokaryonten abweichen kann. Als Expressionsvektor diente das modifizierte Plasmid pCEP-Pu-BM40 (**Abb. 3.1**) [KOHLEFELDT ET AL 1997], welches auf dem kommerziell erhältlichen pCEP-4 basiert und episomal in das Chromosom der Zelle integriert wird.

3.1.1 Der Vektor pCEP-Pu und das BM40-Signalpeptid

Der in diesem Vektor enthaltene starke Promotor des Zytomegalie-Virus (CMV) kontrolliert die Transkription des transfizierten Gens und bewirkt eine Überexpression der cDNAs. Zur Sekretion der rekombinanten Proteine in das Zellkulturmedium wurde das Signalpeptid des Basalmembranproteins BM40 benutzt, dessen cDNA im Vektor nach dem Promotor 5'-seitig zum einklonierten Fragment vorliegt und so in den Vektor integriert wurde, daß es möglich war, Konstrukte gerichtet über eine NheI-Schnittstelle in diesen einzuklonieren. Das Signalpeptid führt zum Ausschleusen des Proteins aus der Zelle, was insbesondere bei den Proteinen mit Transmembranregion von Bedeutung ist, und wird dabei spezifisch abgespalten. Die Verwendung dieser Methode hat den großen Vorteil, daß das rekombinante Medium leichter gereinigt werden kann, als dieses nach einem Zellaufschluß möglich wäre. Durch die proteolytische Abspaltung ergibt sich, daß vier nicht authentische Aminosäuren (APLA) in die N-Termini der rekombinanten Proteine eingeführt werden. Aufgrund ihrer Ladungsneutralität ist jedoch keine substantielle Veränderung der Proteineigenschaften zu erwarten.

Desweiteren enthält der Vektor den Epstein-Barr-Virus-Replikationsursprung (origin of replication, OriP) und das Epstein-Barr-Virus EBNA-1-Gen, die eine episodale high-copy Replikation in einer Zelllinie erlauben, welche das EBNA-1-Protein sezerniert. Zur Selektion transfizierter Zellen ist das Puromycin-Resistenz-Gen Pac integriert.

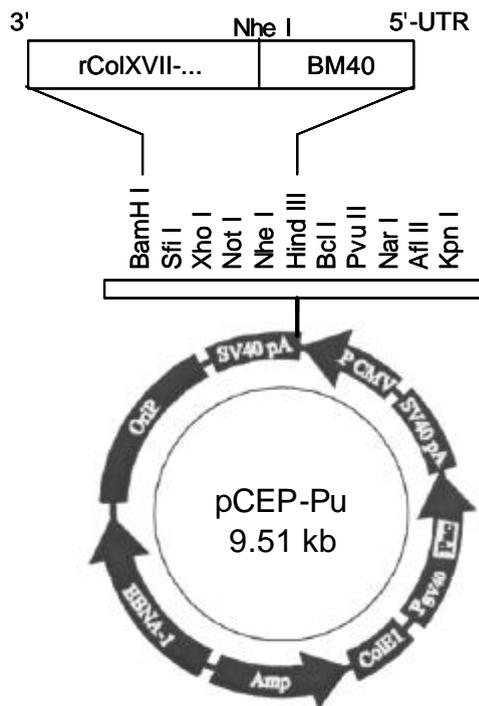


Abb. 3.1: Der episomale Expressionsvektor pCEP-Pu mit BM40-Signalsequenz [KOHLEFELDT ET AL. 1997]

3.1.2 Klonierung der Kollagen XVII-Konstrukte

Für die Amplifikation durch PCR mit entsprechenden Primern wurde als Template humane cDNA, die für Kollagen XVII codiert [GIUDICE ET AL. 1992], verwendet. Die Numerierung der Nukleotide in der cDNA stimmt mit GIUDICE ET AL. [1992] überein (GenBank Acc.-Nr. M91669), während die abgeleitete Proteinsequenz vom Methionin-Startcodon (Position 36 in M91669) gezählt wurde.

Mit Hilfe der PCR wurden ein Kollagen XVII-Konstrukt in vollständiger Länge (rColXVII-VL, nt 1 - 4596, **Abb. 3.2**) und ein sehr kleines Konstrukt mit einem kurzen Stück der intrazellulären NC16c-Domäne, der Transmembranregion und der ersten nichtkollagen extrazellulären Domäne NC16a (rColXVII-F, nt 1374 - 1806, siehe **Abb. 3.2**) amplifiziert und in den Vektor pCEP-Pu-BM40 inkloniert. Um die korrekten Amplifikationen zu überprüfen, wurde jeweils das gesamte Konstrukt sequenziert. Diese Konstrukte wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far, Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck, zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt rColXVII-E (nt 1374 - 2529, siehe **Abb. 3.2**), welches rColXVII-F um die erste kollagene extrazelluläre Domäne C15 erweitert, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Frau Gabriele Baines kloniert [noch nicht veröffentlicht, Daten in Vorbereitung].

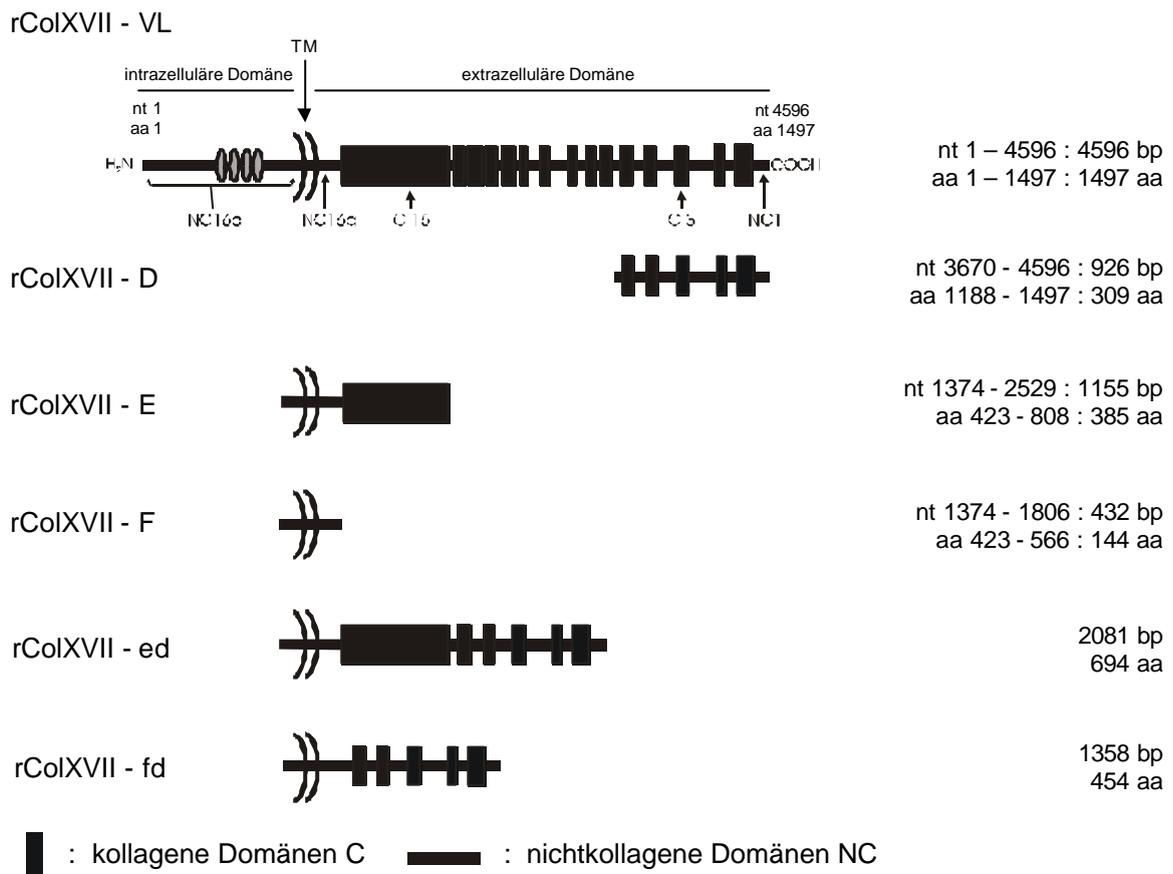


Abb. 3.2: Schematische Übersicht der verwendeten rekombinanten Konstrukte des humanen Kollagen XVII

Die Konstrukte E, F, ed und fd enthalten neben einem kurzen Stück der intrazellulären NC16c-Domäne und der Transmembranregion auch Teile der extrazellulären Domäne.

Die gesamte extrazelluläre Domäne besteht aus einer Serie von 15 kollagenen Domänen (C1 bis C15, dargestellt als hohe vertikale Boxen), die von nichtkollagenen Domänen (NC1 bis NC16a, dargestellt als flacher Strich) unterbrochen werden. Die nichtkollagene Transmembranregion wird als NC16b und die intrazelluläre Domäne als NC16c bezeichnet.

Für die einzelnen Konstrukte sind die Nummern der Nukleotide und die entsprechenden Aminosäurepositionen (nt und aa, nach GenBank Acc.-Nr. M91669) sowie die Gesamtzahlen an Basenpaaren (bp) und Aminosäuren (aa) angegeben.

NC: nichtkollagene Domänen, TM: Transmembranregion (nt 1504 - 1572), C: kollagene Domänen, rColXVII-...: rekombinantes Kollagen XVII-...

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der Konstrukte rColXVII-ed und rColXVII-fd wurde das Vollängen-Konstrukt rColXVII-VL verwendet (**Abb. 3.3**). Zunächst wurden mittels PCR mit den in **Tab. 3.1** angegebenen Primern die beiden Fragmente e und f hergestellt, die sich von E und F durch das Fehlen des Stop-Codons am 3'-Ende unterscheiden. Zusätzlich wurden durch die hierbei verwendeten Primer auf der 5'-Seite eine *NheI*- und auf der 3'-Seite eines *XbaI*- und eine *SalI*- Restriktionsschnittstelle in die

Fragmente eingeführt, die eine gerichtete Insertion der Fragmente in den Vektor ermöglichten und für die weitere Klonierung notwendig waren.

Die beiden amplifizierten Fragmente wurden anschließend mit den Endonukleasen *Sall* und *NheI* verdaut und präparativ mit dem Wizard aus einem Agarosegel aufgereinigt.

Der Vektor pCEP-Pu-BM40-VL wurde durch die Restriktion mit *NheI* und *XhoI* so von seinem Insert getrennt, daß das BM40-Signalpeptid im Vektor verblieben ist und ebenfalls präparativ aus einem Agarosegel aufgereinigt, bevor das Fragment e bzw. f an das 3'-Ende des BM40-Signalpeptids ligiert wurde. Durch die Ligation des *Sall*-3'-Ende des Inserts an die kompatible *XhoI*-Schnittstelle des Vektors fällt diese Restriktionsschnittstelle weg.

Die Vektoren pCEP-Pu-BM40-e und pCEP-Pu-BM40-f wurden dann in kompetente *E.coli*-Zellen (INV110) transformiert und auf Agar-Platten kloniert. Von den üN-Kulturen der gepickten Klone wurden Mini-Präparationen zur Plasmid-Gewinnung durchgeführt und die DNA mittels Restriktionsverdau charakterisiert. Die DNAs je eines positiven Klons wurden durch Sequenzierung bestimmt. Die Sequenzen zeigten keine Abweichung zur publizierten Sequenz [GIUDICE ET AL. 1992] und korrekte in-frame-Insertion. Für die weitere Klonierung wurden größere Plasmidmengen über Midi-Präparationen isoliert.

Tab. 3.1: Primerpaare mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen

Fragment	Primersequenzen	nt
rColXVII-d	s 5' - CCA CCT <u>CTA GAC</u> CCA GGC AAT GTG TGG TCC AGC ATC - 3' <i>XbaI</i>	3670 - 4596
	as 5' - <u>GGA TCC TCA</u> CGG CTT GAC AGC AAT ACT TCT TC -3' <i>BamHI</i> Stop	(926 bp)
rColXVII-e	s 5' - GTC GTA <u>GGC TAG CAG ATA TCC</u> ACA GCT ACA GCA GCA GTG -3' <i>NheI</i> <i>EcoRV</i>	1374 - 2529
	as 5' - TTA <u>GGT CGA C TC TAG AAC</u> GAT CTT GCC TGG AGC TCC TGG -3' <i>Sall</i> <i>XbaI</i>	(1155 bp)
rColXVII-f	s 5' - GTC GTA <u>GGC TAG CAG ATA TCC</u> ACA GCT ACA GCA GCA GTG -3' <i>NheI</i> <i>EcoRV</i>	1374 - 1806
	as 5' - TTA <u>GGT CGA C TC TAG ACC</u> TCG GAG ATT TCC ATT TTC CTG TTC C -3' <i>Sall</i> <i>XbaI</i>	(432 bp)

nt: Nukleotide (und Länge) des zu amplifizierenden Fragments

Um im nächsten Schritt (**Abb. 3.3**) über die *XbaI*-Schnittstelle das Fragment d einzufügen, mußten die Inserts BM40-e und BM40-f in einen Hilfsvektor umkloniert werden, da die *XbaI*-Schnittstelle im pCEP-Pu-Vektor nicht unique ist.

Dafür werden die Konstrukte pCEP-Pu-BM40-e und pCEP-Pu-BM40-f mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und nach der Gelelektion die Inserts BM40-e und BM40-f mit dem Wizard aufgereinigt, bevor sie in den Hilfsvektor pGEM2 ligiert werden, der ebenfalls mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und gereinigt wurde. Die Transformation erfolgte wiederum

in kompetente E.coli-Zellen. Positive Klone wurden, wie oben beschrieben, mit einem Restriktionsverdau charakterisiert und für die Ligation des Fragments d verwendet.

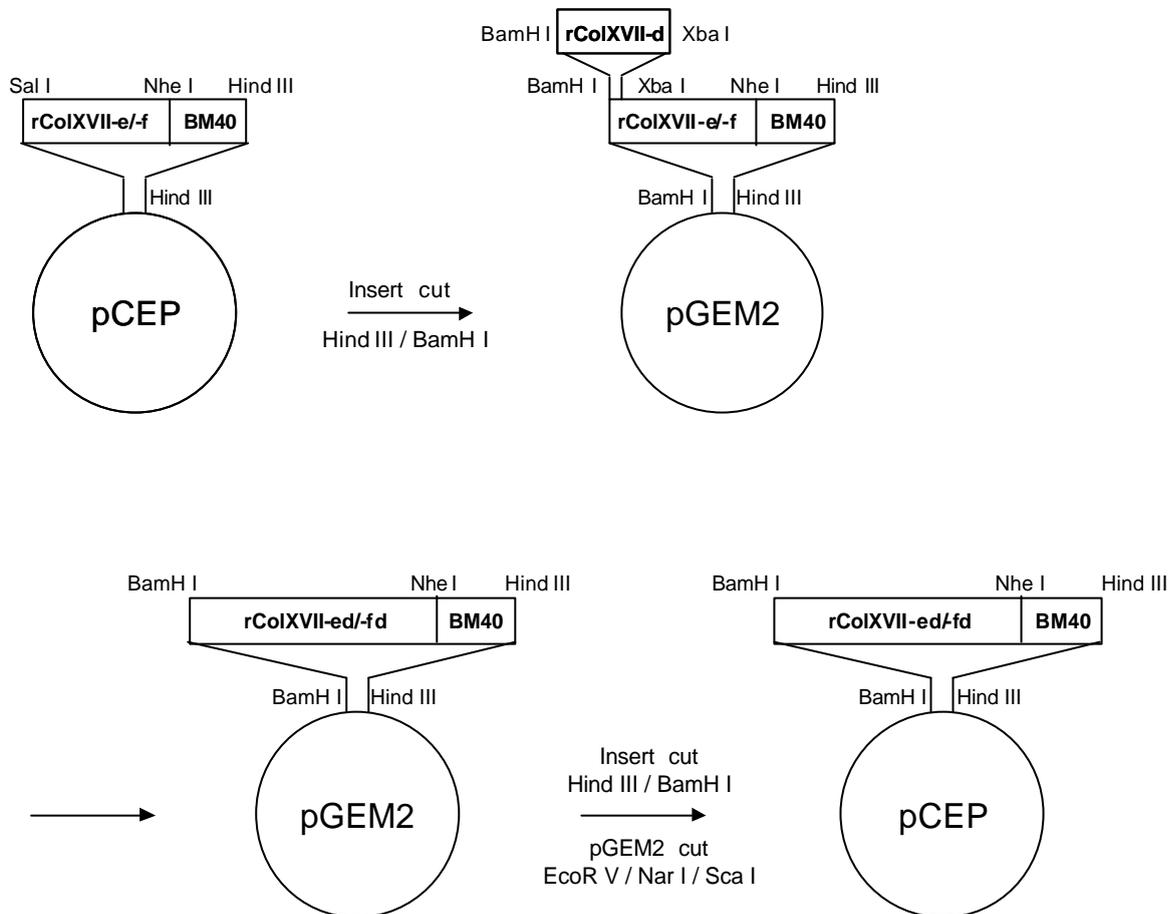


Abb. 3.3: Klonierung der Konstrukte ed und fd

1. Schritt: Das *NheI/SalI*-geschnittene Insert (e bzw. f) wurde in den *NheI/XhoI*-geschnittenen Vektor pCEP-Pu-BM40 ligiert.
2. Schritt: Das Insert wurde, verbunden mit dem BM40-Signalpeptid, mit *HindIII/BamHI* aus dem Vektor ausgeschnitten und in den ebenfalls *HindIII/BamHI*-geschnittenen Vektor pGEM2 ligiert.
3. Schritt: In das Konstrukt wurde dann das zusätzliche Insert d über eine *XbaI/BamHI*-Schnittstelle eingefügt.
4. Schritt: Das Insert BM40-ed bzw. BM40-fd wurde mit *HindIII/BamHI* aus dem Vektor ausgeschnitten und in den *HindIII/BamHI*-geschnittenen Vektor pCEP ligiert. Für diesen letzten Schritt mußte der Vektor pGEM2 mit einem *EcoRV/NarI/ScaI*-Verdau so zerkleinert werden, daß er beim Ligationsschritt nicht religieren würde.

Mit den in **Tab. 3.1** angegebenen Primern wurde aus dem Template rColXVII-VL das Fragment d mit einer *XbaI*-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *BamHI*-Schnittstelle und dem Stop-Codon am 3'-Ende amplifiziert. Nach der Restriktion mit den Endonukleasen *XbaI* und *BamHI* und der Aufreinigung (Wizard) wird das Fragment in die ebenfalls mit *XbaI* und *BamHI* geschnittenen Vektoren pGEM2-BM40-e und pGEM2-BM40-f ligiert

(Abb. 3.3) und in kompetente E.coli (INV110) transformiert. Die Charakterisierung positiver Klone erfolgte auch hier über Restriktionsverdaus.

Im letzten Schritt (Abb. 3.3) mußten die Fragmente BM40-ed und BM40-fd aus dem Vektor pGEM wieder in den Vektor pCEP umklontiert werden. Dieser Schritt erwies sich als unerwartet schwierig, da nach einer Auftrennung über ein Agarosegel eine Klonierung des Inserts in pCEP nicht mehr möglich war. Daher wurde der Vektor pGEM mit einem *EcoRV*-, *NarI*- und *Scal*-Verdau zerkleinert, nachdem das Insert durch einen *BamHI*- und *HindIII* Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten wurde. Dieser nur mit dem Wizard von seinen Restriktionsenzymen aufgereinigte Restriktionsansatz wurde mit einem ebenfalls *BamHI*- und *HindIII*-geschnittenen Vektor ligiert und in kompetente E.coli (INV110) transformiert. Die Charakterisierung positiver Klone der Ligation pCEP-Pu-BM40-ed und pCEP-Pu-BM40-fd wurde wiederum mit verschiedenen Restriktionsverdaus erreicht. Zur Kontrolle wurde von beiden Konstrukten eine Sequenzierung durchgeführt, bei der die Sequenzen keine Abweichung zur erwarteten Sequenz [GIUDICE ET AL. 1992] und keine Verschiebung des Leserasters aufwiesen, so daß die Plasmide pCEP-Pu-BM40-ed und pCEP-Pu-BM40-fd für die Kollagen XVII-Proteinfragmente rColXVII-ed (aa 423 - 808 und 1188 - 1497) und rColXVII-fd (aa 423 - 566 und 1188 - 1497) codieren (Abb. 3.2).

Den verwendeten Konstrukten wurde das BM40-Signalpeptid (siehe 3.1.1) vorgeschaltet, um den rekombinanten Proteinen, die alle die Transmembran-Region enthalten, Sekretion in das Zellkulturmedium und posttranslationale Modifikationen zu ermöglichen. Das Design der Konstrukte im Bereich der 5'-Region und die korrespondierende Translation in Aminosäuren ist in Tab. 3.2 angegeben.

Tab. 3.2: cDNA-Sequenzen der rekombinanten Kollagen XVII-Konstrukte im Bereich der Abspaltungsstelle () des Signalpeptids und die korrespondierende Aminosäuren-translation (aa)

Konstrukt	Sequenzen
rColXVII-E, ed	cDNA ... GCA GCC CCG CTA GCA GAT ATC CAC AGC TAC AGC ... aa ... Ala Ala Pro Leu Ala Asp Ile His Ser Tyr Ser A <u>A P L A</u> D I H S Y S ... BM40 Kollagen XVII →
rColXVII-F, fd	cDNA ... GCA GCC CCG CTA GCA GAT ATC CAC AGC TAC AGC ... aa ... Ala Ala Pro Leu Ala Asp Ile His Ser Tyr Ser A <u>A P L A</u> D I H S Y S ... BM40 Kollagen XVII →
rColXVII-VL	cDNA ... GCA GCC CCG CTA GCA CCG GGG ATC CGT ATG GAT GTA ACC AAG ... aa ... Ala Ala Pro Leu Ala Pro Gly Ile Arg Met Asp Val Thr Lys A <u>A P L A</u> P G I R M D V T K ... BM40 Kollagen XVII →

3.1.3 Erzeugung transfizierter Zelllinien

Die fünf Expressionsvektoren pCEP-Pu-BM40-E, -F, -ed, -fd, und -VL, die für die verschiedenen rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente E, F, ed, fd und VL codieren (siehe **Abb. 3.2**), wurden dann benutzt, um humane Zellen zu transfizieren.

Der Vektor pCEP-Pu, der auch das Epstein-Barr-Virus EBNA-1-Gen für das Epstein-Barr-Virus EBNA-1-Protein (Epstein-Barr nucleic antigen) trägt, benötigt für die extrachromosomale Replikation des Plasmids in Säugerzellen das EBNA-Protein. Daher wurden für die Transfektionen 293-EBNA-Zellen (humane embryonale Nierenzellen, HEK-Zellen) verwendet, eine Zelllinie, in deren Genom das EBNA- und das Neomycin-Resistenz-Gen integriert sind. Dadurch kommt es zu einer stabilen Expression des EBNA-Proteins. Die Zellen sollten im Zellkultur-Medium unter der Zugabe von G418-Sulfat (Neomycin) gehalten werden.

Diese Zelllinie konnte für die rekombinante Expression verschiedener extrazellulärer Proteine erfolgreich genutzt werden [BULLEID ET AL. 2000], da diese Zellen nur sehr wenig endogenes extrazelluläres Protein in das Zellkulturmedium exprimieren. Dies ist insofern von Bedeutung, da alle zu exprimierenden rekombinanten Proteine die Transmembranregion enthalten und zu erwarten ist, daß zumindest ein Teil von Ihnen in die Zellmembran eingebaut wird. Die Verbindung der Konstrukte mit dem heterologen BM40-Signalpeptid sollte den Anteil der in das Kulturmedium sezernierten Proteine erhöhen, denn die Aufreinigung wird signifikant erleichtert, wenn eine relativ hohe Rate von rekombinant exprimiertem Protein gegenüber endogenem Protein im Zellkulturmedium vorliegt.

Weitere Vorteile der 293-EBNA-Zellen für die Produktion von rekombinant exprimierten Proteinen sind deren schnelles Wachstum und die feste Anhaftung an Kunststoff-Oberflächen, die mehrere Zyklen von Mediuminkubation und Ernte zur Gewinnung von konditioniertem Medium ermöglichen.

Da die Expressionsvektoren nach der Transfektion als extrachromosomale Episome vorliegen, gibt es keine klonalen Unterschiede in den Expressionmustern, die durch eine Integration in verschiedenen chromosomalen Bereichen verursacht sein könnte. Somit ist es möglich, die Selektion für die ganze transfizierte Zellpopulation durchzuführen. Das Verfahren wurde für die Gewinnung von Kollagen XVII-Fragmenten, die Anteile der Ektodomäne enthalten, bereits erfolgreich verwendet [AREIDA ET AL. 2001].

Die in Kap. 3.1.2 beschriebenen Konstrukte E, F, ed, fd, und VL wurden einzeln in 293-EBNA-Zellen transfiziert. Es konnten keine Unterschiede in Zellform oder Wachstumscharakteristik, verglichen mit untransfizierten (wild type-, wt-) 293-EBNA-Zellen, beobachtet werden. Diese Zelllinien wurden verwendet, um konditioniertes Medium zu produzieren, aus dem die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente für die weiteren Untersuchungen aufgereinigt werden sollten.

Die auf einer Petrischale gewachsenen Zellen wurden mittels Calcium-Präzipitation transfiziert. Nach der Transfektion wurde dem Zellkulturmedium G418-Sulfat zugesetzt. Am zweiten Tag konnte die Selektion mit Puromycin mit der Initialdosis beginnen, am vierten Tag wurde auf die Erhaltungsdosis reduziert. Nach etwa vier bis sechs Wochen konnten die Kolonien auf eine Zellkulturflasche überführt werden. Die Zellen einer konfluent bewachsenen Flasche wurden dann gesplittet, kryokonserviert und für die anstehenden Versuche verwendet.

Um den Erfolg der Transfektion zu kontrollieren, wurde die aus dem Plasmid transkribierte RNA mittels RT-PCR nachgewiesen (3.2.1). Zur Überprüfung der Translation von Proteinen wurden Triton-Extrakte der Zellen (intrazellulär) und TCA-Fällungen des konditionierten Kulturmediums (extrazellulär) angefertigt (3.2.2). Der Einbau der Proteinfragmente in die Zellmembran wurde mit Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht (3.2.3).

3.2 Kontrolle der Zellen

3.2.1 Transfektion der Zellen: Nachweis der RNA mittels RT-PCR

Nach erfolgreicher Transfektion und Selektion von 293-EBNA-Zellen (siehe 3.1.3) mit den Plasmiden, die für das entsprechende Konstrukt (E, F, ed, fd, VL) codieren, wurde die Transkription der Vektoren in den einzelnen Zelllinien mittels RT-PCR untersucht. Auch sollte ausgeschlossen werden, daß Wildtyp-(wt-)293-EBNA-Zellen endogenes Kollagen XVII transkribieren und translatieren.

Dazu wurde zunächst eine Gesamt-RNA-Isolierung der einzelnen Zelllinien durchgeführt (Kap. 2.3.2). Im Anschluß an die Reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte eine PCR für das Housekeeping-Gen GAPDH (1.1 kb) [FOSS ET AL. 1998], die als Kontrolle für das Gelingen der RT durchgeführt wurde. Alle getesteten DNA zeigen die erwartete Bande bei 1.1 kb (**Abb. 3.4**).

Die PCR für den Bereich des Fragments rColXVII-f (nt 1374 - 1806: 432 bp) wurde durchgeführt, um den zentralen Teil des Kollagen XVII mit der Transmembranregion und der NC16a-Domäne mit den Coiled-Coil-Strukturen nachzuweisen.

Alle Zelllinien, die die Plasmide für die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente rColXVII-E, -F, -ed, -fd, und -VL enthalten, sollten die RT-PCR-Bande bei 432 bp zeigen, nicht jedoch die wt-293-EBNA-Zellen.

Die PCR für den Bereich des Fragments rColXVII-d (nt 3670 - 4596: 926 bp) erfolgte, um bei den längeren Fragmenten ed, fd und VL auch das C-terminale Ende (d) nachzuweisen und so die Vollständigkeit der Proteine zu gewährleisten.

Alle rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente enthalten den Anteil von f (nt 1374 - 1806: 432 bp), in der Bande knapp unter 0.5 kb zu sehen.

Zusätzlich konnte in den Zelllinien für rColXVII-ed, rColXVII-fd und rColXVII-VL das C-terminale Ende d (nt 3670 - 4596: 926 bp) in der Bande knapp unter 1.0 kb nachgewiesen werden.

Mit den PCR für Kollagen XVII konnte gezeigt werden, daß alle transfizierte Zelllinien das Plasmid tragen und das Insert transkribiert wird.

Die 293-EBNA-wt-Zellen sind negativ für beide Fragmente, aber positiv für GAPDH. Wie zu erwarten war, scheint kein endogenes Kollagen XVII vorzuliegen, was mit den weiteren Versuchen noch bestätigt werden sollte.

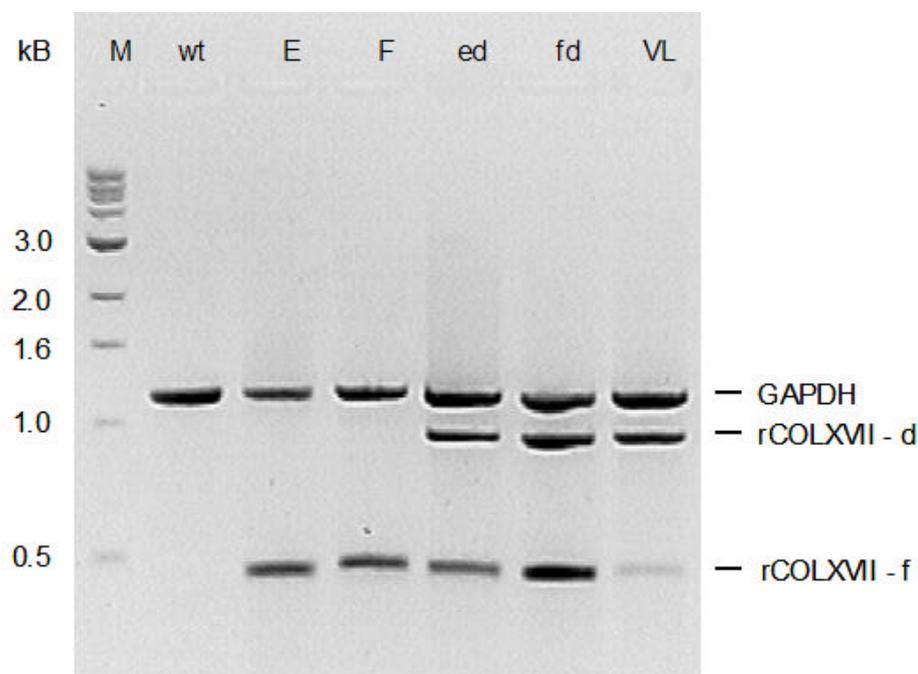


Abb. 3.4: RT-PCR der transfizierten 293-EBNA-Zellen

Zum Nachweis der Transkription des entsprechenden Plasmids und dem Ausschluß von endogenem Kollagen XVII in wt-293-EBNA-Zellen wurde eine RT-PCR für das Housekeeping-Gen GAPDH (1.1 kb) [FOSS ET AL. 1998] und für die Fragmente rColXVII-f (nt 1374 - 1806: 432 bp) und rColXVII-d (nt 3670 - 4596: 926 bp) durchgeführt.

Alle Zellen zeigen die Bande für das Housekeeping-Gen GAPDH. In allen transfizierten (plasmidtragenden) 293-EBNA-Zelllinien wird das Insert transkribiert. Die Wildtyp-(wt-) 293-EBNA-Zellen sind negativ für beide untersuchten Fragmente von Kollagen XVII.

M: Marker, wt: Wildtyp-293-EBNA-Zellen, E: rColXVII-E, F: rColXVII-F, ed: rColXVII-ed, fd: rColXVII-fd, VL: rColXVII-VL.

3.2.2 Translation der rekombinanten Proteine: Triton-Extrakte und TCA-Fällung

Zur Überprüfung der Translation von Proteinen wurden Triton-Extrakte zum Aufschluß der Zellen (Nachweis intrazellulärer Proteine) und TCA-Fällungen des konditionierten Kulturmediums (Nachweis extrazellulärer Proteine) angefertigt. Die TCA-Fällungen des Mediums dienen zusätzlich der Abschätzung, ob das Medium ausreichend rekombinantes Protein für die Aufreinigung mit Ultrafiltration und FPLC enthält.

Durch den Vergleich der Banden im Western-Blot bzw. auf dem Röntgenfilm zwischen der TCA-Fällung und dem Triton-Extrakt sollte auch der Versuch gemacht werden, das Mengenverhältnis von sezerniertem (TCA-Fällung) zu nicht-sezerniertem Protein (Triton-Extrakt) abzuschätzen.

Repräsentative Ergebnisse der Western-Blots der Triton-Extrakte und der TCA-Fällungen des zugehörigen konditionierten Mediums sind in **Abb. 3.5** und **Abb. 3.6** dargestellt.

Abb. 3.5 zeigt die Ponceau S-Färbung des Western-Blots und den belichteten Röntgenfilm des Triton-Extraktes aller Protein-Fragmente. Als Kontrolle wurden wt-293-EBNA-Zellen eingesetzt.

Die Ponceau S-Färbung verdeutlicht, daß sich bei Auftragung gleicher Extrakt-Mengen auch etwa gleiche Mengen an endogenen Zellproteinen im Extrakt befinden. Die durch den NC16a-Antikörper verursachten Färbungen im Röntgenfilm dagegen variieren stark. Die Bande für rColXVII-E ist um ein Vielfaches stärker als für rColXVII-F. Die kalkulierten Molekulargewichte der verschiedenen rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente sind in **Tab. 3.3** angegeben. Diese Werte korrespondieren gut mit den auf dem Film geschwärzten Banden.

Tab. 3.3: Molekulargewichte (MW) der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente

Konstrukt	MW [kD]
rColXVII-E	38
rColXVII-F	16
rColXVII-ed	69
rColXVII-fd	47
rColXVII-VL	180 (120 *)

* Ektodomäne

In **Abb. 3.6** sind die Ponceau S-Färbung des Western-Blots und der belichtete Röntgenfilm der TCA-Fällung des Mediums aller transfizierten 293-EBNA-Zellen und wt-293-EBNA-Zellen dargestellt. Auch hier wurden die gleichen Mengen aufgetragen. Die Ponceau S-Färbung ist wiederum vergleichbar stark für die verschiedenen Fragmente, während die Banden im Röntgenfilm sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sind, was besonders rColXVII-E betrifft.

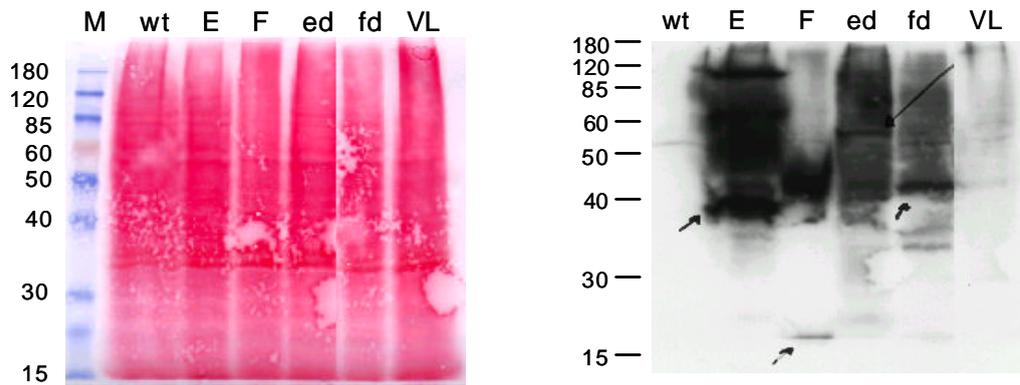


Abb. 3.5: Nachweis der intrazellulären rekombinanten Proteine: Triton-Extrakte

Die Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) zeigt in etwa gleiche Mengen an endogenen Zellproteinen im Extrakt. Die vom AK NC16a verursachte Färbung des belichteten Röntgenfilms (rechts) dagegen variiert stark trotz des Auftragens gleicher Extraktmengen. Als Kontrolle wurden wt-293-EBNA-Zellen verwendet.

M: Marker, wt: wild-typ 293-EBNA-Zellen, E: rColXVII-E (38 kD), F: rColXVII-F (16 kD), ed: rColXVII-ed (69 kD), fd: rColXVII-fd (47 kD), VL: rColXVII-VL (180 kD).

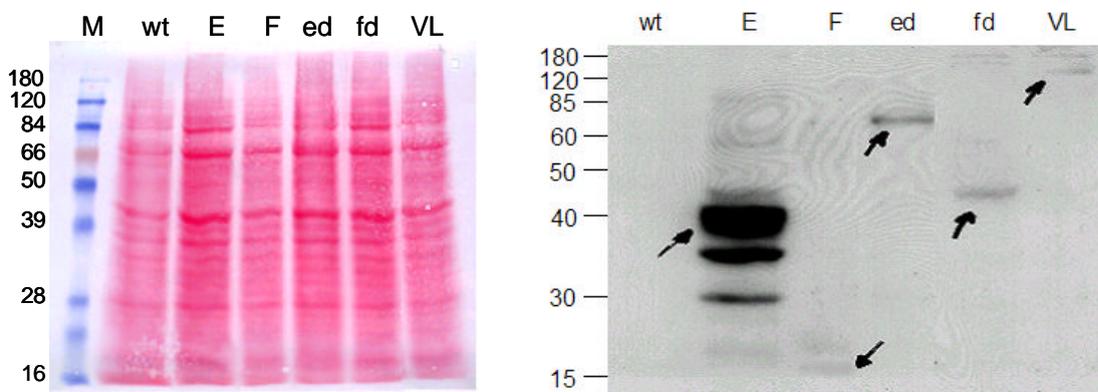


Abb. 3.6: Nachweis der extrazellulären rekombinanten Proteine: TCA-Fällungen

Die Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) zeigt in etwa gleiche Mengen an endogenen Zellproteinen im Kulturmedium. Die vom AK NC16a verursachte Färbung des belichteten Röntgenfilms (rechts) dagegen variiert stark trotz des Auftragens gleicher Mengen der TCA-Fällung des Mediums. Als Kontrolle wurden wt-293-EBNA-Zellen verwendet.

M: Marker, wt: wild-typ 293-EBNA-Zellen, E: rColXVII-E (38 kD), F: rColXVII-F (16 kD), ed: rColXVII-ed (69 kD), fd: rColXVII-fd (47 kD), VL: rColXVII-VL (180 kD).

Bei Wiederholung der Versuche fielen die Banden wiederum unterschiedlich stark zwischen den einzelnen Fragmenten aus. Beim gleichen Protein kommt es außerdem zu verschiedenen starken Banden in den einzelnen Experimenten. Die Zellen translatieren und sezernieren das rekombinante Protein nicht konstant über die Zeit, es kommt zu variierenden Mengen bei gleicher Inkubationsdauer und gleichem Zeitpunkt der Versuchsführung. Auch waren in den ersten drei Tagen andere Mengen nachzuweisen als in den nächsten drei Tagen.

Eine Abschätzung der Mengenverhältnisse zwischen sezerniertem und nicht-sezerniertem Protein war aus diesem Grunde nicht möglich.

3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen: Kollagen XVII

Um zu überprüfen, ob die Kollagen XVII-Proteinfragmente trotz des BM40-Signalpeptids in die Zellmembran der 293-EBNA-Zellen eingebaut werden, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen gegen die erste nichtkollagene extrazelluläre Domäne NC16a durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurden wt-293-EBNA-Zellen verwendet.

Wenn die Proteinfragmente mit ihrer Transmembranregion in die Zellmembran eingebaut werden, befindet sich die Antikörperbindungsstelle NC16a extrazellulär und kann somit durch die Immunfluoreszenz-Färbung detektiert werden.

Bei allen transfizierten Zelllinien 293-EBNA-rColXVII-E, -F, -ed, -fd und -VL erkennt man einen deutlichen fluoreszierenden "Ring" im Bereich der Zellmembran. Die rekombinanten Proteine werden in die Zellmembran eingebaut, daher ist die Immunfluoreszenz-Färbung im Bereich der Zellmembran verstärkt.

Bei der Negativkontrolle, den wt-293-EBNA-Zellen, ist diese verstärkte ringförmige Färbung nicht zu beobachten.

Die transfizierten Zellen sind in unterschiedlichem Maße gefärbt. Nicht alle Zellen tragen die charakteristische Ringfärbung. Das deutet darauf hin, daß die rekombinanten Proteine teilweise durch das BM40-Signalpeptid sezerniert und teilweise trotz des Signalpeptids in die Zellmembran eingebaut werden.

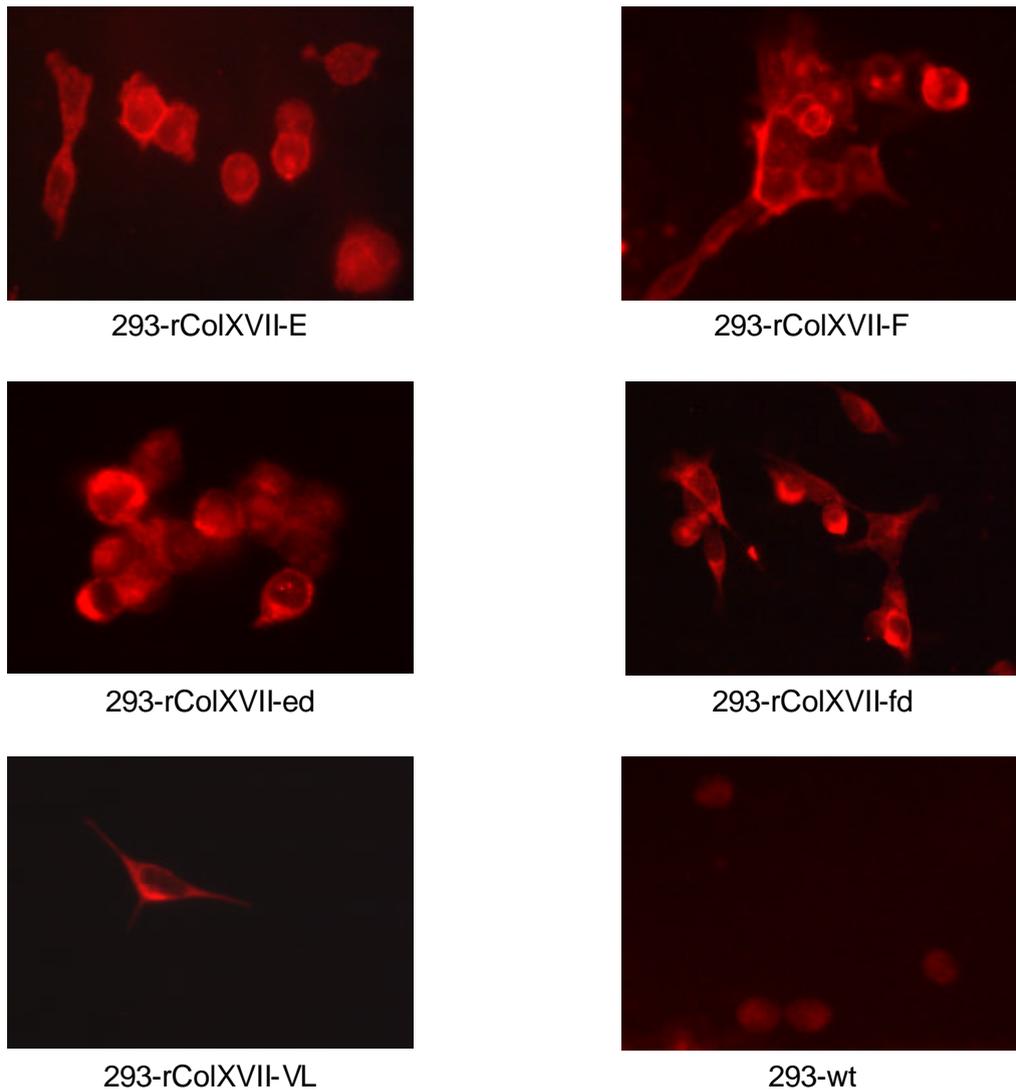


Abb. 3.7: Immunfluoreszenz-Färbungen

Bei allen transfizierten 293-EBNA-Zellen rColXVII-E, -F, -ed, -fd und -VL erkennt man einen deutlichen fluoreszierenden "Ring" im Bereich der Zellmembran. Die rekombinanten Proteine werden in die Zellmembran eingebaut und die Antikörperbindungsstelle NC16a befindet sich extrazellulär, daher ist die Immunfluoreszenz-Färbung im Bereich der Zellmembran verstärkt. Die als Negativkontrolle herangezogenen wt-293-EBNA-Zellen zeigen diese charakteristische Färbung im Bereich der Zellmembran nicht.

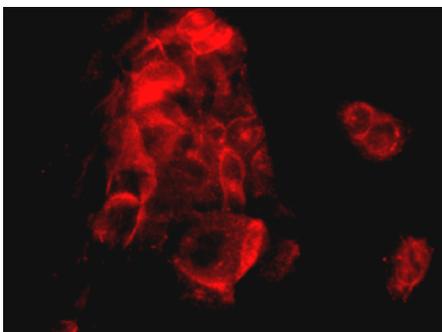
3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen: Integrine

Um die hier verwendete 293-EBNA-Zelllinie auf ihre Eignung für spätere Bindungsstudien zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von wt- und transfizierten 293-EBNA-Zellen gegen die Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ durchgeführt. Da diese Bindungsstudien auch mit Integrinen durchgeführt werden sollen, müssen bei den 293-EBNA-Zellen endogene $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrine ausgeschlossen werden.

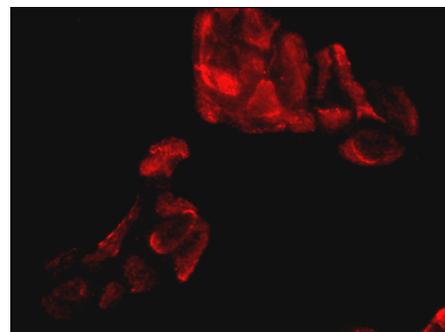
Als Positiv-Kontrolle wurden humane Keratinozyten herangezogen, als transfizierte Zellen wurden in diesen Immunfluoreszenzfärbungen 293-EBNA-F und -VL verwendet.

Die Keratinozyten-Zellverbände sind überwiegend im Bereich der Zellmembran stark angefärbt, jedoch sind z.T. auch intrazelluläre Bereiche markiert (**Abb. 3.8**). Da sich die Integrine vorwiegend im Bereich der Zellmembran befinden, fällt die Anfärbung in diesem Bereich und in dieser Stärke wie erwartet aus.

Bei den transfizierten wie auch bei den untransfizierten 293-EBNA-Zellen erkennt man nur eine sehr schwache unspezifische Färbung der Zellen, die sich gleichmäßig über die gesamte Zelle erstreckt (**Abb. 3.9**). Im Vergleich mit den deutlich angefärbten Keratinozyten sind die untransfizierten und auch die transfizierten 293-EBNA-Zellen negativ sowohl für $\alpha 6$ - als auch für $\beta 4$ -Integrine.



Keratinozyten: $\alpha 6$



Keratinozyten: $\beta 4$

Abb. 3.8: Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen von Keratinozyten gegen Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$ (Positivkontrolle)

Die Keratinozyten-Zellverbände sind hauptsächlich im Bereich der Zellmembran stark angefärbt, aber auch im intrazellulären Bereich markiert. Da sich die Integrine vorwiegend im Bereich der Zellmembran befinden, ist diese Anfärbung gegen $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrine wie erwartet positiv in Keratinozyten.

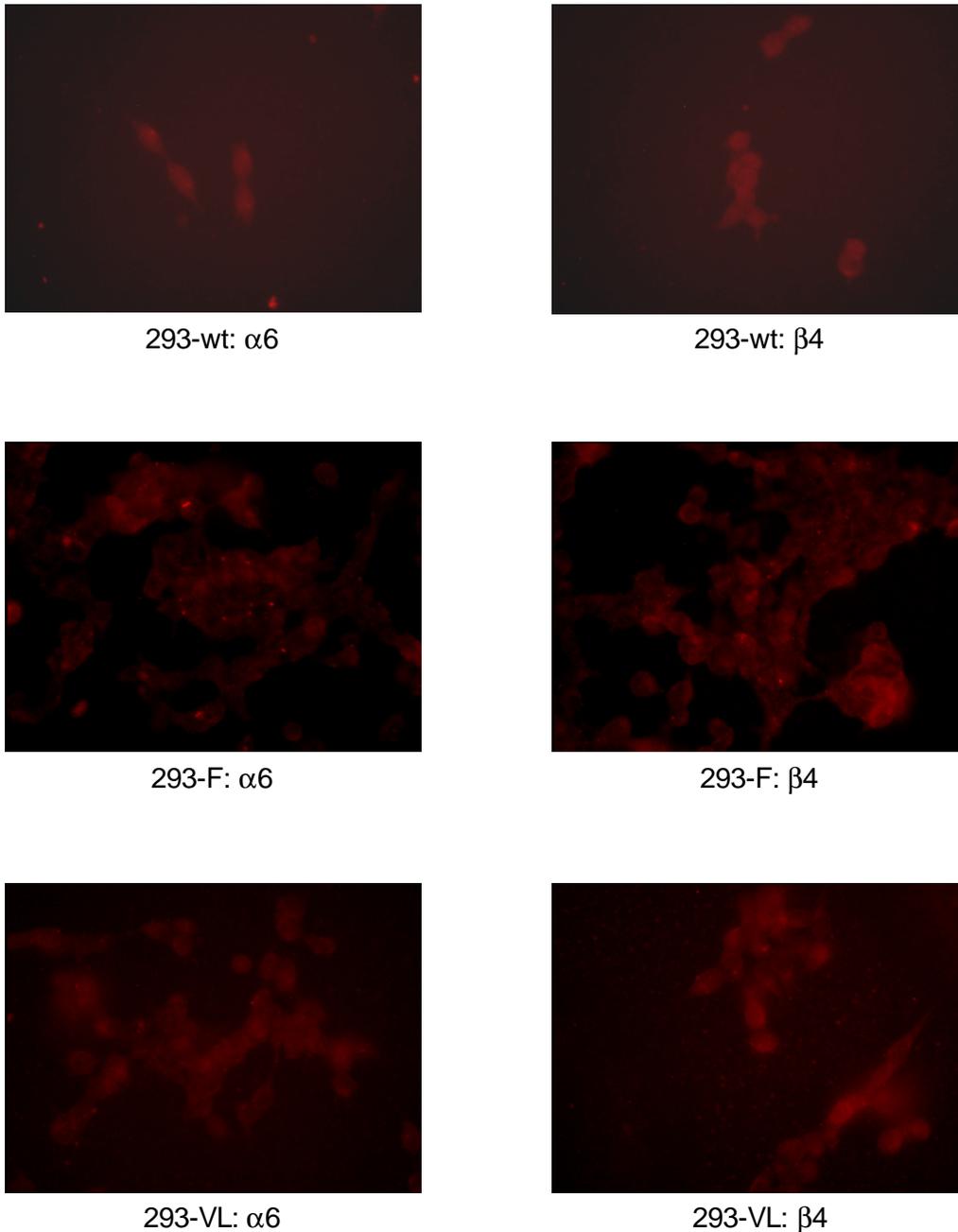


Abb. 3.9: Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen von untransfizierten und transfizierten (F und VL) 293-EBNA-Zellen gegen Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$

Bei den untransfizierten Wildtyp- wie auch bei den transfizierten 293-EBNA-Zellen (hier F und VL) erkennt man nur eine schwache unspezifische Färbung, die sich gleichmäßig über die Zelle erstreckt. Verglichen mit den Keratinozyten sind diese Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz negativ für $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrine.

3.4 Aufreinigung des konditionierten Mediums der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente

Das konditionierte Medium mit den rekombinanten Kollagen XVII-Fragmenten wurde, wie in Kap. 2.5 beschrieben, durch Ultrafiltration konzentriert und für die FPLC im entsprechenden Puffer dialysiert.

3.4.1 rColXVII-F

Der kalkulierte isoelektrische Punkt für rColXVII-F beträgt 6.15. Aus diesem Grund wurde für den ersten Schritt der Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie eine Anionentauschersäule (HiTrap Q) in Verbindung mit einem Tris-HCl-Puffer (pH 8.8) gewählt. Die rekombinanten Proteinfragmente wurden vollständig an das Säulenmaterial gebunden und konnten mit 125 - 165 mM NaCl eluiert werden (**Abb. 3.10**). Ein Großteil der kontaminierenden Proteine eluieren bei anderen NaCl-Konzentrationen.

Mit SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörper-Detektion konnten die Fraktionen detektiert werden, die rColXVII-F (MW: 16 kD) enthalten. Da diese Proben für weitere Untersuchungen noch zu stark durch andere Proteine verunreinigt waren, wurden die 4 positiven Fraktionen 9- 12 gepoolt, konzentriert (siehe Kap. 2.5) und durch eine Gelfiltration (Superose 12) weiter aufgereinigt (**Abb. 3.11**). Die Elution des rColXVII-F erfolgte früh in den Fraktionen 11 und 12. Auch hier erfolgte die Detektion durch Immunoblot.

Diese Fraktionen mit dem rekombinanten Kollagen XVII-F wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.4.2 rColXVII-fd

Für rColXVII-fd (MW: 47 kD) ergab die Berechnung des isoelektrischen Punktes 6.4. Aus diesem Grund wurde das gleiche Aufreinigungs-Schema wie für rColXVII-F verwendet.

Die rekombinanten Fragmente konnten mit 236 - 250 mM NaCl eluiert werden (**Abb. 3.12**), im Vergleich zu rColXVII-F also bei höheren Konzentration von NaCl.

Im Anschluß wurde auch hier eine Gelfiltration der konzentrierten Proben 17 bis 19 durchgeführt. Die Elution erfolgte im Vergleich zu rColXVII-F deutlich später in den Fraktionen 19 und 20 (**Abb. 3.13**).

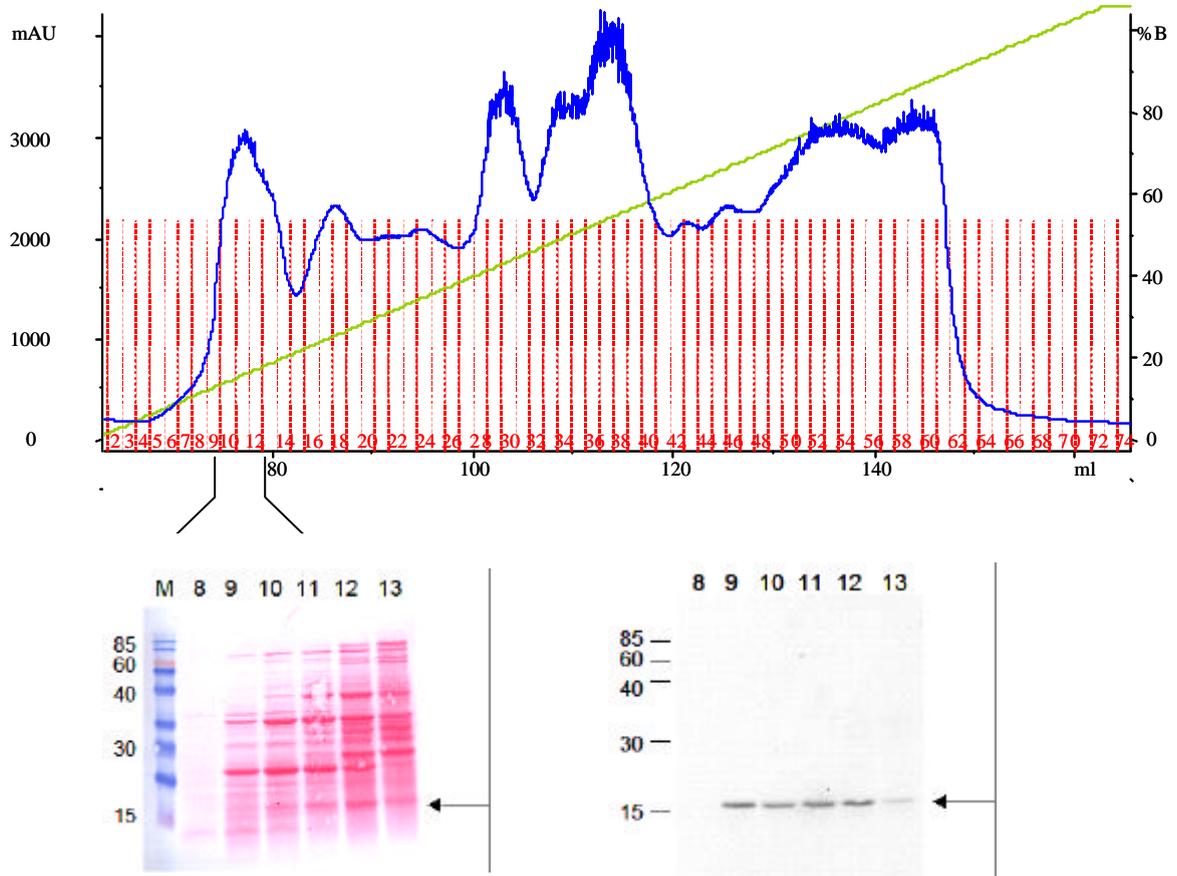


Abb. 3.10: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rCoIXVII-F

Das Chromatogramm der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 9 bis 12 (Bande bei 16 kD, siehe Pfeil), deren Proteine bei einem Gradienten von 125 - 165 mM NaCl eluierten, wurden gepoolt und weiter aufgereinigt.

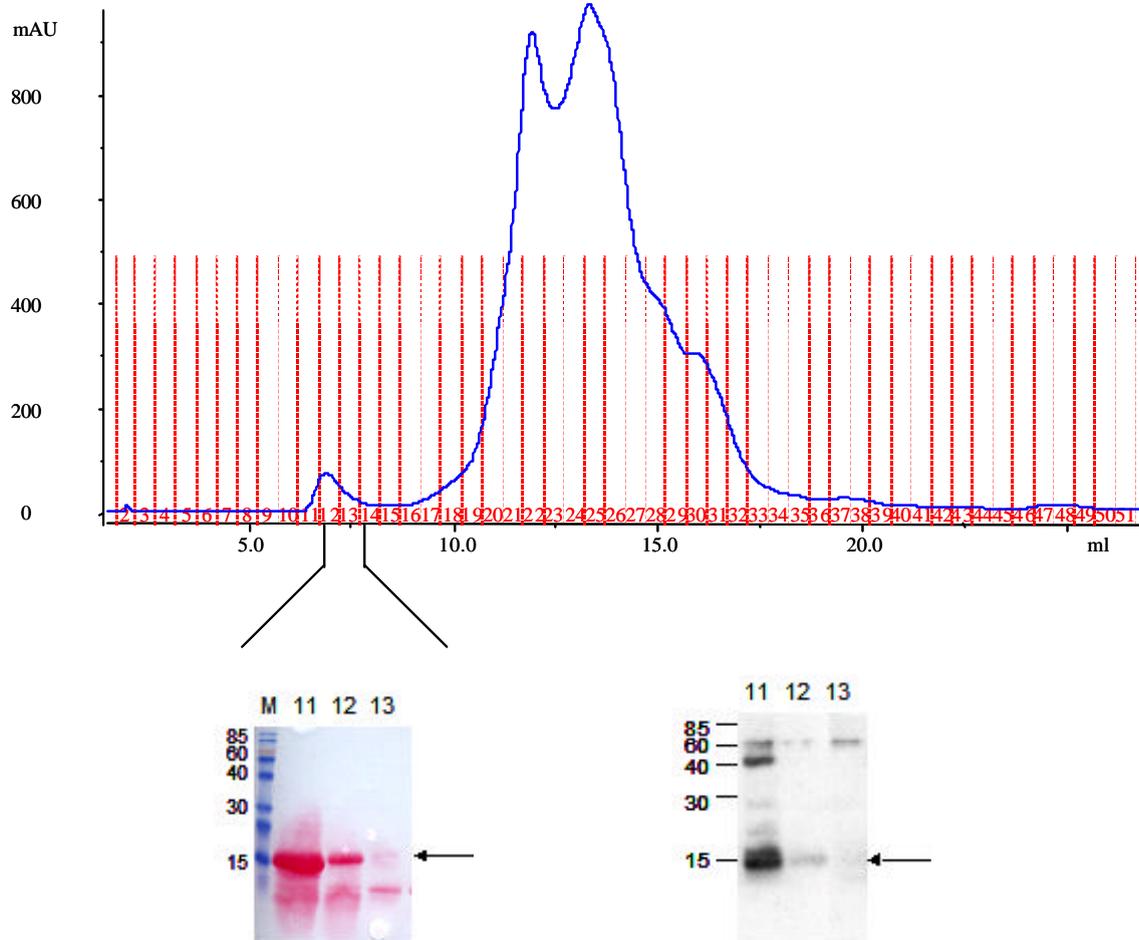


Abb. 3.11: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-F

Das Chromatogramm der Gelfiltration (oben) zeigt die Absorption durch die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau). Die Fraktionen (rot) wurden auch hier mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 11 und 12 (Bande bei 16 kD, siehe Pfeil), enthielten das rekombinante Kollagen XVII-F, mit denen die weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

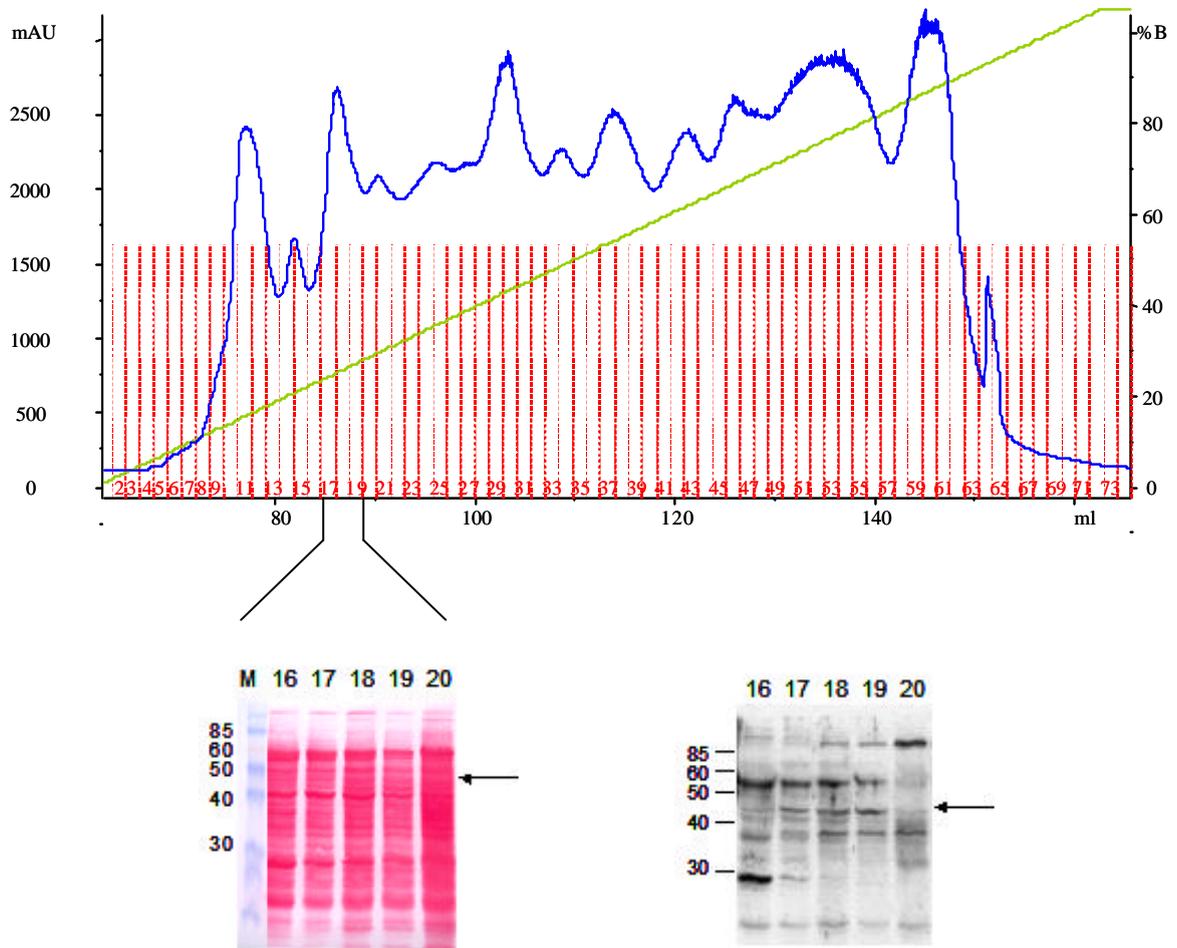


Abb. 3.12: Chromatogramm (oben), Ponceu-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rCoIXVII-fd

Das Chromatogramm der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 17 bis 19 (Bande bei 47 kD, siehe Pfeil), deren Proteine bei einem Gradienten von 236 - 250 mM NaCl eluierten, wurden gepoolt und weiter aufgereinigt.

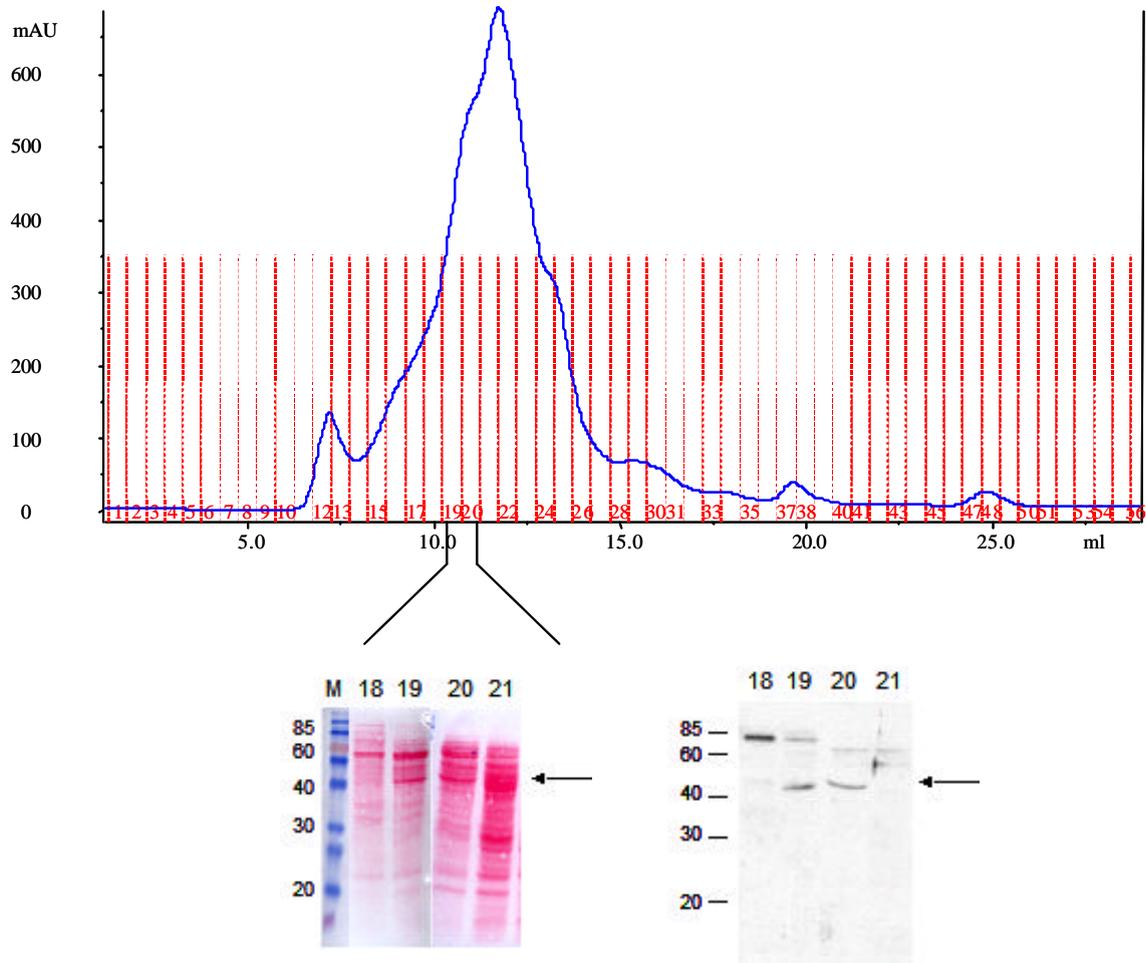


Abb. 3.13: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-fd

Das Chromatogramm der Gelfiltration (oben) zeigt die Absorption durch die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau). Die Fraktionen (rot) wurden auch hier mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 19 und 20 (Bande bei 47 kD, siehe Pfeil), enthielten das rekombinante Kollagen XVII-fd, mit denen die weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

3.4.3 rColXVII-ed

Der kalkulierte isoelektrische Punkt für rColXVII-ed (MW: 69 kD) beträgt 8.7. Für den ersten Schritt der Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie sollte daher zunächst eine Kationentauschersäule (HiTrap SP) mit einem NaAc-Puffer (pH 4.8) verwendet werden.

Bei der vorhergehenden Dialyse des durch Ultrafiltration aufkonzentrierten Mediums bei einem pH von 4.8 kam es jedoch zu einem starken Ausfall von Proteinen (**Abb. 3.14**). Nach einem Zentrifugationsschritt, mit dem das Dialysat in den Überstand "Konzentrat" und das ausgefallene Präzipitat "Pellet" getrennt werden konnte, wurden die beiden Fraktionen im Western-Blot auf die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente rColXVII-ed untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Fragmente sowohl im Überstand gelöst als auch im Pellet ausgefallen vorliegen, was eine Aufreinigung deutlich erschwert und die zu erhaltenden Mengen reduziert.

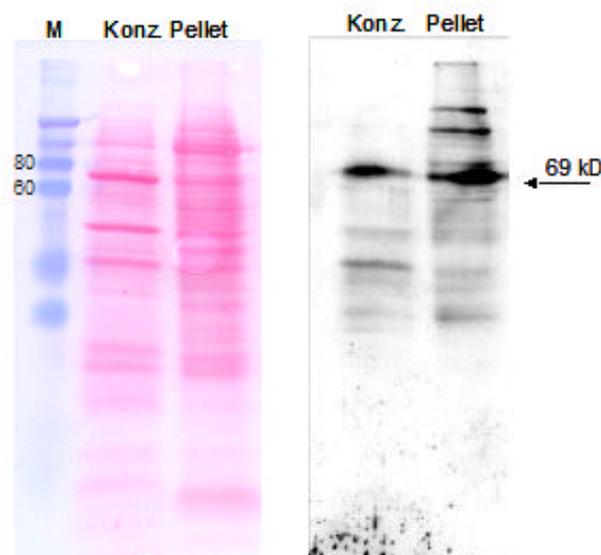


Abb. 3.14: rColXVII-ed-Fragmente

Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der beiden Fraktionen "Konzentrat" und "Pellet" nach der Dialyse bei pH 4.8 und der Zentrifugation (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil).

Konzentrat

Die im Überstand "Konzentrat" vorhandenen Fragmente wurden wie geplant über die Kationenaustauschersäule aufgereinigt und konnten bei einer NaCl-Konzentration von 220 - 250 mM eluiert werden (**Abb. 3.15**).

Dem zweiten Reinigungsschritt der Gelelution (Superose 12) wurden die konzentrierten positiven Fraktionen 22 - 25 unterzogen. Die Elution erfolgte in Fraktion 20, jedoch konnten im Western-Blot nur noch Spuren der rColXVII-ed-Fragmente nachgewiesen werden (**Abb. 3.16**).

Pellet

Die im Präzipitat "Pellet" nachgewiesenen Fragmente müssen vor einer Aufreinigung erst wieder in Lösung gebracht werden. Dazu wurde der pH-Wert mit NaOH angehoben, bis das Pellet bei pH 9 vollständig resuspendiert war. Die Suspension wurde erneut dialysiert, diesmal jedoch in einem Tris-HCl-Puffer bei einem pH-Wert von 9,6, bevor die Ionenaustausch-Chromatographie mit einer Anionenaustauscher-Säule (HiTrap Q, pH 9,6) durchgeführt wurde. Die rekombinanten Proteinfragmente konnten mit 246 - 278 mM NaCl eluiert werden (**Abb. 3.17**). Die positiven Fraktionen konnten im Immunoblot nur sehr schwach nachgewiesen werden. Auch hier wurden im Anschluß die positiven Fraktionen 19 und 20 gepoolt, konzentriert und in einem zweiten Schritt mit Gelfiltration (Superose 12) weiter aufgereinigt. Die Elution erfolgte in Fraktion 19 (**Abb. 3.18**).

Durch den sauren pH (4,8) bei der Dialyse vor der geplanten Kationenaustauscher-Chromatographie kommt es zum Ausfallen eines Großteils der Proteine. In diesem Präzipitat finden sich auch Anteile der rekombinanten rColXVII-ed-Fragmente. Mit den verschiedenen Aufreinigungsschritten kommt es zu großen Verlusten der rekombinanten Proteine, so daß diese Methode der Aufreinigung optimiert werden mußte.

Aus diesem Grund wurde versucht, die rekombinanten Proteine durch eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie zu separieren, wobei der hydrophobe Proteinbereich der Transmembran-Region an das Säulenmaterial binden und mit einem absteigenden Salzstufengradienten eluiert werden sollte. Die rekombinanten Proteine banden jedoch nicht ausreichend an das Säulenmaterial, und konnten schon im Durchlauf und nicht im Eluat nachgewiesen werden.

Da die Aufreinigung der rColXVII-ed-Fragmente mittels Anionenaustauscher-Chromatographie den größten Erfolg hatte, wurden die konzentrierten Medien mit den rekombinanten rColXVII-ed-Fragmenten im folgenden in Anlehnung an das oben ermittelte Protokoll aufkonzentriert: Dialyse in Tris-HCl, pH 10 und Anionenaustauscher-Chromatographie (HiTrap Q) bei pH 10. Die Elution erfolgte bei einer NaCl-Konzentration von 70 - 125 mM (**Abb. 3.19**). Um die Verunreinigungen durch andere Proteine für die folgenden Untersuchungen zu verringern, wurden die 5 positiven Fraktionen 5 - 9 wiederum gepoolt, konzentriert und durch eine Gelfiltration (Superose 12) weiter aufgereinigt (**Abb. 3.20**). Die Elution erfolgte früh in den Fraktionen 12 bis 14. Auch hier erfolgte die Detektion durch Immunoblot.

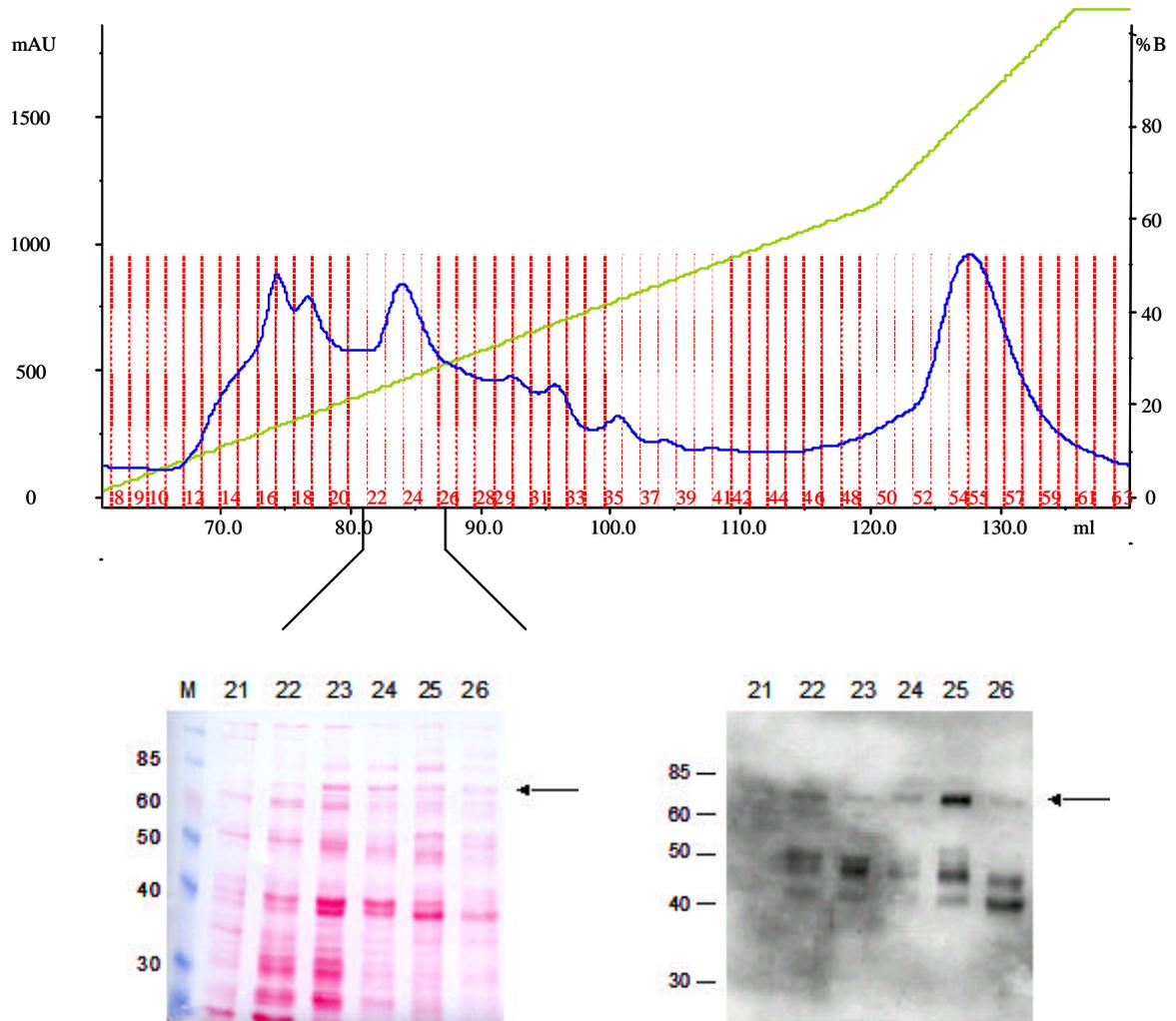


Abb. 3.15: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rColXVII-ed-Konzentrat

Das Chromatogramm der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 22 bis 25 (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil), deren Proteine bei einem Gradienten von 220 - 250 mM NaCl eluierten, wurden gepoolt und weiter aufgereinigt.

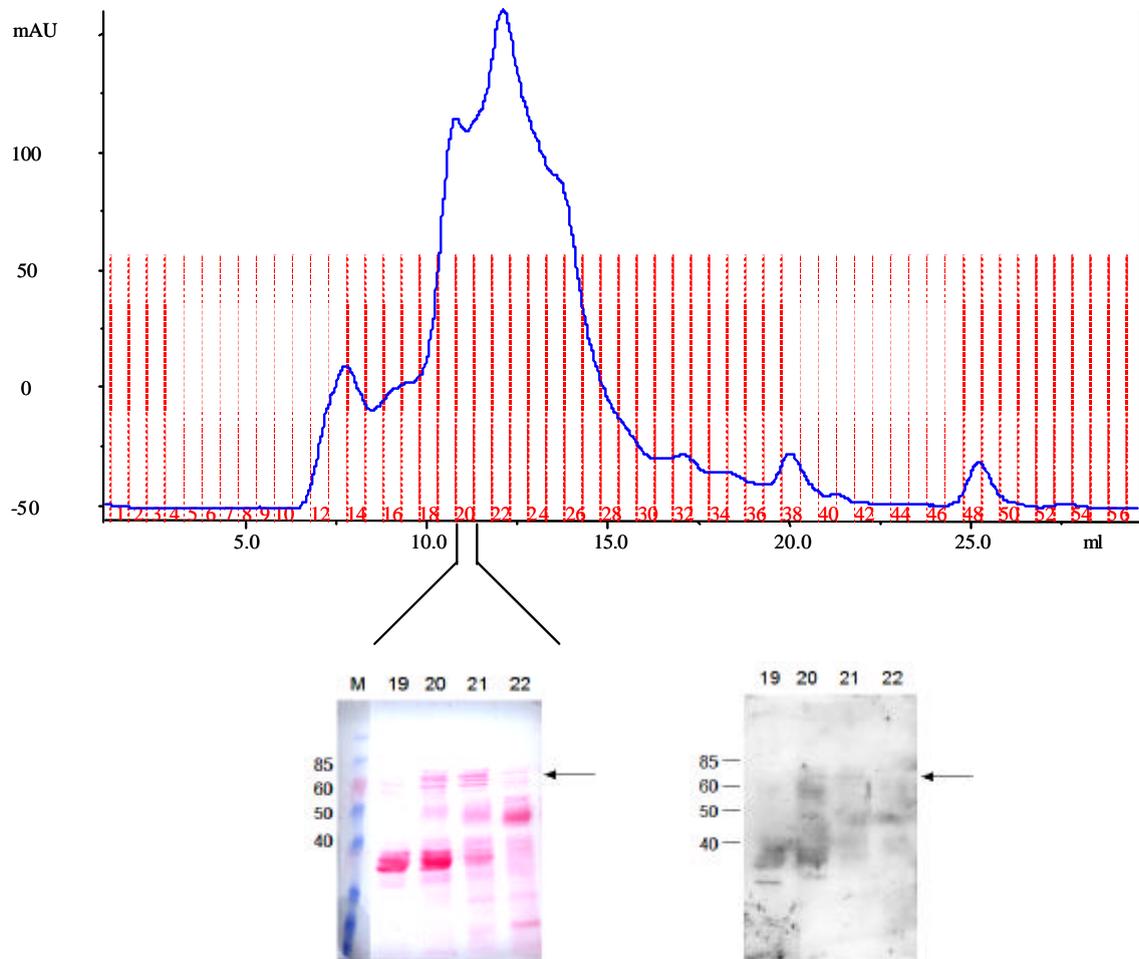


Abb. 3.16: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für das rColXVII-ed-Konzentrat

Das Chromatogramm der Gelfiltration (oben) zeigt die Absorption durch die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau). Die Fraktionen (rot) wurden auch hier mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. In Fraktion 20 konnten allerdings nur noch Spuren der rColXVII-ed-Fragmente (siehe Pfeil) nachgewiesen werden.

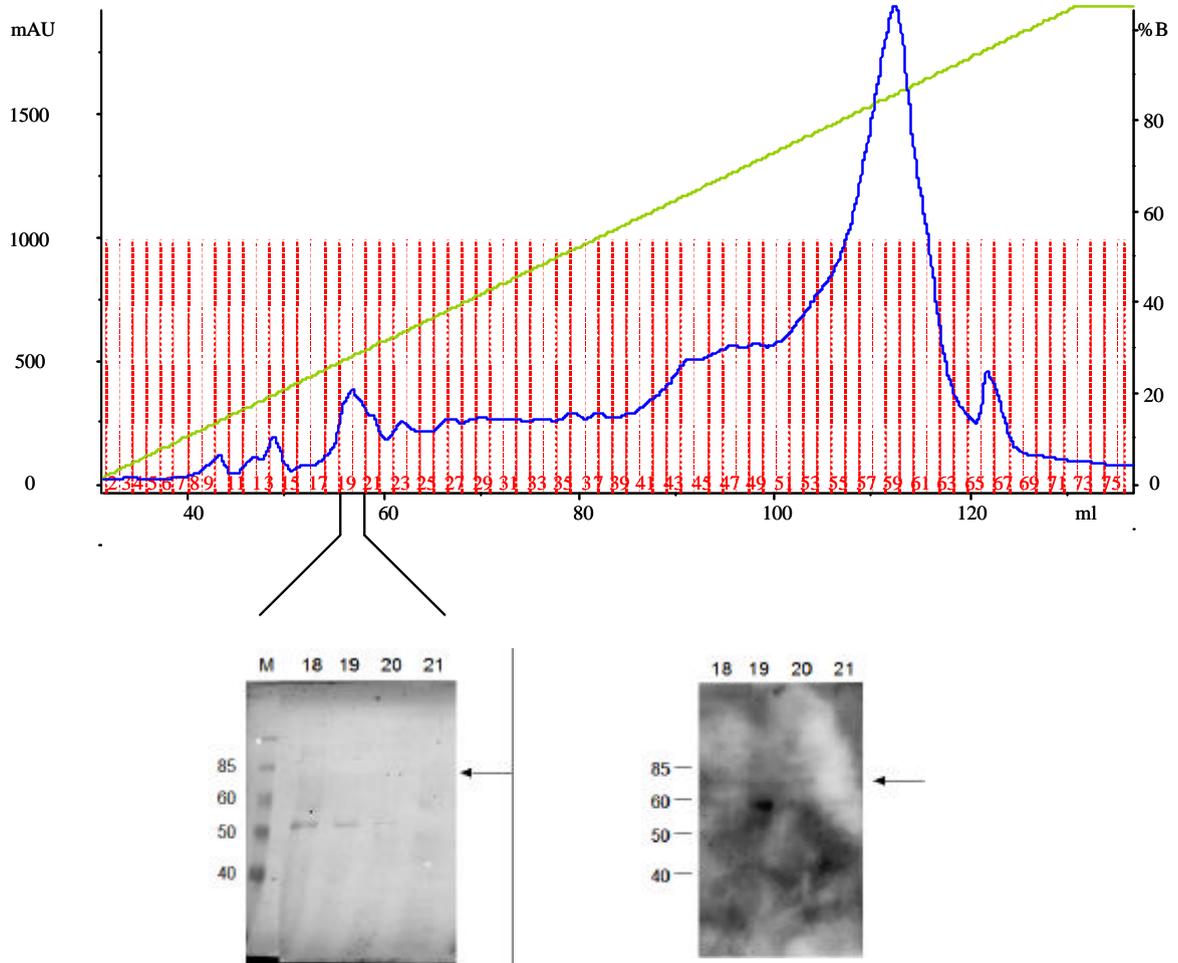


Abb. 3.17: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rCoIXVII-ed-Pellet

Das Chromatogramm der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 19 und 20 (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil), deren Proteine bei einem Gradienten von 246 - 278 mM NaCl eluierten, wurden gepoolt und weiter aufgereinigt.

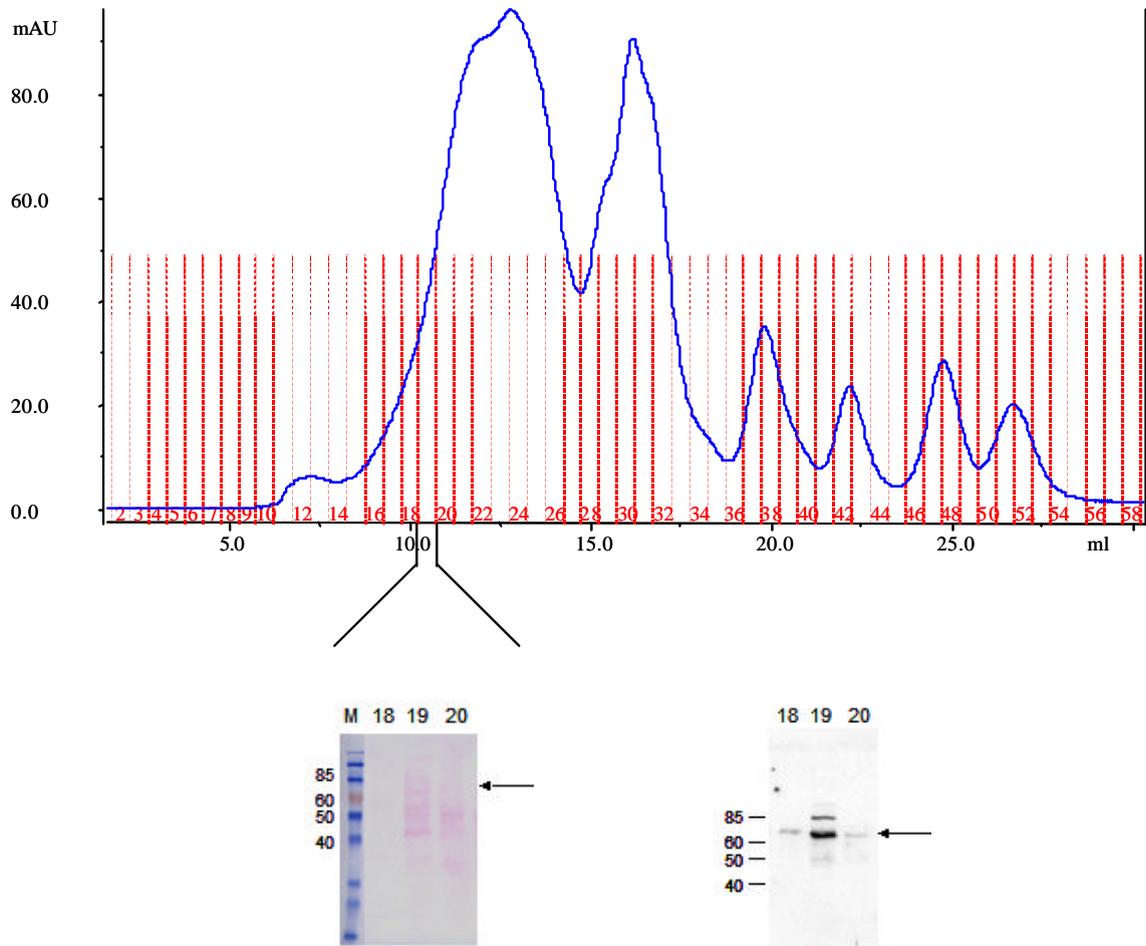


Abb. 3.18: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für das rColXVII-ed-Pellet

Das Chromatogramm der Gelfiltration (oben) zeigt die Absorption durch die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau). Die Fraktionen (rot) wurden auch hier mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positive Fraktion 19 (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil) enthielt das rekombinante Kollagen XVII-ed.

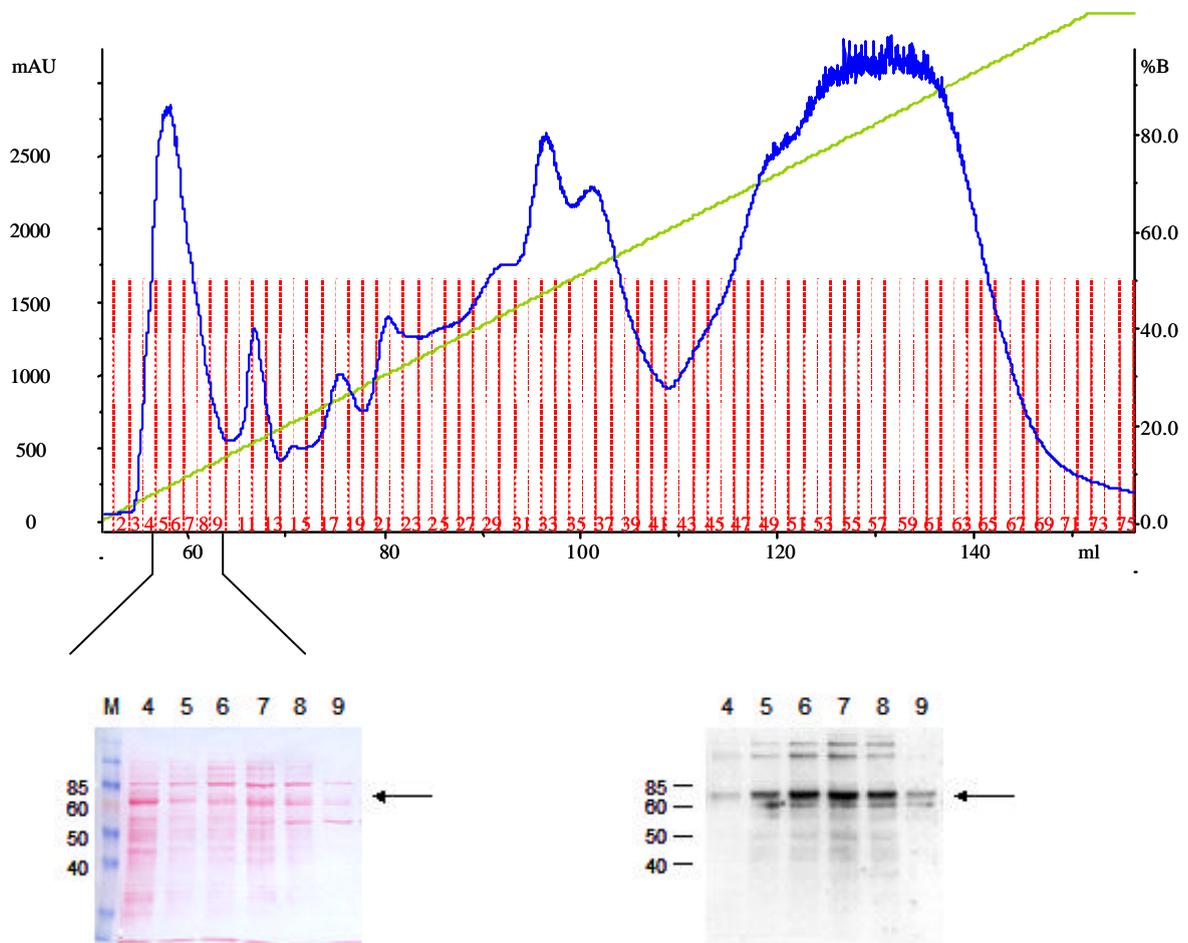


Abb. 3.19: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rCoIXVII-ed

Das Chromatogramm der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 5 bis 9 (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil), deren Proteine bei einem Gradienten von 70 - 125 mM NaCl eluierten, wurden gepoolt und weiter aufgereinigt.

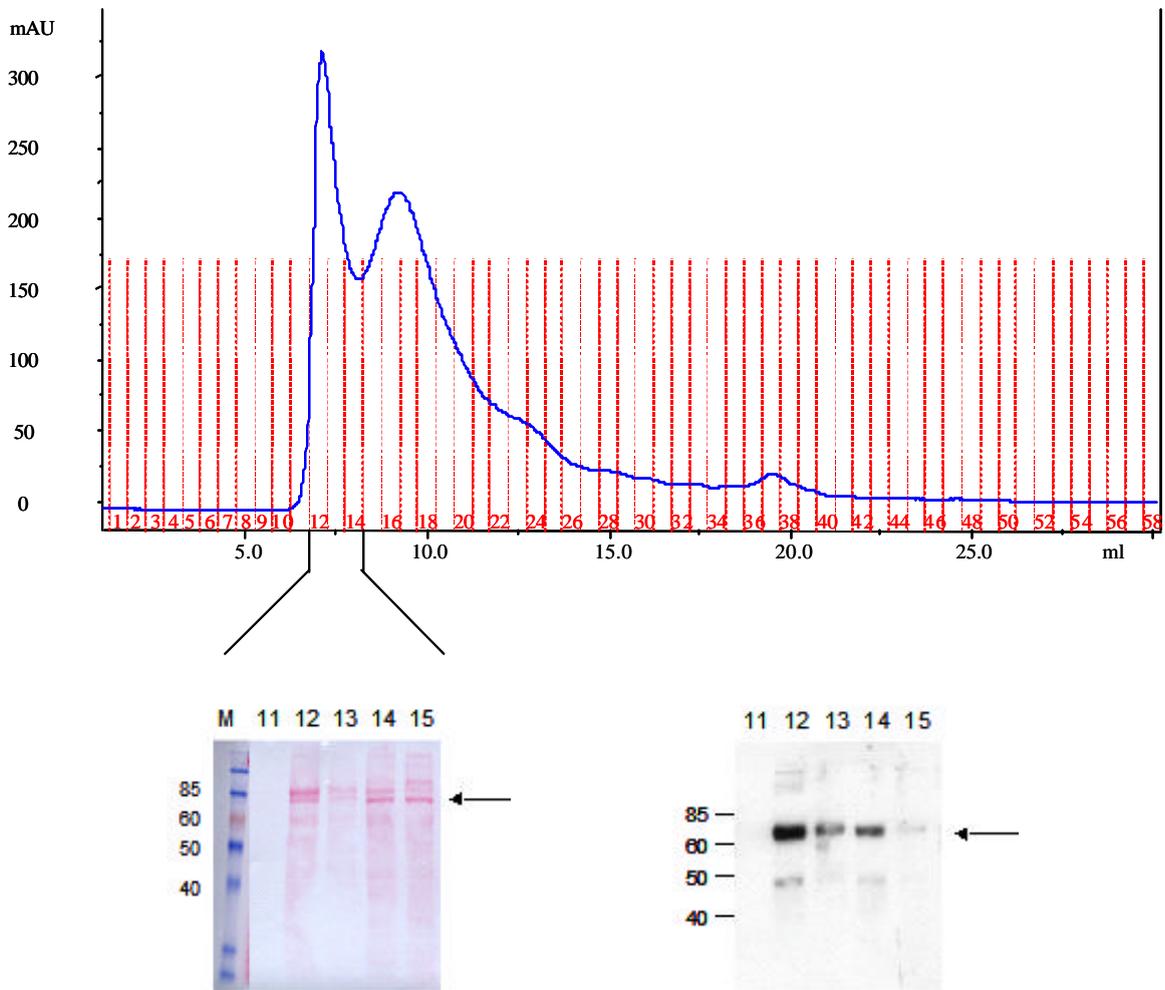


Abb. 3.20: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-ed

Das Chromatogramm der Gelfiltration (oben) zeigt die Absorption durch die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau). Die Fraktionen (rot) wurden auch hier mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die positiven Fraktionen 12 bis 14 (Bande bei 69 kD, siehe Pfeil) enthielten das rekombinante Kollagen XVII-ed, mit denen die weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

3.4.4 rColXVII-VL

Aufgrund der problematischen Aufreinigung der rekombinanten Fragmente rColXVII-ed und dem vergleichbaren *pI* der rekombinanten Kollagen XVII-Vollängen-Proteine rColXVII-VL (mW: 180 kD) von 8.9 wurden mit geringen Mengen des durch Ultrafiltration konzentrierten Mediums zunächst die optimalen Bedingungen (Puffer und pH-Wert für die Ionenaustauscher-Chromatographie) ermittelt (**Abb. 3.21**).

Bei der Dialyse des konzentrierten Mediums in NaAc-Puffer bei einem pH-Wert von 4.8 für die Kationenaustauscher-Chromatographie kommt es wie erwartet wieder zum Ausfallen von Proteinen. Im Immunoblot können die rColXVII-VL-Proteine ausschließlich im Pellet nachgewiesen werden.

Bei der Verwendung von Tris-HCl-Puffer (pH 10) für die Dialyse vor der Anionenaustausch-Chromatographie wie auch bei HEPES-Puffer (pH 7.6) für die Dialyse vor der Kationenaustausch-Chromatographie kommt es zu keinem Ausfallen von Proteinen. Die rekombinanten rColXVII-VL-Proteine können im Immunoblot nachgewiesen werden.

In allen Dialysemedien gleich ist das Auftreten nicht nur der 180 kD-Bande für das VL-Protein, sondern auch immunoreaktive Banden bei 120 sowie 60 kD, was auf verkürzte Anteile der Ektodomäne hindeutet.

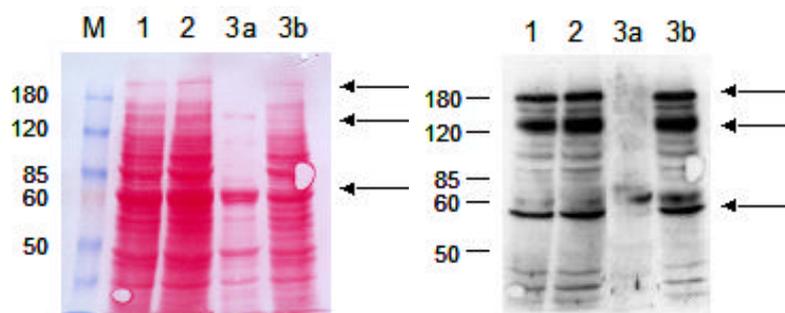


Abb. 3.21: Einstellung optimaler Bedingungen für die Aufreinigung von rColXVII-VL

Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des in verschiedenen möglichen Puffern dialysierten Mediums von rColXVII-VL.

Die Dialyse in Tris-HCl-Puffer, pH 10 (1) und HEPES-Puffer, pH 7.6 (2) verlief problemlos. In 1 und 2 sind die Überstände nach der Dialyse aufgetragen, in der die erwarteten Banden bei 180 kD (Vollängen-Protein) und 120 kD (entspricht der Größe der Ektodomäne von Kollagen XVII) sowie eine weitere Bande bei 60 kD (siehe Pfeile) zu sehen sind.

Bei der Dialyse in NaAc, pH 4.8 jedoch kommt es wie bei rColXVII-ed zum Ausfallen der Proteine. 3a zeigt den Überstand ohne Proteine und 3b die im Pellet ausgefallenen Proteine, die sich nur schwer weiter aufreinigen lassen

Um möglichen Schaden durch Aufreinigungs- und andere Prozesse zu minimieren und die Proteine bei möglichst neutralem pH aufzureinigen und um den pI von 8.9 einzubeziehen, wurde der HEPES-Puffer (pH 7.6) in der Kationenaustausch-Chromatographie (HiTrap SP) verwendet. rColXVII-VL-Fragmente von 120 und 100 kD konnten mit 97 - 125 mM NaCl eluiert werden, das Vollängen-Konstrukt von 180 kD ist nicht mehr nachzuweisen und vermutlich in kleinere Bestandteile zerfallen (**Abb. 3.22**).

Da die positive Fraktion 7 verhältnismäßig sauber vorlag, wurde auf einen zweiten Reinigungsschritt durch Gelelution, bei dem es zu Verlusten an Protein kommen würde, verzichtet.

3.4.5 rColXVII-E

Die Daten für rColXVII-E wurden von G. Baines, S. Areida und D. Korte erhoben [VERÖFFENTLICHUNG IN VORBEREITUNG].

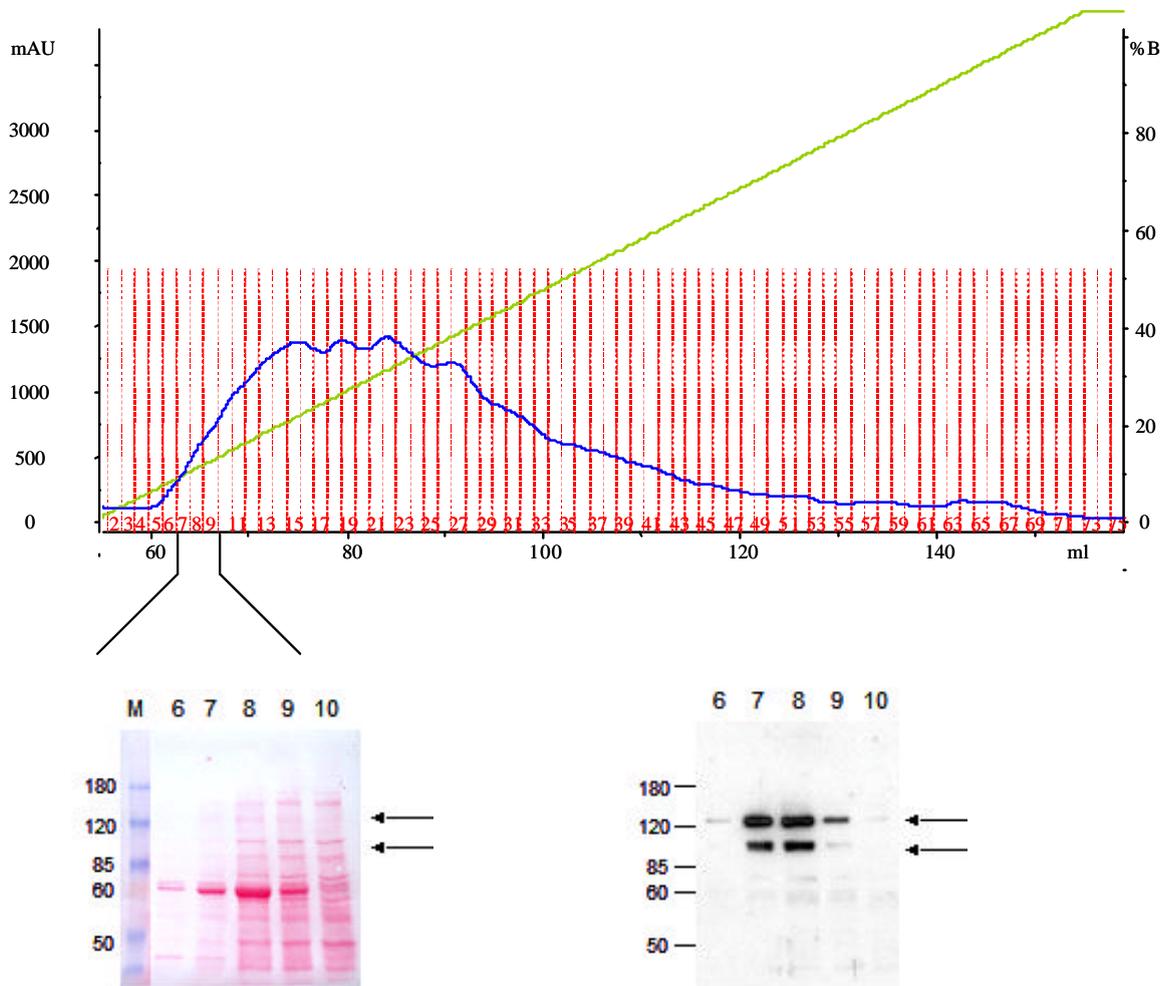


Abb. 3.22: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rColXVII-VL-Konzentrat

Das Chromatogramm der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEC, oben) zeigt die Absorption durch die Elution der gebundenen Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau) und einem Anstieg des Salzgradienten (grün). Die Fraktionen (rot) wurden mit Western-Blot (links) und Antikörper-Detektion (NC16a) im Röntgenfilm (rechts) untersucht. Die in den positiven Fraktionen 7 bis 9 (Banden bei 120 und 100 kD, siehe Pfeile) vorliegenden Proteine wurden bei einem Gradienten von 97 - 125 mM NaCl eluiert. Da die positive Fraktion 7 verhältnismäßig sauber vorlag, wurde auf einen weiteren Reinigungsschritt durch Gelelektion verzichtet.

3.5 Charakterisierung der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente

Um die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente biochemisch und biophysikalisch zu charakterisieren, wurden Analysen durch Trypsin-vermittelten Proteinabbau, CD-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie angewandt.

3.5.1 Trypsin-vermittelter Proteinabbau (Trypsin-Verdau)

Für alle rekombinanten Kollagen XVII-Konstrukte wurde eine Konformationsanalyse durch einen trypsin-vermittelten Proteinabbau durchgeführt.

Dabei kann die Denaturierung der tripelhelikalen Regionen der Kollagen XVII-Fragmente bei verschiedenen Temperaturen durch die Aufzeichnung der Degradation des Proteins durch das Trypsin ermittelt werden.

Die Ergebnisse aus diesem Versuch sollen mit Daten der CD-Spektroskopie (Schmelzpunktbestimmung) verglichen werden.

Der temperaturabhängige Assay nach BRUCKNER UND PROCKOP [1981] wurde, wie unter 2.6.5 beschrieben, durchgeführt.

Abb. 3.23 zeigt die Ponceau S-Färbung des Westernblots und den Röntgenfilm des Assays für rColXVII-ed bei Temperaturen von 30 bis 50°C in 4°-Schritten und von 50 bis 70°C in 10°-Schritten. Die Bande für das unbehandelte rColXVII-ed liegt bei 70 kD. Schon bei einer Temperatur von 30°C kann das Trypsin das Protein teilweise degradieren, was in einer Doppelbande um 40 kD zu sehen ist. Diese Doppelbande verschwindet zwischen 50 und 60°C. Dies ist demnach der Temperaturbereich, in dem eine Auftrennung der Tripelhelix stattfindet, sodaß ein vollständiger Abbau durch Trypsin stattfinden kann.

Auch der Röntgenfilm des Assays für rColXVII-VL (**Abb. 3.24**) zeigt schon bei Temperaturen von 30°C ein Verschwinden der in der unbehandelten Probe vorliegenden Banden von 120 und 100 kD und eine Verstärkung der vorhandenen Bande bei 60 kD, was auch hier auf eine teilweise Degradation des Proteins hindeutet. Eine Auftrennung der Tripelhelix und ein vollständiger Abbau finden bei Temperaturen zwischen 60 und 70°C statt, hier verschwindet auch die Bande bei 60 kD.

Abb. 3.25 zeigt die Ponceau S-Färbung des Westernblots und den Röntgenfilm des Assays für rColXVII-F bei Temperaturen von 30 - 50°C in 2°-Schritten und von 50 - 80°C in 5°-Schritten.

Die unbehandelte Probe zeigt schwache Banden bei 16, 20 und 35 kD sowie eine Doppelbande bei 25 kD. Im gesamten Temperaturbereich erfolgt für das kurze, tripelhelixfreie Konstrukt keine Degradation durch das Trypsin, die Banden bleiben bis 80°C konstant vorhanden.

Auch der Röntgenfilm des Assays für rColXVII-fd (**Abb. 3.26**) zeigt keine Degradation der schon in der unbehandelten Probe vorhandenen Bande bei 47 kD.

In beiden Fragmenten, rColXVII-F und -fd, sind viele nichtkollagene Domänen vorhanden, die Arg- und Lys-Reste enthalten, trotzdem kommt es nicht zu einem vollständigen Abbau durch das Trypsin. Dies legt die Vermutung nahe, daß die nichtkollagenen Domänen gegen proteolytischen Angriff von Trypsin unter den angewandten Konditionen geschützt sind.

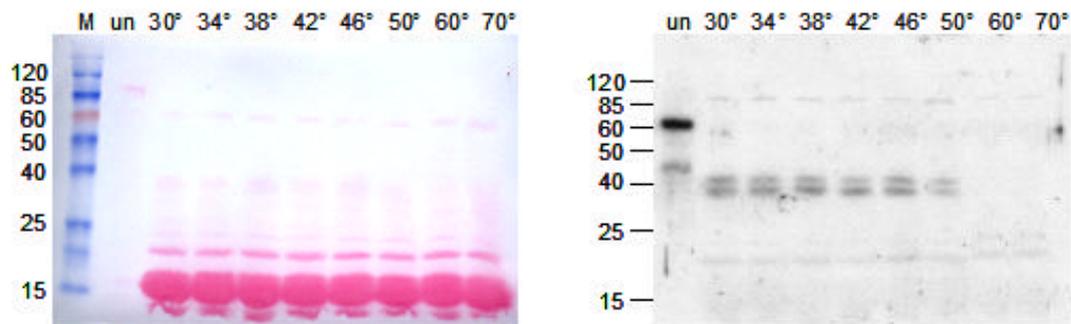


Abb. 3.23: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-ed

Die unbehandelte Probe (un) zeigt die Bande für rColXVII-ed bei 70 kD. Schon bei Temperaturen von 30°C wird das Protein von Trypsin teilweise degradiert, was in einer Doppelbande bei 40 kD resultiert. Bei Temperaturen zwischen 50 und 60°C verschwindet diese Doppelbande dann, was auf einen vollständig Abbau nach Auftrennung der Tripelhelix hinweist.

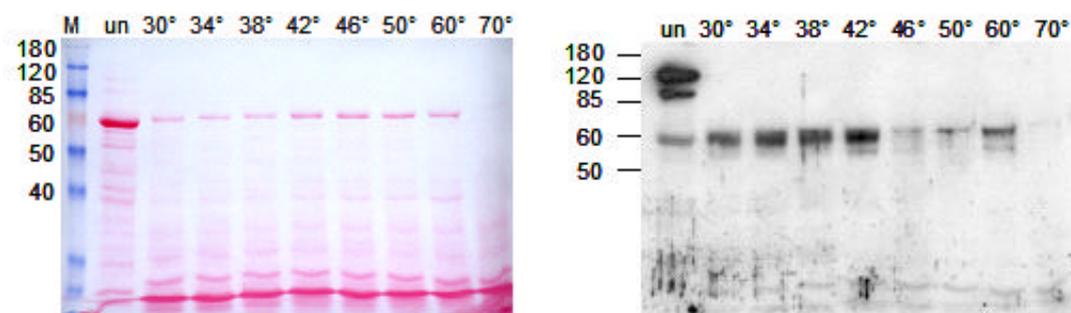


Abb. 3.24: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-VL

Die unbehandelte Probe (un) zeigt die Banden für rColXVII-VL bei 120, 100 und 60 kD. Schon bei Temperaturen von 30°C wird das Protein von Trypsin teilweise degradiert, die Banden bei 120 und 100 kD verschwinden zugunsten einer Verstärkung der Bande bei 60 kD. Bei Temperaturen zwischen 60 und 70°C kommt es zu einem vollständigen Abbau nach Auftrennung der Tripelhelix, auch die Bande bei 60 kD verschwindet dann.

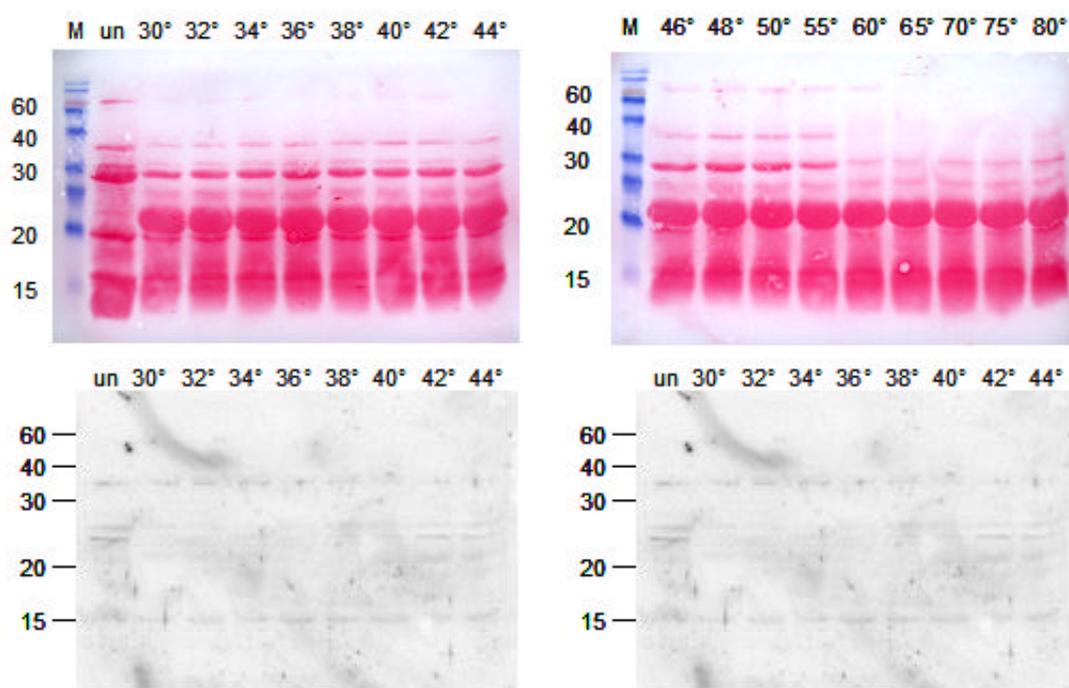


Abb. 3.25: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (oben) und Röntgenfilm (unten) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-F

Die in der unbehandelten Probe (un) vorhandenen Banden bei 16, 20, 35 und 25 kD (Doppelbande) zeigen für den ganzen Temperaturbereich bis 80°C keine Änderung. Das kurze, tripelhelixfreie Konstrukt wird nicht durch das Trypsin degradiert.

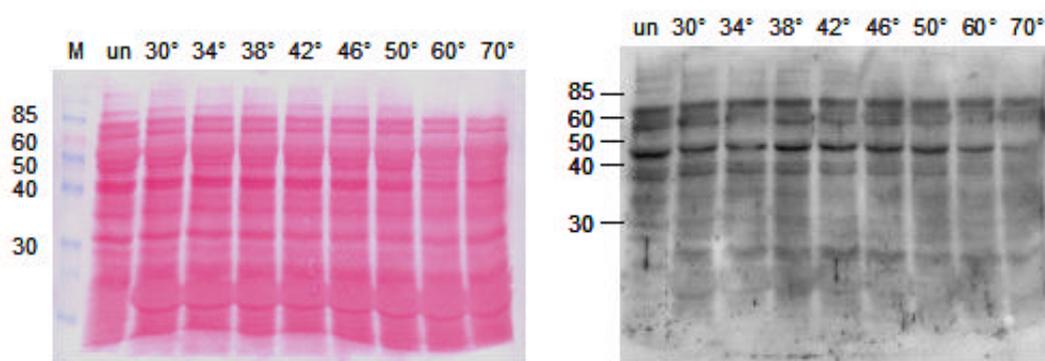


Abb. 3.26: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-fd

Die in der unbehandelten Probe (un) vorhandene Bande bei 47 kD erfährt auch bei Temperaturen bis 70°C keine Änderung. Es kommt nicht zu einem Abbau durch das Trypsin.

3.5.2 Analyse durch CD-Spektroskopie

Um weitere konformelle Aspekte zu untersuchen, wurde bei den Fragmenten eine spektrale und thermale CD-Analyse durchgeführt. Dabei sollten auch die mit den Trypsin-vermittelten Proteinabbau-Assays erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.

Für die spektrale Analyse wurden die Spektren bei 20°C im Wellenlängenbereich von 190 - 300 nm vor thermaler Denaturierung und die Vergleichsspektren nach dem Erhitzen der Probe auf 100°C wiederum bei 20°C im Wellenlängenbereich von 190 - 300 nm aufgezeichnet.

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes (T_m -Wert) wurde das Spektrum bei 221 nm im Temperaturbereich von 20 - 100°C gemessen.

Abb. 3.27 zeigt die CD-Spektren für rColXVII-ed vor und nach thermaler Denaturierung. Das Maximum bei 221 nm mit positiver Elliptizität bei der nichtdenaturierten Probe ist typisch für eine kollagene Tripelhelix. Im Vergleichsspektrum nach thermaler Denaturierung ist das Maximum bei 221 nm nicht mehr vorhanden, das Spektrum erreicht keine Werte positiver Elliptizität. Durch die Denaturierung wurde die vorhandene tripelhelikale Struktur aufgelöst.

Die Schmelzkurve und die differenzierte Schmelzkurve sind in **Abb. 3.28** dargestellt. Sie zeigen einen Schmelzbereich von ca. 50 bis 65°C und einen Schmelzpunkt bei etwa 58°C, der gut mit den aus dem Trypsin-vermittelten Proteinabbau-Assay gut korreliert.

Auch das Spektrum für rColXVII-VL (**Abb. 3.29**) zeigt in der nichtdenaturierten Probe ein für kollagene Tripelhelix typisches Maximum bei 221 nm mit positiver Elliptizität, das nach dem Denaturieren der Probe verschwindet. Wie bei rColXVII-ed wurde durch das Erhitzen die tripelhelikale Struktur aufgelöst.

Mit der Schmelzkurve und der differenzierten Schmelzkurve (**Abb. 3.30**) lassen sich der Schmelzbereich auf ca. 48 bis 65°C und der Schmelzpunkt auf etwa 61°C bestimmen. Auch diese Werte liegen in guter Übereinstimmung mit den Daten des Trypsin-vermittelten Proteinabbau-Assays.

Abb. 3.31 und **Abb. 3.32** zeigen die Spektren für rColXVII-F und rColXVII-fd vor und nach thermaler Denaturierung. Die gereinigten Moleküle, die keine (rColXVII-F) bzw. nur fünf sehr kurze kollagene Domänen (rColXVII-fd) enthalten, zeigen Schultern bei 221 nm, die aber keine Werte positiver Elliptizität erreichen, wie sie für Tripelhelices typisch wären. Da ohne bzw. mit den nur fünf kurzen kollagenen Anteilen keine tripelhelikale Struktur zu erwarten ist und auch die Trypsin-vermittelten Proteinabbau-Assays keinen Schmelzbereich zeigen, konnte auf die Messung der Schmelzkurve verzichtet werden.

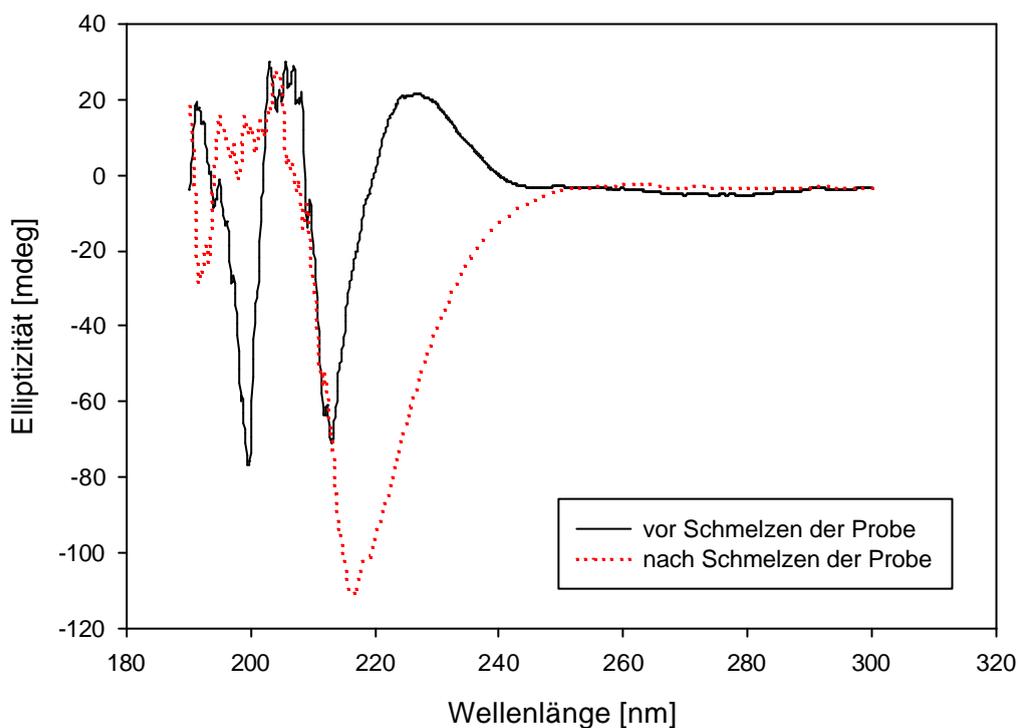


Abb. 3.27: CD-Spektren für rColXVII-ed

Die CD-Spektren für rColXVII-ed vor und nach thermaler Denaturierung wurden bei Wellenlängen von 190 bis 300 nm bei einer Temperatur von 20°C gemessen.

Die Messung der nichtdenaturierten Probe zeigt das für eine kollagene Tripelhelix typische Maximum bei 221 nm mit positiver Elliptizität. In der denaturierten Vergleichsprobe ist dieses Maximum nicht mehr vorhanden, die kollagene Struktur wurde durch das Schmelzen der Probe aufgelöst.

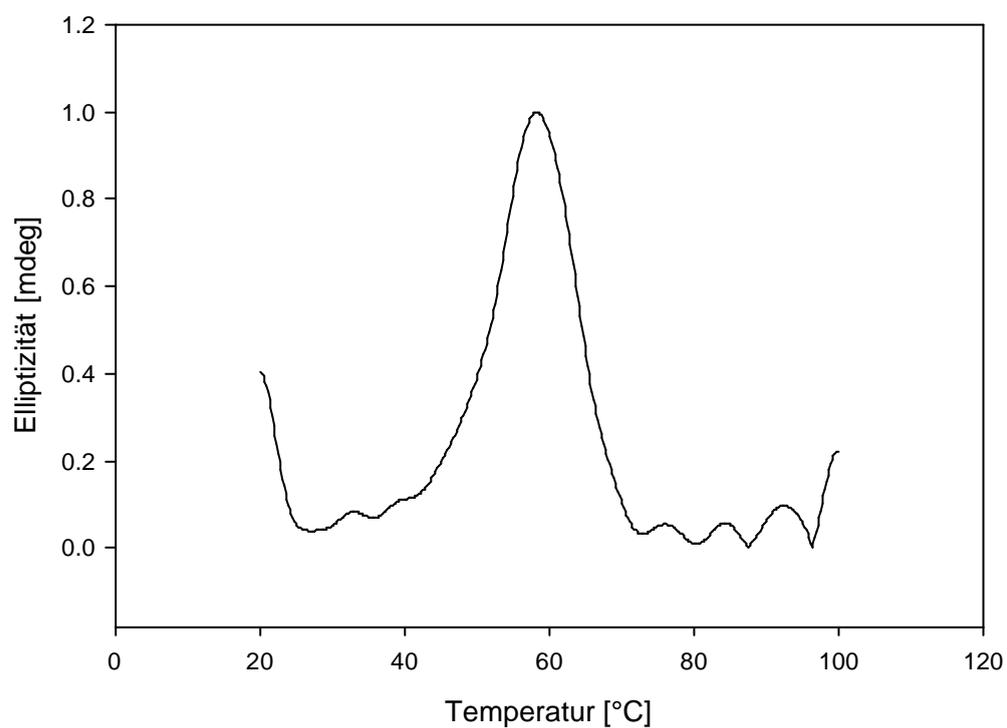
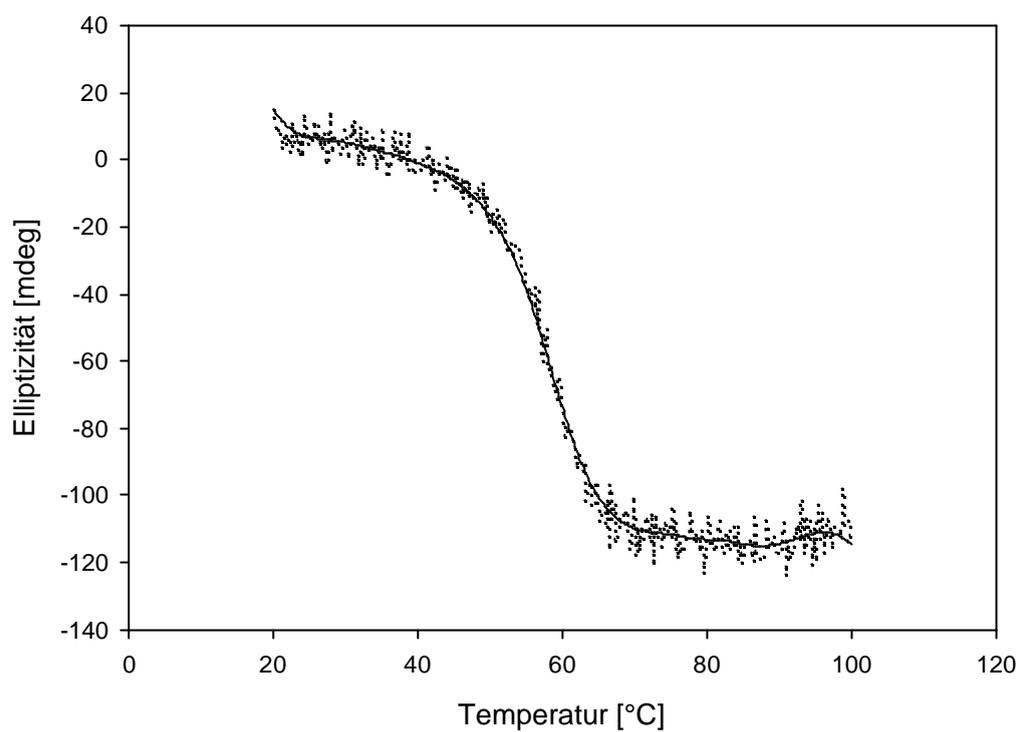


Abb. 3.28: Schmelzkurve und differenzierte Schmelzkurve für rColXVII-ed

Die Messung der Schmelzkurve wurde bei einer festen Wellenlänge von 221 nm in einem Temperaturbereich von 20 bis 100°C durchgeführt.

Die Schmelzkurve der Probe rColXVII-ed zeigt einen Schmelzbereich von ca. 50 bis 65°C. Der Schmelzpunkt kann mit der differenzierten Schmelzkurve auf 58°C bestimmt werden.

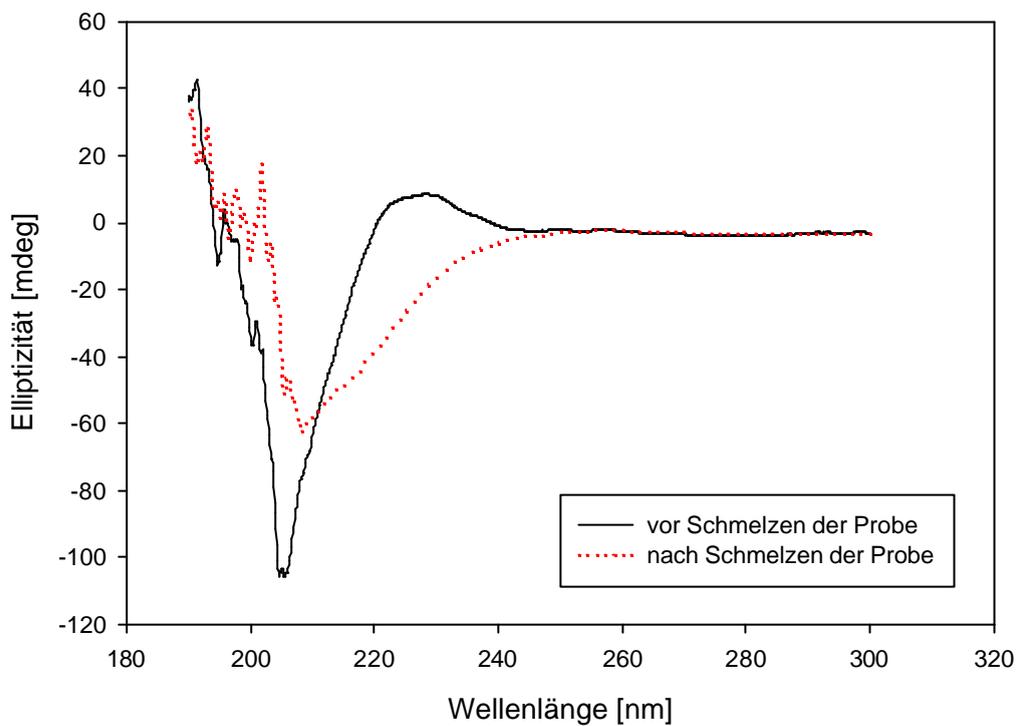


Abb. 3.29: CD-Spektren für rCoIXVII-VL

Die CD-Spektren für rCoIXVII-VL vor und nach thermaler Denaturierung wurden bei Wellenlängen von 190 bis 300 nm bei einer Temperatur von 20°C gemessen.

Die Messung der nichtdenaturierten Probe zeigt auch hier das für eine kollagene Tripelhelix typische Maximum bei 221 nm mit positiver Elliptizität. In der denaturierten Vergleichsprobe ist dieses Maximum nicht mehr vorhanden, die kollagene Struktur wurde durch das Schmelzen der Probe aufgelöst.

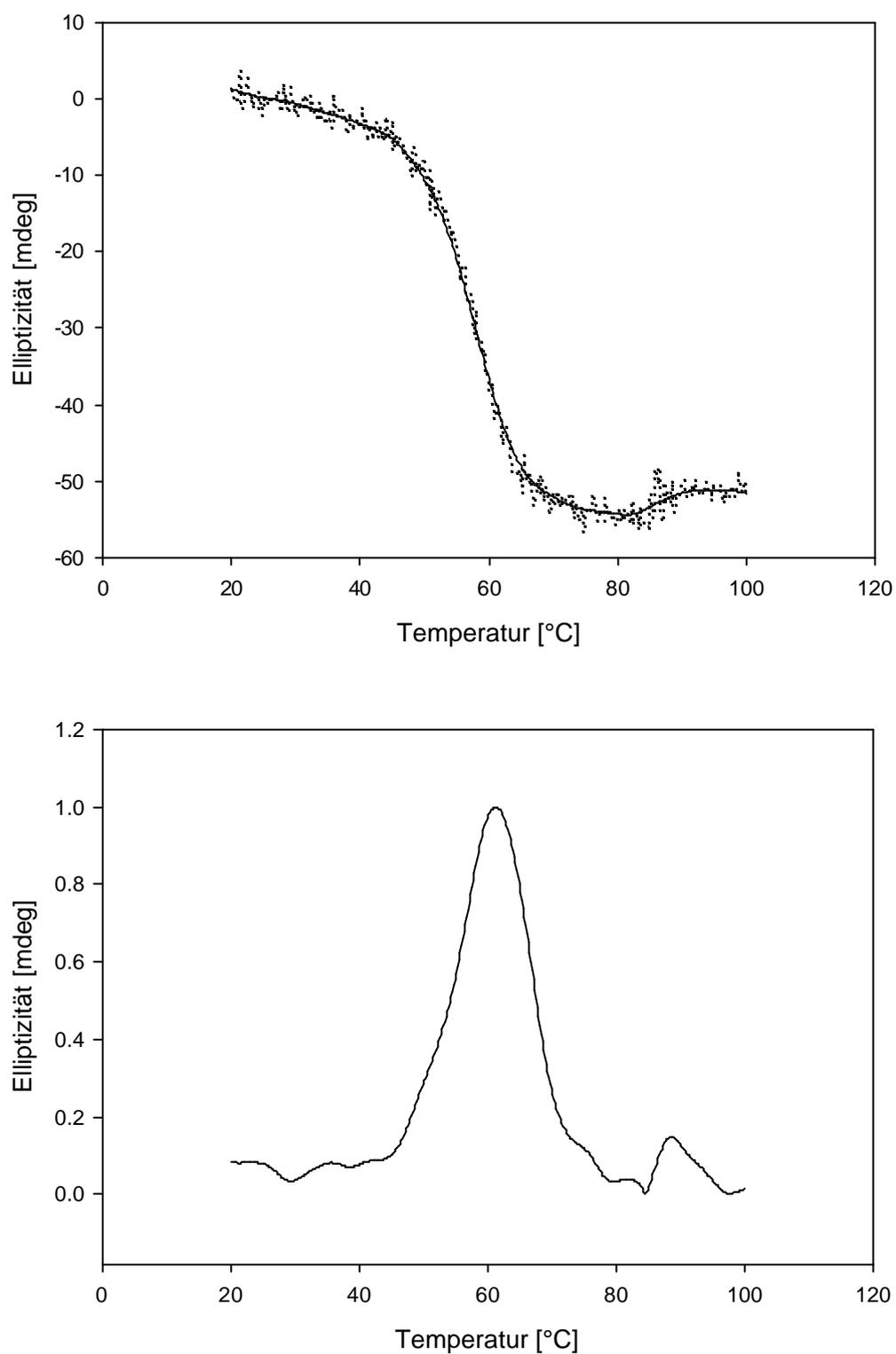


Abb. 3.30: Schmelzkurve und differenzierte Schmelzkurve für rColXVII-VL

Die Messung der Schmelzkurve wurde bei einer festen Wellenlänge von 221 nm in einem Temperaturbereich von 20 bis 100°C durchgeführt.

Die Schmelzkurve der Probe rColXVII-ed zeigt einen Schmelzbereich von ca. 48 bis 65°C. Der Schmelzpunkt kann mit der differenzierten Schmelzkurve auf 61°C bestimmt werden.

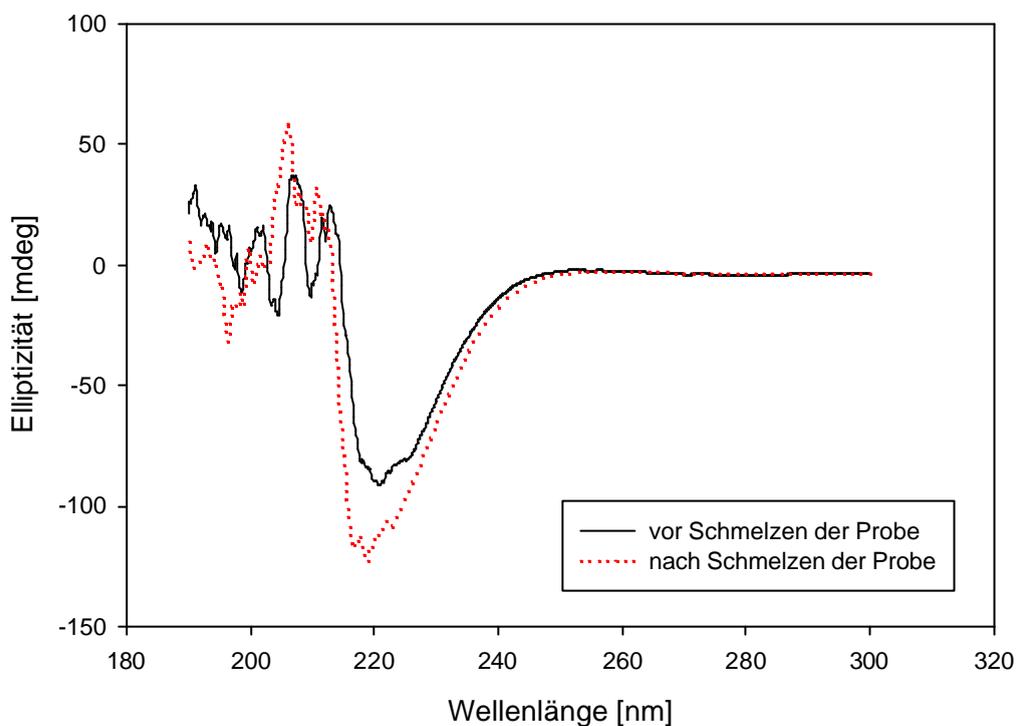


Abb. 3.31: CD-Spektren für rColXVII-F

Die CD-Spektren für rColXVII-F vor und nach thermaler Denaturierung wurden bei Wellenlängen von 190 bis 300 nm bei einer Temperatur von 20°C gemessen.

Die Messung der nichtdenaturierten Probe ähnelt der Messung der denaturierten Probe; sie zeigt eine Schulter bei 221 nm, die aber keine Werte positiver Elliptizität erreicht, wie sie für Tripelhelices typisch wären. Da rColXVII-F keine kollagenen Domänen enthält, war auch keine tripelhelikale Struktur zu erwarten.

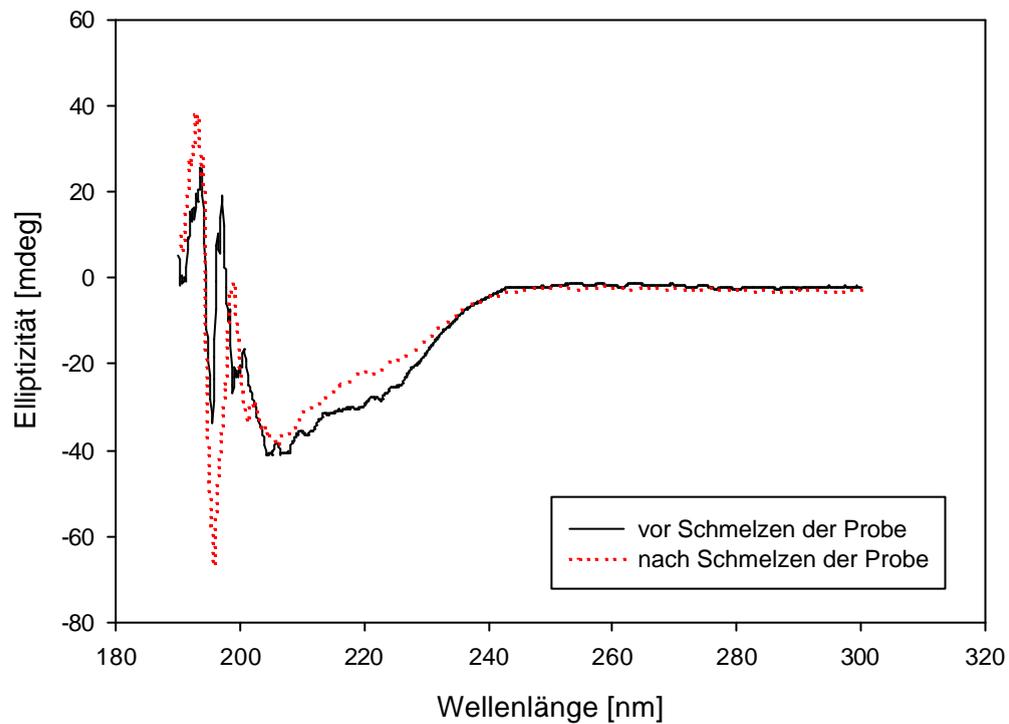


Abb. 3.32: CD-Spektren für rColXVII-fd

Die CD-Spektren für rColXVII-fd vor und nach thermaler Denaturierung wurden bei Wellenlängen von 190 bis 300 nm bei einer Temperatur von 20°C gemessen.

Die Messung der nichtdenaturierten Probe ähnelt auch hier der Messung der denaturierten Probe; sie zeigt eine Schulter bei 221 nm, die aber keine Werte positiver Elliptizität erreicht, wie sie für Tripelhelices typisch wären. Da rColXVII-fd nur 5 unterbrochene, sehr kurze kollagene Domänen am C-terminalen Ende enthält, war keine tripelhelikale Struktur zu erwarten.

3.5.3 Ultrastrukturelle Analyse mit Elektronenmikroskopie nach Rotations-Schrägbedampfung

Um Informationen über Form und Länge der Moleküle zu erhalten, wurden die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente rColXVII-ed, -VL, -fd und -F durch Rotations-Schrägbedampfung mit nachfolgender Elektronenmikroskopie analysiert.

Die Moleküle ed, VL und fd zeigen vorwiegend eine langgestreckte, z.T. leicht geschlungene Form mit einem globulären Kopf am einen Ende, während die Bilder von F ein gewundenes Molekül, ebenfalls mit globulärem Kopf, zeigen.

Bei allen vier Molekülen finden sich jedoch auch Bilder, auf denen der globuläre Kopf nicht eindeutig zu erkennen ist oder sich an beiden Enden des Moleküls zu befinden scheint.

HIRAKO ET AL [1996] haben natives Kollagen XVII von 180 kD dargestellt und die verschiedenen Domänen mit der Primärsequenz korreliert. Aus diesen Proportionen errechnet sich für ed eine Länge von 150 ± 15 nm. Die abgebildeten Moleküle (**Abb. 3.33**) haben Längen von und 306 ± 5 nm (links) und 293 ± 5 nm (rechts). Dies entspricht in etwa dem Zweifachen der errechneten Länge bei 300 ± 15 nm. Auch für weitere Moleküle konnte mit 322 , 288 und 284 ± 5 nm die doppelte Länge gemessen werden. Zusätzlich kommen jedoch auch Moleküle vor, die keinem Vielfachen der errechneten Länge zugeordnet werden können.

Die Moleküle von VL waren nach der Aufreinigung von 180 kD auf 120 bzw. 100 kD verkürzt. Dies bedeutet für die errechneten Längen, daß anstelle von 210 ± 20 nm (180 kD) nur Längen von 140 ± 15 (120 kD) bzw. 115 ± 15 nm (100 kD) erwartet werden können.

Für die abgebildeten Moleküle (**Abb. 3.34**) konnten Längen von 298 ± 5 nm (links) und 308 ± 5 nm (rechts) gemessen werden. Weitere vermessene Moleküle zeigten Längen von 322 , 258 und 293 ± 5 nm.

Auch hier liegt die Länge der gemessenen Moleküle oft im Bereiche der doppelten errechneten Länge bei 230 bis 310 nm, es kommen jedoch ebenfalls Längen vor, die keinem Vielfachen der errechneten Länge entsprechen.

Für fd errechnet sich eine Länge von 100 ± 15 nm. Die abgebildeten Moleküle (**Abb. 3.35**) haben Längen von und 307 ± 5 nm (rechts) und 315 , 305 , 318 , 316 , 306 , 300 und 307 ± 5 nm (links). Diese Moleküle haben etwa die dreifache der errechneten Länge, also 300 ± 15 nm. Auch für weitere Moleküle konnte häufig die dreifache Länge gemessen werden. Außerdem wurden größeren Längen gemessen, die nicht mit einem Vielfachen der errechneten Länge korreliert werden können.

Für F liegen die gemessenen Moleküle in einem weiten Bereich zwischen der einfachen errechneten Länge von 48 ± 8 nm und dem Dreifachen dieses Wertes. Das abgebildete

Einzelmolekül (**Abb. 3.36**) mißt eine Länge von 136 ± 5 nm (rechts). Aufgrund des akkumulierten Auftretens der Moleküle (links) lassen sich die Längen nur schlecht und mit großer Unsicherheit vermessen, da Anfangs- und Endpunkt nicht klar zu erkennen sind. Hier treten mit 92, 90, 138 und 87 ± 5 nm häufig das zwei- und das dreifache der errechneten Länge auf, jedoch wurden auch Werte gemessen, die mit keinem Vielfachen der errechneten Werte übereinstimmen

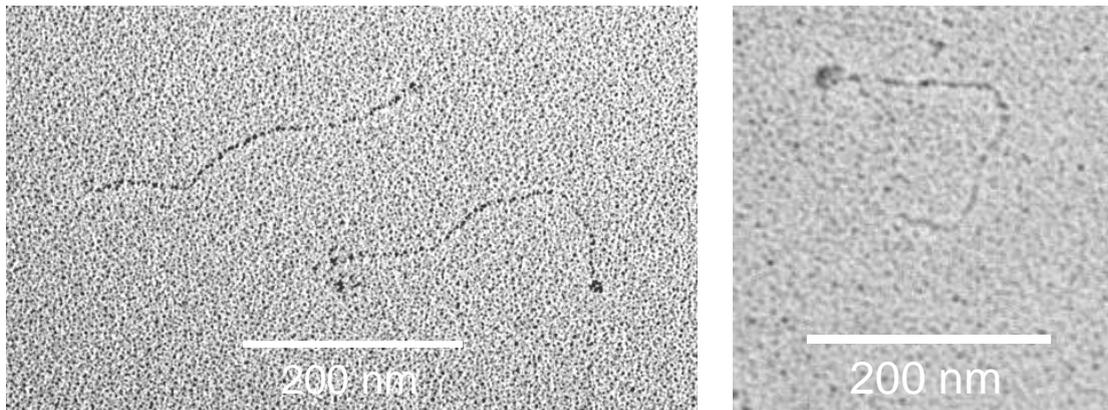


Abb. 3.33: Elektronenmikroskopische Bilder von ed nach Rotations-Schrägbedampfung

Für die abgebildeten Moleküle konnten Längen von 288 und 306 ± 5 nm (links) und 293 ± 5 nm (rechts) gemessen werden, was dem Zweifachen der errechneten Länge von 150 ± 15 nm [HIRAKO ET AL. 1996] entspricht.

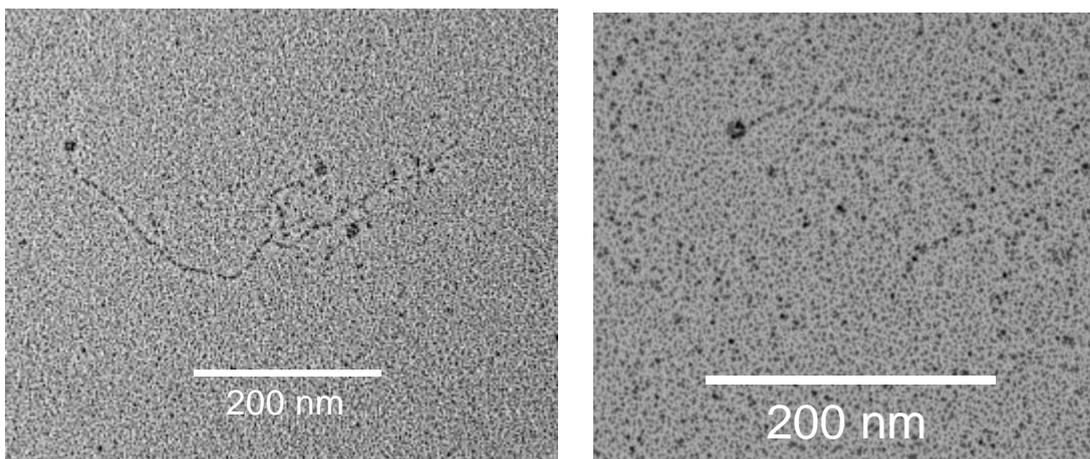


Abb. 3.34: Elektronenmikroskopische Bilder von VL nach Rotations-Schrägbedampfung

Da die Moleküle von VL nach der Aufreinigung von 180 kD auf 120 bzw. 100 kD verkürzt waren, wurden anstelle von 210 ± 20 nm (180 kD) nur errechnete Längen von 140 (120 kD) bzw. 115 ± 15 nm (100 kD) erwartet.

Die abgebildeten Moleküle haben Längen von 298 (links) und 308 ± 5 nm (rechts), was der doppelten der errechneten Länge von 140 bzw. 115 ± 15 nm [HIRAKO ET AL. 1996] entspricht.

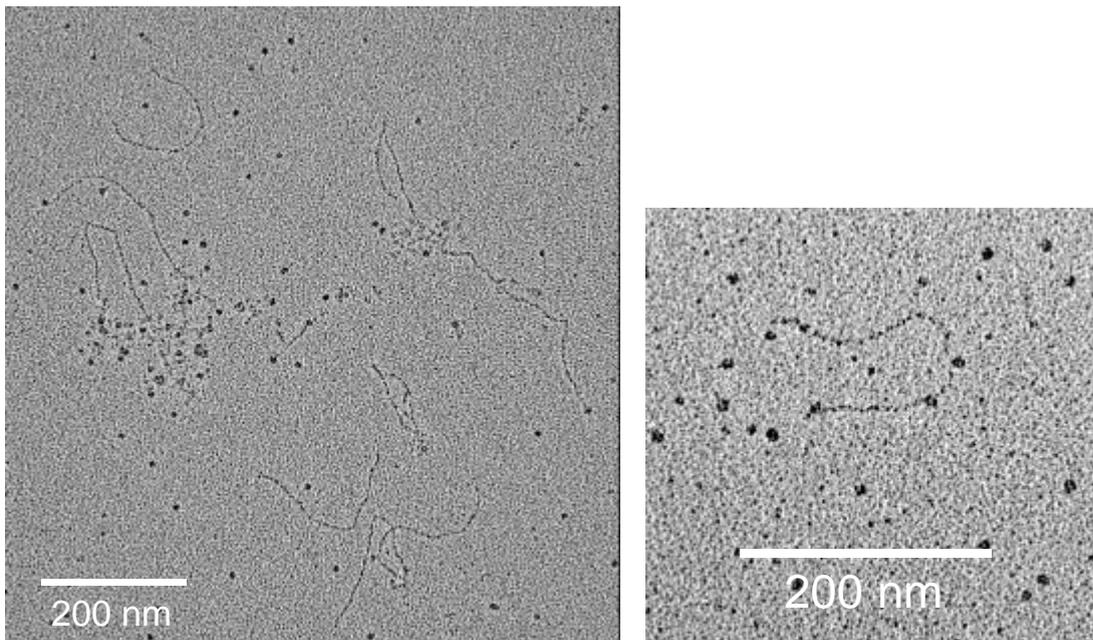


Abb. 3.35: Elektronenmikroskopische Bilder von fd nach Rotations-Schrägbedampfung

Für die abgebildeten Moleküle konnten Längen von 307 ± 5 nm (rechts) und 315, 305, 318, 316, 306, 300 und 307 ± 5 nm (links) gemessen werden, was der dreifachen der errechneten Länge von 100 ± 15 nm [HIRAKO ET AL. 1996] entspricht.

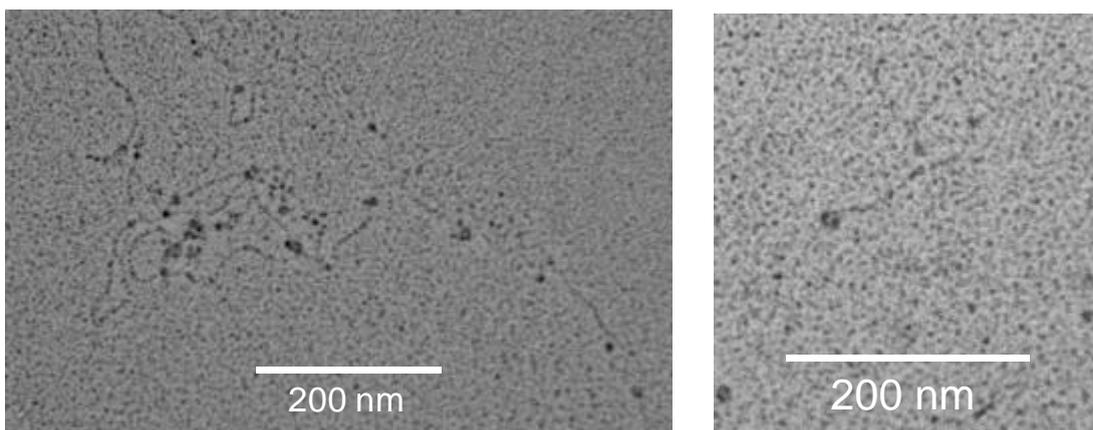


Abb. 3.36: Elektronenmikroskopische Bilder von F nach Rotations-Schrägbedampfung

Das abgebildete Einzelmolekül mißt 136 ± 5 nm (rechts). Aufgrund des akkumulierten Auftretens der Moleküle (links) lassen sich die Längen nur schlecht und mit großer Unsicherheit vermessen, da Anfangs- und Endpunkt nicht klar zu erkennen sind. Hier treten mit 92, 90, 138 und 87 ± 5 nm das zwei- und das dreifache der errechneten Länge auf.

4 DISKUSSION

Kollagen XVII ist ein tripelhelikales transmembranes Molekül mit einer aminoterminalen intrazellulären Domäne, einer hydrophoben transmembranen Domäne und einer carboxyterminalen extrazellulären Domäne, die unterbrochene kollagene Untereinheiten aufweist.

Kollagen XVII wurde als hemidesmosomale Komponente intrazellulär und extrazellulär in Aufbau und Funktion intensiv untersucht, und auch über die Bindungspartner liegen schon viele Forschungsergebnisse vor [z.B. MARINKOVICH 1993; JONES ET AL. 1998; HIRAKO UND OWARIBE 1998; NIEVERS ET AL. 1998; BORRADORI UND SONNENBERG 1999; ZLLIKENS UND GIUDICE 1999; KOSTER ET AL. 2003; MCMILLAN ET AL. 2003; VAN DEN BERGH UND GIUDICE 2003; FRANZKE ET AL. 2003; POWELL ET AL. 2005]. Bisher nicht detailliert bestimmt und charakterisiert wurden die Regionen, die für die Bindung der extrazellulären Domäne mit ihren Bindungspartnern im hemidesmosomalen Plaque in der Lamina lucida verantwortlich sind, und auch eine mögliche Beteiligung an der Signaltransduktion des transmembranen Kollagens wurde noch nicht näher analysiert.

Um zu verstehen, wie Kollagen XVII in physiologischen als auch in pathologischen Situationen funktionell zur Integrität von Hemidesmosomen beiträgt ist es wichtig, Informationen über die genaue Lokalisation der Interaktion mit seinen Bindungspartnern zu gewinnen.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Kollagen XVII-Fragmente entworfen, rekombinant hergestellt und charakterisiert. Die Peptide wurden so entworfen, daß sie für Bindungsstudien und für Untersuchungen im Bereich der Signaltransduktion herangezogen werden können.

Bei der Auswahl der extrazellulären Regionen wurden die für die Untersuchungen der Interaktionsregionen interessanten Bereiche der Ektodomäne ausgewählt: die erste nichtkollagene Domäne NC16a, die sehr große, erste kollagene Domäne C15 und das C-terminale Ende der Ektodomäne NC1-6 mit den kollagenen Domänen C1-5. Die verschiedenen rekombinanten Fragmente besitzen neben einem größeren Anteil der Ektodomäne erstmals auch die Transmembranregion und einen intrazellulären Bereich, was für den Einbau in die Zellmembran essentiell ist.

Mit diesen Fragmenten sollte außerdem die Funktion der Coiled-Coil-Strukturen in der nichtkollagenen Domäne NC16a näher betrachtet werden, die als Nukleus für Trimerisierung und Tripelhelixbildung zu fungieren scheint [AREIDA ET AL. 2001; FRANZKE ET AL. 2003].

4.1 Entwurf, Klonierung, Expression und Aufreinigung der verschiedenen rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptide

Um die verschiedenen entworfenen (siehe auch **Abb. 3.2**), genau definierten Konstrukte von Kollagen XVII zu erhalten, wurde ein erprobtes Expressionssystem für rekombinante Proteine verwendet [KOHLEFELDT ET AL. 1997; AREIDA ET AL. 2001], das hier erstmals für die rekombinante Expression von Kollagen XVII-Fragmenten mit intrazellulärem und transmembranem Anteil genutzt wurde.

Unter verschiedenen Expressionssystemen, die für die Produktion von rekombinanten Kollagenen genutzt werden, sind 293-HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) die am besten geeignete Zelllinie [BULLEID ET AL. 2000]. Dieser Zelltyp exprimiert alle für die posttranslationalen Modifikationen von Kollagenen erforderlichen Enzyme, die für Faltung, Sekretion und Stabilität von rekombinanten Kollagenen entscheidend sind.

Als Expressionssystem wurde ein modifizierter pCEP-Vektor verwendet, der die transkriptionale Kontrollregion des Zytomegalie-Virus (CMV) für eine starke mRNA-Expression der rekombinanten Konstrukte nutzt. Dieser Vektor wird episomal in das Genom der Zelle integriert und bei jeder Zellteilung weitervererbt.

Alle Konstrukte wurden mit einer heterologen DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (BM40) versehen, welches die Sekretion der rekombinanten Proteine mit der Transmembranregion in das Zellkulturmedium ermöglicht. Die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine wird durch diesen Schritt erleichtert, da diese nicht durch einen aufwendigen Zellaufschluß und anschließende Trennung von zellulären Komponenten gewonnen werden müssen.

Es wurden neben den vorhandenen Kollagen XVII-Fragmenten E und F (**Abb. 3.2**) die um den C-terminalen Anteil D erweiterten Konstrukte ed und fd kloniert. Während F neben einem kurzen intrazellulären Stück und der Transmembranregion nur die erste nichtkollagene extrazelluläre Domäne NC16a enthält, ist E zusätzlich um die erste kollagene Domäne C15 erweitert. Diese beiden Fragmente wurden jeweils um den Bereich NC1 bis NC6 mit den 5 kollagenen Domänen C1-5, was dem Fragment D entspricht, ergänzt, sodaß die Konstrukte ed und fd entstanden sind.

Zusätzlich stand ein Vektor für das Vollängen-Kollagen XVII VL zur Verfügung.

Mit allen fünf Expressionsvektoren konnten stabile, episomale Zellklone erzeugt werden. Alle rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptide wurden in das Zellkulturmedium sezerniert. Eine Sekretionsrate konnte nicht bestimmt werden, da die Menge der pro Tag sezernierten Proteine an verschiedenen Tagen nicht konstant war. Vermutlich hängt dies mit den konkurrierenden Befehlen der Transmembranregion, die für den Einbau des Proteins in die Zellmembran verantwortlich ist, und dem BM40-Signalpeptid, das für die Sekretion der Proteine in das Kulturmedium sorgen soll, zusammen.

Für die rekombinante Expression von Kollagen XVII und seinen Fragmenten ist eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Ascorbinsäure im Kulturmedium wichtig, da dieses Vitamin ein essentieller Co-Faktor für die Hydroxylierung von Prolin in 4-

Hydroxyprolin ist. Die Hydroxylierung von Prolin ist für die Stabilisierung der kollagenen Tripelhelix von großer Bedeutung [KIVIRIKKO 1992]. Nach etwa 48 Stunden waren die rekombinanten Proteine im Zellkulturmedium angereichert und konnten durch Immunoblotting detektiert werden. Das mit dieser Methode konditionierte und über mehrere 48-Stunden-Einheiten gesammelte Medium diente als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung.

Für die Konstrukte rColXVII-ed, -fd und -F wurde die Aufreinigung in zwei Schritten durchgeführt. Nach dem ersten Schritt der Aufreinigung durch Anionenaustauscher-Chromatographie lagen noch viele Verunreinigungen durch endogene Proteine der 293-EBNA-Zellen vor. Mit SDS-Page konnte gezeigt werden, daß durch die nachfolgende Gelfiltration eine adäquate Reinigung erreicht werden konnte.

Das rekombinante Vollängen-Kollagen XVII rColXVII-VL lag schon nach dem ersten Schritt der Aufreinigung ausreichend sauber vor, daher wurde auf den zweiten Schritt verzichtet. Jedoch lag das rekombinante Vollängen-Kollagen XVII nicht mehr in der vollen Länge von 180 kD, sondern in trunkierten Versionen von 120 und 100 kD vor.

Für alle Konstrukte konnte nur ein kleiner Teil des Ausgangsmaterials erhalten werden.

Für die Aufreinigung wurden nur nicht-denaturierende Puffersysteme benutzt, um den Funktionalitätsverlust der rekombinanten Proteine zu minimieren.

4.2 Charakterisierung der rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptide

Nach ihrer Aufreinigung wurden die rekombinanten Proteine auf Helixbildung bzw. Oligomerisierung charakterisiert. Es wurde untersucht, ob die Fragmente rColXVII-ed und -VL mit der größten kollagenen Domäne C15 als Einzelstränge oder als kollagene Tripelhelices vorliegen, wie es bei nativem Kollagen XVII der Fall ist. Bei den Fragmenten ohne C15 wurde untersucht, ob es zu einer Ausbildung von Multimeren kommt.

Für diese Charakterisierungen wurden drei Methoden herangezogen: der trypsin-vermittelte Proteinabbau (Trypsinverdau), die spektrale und thermale CD-Analyse und die Elektronenmikroskopie nach Rotationsschrägbedampfung.

4.2.1 Untersuchung der Struktur und Bestimmung des Schmelzbereiches mit Trypsin-vermitteltem Proteinabbau (Trypsin-Verdau)

Bei einem Protease-vermittelten Proteinabbau können Enzyme wie z.B. Trypsin zwar globuläre Strukturen angreifen, nicht aber tripelhelikale Konformationen [BRUCKNER UND PROCKOP 1981]. Erst bei einer Auflösung der tripelhelikalen Struktur, z.B. durch eine Temperaturerhöhung, kann das Trypsin an der freigesetzten Spaltstelle angreifen und das Protein vollständig abbauen. Die rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente lassen sich mit Hilfe eines Trypsin-Verdaus im Hinblick auf ihre tripelhelikale Strukturen und deren Denaturierung, ihren Schmelzbereich und den Schmelzpunkt untersuchen.

Die Fragmente rColXVII-ed und -VL beinhalten die größte kollagene Domäne C15 und sollten somit über eine tripelhelikale Struktur verfügen.

Schon bei der Starttemperatur des Assays von 30°C werden beide Proteine teilweise abgebaut. Hier greift das Trypsin zunächst an den Spaltstellen in den nichthelikalen Strukturen an, während die Spaltstellen in den tripelhelikalen Bereichen für den Abbau bei den niedrigen Temperaturen noch nicht zugänglich sind.

Das Molekulargewicht des unverdauten rColXVII-ed liegt bei 70 kD. Diese Bande ist bereits bei einem Trypsinverdau bei 30°C nicht mehr zu beobachten, statt dessen findet sich eine Doppelbande bei etwa 40 kD. Diese Doppelbande verschwindet bei Temperaturen zwischen 50 und 60°C, wo offensichtlich durch die Denaturierung der tripelhelikalen Struktur die Spaltstellen freigesetzt werden und somit der komplette Abbau des Proteins durch das Trypsin stattfinden kann.

Für das unverdaute rColXVII-VL findet man im SDS-Page Molekulargewichte von 120, 100 und 60 kD. Der Trypsinverdau bei 30°C führt zu einer Verstärkung der 60 kD-Bande, während die Banden bei 120 und 100 kD verschwinden. Erst bei Temperaturen zwischen 60 und 70°C kommt es zu einer Auftrennung der Tripelhelix und zu einem vollständigen Abbau des Proteins (siehe auch **Tab. 4.1**).

Im Gegensatz dazu stehen die Assays der Fragmente rColXVII-F und -fd.

Bei der unbehandelten Probe von rColXVII-F treten schwache Banden bei 16, 20 und 35 kD sowie eine Doppelbande bei 25 kD auf, die sich während der Inkubation im gesamten Temperaturbereich von 30 bis 80°C nicht verändern. Die Spaltregionen in diesem kurzen tripelhelixfreien Konstrukt sind dem Enzym offensichtlich nicht zugänglich und das Polypeptid wird nicht durch Trypsin abgebaut.

Das Molekulargewicht des unverdauten rColXVII-fd liegt bei 47 kD. Auch hier verändert sich die Bande im gesamten Temperaturbereich zwischen 30 und 70°C nicht. Dieses Konstrukt enthält zwar die neben der vermutlich für die Ausbildung der Tripelhelix wichtigen Domäne NC16a auch die kollagenen Domänen C1-5 am C-terminalen Ende, es kommt jedoch nicht zur Ausbildung einer Tripelhelix. Auch dieses rekombinante Polypeptid verändert sich im gesamten Temperaturbereich nicht, und es findet kein Abbau wie bei rColXVII-ed und -VL statt (siehe auch **Tab. 4.1**).

Bei beiden Fragmenten müssen folglich Strukturen vorliegen, die dem Trypsin keinen Zugang zum aktiven Zentrum der Angriffsregion erlauben. Dies deutet auf das Vorliegen einer superhelikalen Struktur durch die Oligomerisierung von Einzelketten hin, bei der die Spaltstellen für das Trypsin nicht zugänglich sind.

Tab. 4.1: Ergebnisse der Trypsin-Verdaus der Kollagen XVII-Fragmente

Fragment	Molekulargewicht des unverdauten Proteins	Molekulargewicht bei einem Trypsin-Verdau bei 30°C	vollständiger Abbau des Proteins
rColXVII-ed	70 kD	Doppelbande bei etwa 40 kD	zwischen 50 und 60°C
rColXVII-VL	120, 100 und 60 kD	Verstärkung der 60 kD Bande	zwischen 60 und 70°C
rColXVII-F	16, 20 und 35 kD sowie eine Doppelbande bei 25 kD	keine Veränderungen zur unverdauten Probe	keine Veränderung zwischen 30 und 80°C
rColXVII-fd	47 kD	keine Veränderungen zur unverdauten Probe	keine Veränderung zwischen 30 und 80°C

4.2.2 Untersuchung der Struktur und Bestimmung des Schmelzpunktes (T_m-Wert) mit spektraler und thermaler CD-Spektroskopie

Diese Ergebnisse können mit denen aus CD-Analysen verglichen werden. Bei Molekülen mit kollagenen tripelhelikalen Strukturen werden in spektralen CD-Analysen charakteristische Maxima bei 221 nm beobachtet [PELTONEN ET AL. 1980]. Mit thermalen CD-Analysen kollagener tripelhelikaler Strukturen läßt sich dann der Schmelzpunkt (T_m-Wert) bestimmen.

Die rekombinanten Polypeptide wurden dann durch CD-Spektroskopie charakterisiert. Hierbei wurden zunächst spektrale CD-Analysen durchgeführt, um zu ermitteln, ob tripelhelikale Struktur vorliegt. Dabei wurde das Spektrum bei 20°C vor und nach thermaler Denaturierung gemessen. Bei Vorliegen einer kollagenen Tripelhelix sollte ein charakteristisches Maximum bei 221 nm beobachtet werden, das nach thermaler Denaturierung nicht mehr nachweisbar ist.

Bei den rekombinanten Polypeptiden, bei denen eine tripelhelikale Struktur nachgewiesen werden konnte, wurde dann mit thermaler CD-Analyse der Schmelzpunkt (T_m-Wert) bestimmt, indem das Spektrum bei 221 nm im Temperaturbereich von 20 bis 100°C gemessen wurde.

Die Fragmente rColXVII-ed und -VL zeigen in der spektralen Analyse das erwartete Maximum bei 221 nm mit positiver Elliptizität, das nach thermaler Denaturierung nicht mehr nachweisbar ist. Beide Fragmente enthalten folglich eine kollagene tripelhelikale Komponente, die durch die Erhitzung aufgelöst wurde.

In der thermalen Analyse wurden die Schmelzkurven aufgezeichnet und daraus die differenzierten Schmelzkurven berechnet, sodaß sich für rColXVII-ed ein Schmelzbereich von 50 bis 65°C und der Schmelzpunkt bei etwa 58°C ergeben.

Für rColXVII-VL findet man einen Schmelzbereich von 48 bis 65°C. Der Schmelzpunkt liegt mit 61°C geringfügig höher als bei rColXVII-ed (siehe auch **Tab. 4.2**).

Für die Fragmente rColXVII-F und -fd zeigen die CD-Spektren keine Maxima bei 221 nm. Die bisherigen Ergebnisse werden hierdurch bestätigt. Diese Fragmente besitzen keine kollagene Tripelhelix. Auf die Messung der Schmelzkurve konnte daher verzichtet werden.

Tab. 4.2: Ergebnisse der CD-Analysen der Kollagen XVII-Fragmente

Fragment	Maximum bei 221 nm *	kollagene Struktur	Schmelzbereich **	Schmelzpunkt ***
rColXVII-ed	ja; nach thermaler Denaturierung nicht mehr nachweisbar	ja	50 - 65°C	58°C
rColXVII-VL	ja; nach thermaler Denaturierung nicht mehr nachweisbar	ja	48 - 65°C	61°C
rColXVII-F	nein	nein		
rColXVII-fd	nein	nein		

* in der spektralen CD-Analyse

** bestimmt mit thermaler CD-Analyse

*** berechnet aus der differenzierten Schmelzkurve

4.2.3 Vergleich der gemessenen T_m-Werte mit der Literatur

Die gemessenen T_m-Werte von 58 bzw. 61°C für rColXVII-ed bzw. VL sind vergleichsweise hoch. In der Literatur wurden die Werte für T_m mit CD-Spektroskopie bisher nur für rekombinante Fragmente gemessen, die ausschließlich im Bereich der Ektodomäne liegen sowie für natives Vollängen-Kollagen XVII, das aus humanen Keratinozyten gewonnen wurde. Für die Bestimmung der T_m-Werte von rekombinant hergestellten Fragmenten von Kollagen XVII, die intrazelluläre und membrandurchspannende Anteile enthalten, liegen bisher keine Vergleichswerte vor (Tab. 4.3).

Für die rekombinante Ektodomäne werden T_m-Werte von 41°C (komplette Ektodomäne NC16a bis NC1) und 35°C (Domänen NC16a und C15), gemessen mit CD-Spektroskopie [AREIDA ET AL. 2001] und für die native Form des Vollängen-Kollagen XVII 41.5 bzw. 44°C, gemessen mit Pepsin/Trypsin- bzw. Trypsin-vermitteltem Proteinabbau [SCHÄCKE ET AL. 1998], angegeben.

Für ein rekombinantes Fragment der Ektodomäne, das die Domäne C15 ganz, aber nur einen kleinen Teil der NC16a-Region enthält, konnte ein T_m-Wert von nur 26.5°C bestimmt werden [TASANEN ET AL. 2000A]. Diesem Fragment fehlt die in der NC16a-Region liegende Coiled-Coil-Struktur, die für die Tripelhelixbildung mitverantwortlich sein soll, da dieser Struktur die Zusammenführung der drei α -Ketten zugeschrieben wird. Aufgrund des Fehlens dieser Strukturen ist der T_m-Wert deutlich niedriger als der von AREIDA ET AL. auf 35°C bestimmte Wert [2001], was die Vermutung stützt, daß diese Region zur Stabilität des Fragmentes beiträgt.

Tab. 4.3: Vergleich der gemessenen Tm-Werte mit der Literatur

Fragment	kollagene Struktur	Schmelzbereich (Trypsin-Verdau)	Schmelzbereich (CD-Analyse)	Schmelzpunkt (CD-Analyse)	Vergleich mit Literatur und Spezifikationen
rColXVII-ed	ja	50 - 60°C	50 - 65°C	58°C	35°C ¹ nur rekombinante Ektodomäne: NC16a und C15 (ohne intrazelluläre und transmembrane Anteile) [AREIDA ET AL. 2001]
rColXVII-VL	ja	60 - 70°C	48 - 65°C	61°C	41°C ¹ nur rekombinanten Ektodomäne: NC16a bis NC1 (ohne intrazelluläre und transmembrane Anteile) [AREIDA ET AL. 2001] 41.5°C ² bzw. 44°C ³ natives Kollagen XVII (Vollänge) [SCHÄCKE ET AL. 1998]

¹ gemessen mit CD-Spektroskopie

² gemessen mit Pepsin/Trypsin-Verdau

³ gemessen mit Trypsinverdau

Ursache für die in dieser Arbeit gemessenen signifikant höheren Tm-Werte kann durch die rekombinante Herstellung von Kollagen XVII mit der intrazellulären und der transmembranen Domäne bedingt sein. Offensichtlich scheint, daß sich die rekombinant hergestellten Polypeptide in ihren strukturellen Eigenschaften deutlich von den nativen Proteinen unterscheiden, was die Tripelhelixbildung und die Stabilität betrifft. Andererseits werden hier erstmals Fragmente mit intrazellulärem Anteil und der Transmembran-Region vermessen und es ist wahrscheinlich, daß gerade die TM-Region einen signifikanten Einfluß auf die Struktur des rekombinanten Polypeptide hat, da auch die erste Coiled-Coil-Region direkt an die TM-Region anschließt.

Zuletzt ist zu bemerken, daß bei den Untersuchungen mit dem als rekombinanten Vollängen-Kollagen XVII-Protein bezeichneten rColXVII-VL keine Moleküle mit 180 kD, sondern trunkierte Moleküle zugrunde lagen. Sowohl bei der Herstellung der kodierenden DNA (siehe Kap. 3.2.1) als auch bei der Anzucht der Zellen (siehe Kap. 3.2.2) konnte rColXVII-VL mit einer Größe von 180 kD nachgewiesen werden. Nach der Aufreinigung waren jedoch nur noch Moleküle mit einer Größe von 120, 100 und 60 kD vorhanden. Sie beinhalten sicher die NC16a-Domäne, da dort der Antikörper zum Nachweis im Western-Blot bindet.

Bei der Trunkierung wären entweder der Verlust des intrazellulären und des membrandurchspannenden Anteils oder die Abspaltung eines Teils der Ektodomäne möglich.

Auf die erste Möglichkeit könnte hinweisen, daß das rekombinante Polypeptid an der gleichen Stelle "bricht" wie die zweite natürlich vorkommende, durch Shedding erzeugte Variante mit einem Molekulargewicht von 120 kD.

Für die zweite Möglichkeit sprechen die gemessenen hohen T_m-Werte, da die intrazelluläre- und die TM-Domäne bei den rekombinanten Molekülen vermutlich für diese Werte verantwortlich sind.

Eine Protein-Sequenzierung könnte dies abschließend klären, jedoch war eine Sequenzierung der Fragmente nicht möglich, da die N-Termini blockiert waren.

4.2.4 Untersuchung der Strukturen mit Elektronenmikroskopie nach Rotations-Schrägbedampfung

Die Strukturen biologischer Moleküle können mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nach Rotationsbedampfung untersucht werden. Bei diesem Verfahren werden durch die Beschichtung der Originalmoleküle mit einer Platin-Kohle-Schicht elektronendichte Abbildungen erzeugt, die anschließend im Transmissionselektronenmikroskop (EM) untersucht werden können.

Alle vier Moleküle rColXVII-ed, -VL, -fd und -F, im Folgenden nur als ed, VL, fd und F bezeichnet, konnten elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Bei vielen Molekülen ist jeweils eine globuläre Struktur, der Kopf, zu erkennen, der mit der intrazellulären und der Transmembran-Domäne korrespondiert [HIRAKO ET AL. 1996].

Dieser Kopf wird auch für das aufgereinigte VL-Polypeptid beobachtet. Dies erhärtet die unter 4.2.2 getroffene Vermutung, daß bei der Aufreinigung die Ektodomäne verkürzt wurde, da diese globuläre Struktur bei Fehlen der intrazellulären und transmembranen Anteile sonst wahrscheinlich nicht zu beobachten wäre.

An diese globuläre Strukturen anschließend folgt bei ed und VL zunächst ein gerades, steif wirkendes Element, das mit der C15-Domäne korreliert [HIRAKO ET AL. 1996], bevor der Rest des Moleküls in etwas mehr gewundener Form folgt. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisher veröffentlichten Bildern überein [HIRAKO ET AL. 1996].

Dieses "Stäbchen" ist bei den Aufnahmen von fd nicht so klar zu erkennen. Hier zeichnet sich schon früher eine Krümmung des Moleküls ab. Da bei diesem Konstrukt an die Domäne NC16a gleich das C-terminale, gewundene Ende anschließt, entsprechen auch diese Bilder der Erwartung [NONAKA ET AL. 2000].

In allen Fällen finden sich jedoch auch Aufnahmen, bei denen der globuläre Kopf nicht eindeutig zu erkennen ist.

Für F waren vorwiegend Bilder zu beobachten, bei denen die Moleküle sehr akkumuliert aufgetreten sind. Auch hier ist keine steife Region zu erkennen. Außerdem scheint es, als

ob die Moleküle längs miteinander verbunden oder aneinandergereiht vorliegen, und es ist nicht möglich, Anfang und Ende eines einzelnen Moleküls zu erkennen.

Längenmessung aller vier Moleküle konnten die rechnerisch ermittelten Längen nicht bestätigen. Die gemessenen Längen entsprechen vorwiegend dem zwei- und dreifachen Wert der errechneten Längen, jedoch kommen auch Werte vor, die mit keinem Vielfachen der errechneten Werte übereinstimmen.

Tab. 4.4: Korrelation von errechneten und gemessenen Längen der Kollagen XVII-Fragmente

Fragment	errechnete Länge	gemessene Längen
rColXVII-ed	150 ± 15 nm	306, 293, 322, 288, 284 ± 5 nm
rColXVII-VL	140 ± 15 nm (120 kD)	298, 308, 322, 258, 293 ± 5 nm
	115 ± 15 nm (100 kD) 70 ± 10 nm (60 kD)	
rColXVII-F	48 ± 8 nm	136, 92, 90, 138, 87 ± 5 nm
rColXVII-fd	100 ± 15 nm	307, 315, 305, 318, 316, 306, 300, 307 ± 5 nm

Die Moleküle sind offensichtlich in der Lage, sich durch Aggregation in Längsrichtung aneinanderzureihen. Dabei scheint sich die globuläre Struktur am N-Terminus aufzulösen und eine Wechselwirkung mit dem extrazellulären C-Terminus des nächsten Moleküls einzugehen. Die Ursache für diese Interaktion könnte die hydrophobe Region der intrazellulären und Transmembran-Domäne sein.

Auch bei den Untersuchungen von rColXVII-E [PUBLIKATION IN VORBEREITUNG] wurden Moleküle mit sehr unterschiedlichen Längen beobachtet.

Bisher wurden jedoch noch keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Rotationsschrägbedampfung von rekombinantem Kollagen XVII oder Kollagen XVII-Fragmenten mit intrazellulärem und transmembranem Anteil zusammen mit Anteilen der Ektodomäne veröffentlicht.

Die Moleküle F und fd enthalten keine bzw. nur die letzten 5 unterbrochenen kollagenen Domänen. Daher konnte nicht von einer Tripelhelixbildung ausgegangen werden, was auch durch die Untersuchungen mit Trypsin-vermitteltem Proteinabbau und CD-Spektroskopie bestätigt wurde. Somit dürfte keine elektronenmikroskopische Abbildung möglich sein, da der Durchmesser von Einzelketten bei der hier angewandten Untersuchung unterhalb der Auflösungsgrenze liegt und Monomere nicht darstellbar sind. Da dennoch für fd und F Moleküle dargestellt wurden, müssen sich mehrere Einzelketten in einer Helix zu Multimeren verbunden haben, um die Dicke zu erhalten, die für die elektronenmikroskopische Aufnahme nötig ist. Als "Auslöser" für die Oligomerisierung oder Helixbildung kommen die Coiled-Coil-Strukturen in der NC16a-Region in Frage, die in beiden Molekülen vorliegen.

4.3 Bedeutung der Coiled-Coil-Strukturen

Coiled-Coil-Strukturen sind häufig vorkommende Oligomerisierungsstrukturen in Proteinen. Fast alle Mitglieder der Proteinfamilie der Kollagene enthalten diese Strukturen, die die Trimerisierung induzieren [MCALINDEN ET AL. 2003]. N-terminale Coiled-Coil-Strukturen sind bekannt für die Induktion der Tripelhelixbildung von Transmembran-Kollagenen. Bei FACITs und MACITs wurden diese Strukturen zwischen kollagenen Domänen gefunden [MCALINDEN ET AL. 2003].

Um Coiled-Coil-Strukturen in Proteinen zu detektieren, kann man das Programm COILS [LUPAS ET AL. 1991] verwenden. Hierbei wird in der Primärstruktur des Proteins nach den typischen Heptad-Repeats, der Wiederholung eines konservierten Musters von sieben Resten, gesucht, denen die Zusammenführung der Einzelketten für die Ausbildung der "Supercoil" zugeschrieben wird.

In der Primärstruktur von Kollagen XVII finden sich mit dieser Methode zwei Coiled-Coil-Strukturen. Die erste umfaßt sechs Heptad-Repeats (AA 471-509), die sich direkt am Übergang von der TM-Region zur ersten nichtkollagenen Domäne NC16a befinden. Am C-terminalen Ende von NC16a am Übergang zu C15 findet sich die zweite Coiled-Coil-Struktur mit 2.5 Heptad-Repeats.

Coiled-Coil-Strukturen können die Thermostabilität eines oligomeren Moleküls erheblich erhöhen und auch für die Oligomerisierung selbst (hier Tripelhelixbildung) Triggereffekte haben. Das heißt, daß durch die starken hydrophoben Wechselwirkungen eines Coiled-Coil-Motivs die Alphaketten eines Kollagen-Moleküls zusammengefügt werden, woraufhin die Tripelhelixbildung einsetzen kann.

Es wurde vermutet, daß die erste Coiled-Coil-Struktur im Kollagen XVII für die Ausbildung einer dreisträngigen Helix vor der Bildung der kollagenen Tripelhelix verantwortlich ist [BALDING ET AL. 1997]. Untersuchungen für Kollagen XIII von LATVANLEHTO ET AL. [2003] lassen den Schluß zu, daß die erste Coiled-Coil-Region nahe der TM-Domäne (NC1) notwendig für die Zusammenführung der N-terminalen Enden der drei $\alpha 1(\text{XIII})$ -Ketten ist, während eine weiter entfernt liegende, zweite Region im Bereich von NC3 in die Zusammenführung des C-terminalen Anteils des Moleküls involviert ist.

Bei Kollagen XVII liegen beide Coiled-Coil-Strukturen vergleichsweise dicht beieinander innerhalb derselben nichtkollagenen Domäne (NC16a).

AREIDA ET AL [2001] schlagen vor, daß die erste Coiled-Coil-Struktur von Kollagen XVII für die Auswahl dreier korrekter Alpha-Ketten sorgt, die dann in der zweiten Coiled-Coil-Struktur für die Tripelhelixbildung zusammengefügt werden.

Dieser Vorschlag wird von der Beobachtung gestützt, daß es auch ohne kollagene Regionen in Fragment F zu einer Helixbildung (Oligomerisierung) kommt. Die Moleküle kann man in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von F darstellen, obwohl der Durchmesser von Einzelketten unterhalb der Auflösungsgrenzen des EM liegt.

Mit einer Untersuchung von rekombinanten Fragmenten, die die Coiled-Coil-Region nicht enthalten, kann diese These letztendlich bewiesen werden.

4.4 Übersicht der Ergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle sind zur besseren Übersicht alle Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Trypsinverdau, mit CD-Spektroskopie, mit Elektronenmikroskopie und die Folgerungen aus diesen Untersuchungen für die Molekülstruktur aufgeführt.

Tab. 4.5: Ergebnisübersicht

Fragment	Trypsinverdau, vollständigiger Abbau	CD-Analyse Schmelzbereich	CD-Analyse Schmelzpunkt	Elektronenmikroskopische Darstellung	Folgerung
rColXVII-ed	50-60°C	kollagene Struktur	50-65°C	58°C	Moleküle darstellbar Tripelhelixbildung
rColXVII-VL	60-70°C	kollagene Struktur	48-65°C	61°C	Moleküle darstellbar Tripelhelixbildung
rColXVII-F	kein vollständigiger Abbau	keine kollagene Struktur	kein Schmelzen	Moleküle darstellbar	Oligomerisierung
rColXVII-fd	kein vollständigiger Abbau	keine kollagene Struktur	kein Schmelzen	Moleküle darstellbar	Oligomerisierung

4.5 Voruntersuchung für die Bindungsstudien

Mit den entworfenen Fragmenten können Bindungsstudien durchgeführt werden, um die für die Bindung von Kollagen XVII an seine Interaktionspartner zuständigen Regionen zu detektieren. Da auch Nierenzellen über verschiedene Integrine an eine Basalmembran gebunden sind, muß vor der Verwendung der 293-EBNA-Zellen für Zellbindungsstudien ausgeschlossen werden, daß diese Zelllinie die Integrine endogen exprimiert.

Durch die Immunfluoreszenz-Färbungen konnte gezeigt werden, daß keine endogenen Integrine vorliegen, die die Ergebnisse von Bindungsversuchen an Integrine verfälschen würden. Insofern kann mit den verwendeten Zellen auch in den Bindungsstudien gearbeitet werden.

4.6 Schlußfolgerung

In dieser Arbeit wurden verschiedene definierte Kollagen XVII-Fragmente rekombinant hergestellt und ihre Struktur untersucht.

Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei zum einen ein Coiled-Coil-Motiv nahe der Transmembran-Domäne, das auch bei Molekülen ähnlicher Struktur zu finden ist (Kollagen XIII, Makrophagen Scavenger Rezeptor [HÄGG ET AL. 2001]). Dieses Motiv hat eine essentielle Funktion bei der Tripelhelixbildung und ist auch für die Oligomerisierung von nicht-kollagenen Anteilen verantwortlich.

Desweiteren kann der Bindungsmechanismus von Kollagen XVII und die Wechselwirkungen mit anderen Basalmembran-Komponenten untersucht werden. Besonders die räumliche Identifizierung der verantwortlichen Regionen ist von großem Interesse und kann mit den in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Fragmenten von Kollagen XVII durchgeführt werden. Bei dem membranständigen Protein, kann so die Bindung der transfizierten Zellen an extrazelluläre Matrixmoleküle durch Zellbindungsassays untersucht werden. In diesen Zellen kann Kollagen XVII nicht im Zusammenspiel mit anderen hemidesmosomalen Komponenten an Matrixkomponenten binden, sodaß die besondere Rolle der einzelnen Regionen von Kollagen XVII herausgearbeitet werden kann.

4.7 Ausblick

Aus vorläufigen Experimenten finden sich Hinweise, daß Kollagen XVII Zelladhäsion vermitteln kann. So wurde z.B. bei bullösen Dermatosen beobachtet, daß Kollagen XVII mit dem distalen C-Terminus der Ektodomäne an Laminin 5 bindet [TASANEN ET AL. 2004]. Um klarere Aussagen über weitere potentielle Bindungspartner in der Basalmembranzzone zu erhalten, muß die Kollagen XVII-Bindung mit unterschiedlichen Vertretern der dermoepidermalen Junktion und der ECM analysiert werden.

Noch nicht untersucht wurde die Möglichkeit, ob das membranständige Molekül durch die Anheftung an die Basalmembran Signale zur Regulation der Genexpression erzeugt (Outside-In-Signalling). Da sich die Signaltransduktion mit Basalmembran-Komponenten bisher auf die Wechselwirkung mit Integrinen konzentriert hat, kann jetzt mit transfizierten Zellen untersucht werden, ob auch direkt vom Kollagen XVII Signale für die Genaktivierung produziert werden können. Für die epithelialen Proteine wird eine Beteiligung an der Regulation der Zelladhäsion und -migration vermutet. Diese Annahme wird dadurch erhärtet, daß Kollagen XVII Ligandeninteraktionen mit Integrin $\alpha6\beta4$ [BORRADORI ET AL. 1997], Plektin und BP230 [NIEVERS ET AL. 1999] sowie Laminin 5 [TASANEN ET AL. 2004] aufweist. Außerdem fungiert die Endodomäne möglicherweise als Signalübermittler, während die extrazelluläre Domäne an der Matrixbindung an der Basalmembran beteiligt ist.

Durch die Herstellung und rekombinante Expression definierter Kollagen XVII-Fragmente, die neben den möglichen Bindungsregionen der Ektodomäne erstmals auch einen intrazellulären und transmembranen Anteil besitzen, können jetzt Informationen zur Strukturbildung, zur Bedeutung struktureller Parameter für die Wechselwirkung mit Basalmembran-Komponenten, zur Zellanhaftung und zur Kommunikation gewonnen werden.

4.7.1 Bindungsstudien

Bei der Charakterisierung der Fragmente konnte gezeigt werden, daß nur ein Teil der rekombinanten Polypeptide in die Zellmembran eingebaut werden. Das für die Expression verwendete BM40-Signalpeptid ist jedoch hinderlich für Studien, bei denen ein membranständiges Polypeptid benötigt wird. Aus diesem Grund müssen die Fragmente vor ihrem Einsatz noch modifiziert werden. Dabei kann mit der bisher verwendeten Klonierungsstrategie das BM40-Signal aus dem pCEP-BM40-Pu-Vektor herausgetrennt werden. Mit den so entstandenen Vektoren pCEP-Pu, die für die Konstrukte ohne BM40-Signalpeptid kodieren, können wieder transfizierte Zellklone erzeugt werden. Diese Zellen sollten dann das rekombinante Polypeptid in die Zellmembran direkt integrieren und bieten eine gute Voraussetzung für die Bindungsstudien.

Nachfolgend werden einige Experimente skizziert, die dazu beitragen könnten, Auskunft über die Bindungspartner und Veränderungen in den Zellen durch die Ligandenbindung zu erhalten.

Zellbindungsstudien

Mit der Durchführung von Zellbindungsassays mit verschiedenen Zellen, die mit membranständigen Kollagen XVII-Fragmenten transfiziert wurden, kann die für den Bindungsmechanismus verantwortliche Region räumlich identifiziert werden:

Der Boden von Zellkultur-Wells wird mit dem zu untersuchenden möglichen Bindungspartner von Kollagen XVII beschichtet. Anschließend werden die transfizierten

Zellen mit den membranverankerten Kollagen XVII-Fragmenten inkubiert und dann die Anzahl der anhaftenden Zellen bestimmt.

Protein-Protein-Interaktionen

Um Informationen über die Wechselwirkung zweier Proteine zu erhalten, können Solid-Phase-Interaktionsuntersuchungen durchgeführt werden:

Dabei wird ein Ligand an eine feste Phase (Plastik) adsorbiert, während der andere Ligand in der löslichen Phase in seriellen Verdünnungen inkubiert wird. Die Detektion des gebundenen Liganden erfolgt dann mittels spezifischer Antikörper im ELISA-Verfahren.

Diese Methode liefert zwar klare Informationen darüber, ob die Liganden miteinander interagieren, erlaubt jedoch nicht, die Stärke einer solchen Bindung zu bestimmen, was aber durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz erreicht werden kann: ein Interaktionspartner wird kovalent an einen Chip gebunden und der zweite Interaktionspartner in der flüssigen Phase dazugegeben. Diese Biacore-Studien können zur Verfolgung der Bindung und zur Ermittlung der reellen Bindungsstärken in Echtzeit eingesetzt werden und erlaubt die Berechnung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten.

Untersuchungen zur Signaltransduktion

Die Signaltransduktion auf basaler Ebene kann durch Einsatz von Antikörpern gegen phosphorylierte Proteine untersucht werden, um in den Zellen mit den rekombinanten membranständigen Konstrukten eine Signalerzeugung bei Adhärenz an eine beschichtete Oberfläche oder an einen speziellen Liganden zu detektieren: liegt überhaupt ein Outside-In-Signalling vor und kann man einen bestimmten extrazellulären Bereich dafür verantwortlich machen.

4.7.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Rotationsschrägbedampfung

Die Längenmessungen aller vier Moleküle konnten die rechnerisch ermittelten Längen nicht bestätigen. Da in den vorliegenden Publikationen aufgereinigtes, bovines, natives Kollagen XVII verwendet wurde [HIRAKO ET AL. 1996], sind weitere Untersuchungen nötig, um die Ursache der abweichenden Längen zu verstehen bzw. die rekombinanten Moleküle so aufzureinigen und vorzubehandeln, daß eine Abbildung in der erwarteten Länge ohne Aggregatbildung möglich wird.

4.7.3 Bestimmung der T_m-Werte von rekombinanten Kollagen XVII-Fragmenten mit intrazellulärem und transmembranem Anteil

Die in dieser Arbeit ermittelten T_m-Werte von rekombinant hergestellten Kollagen XVII-Fragmenten, die erstmals einen intrazellulären und einen transmembranen Anteil besitzen, und die publizierten Werten von nativem Kollagen XVII bzw. rekombinant hergestellten Fragmenten, die ausschließlich Anteile der Ektodomäne umfassen, weisen Diskrepanzen auf. Für ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Werte zwischen,

rekombinanten Kollagen XVII-Polypeptiden mit und ohne intrazellulären und transmembranen Anteil sind daher weitergehende Untersuchungen nötig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Kollagen XVII ist ein kollagenes Transmembran-Protein und eine strukturelle Komponente der Hemidesmosomen im dermo-epidermalen Ankerkomplex. Verschiedene Studien konnten zeigen, daß es eine globuläre, zytosolische, aminoternale Domäne, eine Transmembran-Region und einen flexible, extrazelluläre, carboxyterminale Domäne besitzt. Der extrazelluläre Anteil von Kollagen XVII kann durch ADAMs-vermitteltes Shedding auch von der Zelloberfläche freigesetzt werden.

Kollagen XVII spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen erworbenen und angeborenen bullösen Erkrankungen, die durch ein Ablösen der Epidermis von der unterliegenden Basalmembran charakterisiert sind.

Kollagen XVII ist auch ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran und als Interaktionspartner für hemidesmosomale und extrazelluläre Matrixproteine wie Integrin $\alpha 6\beta 4$ und Laminin 5 bekannt.

Um die Frage zu untersuchen, welche Regionen von Kollagen XVII für die Bindung zuständig sind und welcher Bindungsmechanismus vorliegt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Konstrukte mit den für die Bindung interessanten Regionen (Coiled-Coil-Region/NC16a, C15 und das G-terminale Ende) entworfen. Die Konstrukte wurden so gewählt, daß damit auch Untersuchungen zu einer möglichen Signaltransduktion durchgeführt werden können.

Im Bereich der ersten nichtkollagenen Domäne NC16a befinden sich zwei Coiled-Coil-Strukturen, für die eine essentielle Rolle bei der Tripelhelixbildung angenommen wird. Mit den entworfenen Fragmenten von Kollagen XVII wurde auch die Bedeutung der Coiled-Coil-Domänen für die Oligomerisierung von Einzelketten ohne tripelhelikale Strukturen untersucht.

Für diese Fragestellungen wurden erstmals rekombinante Fragmente entworfen, die sowohl einen großen Anteil der Ektodomäne als auch die Transmembranregion und einen intrazellulären Bereich enthalten.

Die für die Herstellung dieser Fragmente benötigten Expressionsplasmide wurden konstruiert und in Säugerzellen transfiziert. Nach der Expression der rekombinanten Polypeptide ins Zellkulturmedium und deren Aufreinigung aus dem konditionierten Medium wurden die Proteine mit biophysikalischen (CD-Spektroskopie), biochemischen (Trypsin-vermittelter Proteinabbau) und ultrastrukturellen Methoden (Elektronenmikroskopie nach Rotations-Schrägbedampfung) charakterisiert.

Dabei konnte gezeigt werden, daß sich alle konstruierten Fragmente mit intrazellulärem, transmembranem und extrazellulärem Anteil rekombinant herstellen lassen.

Bei den beiden Fragmente rColXVII-ed und -VL, die die größte kollagene Domäne C15 enthalten, konnte mittels Trypsin-Verdau und CD-Spektroskopie wie erwartet eine tripelhelikale Konformation nachgewiesen werden.

Für die beiden Fragmente rColXVII-F und fd, die keine bzw. nur fünf sehr kurze kollagene Domänen besitzen, konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie gezeigt werden, daß keine Tripelhelices vorliegen. Jedoch deuten die Ergebnisse des Trypsin-Verdau bei beiden Konstrukten auf eine Oligomerisierung von Einzelketten hin.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Rotations-Schrägbedampfung der Moleküle konnte diese Vermutung bestätigt und gezeigt werden, daß Kollagen XVII ohne tripelhelikale Struktur, aber mit den Coiled-Coil-Regionen, oligomerisiert

Daneben wurden die verwendeten 293-EBNA-Zellen mit den rekombinanten Transmembranproteinen auch auf ihre mögliche Verwendung in Zellbindungsassays untersucht. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen konnte gezeigt werden, daß diese Zellen die für die Studien interessanten Proteine nicht endogen exprimieren und somit das verwendete 293-EBNA-Zellsystem für die Bindungsstudien verwendet werden kann.

Damit wurden die Grundlagen für Bindungsstudien gelegt werden, die dazu beitragen, Auskunft über den Bindungsmechanismus und die räumliche Identifizierung der verantwortlichen Regionen sowie über die Signaltransduktion von Kollagen XVII zu erhalten.

6 ANHANG

6.1 Zirkulardichroismus

Ein wichtiges Merkmal vieler Biopolymere ist die Existenz von helikaler Sekundärstruktur, z.B. α -Helices von Polypeptiden und Proteinen, Einzel-, Doppel- und Tripelhelices von Polynukleotiden oder die helikalen Konformationen von einigen Polysacchariden. Die Detektion solcher Strukturen in Biopolymeren, die quantitativen Messungen dieser Strukturen und der Strukturänderungen spielen eine wichtige Rolle in unserem Verständnis der Funktion dieser Moleküle.

Proteine und Polypeptide besitzen eine genau definierte Konformation, die untrennbar an ihre biologische Funktion geknüpft ist. Molekülketten können zu α -Helices oder β -Faltblattstrukturen (Sekundärstruktur) angeordnet sein, die wiederum in bestimmter Weise gefaltet oder mit anderen verdrillt sein können (Tertiärstruktur).

Konformationsänderungen der nativen Verbindungen (Denaturierung) durch Helix-Knäuel-Umwandlung lassen Rückschlüsse auf die Art und Stärke der verschiedenen zwischenmolekularen Wechselwirkung zu.

Um helikale Strukturen zu untersuchen, ist eine physikalische Eigenschaft nötig, die explizit von der Asymmetrie der Struktur gelöster Moleküle abhängt. Diese Eigenschaft wird durch die Antwort der Moleküle auf polarisiertes Licht geliefert.

Die Denaturierung kann thermisch durch das Erhitzen der zu untersuchenden Probe ausgelöst werden, aber auch durch pH-Änderungen oder Elektrolyte.

Um die Umwandlung spektroskopisch verfolgen zu können, nutzt man die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (circular dichroism, CD), deren Grundlagen im folgenden näher erläutert werden.

6.1.1 Polarisation von Licht

Licht ist eine elektromagnetische, transversale Welle, die durch die Amplitude und die Orientierung ihrer Komponenten elektrisches und magnetisches Feld charakterisiert ist.

Wie in **Abb. 6.1** gezeigt wird, stehen der elektrische (\vec{E} oder **E**) und magnetische (\vec{H} oder **H**) Feldvektor immer senkrecht zueinander und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung.

Aufgrund seines transversalen Charakters läßt sich Licht polarisieren. Als Polarisationsrichtung einer Lichtwelle bezeichnet man meistens die Schwingungsrichtung des elektrischen Feldvektors.

In dem Licht, das die Sonne oder eine thermische Quelle (glühender Körper) aussendet, sind alle Polarisationsrichtungen gleichmäßig und ungeordnet vertreten. Der Emissionstakt eines einzelnen Atoms ergibt zwar im allgemeinen polarisiertes Licht, da

aber der Temperaturstrahler mehratomig ist, überlagern sich sehr viele solcher Einzeltakte in völlig ungeordneter Weise. Dieses Licht ist unpolarisiert, d.h. keine Schwingungsrichtung ist bevorzugt. Man spricht von natürlichem Licht.

Durch den Einsatz verschiedener optischer Geräte kann von einem unpolarisierten Lichtstrahl eine Strahlung separiert werden, die eine bestimmte Polarisationscharakteristik aufweist.

Findet die Schwingung in nur einer bestimmten Ebene statt, so spricht man von einer **linear polarisierten Welle**. Dies ist der einfachste Fall der Polarisation (**Abb. 6.1**). Hierbei verläuft die Ausbreitungsrichtung entlang der x -Achse, der elektrische Vektor zeigt in Richtung der z -Achse und der magnetische Vektor in Richtung der y -Achse.

Gemessen an einem bestimmten Punkt im Raum schwingen die Feldvektoren (**E** und **H**) mit einer Frequenz ν (1/sec).

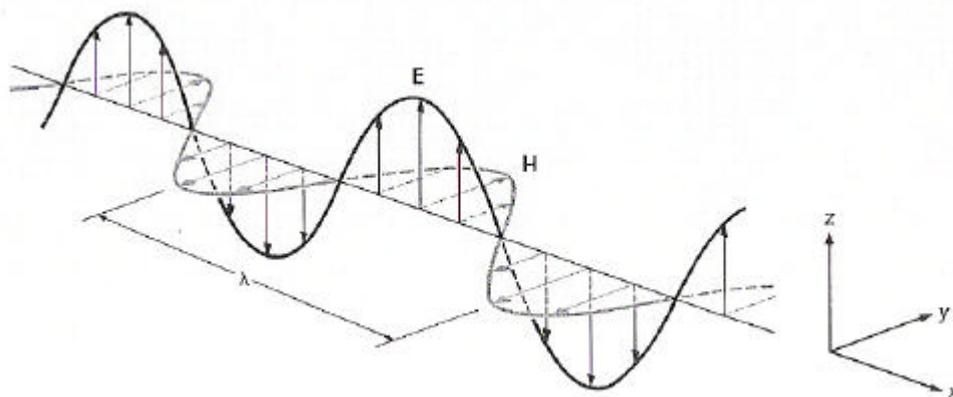


Abb. 6.1: Linear polarisiertes Licht

Der elektrische und der magnetische Feldvektor stehen immer senkrecht zueinander und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Die Schwingung findet bei linear polarisiertem Licht in nur einer bestimmten Ebene statt. Hierbei verläuft die Ausbreitungsrichtung entlang der x -Achse, der elektrische Vektor (**E**) zeigt in Richtung der z -Achse und der magnetische Vektor (**H**) in Richtung der y -Achse.

λ : Wellenlänge

Eine linear polarisierte Welle lässt sich auch als Überlagerung zweier linear polarisierter Wellen mit senkrecht zueinander stehenden Feldvektoren ($\mathbf{E}_L \perp \mathbf{E}_R$) und ohne Phasendifferenz Δj darstellen. Diese beiden Polarisierungen bilden eine Basis für die Darstellung einer beliebigen Linearpolarisation. Die Amplitude der resultierenden Vektorsumme der beiden Amplituden \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R , ihr Betrag und ihre Richtung hängen von der relativen Größe von \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R ab.

Eine weitere Art von Polarisation entsteht, wenn die Wellen \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R mit einer Phasenverschiebung von $\Delta\mathbf{j} = \mathbf{I}/4$ überlagert werden. Die Amplitude dreht sich um die Ausbreitungsachse einmal pro Schwingung, ihr Betrag bleibt konstant. Diese Polarisation nennt man **zirkulare Polarisation** (Abb. 6.2).

An jedem Punkt auf der x-Achse kann der elektrische Vektor als rotierend in einer Ebene senkrecht zu dieser Achse mit ν Rotationen/sec dargestellt werden. Die Wellenlänge λ korrespondiert mit einer kompletten Umdrehung. Die Bewegung eines Punktes des Feldvektors beschreibt einen helikalen Weg mit einer Ausbreitungsgeschwindigkeit $c = \mathbf{I}n$ in z-Richtung.

Je nach Drehsinn (entsprechend $\Delta\mathbf{j} = +\mathbf{I}/4$ oder $-\mathbf{I}/4$) wird eine zirkular polarisierte Welle als rechtszirkular- (RZP) oder linkszirkular polarisiert (LZP) bezeichnet.

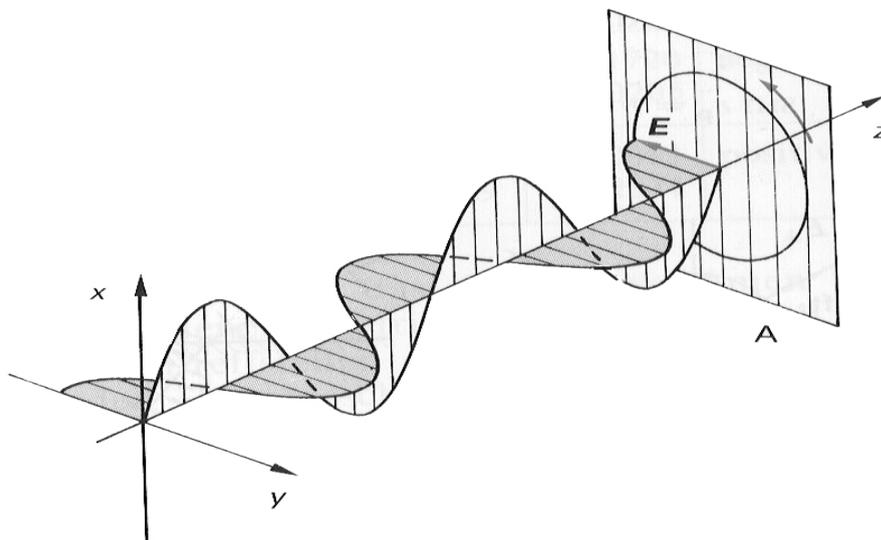


Abb. 6.2: Zirkular polarisiertes Licht

Zwei linear polarisierte Wellen \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R mit ihren Feldvektoren senkrecht zueinander, besitzen eine relative Phasenverschiebung von $\Delta\mathbf{j} = -\mathbf{I}/4$. Der resultierende elektrische Feldvektor \mathbf{E} dreht sich nach links während der Wellenausbreitung (abgebildet in Ebene A), d.h. im Sinne einer Linksschraube.

Überlagert man rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht gleicher Amplitude ($\Delta\mathbf{j} = +\mathbf{I}/4$ und $-\mathbf{I}/4$), so entsteht wieder eine linear polarisierte Welle, deren Polarisationsebene von der Phasendifferenz der beiden überlagerten Wellen abhängt (der Winkel Θ des \mathbf{E} -Feldvektors zur x-Achse ist gegeben durch $\Theta = \Delta\mathbf{j}/2$). Das heißt, daß linear polarisiertes Licht als Summe von zwei zirkular polarisierten Komponenten angesehen werden kann.

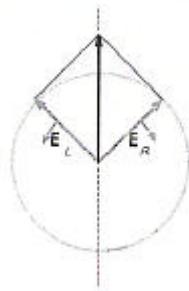


Abb. 6.3: Linear polarisiertes Licht als Summe zweier zirkular polarisierter Komponenten gleicher Amplitude

Der Blick ist direkt auf die Quelle gerichtet. Die Vektorsumme der zwei Feldkomponenten oszilliert entlang der gestrichelten Linie, wenn \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R rotieren.

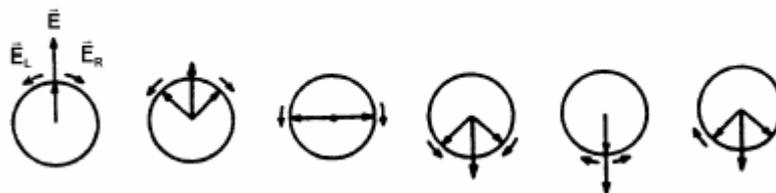


Abb. 6.4: Überlagerung eines links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls

Linear polarisiertes Licht lässt sich auch als eine Überlagerung von einem rechts- und einem linkszirkular polarisierten Lichtstrahl gleicher Wellenlänge und gleicher Intensität auffassen.

Wenn zwei zirkular polarisierte Komponenten ungleicher Amplitude kombiniert werden (**Abb. 6.5** und **Abb. 6.6**), ist das Ergebnis elliptisch polarisiertes Licht. Das wird sowohl von der Elliptizität (dem Verhältnis der Achsen der Ellipse) als auch der Richtung der Hauptachse charakterisiert.

Beträgt die Phase $0 < \Delta j < I / 4$, so dreht sich die Amplitude und ändert ihren Betrag gleichzeitig; dies wird als **elliptische Polarisation** bezeichnet.

Bei einer Annäherung an die Grenzen $\Delta j \cong 0$ oder $\Delta j \cong I / 4$ nähert sich die elliptische Polarisation wiederum der zirkularen bzw. linearen Polarisation.

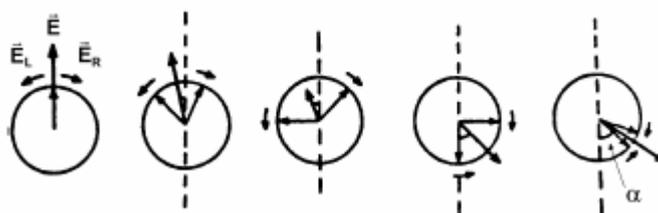


Abb. 6.5: Überlagerung eines links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls

Dargestellt sind Momentaufnahmen, alle zur selben Zeit, aber in größer werdenden Abständen zur Quelle



Abb. 6.6: Elliptisch polarisiertes Licht

Werden zwei zirkular polarisierte Komponenten ungleicher Amplitude kombiniert, so resultiert elliptisch polarisiertes Licht.

6.1.2 Optische Rotation und Zirkulardichroismus

Grundlage dieser Methode ist die Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiver Materie. Dabei können grundsätzlich zwei verschiedene, aber eng verwandte Effekte auftreten. Wird eine linear polarisierte Welle beim Durchlaufen des Mediums wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, spricht man von optischer Rotationsdispersion (ORD). Werden die beiden zirkular polarisierten Komponenten, aus denen eine linear polarisierte Welle zusammengesetzt ist, zusätzlich verschieden stark absorbiert, so liegt Zirkulardichroismus (CD) vor.

Die Voraussetzung für das Auftreten von ORD und CD ist die Chiralität des betreffenden Moleküls, d.h. es muß eine Asymmetrie in der Elektronenverteilung vorliegen. Dies kann durch die Struktur des Moleküls, aber auch durch seine räumliche Anordnung gegeben sein. Zusätzliche Bedingung für CD ist die Fähigkeit des Moleküls, Licht zu absorbieren.

Optische Rotationsdispersion (ORD)

Wenn linear polarisiertes Licht irgendeiner Wellenlänge eine optisch aktive Substanz passiert, rotiert die lineare Polarisation (**Abb. 6.7**). Der Winkel dieser Drehung (α) ist abhängig von der Natur der Substanz, der Dicke der Probe (d) und der Konzentration (c) der optisch aktiven Substanz in der Probe: $\alpha = [\alpha] d c$. $[\alpha]$ bezeichnet man als spezifische Rotation. Idealerweise ist sie nur abhängig von der Natur der optisch aktiven Substanz. Die Rotation der Polarisationssebene kann entweder in oder gegen die Uhrzeigerichtung stattfinden (Dextro- bzw. Levo-Orientierung). Die Beziehung zwischen Zirkulardichroismus und optischer Rotation ist analog der Beziehung zwischen Absorption und Refraktion von unpolarisiertem Licht.

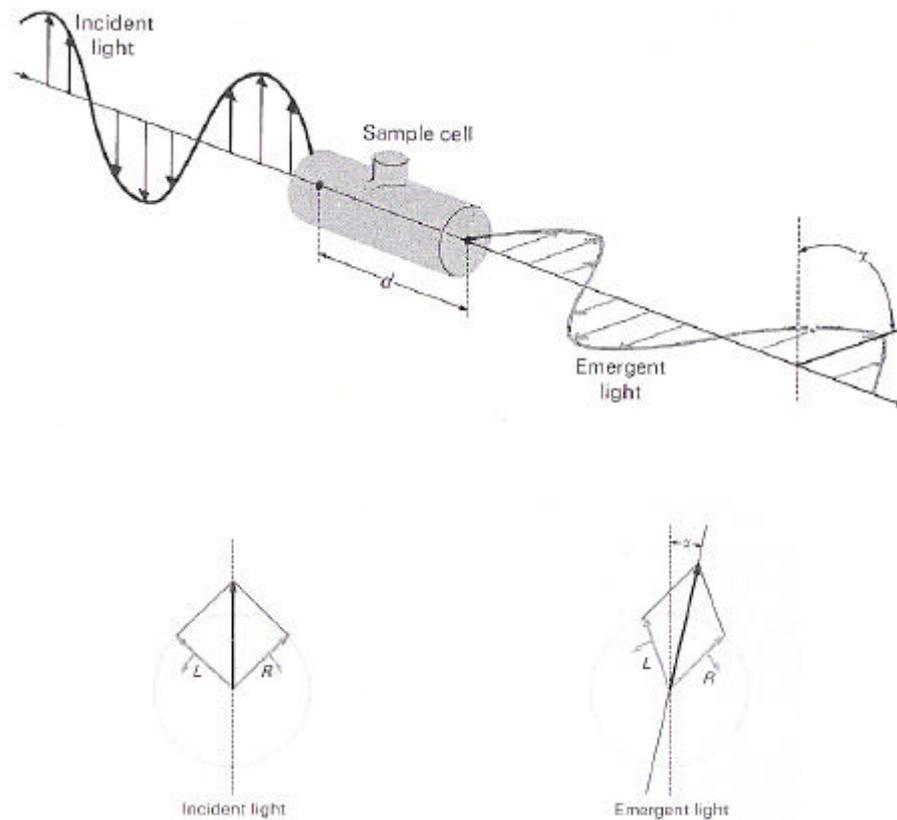


Abb. 6.7: Optische Rotation

Der einfallende Strahl ist linear polarisiert, der elektrische Vektor zeigt in Richtung der z-Achse. Auch das ausfallende Licht ist immer noch linear polarisiert, aber die Polarisationsebene ist um den Winkel α gedreht und die Lösung in der Probenzelle ist dextrorotierender Natur.

Zirkulardichroismus (CD)

Wenn zirkular polarisiertes Licht durch eine Lösung einer optisch aktiven Substanz fällt, ist die Absorptivität von der Händigkeit des Lichts abhängig. Im Bereich optisch aktiver Absorptionsbanden werden der links- und rechtszirkular polarisierte Strahl unterschiedlich stark absorbiert ($e_L \neq e_R$).

Man definiert den Zirkulardichroismus zu einer gegebenen Wellenlänge λ als $\Delta e = e_L - e_R$, die Differenz der Extinktionskoeffizienten für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht. Aus historischen Gründen verwendet man jedoch die Elliptizität. Zirkulardichroismus wird nur in Wellenlängenbereichen beobachtet, wo die Substanz das Licht absorbiert.

Man kann sich den Zusammenhang der beiden Größen veranschaulichen, wenn man sich das linear polarisierte Licht in zwei gegenläufigen zirkular polarisierten Wellen zerlegt vorstellt. Beim Durchtritt durch die Meßlösung wird die eine Welle stärker absorbiert als die andere. 'Addiert' man die beiden Wellen dann wieder, ist das Ergebnis nicht mehr linear sondern elliptisch polarisiertes Licht.

$$\text{Elliptizität } \Theta(I) = k (\mathbf{e}_R - \mathbf{e}_L) c d$$

mit $\mathbf{e}_R, \mathbf{e}_L$: Extinktionskoeffizienten, c: Konzentration, d: Schichtdicke, k: Konstante oder $\Theta = \arctan (b/a)$

mit b, a = kleine, große Achse der Ellipse.

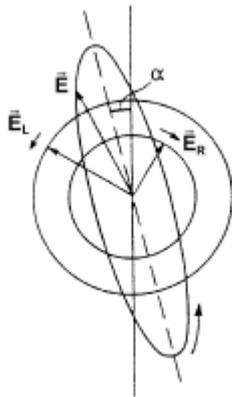


Abb. 6.8: Zirkulardichroismus

Beim Austritt aus der optisch aktiven Substanz sind die beiden Teilstrahlen unterschiedlich stark geschwächt, sodaß der Summenvektor eine Ellipse beschreibt, deren Hauptachse gegenüber der Ausgangsrichtung um den Winkel α geneigt ist.

Manche Substanzen haben verschiedene Lichtgeschwindigkeiten für rechts- und linkszirkular polarisierte Lichtkomponenten. Wenn linear polarisiertes Licht sie durchläuft, das aus der Überlagerung von rechts- und linkszirkular polarisierten Komponenten besteht, werden die beiden Komponenten relativ zueinander phasenverschoben, je nach Proben- dicke Δz . Dies produziert eine Drehung α der Polarisations- ebene proportional zu Δz :

$$\alpha = \Delta j / 2 = k (n_{LZP} - n_{RZP}) \Delta z / 2,$$

mit n: Brechungsindizes für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht, k: Konstante.

Bei Lösungen ist die Drehung auch proportional zur Konzentration c des optisch aktiven Stoffes. Die Proportionalitätskonstante ist die spezifische Drehung α_K , gemessen als Drehwinkel / Probendicke ($^\circ/\text{mm}$). Dieser Effekt beruht darauf, daß die optisch aktiven Substanzen eine Chiralität (Händigkeit) besitzen: ihre Polarisierbarkeit ist verschieden für rechts- und linkszirkular polarisierte Lichtwellen. Der Effekt ist wellenlängenabhängig und wird Zirkulardichroismus genannt.

6.1.3 CD-Spektrometer

Als Lichtquelle im CD-Spektrometer dient eine Xenon-Hochdrucklampe mit einem nachgeschalteten Monochromator. Der monochromatische Lichtstrahl fällt zunächst durch ein Polarisationsprisma (linear polarisiertes Licht), anschließend durch einen elektrooptischen Modulator, der abwechselnd die rechts- oder die linkszirkular polarisierte Komponente durchläßt, je nach Polung des elektrischen Feldes. Die beiden rechts- und linkszirkular polarisierten Lichtstrahlen laufen dann durch die Probe in einer Quarz-Küvette, die das Licht elliptisch polarisiert und werden dann in einem Photomultiplier als Detektor verarbeitet, der eine Spannung in direktem Verhältnis zur Elliptizität der Polarisation des in ihn eingestrahlenen Lichts erzeugt.

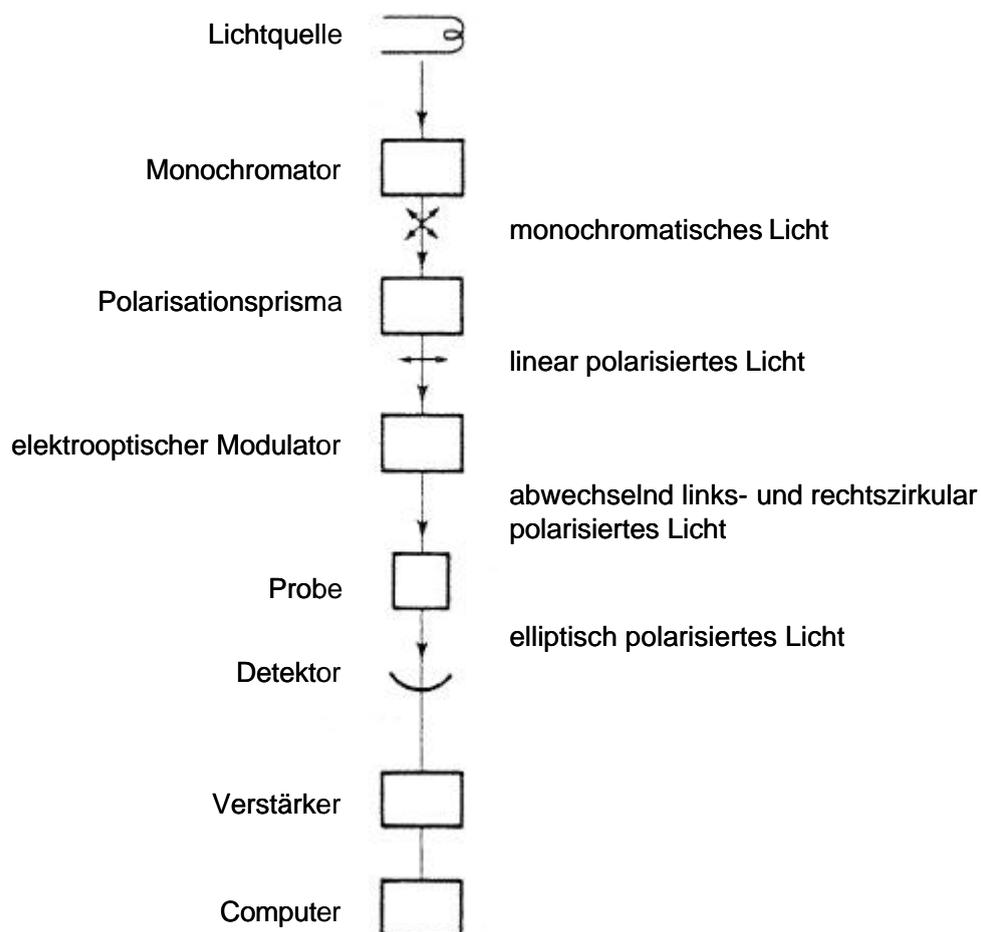


Abb. 6.9: CD-Spektrometer: Diagramm des optischen Systems

7 LITERATUR

- Adams JC und Watt FM** (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**, 1183-1198.
- Areida SK, Reinhardt DP, Müller PK, Fietzek PP, Köwitz J, Marinkovich MP, Notbohm H** (2001) Properties of the collagen type XVII ectodomain. Evidence for N- to C-terminal triple helix folding. *J Biol Chem* **276**, 1594-1601.
- Balding SD, Diaz LA, Giudice GJ** (1997) A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex. *Biochemistry* **36**, 8821-8830.
- Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, Giudice GJ** (1996) Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* **106**, 141-146.
- Becherer JD und Blobel CP** (2003) Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr Top Dev Biol* **54**, 101-123.
- Bedane C, McMillan JR, Balding SD, Bernard P, Prost C, Bonnetblanc JM, Diaz LA, Eady RA, Giudice GJ** (1997) Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol* **108**, 901-907.
- Bernard P, Prost C, Lecerf V, Intrator L, Combemale P, Bedane C, Roujeau JC, Revuz J, Bonnetblanc JM, Dubertret L** (1990) Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* **94**, 630-635.
- Bissell MJ und Barcellos-Hoff MH** (1987) The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *J Cell Sci Suppl* **8**, 327-343.
- Black RA und White JM** (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 654-659.
- Blumer KJ und Johnson GL** (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci* **19**, 236-240.
- Borradori L und Sonnenberg A** (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* **112**, 411-418.
- Borradori L, Koch PJ, Niessen CM, Erkeland S, van Leusden MR, Sonnenberg A** (1997) The localization of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmic domain and seems to be regulated by the beta4 integrin subunit. *J Cell Biol* **136**, 1333-1347.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brinckmann J** (2005) Collagens at a glance. *Top Curr Chem* **247**, 1-6.
- Bruckner P und Prockop DJ** (1981) Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen. *Anal Biochem* **110**, 360-368.
- Bruckner-Tuderman L und Bruckner P** (1998) Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders. *J Mol Med* **76**, 226-327.
- Bulleid NJ, John DC, Kadler KE** (2000) Recombinant expression systems for the production of collagen. *Biochem Soc Trans* **28**, 350-353.
- Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ, Wayner EA** (1990) Distinct functions for integrins alpha3 beta1 in focal adhesions and alpha6 beta4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol* **111**, 3141-3154.
- Charvat S, Le Griel C, Chignol MC, Schmitt D, Serres M.** (1999) Ras-transfection up-regulated HaCaT cell migration: inhibition by Marimastat. *Clin Exp Metastasis* **17**, 677-685.
- Chen C und Okayama H** (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-2752.
- Chen Y, Molloy SS, Thomas L, Gambie J, Bächinger HP, Ferguson B, Zonana J, Thomas G, Morris NP** (2001) Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7218-7223.

- Chopra A, Maitra B, Korman NJ** (1998) Decreased mRNA expression of several basement membrane components in basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **110**, 52-56.
- Christiano AM und Uitto J** (1996A) Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* **5**, 1-11.
- Christiano AM und Uitto J** (1996B) Molecular diagnosis of inherited skin diseases: the paradigm of dystrophic epidermolysis bullosa. *Adv Dermatol* **11**, 199-214.
- Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pita O, Owaribe K, Mastrogiacomo A, Sera F, Borradori L, Zambruno G.** (2004) Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol.* **122**, 103-110.
- Diaz LA, Ratrie H, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ** (1990) Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* **86**, 1088-1094.
- Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB** (1992) Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest* **90**, 1628-1633.
- Engel J und Bächinger HP** (2005) Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top Curr Chem* **247**, 7-23.
- Engel J und Kammerer RA** (2000) What are oligomerization domains good for? *Matrix Biol* **19**, 283-288.
- Fairley JA, Heintz PW, Neuburg M, Diaz LA, Giudice GJ** (1995) Expression pattern of the bullous pemphigoid-180 antigen in normal and neoplastic epithelia. *Br J Dermatol* **133**, 385-391.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, Heagerty A, Hintner H, Jonkman MF, McGrath J, McGuire J, Moshell A, Shimizu H, Tadani G, Uitto J** (2000) Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: report of the second international consensus meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* **42**, 1051-1066.
- Floeth M, Fiedorowicz J, Schäcke H, Hammami-Hausli N, Owaribe K, Trüeb RM, Bruckner-Tuderman L** (1998) Novel homozygous and compound heterozygous COL17A1 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **111**, 528-533.
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP** (1998) Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* **9**, 67-78.
- Franzke CW, Tasanen K, Borradori L, Huotari V, Bruckner-Tuderman L** (2004) Shedding of collagen XVII/BP180. Structural motifs influence cleavage from cell surface. *J Biol Chem* **279**, 24521-24529.
- Franzke CW, Tasanen K, Schäcke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee DC, Fahrenholz F, Bruckner-Tuderman L** (2002) Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J* **21**, 5026-5035.
- Franzke CW, Tasanen K, Schumann H, Brucker-Tuderman L** (2003) Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol* **22**, 299-309.
- Garrod DR** (1993) Desmosomes and Hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 230-240.
- Giancotti FG** (1996) Signal transduction by the alpha6beta4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci* **109**, 1165-1172.
- Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA** (1992) Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* **99**, 243-250.
- Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA** (1993) Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* **151**, 5742-5750.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-72.
- Green KJ und Jones JC** (1996) Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J* **10**, 871-881.
- Greenspan DS** (2005) Biosynthetic processing of collagen molecules. *Top Curr Chem* **247**, 149-183.

- Hägg P, Rehn M, Huhtala P, Väisänen T, Tamminen M, Pihlajaniemi T** (1998) Type XIII collagen is identified as a plasma membrane protein. *J Biol Chem* **273**, 15590-15597.
- Hashimoto I, Schnyder UW, Anton-Lamprecht I** (1976) Epidermolysis bullosa hereditaria with junctional blistering in an adult. *Dermatologica* **152**, 72-86.
- Hintner H und Wolff K** (1982) Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* **118**, 375-384.
- Hirako Y und Owaribe K** (1998) Hemidesmosomes and their unique transmembrane protein BP180. *Microsc Res Tech* **43**, 207-217.
- Hirako Y, Usukura J, Nishizawa Y, Owaribe K** (1996) Demonstration of the molecular shape of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J Biol Chem* **271**, 13739-13745.
- Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K** (1998) Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* **273**, 9711-9717.
- Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A** (1990) Cloning and sequence analysis of beta4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kD cytoplasmic domain. *EMBO J* **9**, 765-770.
- Hooper NM, Karran EH, Turner AJ** (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J* **321**, 265-279.
- Hopkinson SB und Jones JC** (2000) The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the Nterminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell* **11**, 277-286.
- Hopkinson SB, Baker SE, Jones JC** (1995) Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha6 integrin. *J Cell Biol* **130**, 117-125.
- Hopkinson SB, Findlay K, deHart GW, Jones JC** (1998) Interaction of BP180 (type XVII collagen) and alpha6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol* **111**, 1015-1022.
- Hopkinson SB, Riddelle KS, Jones JC** (1992) Cytoplasmic domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization. *J Invest Dermatol* **99**, 264-270.
- Hsu S, Ghohestani RF, Uitto J** (2000) Lichen planus pemphigoides with IgG autoantibodies to the 180 kD bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen). *J Am Acad Dermatol* **42**, 136-141.
- Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE** (1998) Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays* **20**, 488-494.
- Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM, Quaranta V** (1991) A function for the integrin alpha6beta4 in the hemidesmosome. *Cell Regul* **2**, 427-438.
- Jung EG** (2002) Dermatologie. 4. Auflage, Thieme-Verlag.
- Kammerer RA** (1997) Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains in extracellular proteins. *Matrix Biol* **15**, 555-568.
- Kirfel G, Herzog V** (2004) Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma* **223**, 67-78.
- Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M** (1999) Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by Pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**, 137-144.
- Kivirikko KI, Myllylä R, Pihlajaniemi T** (1992) In: Posttranslational modifications of proteins (Hrsg. Harding JJ und Crabbe MJC). CRC Press, 1-51.
- Klatte DH, Kurpakus MA, Grelling KA, Jones JC** (1989) Immunochemical characterization of three components of the hemidesmosome and their expression in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* **109**, 3377-3390.
- Kohlfeldt E, Maurer P, Vannahme C, Timpl R** (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* **414**, 557-561.
- Korge BP und Krieg T** (1996) The molecular basis for inherited bullous diseases. *J Mol Med* **74**, 59-70.
- Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A** (2003) Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* **116**, 387-399.

- Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA** (1986) Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* **136**, 1231-1235.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Latvanlehto A, Snellman A, Tu H, Pihlajaniemi T** (2003) Type XIII collagen and some other transmembrane collagens contain two separate coiled-coil motifs, which may function as independent oligomerization domains. *J Biol Chem* **278**, 37590-37599.
- Li K, Sawamura D, Giudice GJ, Diaz LA, Mattei MG, Chu ML, Uitto J** (1991) Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium. *J Biol Chem* **266**, 24064-24069.
- Li K, Tamai K, Tan EM, Uitto J** (1993) Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kilodalton bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene the 3'-untranslated region of the mRNA. *J Biol Chem* **268**, 8825-8834.
- Lupas A** (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-382.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J** (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Marinkovich MP** (1993) The molecular genetics of basement membrane disease. *Arch Dermatol* **129**, 1557-1565.
- Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, Hashimoto T** (1996) The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res* **288**, 507-509.
- Mazzorana M, Giry-Loziquez C, van der Rest M** (1995) Trimeric assembly of collagen XII: effect of deletion of the C-terminal part of the molecule. *Matrix Biol* **14**, 583-588.
- McAlinden A, Smith TA, Sandell LJ, Ficheux D, Parry DA, Hulmes DJ** (2003) Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains are almost ubiquitous in the collagen superfamily. *J Biol Chem* **278**, 42200-42207.
- McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, Li K, Owaribe K, McMillan JR, Eady RA, Uitto J** (1995) Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet* **11**, 83-86.
- McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H** (2003) Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* **31**, 169-177.
- Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, Yancey KB, Balding SD, Giudice GJ, Diaz LA, Nishikawa T, Kiyokawa C, Hashimoto T.** (1998) Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci* **17**, 39-44.
- Mutasim DF, Takahashi Y, Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Diaz LA** (1985) A pool of bullous pemphigoid antigen(s) is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J Invest Dermatol* **84**, 47-53.
- Nie Z und Hashimoto T** (1999) IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *J Invest Dermatol* **112**, 254-255.
- Niessen CM, van der Raaij-Helmer MH, Hulsman EH, van der Neut R, Jonkman MF, Sonnenberg A** (1996) Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci* **109**, 1695-1706.
- Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A** (1999) Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* **18**, 5-17.
- Nishizawa Y, Uematsu J, Owaribe K** (1993) HD4, a 180 kDa bullous pemphigoid antigen, is a major transmembrane glycoprotein of the hemidesmosome. *J Biochem* **113**, 493-501.
- Nonaka S, Ishiko A, Masunaga T, Akiyama M, Owaribe K, Shimizu H, Nishikawa T** (2000) The extracellular domain of BPAG2 has a loop structure in the carboxy terminal flexible tail in vivo. *J Invest Dermatol* **115**, 889-892.
- Nykvist P, Tasanen K, Viitasalo T, Käpylä J, Jokinen J, Brucker-Tuderman L, Heino J** (2001) The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. *J Biol Chem* **276**, 38673-38679.

- Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Käpylä J, Pihlajaniemi T, Heino J (2000)** Distinct recognition of collagen subtypes by alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. Alpha1beta1 mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem* **275**, 8255-8261.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995)** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423.
- Parikka M, Kainulainen T, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Salo T (2001)** Altered expression of collagen XVII in ameloblastomas and basal cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **30**, 589-595.
- Peltonen L, Palotie A, Hayashi T, Prockop DJ (1980)** Thermal stability of type I and type III procollagens from normal human fibroblasts and from a patient with osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 162-166.
- Perriard J, Jaunin F, Favre B, Büdinger L, Hertl M, Saurat JH, Borradori L (1999)** IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* **112**, 141-147.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998)** An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281-1284.
- Pihlajaniemi T und Rehn M (1995)** Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **50**, 225-262.
- Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM (2005)** Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clin Exp Dermatol* **30**, 682-687.
- Prockop DJ und Kivirikko KI (1995)** Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* **64**, 403-434.
- Pulkkinen L und Uitto J (1998)** Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the alpha6beta4 integrin and the 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Exp Dermatol* **7**, 46-64.
- Rezniczek GA, de Pereda JM, Reipert S, Wiche G (1998)** Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* **141**, 209-225.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F, Van der Rest M (2005)** The collagen superfamily. *Top Curr Chem* **247**, 35-84.
- Sawamura D, Li K, Chu ML, Uitto J (1991)** Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem* **266**, 17784-17790.
- Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman K, Nievers MG, Niessen CM, Steenbergen RD, Snijders PJ, Sonnenberg A (1998)** Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol* **142**, 271-284.
- Schäcke H, Schumann H, Hammami-Hausli N, Raghunath M, Brucker-Tuderman L (1998)** Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. *J Biol Chem* **273**, 25937-25943.
- Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999)** Anatomie. 8. Auflage, Springer-Verlag.
- Schlöndorff J und Blobel CP (1999)** Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112**, 3603-3617.
- Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D (2000)** Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **115**, 842-848.
- Schumann H, Hammami-Hausli N, Pulkkinen L, Mauviel A, Küster W, Lüthi U, Owaribe K, Uitto J, Bruckner-Tuderman L (1997)** Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* **60**, 1344-1353.

- Schumann J, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, Bruckner-Tuderman L** (2000) The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* **156**, 685-695.
- Snellman A, Tu H, Väisänen T, Kvist AP, Huhtala P, Pihlajaniemi T** (2000) A short sequence in the N-terminal region is required for the trimerization of type XIII collagen and is conserved in other collagenous transmembrane proteins. *EMBO J* **19**, 5051-5059.
- Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI** (1981) Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* **24**, 897-903.
- Stanley JR, Woodley DT, Katz SI** (1984) Identification and partial characterization of pemphigoid antigen extracted from normal human skin. *J Invest Dermatol* **82**, 108-111.
- Suzuki M, Harada S, Owaribe K, Yaoita H** (1996) Intracellular ionic changes induced by bullous pemphigoid IgG subclasses. *Autoimmunity* **23**, 181-197.
- Suzuki M, Murata S, Yaoita H, Nakagawa H** (2002) An antibody to BP 180 kDa antigen is able to induce an increase of intracellular Ca²⁺ concentration in DJM-1 (human squamous cell carcinoma) cells. *Autoimmunity* **35**, 271-276.
- Tamura RN, Rozzo C, Starr L, Chambers J, Reichardt LF, Cooper HM, Quaranta V** (1990) Epithelial integrin alpha6beta4: complete primary structure of alpha6 and variant forms of beta4. *J Cell Biol* **111**, 1593-1604.
- Tasanen K, Eble JA, Aumailley M, Schumann H, Baetge J, Tu H, Bruckner P, Brucker-Tuderman L** (2000A) Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J Biol Chem* **275**, 3093-3099.
- Tasanen K, Floeth M, Schumann H, Bruckner-Tuderman L** (2000B) Hemizygoty for a glycine substitution in collagen XVII: unfolding and degradation of the ectodomain. *J Invest Dermatol* **115**, 207-212.
- Tasanen K, Tunggal L, Chometon G, Bruckner-Tuderman L, Aumailley M** (2004) Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *Am J Pathol* **164**, 2027-2038.
- Tenner AJ** (1999) Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol* **11**, 34-41.
- Uitto J und Christiano AM** (1992) Molecular genetics of the cutaneous basement membrane zone. Perspectives on Epidermolysis bullosa and other blistering skin diseases. *J Clin Invest* **90**, 687-692.
- Uitto J und Pulkkinen L** (1996) Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Mol Biol Rep* **23**, 35-46.
- Uitto J und Richard G** (2004) Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **131C**, 61-74.
- Van den Bergh F und Giudice GJ** (2003) BP180 (type XVII collagen) and its role in cutaneous biology and disease. *Adv Dermatol* **19**, 37-71.
- Westgate GE, Weaver AC, Couchman JR** (1985) Bullous pemphigoid antigen localization suggests an intracellular association with hemidesmosomes. *J Invest Dermatol* **84**, 218-224.
- Wiche G** (1998) Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* **111**, 2477-2486.
- Yamada T, Endo R, Tsukagoshi K, Fujita S, Honda K, Kinoshita M, Hasebe T, Hirohashi S** (1996) Aberrant expression of a hemidesmosomal protein, bullous pemphigoid antigen 2, in human squamous cell carcinoma. *Lab Invest* **75**, 589-600.
- Yancey KB** (2005) The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *J Clin Invest* **115**, 825-828.
- Yang Y, Dowling J, Yu QC, Kouklis P, Cleveland DW, Fuchs E** (1996) An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**, 655-665.
- Zillikens D** (2002) BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. *Keio J Med* **51**, 21-28.
- Zillikens D und Giudice GJ** (1999) BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res* **291**, 187-194.
- Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM Jr, Diaz LA, Brucker-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ** (1999) Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16a domain of BP180. *J Invest Dermatol* **113**, 947-953.

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ (1997) Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* **109**, 573-579.

Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ (1998) The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol* **110**, 207-210.

8 ABBILDUNGEN

Abb. 1.1: Schematische Übersicht der Haut	1
Abb. 1.2: Zellen der Epidermis.....	2
Abb. 1.3: Schema der dermo-epidermalen Junktionszone	4
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Zell-Matrix-Kontakte	5
Abb. 1.5: Kollagen XVII.....	11
Abb. 1.6: Shedding von Zelloberflächen-Kollagenen	14
Abb. 1.7: Shedding von Kollagen XVII.....	16
Abb. 1.8: Bullöses Pemphigoid.....	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Bedampfungsanlage	47
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Rotations-Schrägbedampfung.....	47
Abb. 3.1: Der episomale Expressionsvektor pCEP-Pu mit BM40-Signalsequenz [Kohlfeldt et al. 1997]	51
Abb. 3.2: Schematische Übersicht der verwendeten rekombinanten Konstrukte des humanen Kollagen XVII	52
Abb. 3.3: Klonierung der Konstrukte ed und fd.....	54
Abb. 3.4: RT-PCR der transfizierten 293-EBNA-Zellen	58
Abb. 3.5: Nachweis der intrazellulären rekombinanten Proteine: Triton-Extrakte	60
Abb. 3.6: Nachweis der extrazellulären rekombinanten Proteine: TCA-Fällungen.....	60
Abb. 3.7: Immunfluoreszenz-Färbungen	62
Abb. 3.8: Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen von Keratinozyten gegen Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$ (Positivkontrolle).....	63
Abb. 3.9: Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen von untransfizierten und transfizierten (F und VL) 293-EBNA-Zellen gegen Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$	64
Abb. 3.10: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rColXVII-F	66
Abb. 3.11: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-F	67
Abb. 3.12: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rColXVII-fd	68
Abb. 3.13: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-fd.....	69
Abb. 3.14: rColXVII-ed-Fragmente.....	70
Abb. 3.15: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rColXVII-ed-Konzentrat	72
Abb. 3.16: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für das rColXVII-ed-Konzentrat	73
Abb. 3.17: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rColXVII-ed-Pellet.....	74
Abb. 3.18: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für das rColXVII-ed-Pellet	75

Abb. 3.19: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für rColXVII-ed.....	76
Abb. 3.20: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Gelfiltration für rColXVII-ed.....	77
Abb. 3.21: Einstellung optimaler Bedingungen für die Aufreinigung von rColXVII-VL.....	78
Abb. 3.22: Chromatogramm (oben), Ponceau-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) der Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) für das rColXVII-VL-Konzentrat.....	80
Abb. 3.23: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-ed.....	82
Abb. 3.24: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-VL.....	82
Abb. 3.25: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (oben) und Röntgenfilm (unten) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-F.....	83
Abb. 3.26: Ponceau S-Färbung des Western-Blot (links) und Röntgenfilm (rechts) des Trypsin-vermittelten Proteinabbaus von rColXVII-fd.....	83
Abb. 3.27: CD-Spektren für rColXVII-ed.....	85
Abb. 3.28: Schmelzkurve und differenzierte Schmelzkurve für rColXVII-ed.....	86
Abb. 3.29: CD-Spektren für rColXVII-VL.....	87
Abb. 3.30: Schmelzkurve und differenzierte Schmelzkurve für rColXVII-VL.....	88
Abb. 3.31: CD-Spektren für rColXVII-F.....	89
Abb. 3.32: CD-Spektren für rColXVII-fd.....	90
Abb. 3.33: Elektronenmikroskopische Bilder von ed nach Rotations-Schrägbedampfung.....	92
Abb. 3.34: Elektronenmikroskopische Bilder von VL nach Rotations-Schrägbedampfung.....	92
Abb. 3.35: Elektronenmikroskopische Bilder von fd nach Rotations-Schrägbedampfung.....	93
Abb. 3.36: Elektronenmikroskopische Bilder von F nach Rotations-Schrägbedampfung.....	93
Abb. 6.1: Linear polarisiertes Licht.....	112
Abb. 6.2: Zirkular polarisiertes Licht.....	113
Abb. 6.3: Linear polarisiertes Licht als Summe zweier zirkular polarisierter Komponenten gleicher Amplitude.....	114
Abb. 6.4: Überlagerung eines links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls.....	114
Abb. 6.5: Überlagerung eines links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls.....	114
Abb. 6.6: Elliptisch polarisiertes Licht.....	115
Abb. 6.7: Optische Rotation.....	116
Abb. 6.8: Zirkulardichroismus.....	117
Abb. 6.9: CD-Spektrometer: Diagramm des optischen Systems.....	118

9 TABELLEN

Tab. 1.1: Kollagene.....	7
Tab. 1.2: Formen der junktionalen Epidermolysis bullosa [aus Fine et al. 2000]	19
Tab. 2.1: Primerpaare mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen (s: sense, a: antisense)	22
Tab. 2.2: PCR-Programme	23
Tab. 2.3: Primerpaare	34
Tab. 2.4: PCR-Programme	34
Tab. 2.5: Verwendete Primär-Antikörper.....	35
Tab. 2.6: Verwendete Sekundär-Antikörper	35
Tab. 2.7: Dialysepuffer der verschiedenen Medien.....	37
Tab. 2.8: Säulen und Puffer für die FPLC	38
Tab. 2.9: Werte für $\epsilon(280)$ für die einzelnen Konstrukte	40
Tab. 2.10: Zusammensetzungen der SDS-Gele für die verschiedenen Konstrukte, 10 ml total	42
Tab. 2.11: Thermale Inkubationsgradienten der Trypsin-Verdaus	46
Tab. 2.12: Parameter für die Messungen der CD-Spektren und die Schmelzpunktbestimmungen (T_m -Werte).....	49
Tab. 3.1: Primerpaare mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen.....	53
Tab. 3.2: cDNA-Sequenzen der rekombinanten Kollagen XVII-Konstrukte im Bereich der Abspaltungsstelle (\downarrow) des Signalpeptids und die korrespondierende Aminosäuretranslation (aa)	55
Tab. 3.3: Molekulargewichte (MW) der rekombinanten Kollagen XVII-Fragmente.....	59
Tab. 4.1: Ergebnisse der Trypsin-Verdaus der Kollagen XVII-Fragmente	98
Tab. 4.2: Ergebnisse der CD-Analysen der Kollagen XVII-Fragmente	99
Tab. 4.3: Vergleich der gemessenen T_m -Werte mit der Literatur.....	100
Tab. 4.4: Korrelation von errechneten und gemessenen Längen der Kollagen XVII-Fragmente.....	102
Tab. 4.5: Ergebnisübersicht	104

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkolleg 288 der DFG ("Strukturen und Mediatoren der Zellinteraktion") am Institut für Medizinische Molekularbiologie der Universität zu Lübeck zwischen 2000 und 2004 angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. K. Müller und meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Notbohm, die mir die spannende Arbeit an Kollagen XVII ermöglicht haben.

Desweiteren möchte ich mich bei Gaby Baines und Dr. Dorothea Korte bedanken. Mein besonderer Dank gilt Karin Wiessmann für die Rotationsschrägbedampfung, die Elektronenmikroskopie und vielen hilfreichen Diskussionen beim Café au Lait.

Silke Heymann und Dr. Claudia Neumann möchte ich ebenfalls ein riesengroßes Dankeschön aussprechen. Von Euch habe ich die meisten meiner Methoden gelernt und viele fachliche Diskussionen führen können.

Ausserdem bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Bereitschaft, mich mit Methodik und Fachwissen zu unterstützen, und die gute Zusammenarbeit, die zum Gelingen dieser Arbeit ihren Teil beigetragen haben:

Julia, Katja, Martina, Barbara, Marius, Alexandra, Heiko, Tillman, Dieter, Jürgen R. und Jürgen B.

Nicht zu vergessen sind die Korrekturleserinnen und Korrekturleser: Dr. Claudia Neumann, Dr. Siegbert Günther, Dr. Maja Krützfeldt, Dr. Ulrike Römer, Hendrik Wessels, Alexander Mion, Alexandra Toran und Hartmut Römer-Vetter. Vielen Dank für Eure Hilfe bei der Formatierung, die kritischen Anmerkungen und die sachdienlichen Hinweise auf diesen oder jenen Tüppfehler!

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben.

Lübeck, Oktober 2006

Janine Korn

geb. am 01.05.1970 in Wolfsburg

Schul Ausbildung

08.1976 - 05.1989 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Wolfsburg
Allgemeine Hochschulreife im Mai 1989

Hochschulstudium

10.1989 - 03.1996 Studium der Physik an der Technischen Universität Braunschweig
Vertiefungsrichtung Technische Physik, Nebenfach Medizintechnik
Abschluß als Diplom-Physikerin, Note "gut"
Diplomarbeit in der Angewandten Physik: "Herstellung von Metalloxid-Schichten nach einem MOCVD-Verfahren bei Atmosphärendruck" (Institut für Oberflächentechnik und Plasmatechnische Werkstoffentwicklung der Technischen Universität Braunschweig, Prof. Dr. G. Wahl)

Berufliche Praxis und Weiterbildung

04.1996 - 04.1998 Weiterbildung zur Kardiotechnikerin (Perfusionistin),
Akademie für Kardiotechnik am Deutschen Herzzentrum Berlin

06.1998 - 07.1998 Gast-Kardiotechnikerin an der Klinik Hirslanden, Zürich, Schweiz

07.1998 - 04.2000 Kardiotechnikerin (Perfusionistin) in der Herzchirurgischen Poliklinik
des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Promotion

05.2000 - 06.2003 Stipendiatin des Graduiertenkollegs 288 der DFG ("Strukturen
und Mediatoren der Zellinteraktion", Projekt B7: Zell-Matrix-
Interaktion) am Institut für Medizinische Molekularbiologie der
Universität zu Lübeck (Prof. Dr. P. K. Müller)
Titel: "Expression und Charakterisierung rekombinanter
Fragmente von Kollagen XVII"

Berufliche Praxis

seit 09.2004 Clinical Research Associate bei i3 research | SKM Oncology,
Wiesbaden

Wiesbaden, 14.10.2006

Janine Korn