

# **Klonierung, Expression und Charakterisierung kryptischer Fibronectin-Proteinasen**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades an der Universität Bielefeld**

**vorgelegt von**

**Jörn Schnepel**

**aus Nettelstedt**

**Bielefeld**

**2000**

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Tschesche danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine gute Betreuung und die wertvollen Anregungen, die immer zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe BC I danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt :

- Dr. Jens Unger und Dr. André Oberpichler, sowie den Dipl. Chemikern/innen Lutz Schwettmann, Martin Roderfeld, Rainer Friebel und Aylin Mende für zahlreiche Anregungen und Diskussionen.
- Claudia Hübel, ohne sie wäre der Umfang der praktischen Arbeiten nicht möglich gewesen.
- Margot Müller und Rainer Beckmann für ihre Hilfestellung in bürokratischen und technischen Fragen.
- Dr. Martin Farr, Dr. J. Calvete und Dipl. Chem. Bernd Stratmann für die Bereitstellung der TIMP-Varianten.
- Dipl. Chem. Petra Dißmann für die Isolierung und Bereitstellung von Plasma-Fibronectin.
- den Diplomanden Karin Schlüter und Jörg Kintscher für hilfreiche Fragen und Ergebnisse im Rahmen ihrer Diplomarbeiten.
- Sabine Grabolle, Katharina Köster und Marc-Oliver Luther für die Protein-Sequenzierungen.
- Dr. F.E. Baralle für die Überlassung der Fibronectin cDNA-Konstrukte.
- Dr. Herbert Wenzel, Dipl. Chem. Martin Roderfeld, Dipl. Chem. Aylin Mende, Dipl. Chem. Lutz Schwettmann für die Bereitschaft, sich mit dem Manuskript dieser Arbeit auseinanderzusetzen.
- Prof. Dr. med. K. Kleesiek für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und bei Nicole für ihre moralische Unterstützung während der Erstellung meiner Doktorarbeit bedanken.

## Inhaltsverzeichnis

	<b><u>Danksagung</u></b>	
<b>1.</b>	<b><u>Abkürzungen</u></b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Allgemein</b>	<b>1</b>
1.2.	<b>DNA-Basen</b>	<b>2</b>
1.3.	<b>Aminosäuren</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>4</b>
<b>2.1.</b>	<b>Fibronektin</b>	<b>4</b>
2.1.1.	Struktur	5
2.1.2.	Funktion	6
<b>2.2.</b>	<b>Kryptische Fibronektin-Proteinasen</b>	<b>8</b>
2.2.1.	Fibronektinase	8
2.2.2.	Fibronektin-Typ IV-Kollagenase	10
2.2.3.	Fibronektin-Gelatinase und Fibronektin-Lamininase	12
2.2.4.	Fibronektin-Kollagenase	13
<b>2.3.</b>	<b>Extrazelluläre Matrix (ECM)</b>	<b>13</b>
<b>2.4.</b>	<b>Fibronektin in physiologischen und pathologischen Prozessen</b>	<b>15</b>
2.4.1.	Wundheilung	15
2.4.2.	Tumorbildung und Metastasierung	17
2.4.3.	Rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis	19
2.4.4.	Muskeldystrophie	20
<b>3.</b>	<b><u>Zielsetzung</u></b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b><u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u></b>	<b>24</b>
4.1.	<b>Klonierung der Fibronektin-Proteinasen</b>	<b>24</b>
4.2.	<b>Expression und Charakterisierung der Fibronektinase</b>	<b>25</b>
4.3.	<b>Expression und Charakterisierung der Fn-Typ IV-Kollagenase</b>	<b>26</b>
4.4.	<b>Expression und Charakterisierung der Fibronektin-Gelatinase</b>	<b>28</b>

---

<b>5.</b>	<b><u>Geräte und Materialien</u></b>	<b>29</b>
<b>5.1.</b>	<b>Geräte</b>	<b>29</b>
<b>5.2.</b>	<b>Materialien</b>	<b>30</b>
5.2.1.	Materialien für Säulenchromatographien	30
5.2.2.	Antikörper und Antikörperkonjugate	30
5.2.3.	Standards	30
5.2.4.	Proteine und Peptide	30
5.2.5.	Oligonukleotide	31
5.2.6.	DNA-modifizierende Enzyme	31
5.2.7.	Chemikalien	32
<b>5.3.</b>	<b>Sonstiges</b>	<b>32</b>
<b>5.4.</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>33</b>
5.4.1.	<i>Escherichia coli</i> [INV $\alpha$ F']	33
5.4.2.	<i>Escherichia coli</i> [JM83]	34
5.4.3.	<i>Escherichia coli</i> [HMS174(DE3)]	34
5.4.4.	<i>Escherichia coli</i> [BL21(DE3)]	34
<b>5.5.</b>	<b>Vektoren</b>	<b>35</b>
5.5.1.	pCR™2.1-Vektor und pCR™2.1-TOPO-Vektor	35
5.5.2.	pET-11a-Vektor	36
5.5.3.	pET-12b-Vektor	37
<b>6.</b>	<b><u>Methoden</u></b>	<b>38</b>
<b>6.1.</b>	<b>Gentechnische Methoden</b>	<b>38</b>
6.1.1.	Die Polymerase-Kettenreaktion	38
6.1.2.	<i>E. coli</i> Übernachtskulturen	39
6.1.3.	Tiefkühlkulturen	40
6.1.4.	Alkalische Mini-Lyse	41
6.1.5.	Plasmidisolierung nach „QIAprep™-Spin“	42
6.1.6.	Phenolextraktion	42
6.1.7.	Ethanol-fällung	43
6.1.8.	DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen	43
6.1.9.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	44
6.1.10.	TA-Klonierung	44
6.1.11.	Selektion von positiven Klonen	46
6.1.12.	Restriktion von DNA	46

---

6.1.13.	DNA-Sequenzierung	47
6.1.14.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	47
6.1.15.	Klonierung in Expressionsvektoren	48
<b>6.2.</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>50</b>
6.2.1.	Genexpression in <i>E. coli</i> -Zellen	50
6.2.2.	Expressionskontrolle	51
6.2.3.	Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „ <i>inclusion bodies</i> “	51
6.2.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
6.2.5.	Coomassie-Blue-Färbung	54
6.2.6.	Silberfärbung von PAA-Gelen	55
6.2.7.	Immobilisierung von Proteinen durch Elektrobloiting	56
6.2.8.	Mikrosequenzierung nach Edman	56
6.2.9.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	57
6.2.10.	Ionenaustauschchromatographie	58
6.2.11.	Gelfiltration	58
6.2.12.	„Reversed Phase“-HPLC	59
6.2.13.	<i>In vitro</i> -Faltung von rekombinanten Proteinen	59
6.2.14.	<i>In vitro</i> -Faltung durch das Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol	60
6.2.15.	Ultrafiltration	61
6.2.16.	Zymographie	61
6.2.17.	Proteolytische Spaltung von Proteinen	62
6.2.18.	Proteolytische Spaltung des Mca-Peptides	62
<b>7.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>63</b>
<b>7.1.</b>	<b>Klonierung der Fibronektinase-cDNA</b>	<b>63</b>
7.1.1.	PCR-Amplifizierung der Fibronektinase-cDNA	63
7.1.2.	TA-Klonierung des PCR-Amplifikates in den pCR™2.1-Vektor	64
7.1.3.	DNA-Sequenzierung des Fnase/pCR™2.1-Plasmids	65
7.1.4.	Klonierung der Fibronektinase-cDNA in Expressionsvektoren	65
<b>7.2.</b>	<b>Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronektinase</b>	<b>66</b>
7.2.1.	Expression von Fibronektinase in <i>E. coli</i>	66
7.2.2.	Identifizierung des Genproduktes durch N-terminale Sequenzierung	67
7.2.3.	Reinigung der rekombinanten Fibronektinase	68
7.2.4.	Immunologischer Nachweis der Fibronektinase	69

<b>7.3.</b>	<b>Faltung und Charakterisierung der rekombinanten Fibronectinase</b>	<b>70</b>
7.3.1.	Faltung von Fnase durch das Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol	70
7.3.2.	Charakterisierung der Substratspezifität	71
7.3.2.1.	Spaltung von Fibronectin	71
7.3.2.2.	Spaltung von Aktin und Myosin	73
<b>7.4.</b>	<b>Klonierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-cDNA</b>	<b>76</b>
7.4.1.	PCR-Amplifizierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-cDNA	76
7.4.2.	TA-Klonierung der PCR-Amplifikate in den pCR™2.1-Vektor	77
7.4.3.	DNA-Sequenzierung der FnColA/ - und FnColB/pCR™2.1-Plasmide	78
7.4.4.	Klonierung der Fn-Typ IV-Kollagenase-cDNAs in Expressionsvektoren	79
7.5.	Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronectin-Typ IV-Kollagenasen A und B	80
7.5.1.	Expression von FnColA und FnColB in <i>E. coli</i>	80
7.5.2.	Identifizierung der Genprodukte durch N-terminale Sequenzierung	82
7.5.3.	Reinigung der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B	82
7.5.4.	Immunologischer Nachweis von FnColA und FnColB	84
<b>7.6.</b>	<b>Faltung und Charakterisierung der Fibronectin-Typ IV- Kollagenasen A und B</b>	<b>84</b>
7.6.1.	Faltung von FnColA und FnColB durch das Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol	84
7.6.2.	Charakterisierung der Substratspezifität	85
7.6.2.1.	Spaltung von Gelatin	85
7.6.2.2.	Spaltung von Kollagenen	86
7.6.2.3.	Spaltung der Insulin B-Kette	89
7.6.2.4.	Weitere Spaltungsexperimente	90
7.6.2.5.	Inhibierung der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenase	90
<b>7.7.</b>	<b>Klonierung der Fibronectin-Gelatinase-cDNA</b>	<b>92</b>
7.7.1.	PCR-Amplifizierung der Fibronectinase-cDNAs	92
7.7.2.	TA-Klonierung der PCR-Amplifikate in den pCR™2.1-TOPO-Vektor	94
7.7.3.	DNA-Sequenzierung der pFnGel/pCR™2.1-TOPO- und cFnGel/pCR™2.1-TOPO-Plasmide	95
7.7.4.	Klonierung der Fibronectin-Gelatinase-cDNAs in Expressionsvektoren	95

---

<b>7.8.</b>	<b>Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronectin-Gelatinasen</b>	<b>97</b>
7.8.1.	Expression von pFnGel und cFnGel in <i>E. coli</i>	97
7.8.2.	Identifizierung der Genprodukte durch N-terminale Sequenzierung	98
7.8.3.	Reinigung der rekombinanten Fibronectin-Gelatinasen	99
7.8.4.	Immunologischer Nachweis von pFnGel und cFnGel	100
<b>7.9.</b>	<b>Faltung und Charakterisierung der rekombinanten Fibronectin-Gelatinasen</b>	<b>101</b>
7.9.1.	Faltung von pFnGel und cFnGel an Q-Sepharose	101
7.9.2.	Charakterisierung der Substratspezifität	101
7.9.2.1.	Spaltung von Gelatin und Plasma-Fibronectin	102
7.9.2.2.	Spaltung der Insulin B-Kette	103
<b>8.</b>	<b><u>Diskussion und Ausblick</u></b>	<b>104</b>
<b>8.1.</b>	<b>Fibronectinase</b>	<b>104</b>
8.1.1.	Etablierung eines Expressionssystems	105
8.1.2.	Charakterisierung der Fibronectinase	106
<b>8.2.</b>	<b>Fibronectin-Typ IV-Kollagenase</b>	<b>108</b>
8.2.1.	Etablierung eines Expressionssystems	109
8.2.2.	Charakterisierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase	110
<b>8.3.</b>	<b>Fibronectin-Gelatinase</b>	<b>114</b>
8.3.1.	Etablierung eines Expressionssystems	115
8.3.2.	Charakterisierung der Fibronectin-Gelatinase	116
<b>9.</b>	<b><u>Literatur</u></b>	<b>118</b>

## 1. Abkürzungen

### 1.1. Allgemein

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolphosphat
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	engl. „bovine serum albumin“
cDNA	copy-DNA
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. „desoxyribonucleinic acid“
DNP	2,4-Dinitrophenyl
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	engl. „extracellular matrix“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
HPLC	engl. „high performance liquid chromatography“
ib	engl. „inclusion body“
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	$\beta$ -Galactosidase-Gen
LB	Luria Broth
LMW	engl. „low molecular weight“



---

M	molar
Mca	7-(Methoxycumarin-4-yl)acetyl
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	engl. „messenger RNA“
NBT	engl. „nitro blue tetrazolium“
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. „polymerase chain reaction“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	engl. „ribonucleic acid“
<i>RP</i> -HPLC	engl. „reversed phase HPLC“
rpm	engl. „rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. „sodiumdodecylsulphate“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	engl. „tris buffered saline tween“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIMP	engl. „tissue inhibitor of metalloproteinases“
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UF	Ultrafiltration
ün	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid

### 1.2. DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

**1.3. Aminosäuren**

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## 2. Einleitung

### 2.1. Fibronektin

Als Fibronektin (Fn) bezeichnet man eine Familie von multifunktionellen makromolekularen Glykoproteinen, die sich sowohl strukturell als auch immunologisch sehr ähnlich sind. Fibronektin ist ein ubiquitäres Protein, welches auf vielen Zelloberflächen, in extrazellulären Flüssigkeiten, in Bindegeweben und auf Membranen vorkommt (Tab.1). Primär fungiert es als Adhäsionsmolekül. Fibronektin vermittelt vorrangig die Kopplung von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), an Fibrillen oder an andere Zellen. Außerdem werden Komponenten der ECM durch Fibronektin miteinander verknüpft. Der Name Fibronektin leitet sich von den lateinischen Wörtern *fibra* (Faser) und *nectere* (kleben) und somit von der Funktionalität der Proteinfamilie ab (Akiyama *et al.*, 1987; Mohri, 1996).

Zellen	Amnionzellen	Glioblasten	Myoblasten
	Chondrozyten	Hepatozyten	Osteoblasten
	Endothelzellen	Leukozyten	Schwann Zellen
	Epithelzellen	Mastzellen	Synovialzellen
	Fibroblasten	Melanozyten	Thrombozyten
Extrazellulär	Amnionflüssigkeit	Extrazelluläre Matrix	Sperma
	Blutplasma	Gehirnflüssigkeit	Synovialflüssigkeit

Tab.1 : Vorkommen von Fibronektin

Fibronektin wurde erstmals 1948 von Morrison *et al.* entdeckt. Sie fanden ein Protein in fibrinogenhaltigen Fraktionen des Blutplasmas, welches in der Kälte unlöslich und nicht durch Thrombin ausfällbar war, und nannten es C1g (cold insoluble globulin of plasma) (Morrison *et al.*, 1948). Erst Anfang der 70er Jahre erfolgten genauere Untersuchungen auf dem Gebiet der Zelloberflächenproteine. Dabei wurden diverse Proteine isoliert, die aufgrund ihrer Funktion als „cell adhesion factor“ (CAF), „cell surface protein“ (CSP), „large external transformation sensitive protein“ (LETS), „cell spreading factor“ (CSF),

„opsonic protein“ oder „antigelatin factor“ bezeichnet wurden (Mosesson *et al.*, 1980). Immunologische Untersuchungen ergaben, daß diese Zelloberflächenproteine und das von Morrison entdeckte Clg identische Eigenschaften besitzen und eng miteinander verwandt sind. Als Bezeichnung für diese Proteine etablierten Ruoslathi und Vaehri den Gruppennamen „Fibronektin“ (Rouslathi und Vaehri, 1975).

### 2.1.1. Struktur

Fibronektine sind Dimere bestehend aus zwei nahezu identischen Untereinheiten, die am C-Terminus durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb.1). Die Größe der Untereinheiten kann zwischen 230 kDa und 250 kDa variieren. Jede dieser Polypeptidketten besteht wiederum aus einzelnen dicht gefalteten Domänen, die weitgehend resistent gegenüber proteolytischen Enzymen sind und Bindungsaffinitäten zu Zellen oder Makromolekülen wie Kollagen, Heparin, Fibrin, Aktin, Integrinen oder DNA besitzen (Hynes, 1989; Potts und Campbell, 1994).

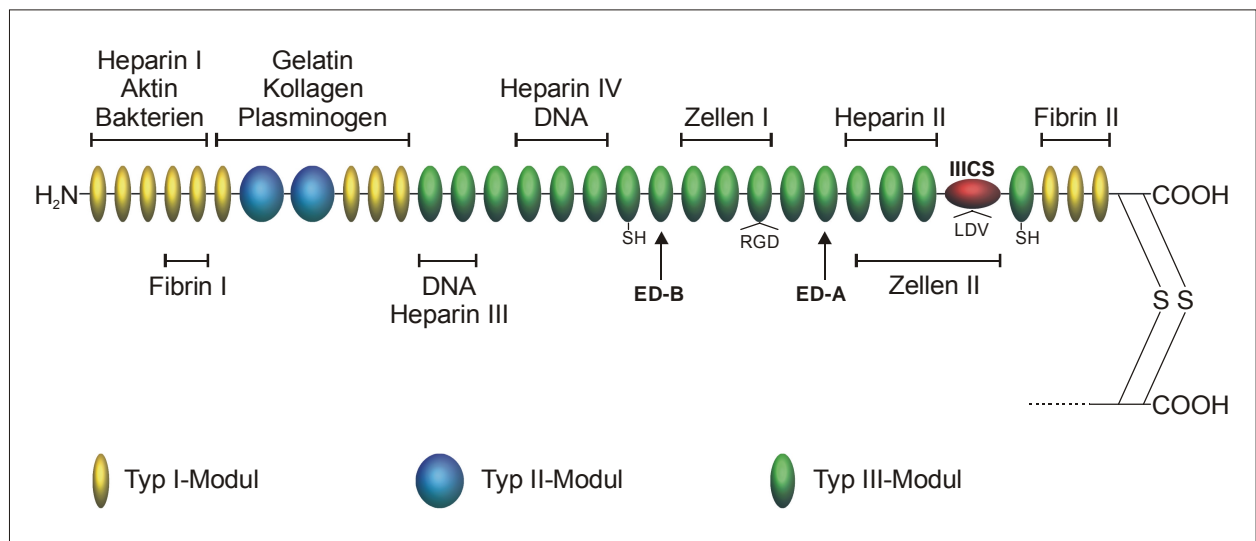


Abb.1 : Struktur und Bindungsdomänen des Fibronektin

Die Bindungsdomänen setzen sich aus drei Typen von Aminosäuresequenzen (I, II, III) zusammen. Es existieren 12 Typ I-Module, je 45 Aminosäuren groß, aufgeteilt in drei Gruppen. Benachbart liegen zwei Typ II-Module (60 AS) und 15-17 Typ III-Module, ca. 90 AS groß. Die Typ I- und Typ II-Module enthalten jeweils zwei Disulfidbrücken, welche in der Typ III-Sequenz fehlen. Außerdem enthält jede Polypeptidkette jeweils zwei freie Cystein-Reste. Jedes Modul wird durch ein eigenes Exon kodiert, dadurch sind die Sequenzen von Modulen gleichen Typs zwar ähnlich, aber keinesfalls immer identisch. So unterscheidet sich das Typ III-Modul in der ersten Zellbindungsdomäne von den restlichen Typ III-Abschnitten durch die Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD). Diese Sequenz ermöglicht die Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren (v.a.  $\beta_1$ -Integrine). Auch unter den Typ I- und Typ II-Abschnitten gibt es geringe Sequenzabweichungen, die für unterschiedliche Bindungsspezifitäten verantwortlich gemacht werden. Außerdem kann die Anzahl der einzelnen Modul-Typen von Untereinheit zu Untereinheit variieren (Kornblihtt *et al.*, 1985; Yamada, 1989).

### 2.1.2. Funktion

Fibronectin wird in zwei Isoformen, Plasma-Fibronectin (pFn) und Zelloberflächen-Fibronectin („cellular fibronectin“, cFn), unterteilt. Die immunologisch identischen Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich vorwiegend in drei Domänen : Extra-Domäne A (ED-A), Extra-Domäne B (ED-B) und „connecting segment“ IIICS (Abb.1). Die verschiedenen Formen des Fibronectins sind in einem Gen von etwa 70 Kilobasen Länge kodiert, das 50 Exons umfaßt. Im Primärtranskript des Gens sind die Exons noch durch nicht kodierende Introns getrennt. Je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium der Zelle werden während der Prozessierung die intervenierenden Sequenzen und nicht benötigten Exons herausgeschnitten und die Enden zur fertigen mRNA zusammengespleißt, die dann an den Ribosomen zum entsprechenden Fibronectin translatiert wird. Die Zellen besitzen somit die Möglichkeit gewebsspezifische Fibronectin-Moleküle zu synthetisieren (George *et al.*, 1993; Jarnagin *et al.*, 1994). Beim Menschen sind bis heute 20 verschiedene Fibronectin-mRNAs nachgewiesen worden (Owens *et al.*, 1986; Schwarzbauer *et al.*, 1987; MacLeod *et al.*, 1996).

Die Funktionen der verschiedenen Fibronektin-Arten beruhen zum großen Teil auf ihren Bindungseigenschaften. Das Zelloberflächen-Fibronektin wird vor allem von Fibroblasten, Epithelzellen, Chondrozyten und Myoblasten sezerniert und auf deren Zelloberfläche gebunden. Durch die Bindungsaffinität zu Makromolekülen der extrazellulären Matrix ist es somit maßgeblich an der Strukturbildung von Geweben beteiligt. Außerdem ist cFn in der Lage, durch intermolekulare Disulfidverbrückung lange Fibrillen auszubilden, an denen verschiedene Zellen eine Orientierung zur Migration finden. Diese Eigenschaft dient vor allem der Differenzierung von Geweben, wie z.B. bei der Embryogenese oder der Wundheilung (Brown *et al.*, 1993; Nিকেleit *et al.*, 1996). Anders als z.B. die Kollagene benötigt Fibronektin die Zelloberfläche mit ihren Rezeptoren (Integrinen) zur Ausbildung der Filamente (Wennerberg *et al.*, 1996). Plasma-Fibronektin, welches in löslicher Form im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten (Tab.1) zirkuliert, wird hauptsächlich von Hepatozyten, aber auch von Endothelzellen und Makrophagen sezerniert. Es ist beteiligt an der Blutgerinnung, der Wundheilung und der Phagozytose. Außerdem dient es als Opsonin für Gewebetrümmer und Bakterien. Eine besondere Aufgabe kommt dem pFn auch in der Embryogenese zu. So wurde durch Experimente an „knock-out“-Mäusen gezeigt, daß die Tiere mit einem inaktiven Fibronektin-Gen nicht lebensfähig sind (George *et al.*, 1993).

Alle beschriebenen physiologischen und pathologischen Funktionen des Fibronektins sind auf die vielseitigen Adhäsionseigenschaften zurückzuführen. Im Gegensatz dazu haben verschiedene Studien gezeigt, daß Fibronektin-Fragmente andere biologische Funktionen erfüllen können als das intakte Protein. So wurden definierte Fn-Fragmente gefunden, die die Transformation fördern oder das Wachstum von Endothelzellen inhibieren (De Petro *et al.*, 1983; Homandberg *et al.*, 1986). Andere Fn-Fragmente sind in der Lage die Expression von Kollagenase, Stromelysin, TIMP-1, Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  oder Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator zu erhöhen (Beezhold *et al.*, 1992; Tremble *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994; Bewsey *et al.*, 1996; Homandberg *et al.*, 1998). Zusätzlich wurden Fragmente entdeckt, die eine proteolytische Aktivität besitzen. In humanem Plasma-Fibronektin existieren vier latente Proteinasen : Fibronektinase (Serin-Proteinase), Fn-Typ IV-Kollagenase (Metalloproteinase), Fn-Gelatinase und Fn-Lamininase (Aspartatproteinase). Ferner wurde aus Zelloberflächen-Fibronektin eine weitere Metalloproteinase, die Fn-Kollagenase, isoliert.

## 2.2. Kryptische Fibronectin-Proteinasen

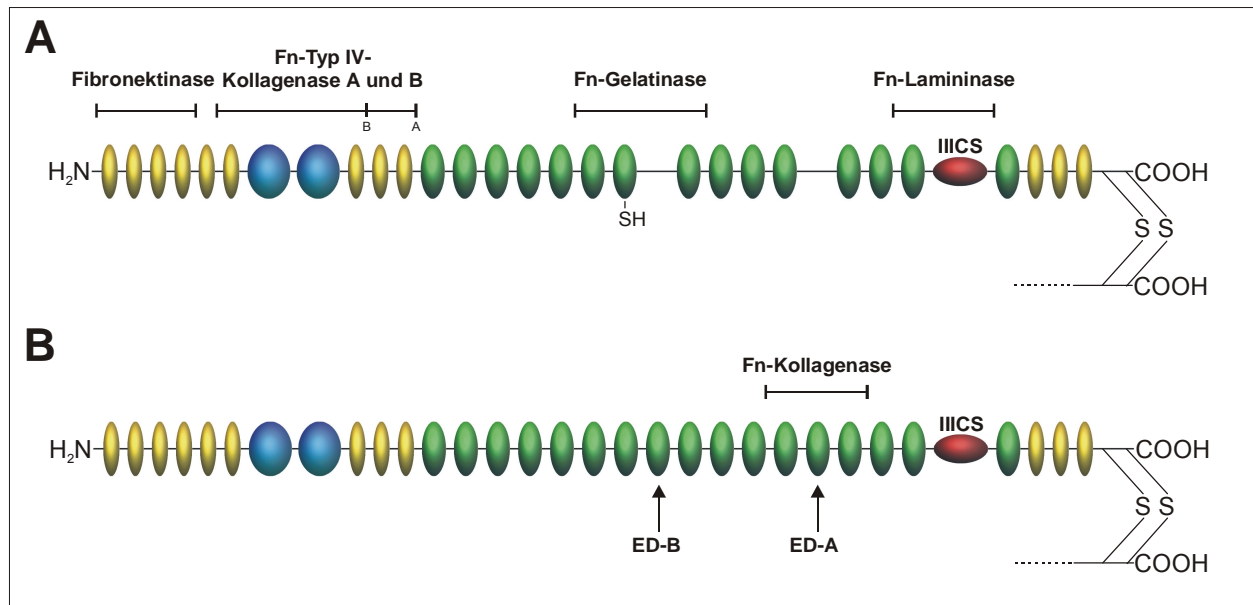


Abb.2 : Lage der kryptischen Fibronectin-Proteinasen A) Plasma-Fibronectin  
B) Zelloberflächen-Fibronectin

### 2.2.1. Fibronectinase

Die Fibronectinase (Fnase) ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Serin-Proteinase und wurde erstmals 1991 von Lambert Vidmar *et al.* beschrieben. Durch proteolytische Spaltung von humanem Plasma-Fibronectin mit Kathepsin D entsteht ein 70 kDa-Fragment, welches dem N-Terminus des Fibronectins mit der Heparin/Fibrin I- und der Kollagen-Bindungsdomäne entspricht. Durch Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unterliegt das 70 kDa-Fragment einer Autolyse, welche die Spaltung der Bindung  $\text{R}^{290}\text{-A}^{291}$  zur Folge hat. Es entstehen zwei Fragmente : ein 45 kDa-Fragment, welches der Kollagen-Bindungsdomäne entspricht und ein 27 kDa-Fragment, bestehend aus den ersten fünf N-terminalen Typ I-Modulen des Fibronectins. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unterliegt das gereinigte 27 kDa-Fragment weiteren Prozessierungsschritten. Zunächst entsteht durch Abspaltung des fünften Typ I-Moduls ein 23 kDa-Fragment. Anschließend erreicht das Protein durch Aufspaltung des „Finger-Loops“ im zweiten Typ I-Modul an der Bindung  $\text{K}^{116}\text{-D}^{117}$  eine aktive 22 kDa-Form (Abb. 3), die in der Lage ist Fibronectin und Fibronectin-Fragmente zu spalten (Lambert Vidmar *et al.*, 1991a).

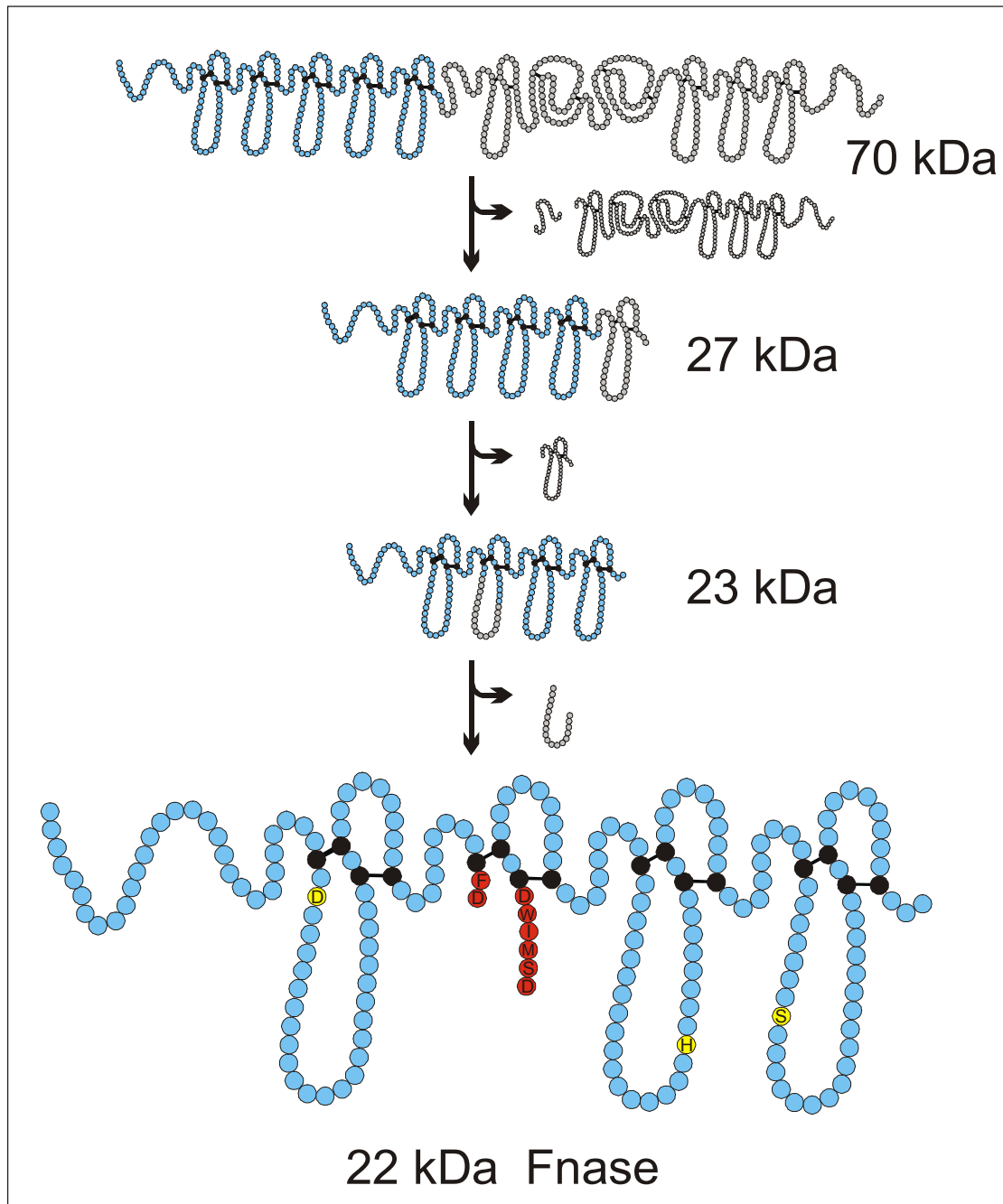


Abb.3 : Generierung und Aktivierung der Fibronektinase

Das aktive 22 kDa-Fragment besteht aus einer leichten 8 kDa-Kette, welche dem N-Terminus des Fibronektins entspricht, und einer schweren 14 kDa-Kette mit der N-terminalen Sequenz DSMIW ( $D^{117}$ - $W^{121}$ ). Die Öffnung des „Finger-Loops“ im zweiten Typ I-Modul bewirkt eine Flexibilität in der Tertiärstruktur, die die Formierung des katalytischen Zentrums ermöglicht. Die katalytische Triade wird dabei wahrscheinlich durch  $D^{54}$ ,  $H^{158}$  und  $S^{194}$  gebildet (Unger, 1998).



Die größte Sequenzhomologie zwischen der Fibronektinase und anderen Serinproteinasen wurde für die Subtilisin-ähnlichen Proteinasen gefunden. Zu dieser Familie gehören unter anderem die Prohormonkonvertasen, die Kexine und die Furine. Sie sind an der Aktivierung von Hormonen, Wachstumsfaktoren und anderen Proteinen beteiligt und spalten bevorzugt an Paaren von basischen Aminosäuren, wie Arg-Arg oder Lys-Arg (Barret, 1994; Siezen und Leunissen, 1997).

### 2.2.2. Fibronektin-Typ IV-Kollagenase

Die Fn-Typ IV-Kollagenase wird wie die Fibronektinase aus dem N-terminalen 70 kDa-Fragment des humanen Plasma-Fibronektins, welches durch Proteolyse mit Kathepsin D entstanden ist, generiert. Durch Inkubation bei 37°C in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entsteht ein 45 kDa-Fragment, welches der Kollagen-Bindungsdomäne von pFn entspricht. Durch Einwirkung von Fibronektinase wird C-terminal ein 5 kDa-Peptid abgespalten und es entsteht die aktive 40 kDa große Fibronektin-Typ IV-Kollagenase A (FnColA). Sie enthält die Typ I-Module 6-9 sowie die beiden Typ II-Module. Durch eine weitere Autoprozessierung in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird ein weiteres C-terminales Proteinfsegment (Typ I-Module 8 und 9) abgespalten und man erhält die 27 kDa große Fibronektin-Typ IV-Kollagenase B (FnColB) (Abb. 4). Beide aktiven Formen besitzen den gleichen N-Terminus, der dem N-Terminus der Kollagen-Bindungsdomäne von Plasma-Fibronektin entspricht ( $\text{V}^{293}\text{-Y-Q-P-Q-P-H}^{299}$ ).

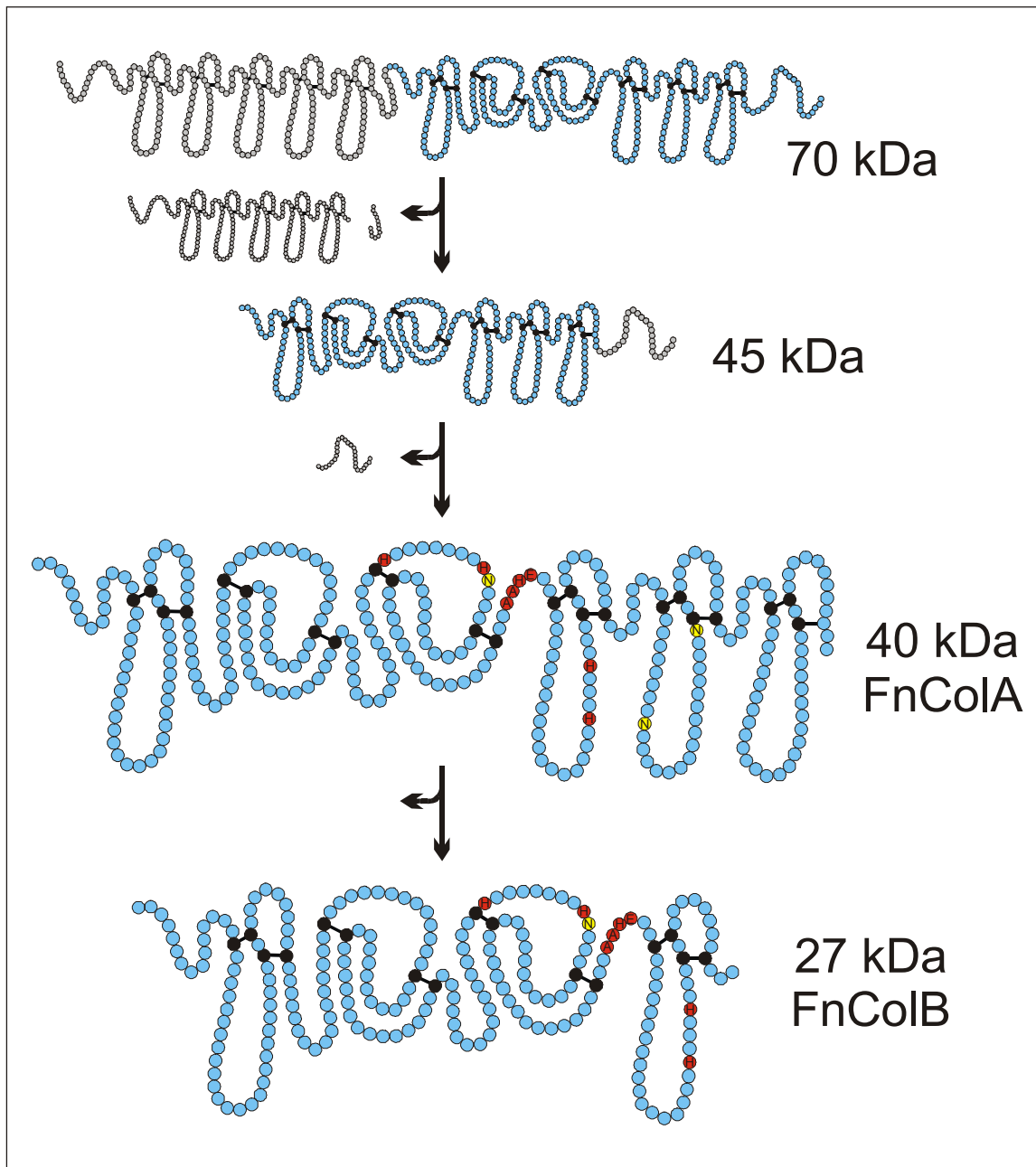


Abb.4 : Generierung und Aktivierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenasen A und B

Bei den Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B handelt es sich um Metalloproteinasen, die ihre größte Sequenzhomologie zu der Familie der Metzinkine, speziell zu den Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9), besitzen. Die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinasen ist homolog zu den Typ II-Modulen der Kollagen-Bindungsdomäne des Fibronectins. Die Sequenz des katalytischen Zentrums mit dem Zink-Bindungsmotiv der Metzinkine zeigt eine Homologie bei vier Aminosäuren, einschließlich des ersten Histidin-Restes (A<sup>464</sup>-A-H-E), zwischen dem zweiten Typ II-Modul und dem siebten Typ I-Modul des Fibronectins. Der zweite und dritte Histidin-Rest des Zink-Bindungsmotives

(HExxHxxGxxH) ist zwar nicht an den entsprechenden Stellen der Fibronectin-Sequenz vorhanden, es existieren jedoch in ihrer Nähe vier weitere Histidine ( $H^{421}$ ,  $H^{429}$ ,  $H^{488}$  und  $H^{492}$ ), die in die Koordination des Zink-Ions involviert sein können (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b; Schnepel und Tschesche, 2000).

### 2.2.3. Fibronectin-Gelatinase und Fibronectin-Lamininase

Humanes Plasma-Fibronectin enthält zwei weitere latente gelatinolytische Enzyme, die Fibronectin-Gelatinase (FnGel) und die Fibronectin-Lamininase (FnLam). Beide können aus dem gereinigten, durch Kathepsin D-Spaltung gewonnenen 190 kDa-Fragment des humanen pFn in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ -Ionen aktiviert werden. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von FnGel (35 kDa) und FnLam (25 kDa) ist bisher nicht geklärt (Planchenault *et al.*, 1990; Emod *et al.*, 1990). Eine weitere Möglichkeit die beiden Aspartatproteinasen zu generieren ist die Spaltung von Plasma-Fibronectin mit *Achromobacter*-Kollagenase. Im Gegensatz zu der Kathepsin D-Spaltung werden die aktiven Fragmente hier ohne zusätzlichen Aktivierungsschritt erhalten (Imhoff *et al.*, 1990).

Die Fn-Gelatinase ist in den Typ III-Modulen 6, 7 und 9 lokalisiert, die Fn-Lamininase umfaßt das Typ III-Modul 16 und das „connecting segment“ IIICS. Beide Enzyme spalten Fibronectin und denaturiertes Typ I-Kollagen, zusätzlich wird durch FnLam auch Laminin verdaut. Sequenzvergleiche ergaben für beide Proteinasen eine große Homologie zu den retroviralen Aspartatproteinasen mit der „active-site“-Sequenz DTG (FnGel :  $D^{1187}$ - $T^{1188}$ - $G^{1189}$ ; FnLam :  $D^{2029}$ - $T^{2030}$ - $G^{2031}$ ). Die retroviralen Proteinasen, die der Reifung viraler Proteine dienen, bilden zur Entwicklung ihrer Aktivität Dimere aus. Dadurch gelangen zwei Aspartat-Reste in räumliche Nähe und tragen so zur Bildung des katalytischen Zentrums bei. Wie diese Aspartatproteinasen werden auch die Fn-Gelatinase und die Fn-Lamininase durch Pepstatin A und  $\alpha_2$ -Makroglobulin gehemmt (Dunn, 1991; Katz und Skalka, 1994; Unger und Tschesche, 1999).

#### **2.2.4. Fibronektin-Kollagenase**

Die Fn-Kollagenase wurde 1996 von Boudjennah *et al.* aus Zelloberflächen-Fibronektin erhalten. Die Generierung erfolgt durch Spaltung von cFn mit Kathepsin B oder L. Dabei entstehen ein 90 kDa- und ein 110 kDa-Fragment, welche in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen autoproteolytisch weiter abgebaut werden. Durch diesen weiteren Zerfall werden drei proteolytisch aktive Fragmente (47, 43 und 37 kDa) generiert, die immunologisch identisch sind und die gleiche gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität aufweisen. Diese Fragmente sind in der zentralen Zell-Bindungsdomäne des Fibronektins lokalisiert und enthalten die Extra-Domäne A (ED-A), so daß sie nur aus Zelloberflächen-Fibronektin und nicht aus Plasma-Fibronektin isoliert werden können (Boudjennah *et al.*, 1996; Boudjennah *et al.*, 1998).

Bei der Fn-Kollagenase handelt es sich um eine Metalloproteinase. Als Zink-Bindungsmotiv kommt die Sequenz HHPEH ( $\text{H}^{1392}$ - $\text{H}^{1396}$ ) in Frage. Dieses inverse Motiv (HxxEH) ist charakteristisch für eine kleine Gruppe der Zink-Metalloproteinase, die Inverzinkine. Obwohl die Substrate einiger Mitglieder dieser Familie bekannt sind, gibt es über die Spaltungsspezifitäten noch keine genauen Aussagen (Hooper, 1994; Barret, 1995).

#### **2.3. Extrazelluläre Matrix (ECM)**

Viele Zellen in tierischen Organismen sind in Zellverbänden, den Geweben, organisiert. Sowohl die Entwicklung als auch die normale Funktionalität aller Zellen im lebenden Organismus hängt von den Wechselwirkungen von Molekülen mit ihrer Umgebung ab. Die Hauptklassen von Molekülen, die zelluläre Funktionen regulieren, sind Wachstumsfaktoren, Zell-Adhäsionsmoleküle und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Als ECM wird der Raum zwischen den Zellen bezeichnet, der von einem komplexen Makromolekülgeflecht ausgefüllt wird. Zusammen mit den Zellen stellt die ECM das organische Gewebe dar (Alberts *et al.*, 1989).

Die Hauptbestandteile der ECM werden in zwei Gruppen eingeteilt : Faserproteine und Proteoglykane. Die Proteoglykane sind hochmolekulare Aggregate mit einem Proteingerüst, welches durch Polysaccharidketten wie Keratin-, Dermatan-, Heparin- oder Chondroitinsulfat verknüpft ist. Sie sind für die physikalischen Eigenschaften

(Elastizität, Druckfestigkeit etc.) der verschiedenen Gewebe verantwortlich. Proteoglykane können Wasser binden und bilden so hydratisierte Gele, die die Metabolisierung wasserlöslicher Moleküle und die Wanderung von Zellen ermöglichen. Außerdem dienen sie als mechanische Stütze für das Gewebe.

Die Faserproteine werden nach ihrer Funktion in Strukturproteine und Adhäsionsproteine eingeteilt. Zu den Adhäsionsproteinen gehören u.a. Fibronectin und Laminin. Sie sind für die Bindung von Zellen mit Makromolekülen innerhalb der Matrix verantwortlich. Die Strukturproteine, wie z.B. Kollagene oder Elastin, tragen zur Stabilität der extrazellulären Matrix bei. Alle Kollagene besitzen Domänen, die die gleiche Konformation einer Tripel-Helix aufweisen. Diese Domänen bestehen aus drei Untereinheiten - den  $\alpha$ -Ketten - und beinhalten jeweils das wiederkehrende  $(G-X-Y)_n$ -Sequenz-Motiv. Die Tripel-Helix besteht aus drei linksdrehenden Helices, die eine rechtsdrehende Superhelix bilden (Vuorio *et al.*, 1990).

Durch unterschiedliche Zusammensetzung und Strukturierung der ECM-Komponenten kann die extrazelluläre Matrix stark in ihren physikalischen Eigenschaften variieren und so unterschiedliche Gewebe wie Blutgefäße, Sehnen, Knorpel oder Knochen ausbilden. An der Grenzfläche zum Epithel bildet die ECM eine widerstandsfähige Schicht, die Basalmembran, aus.

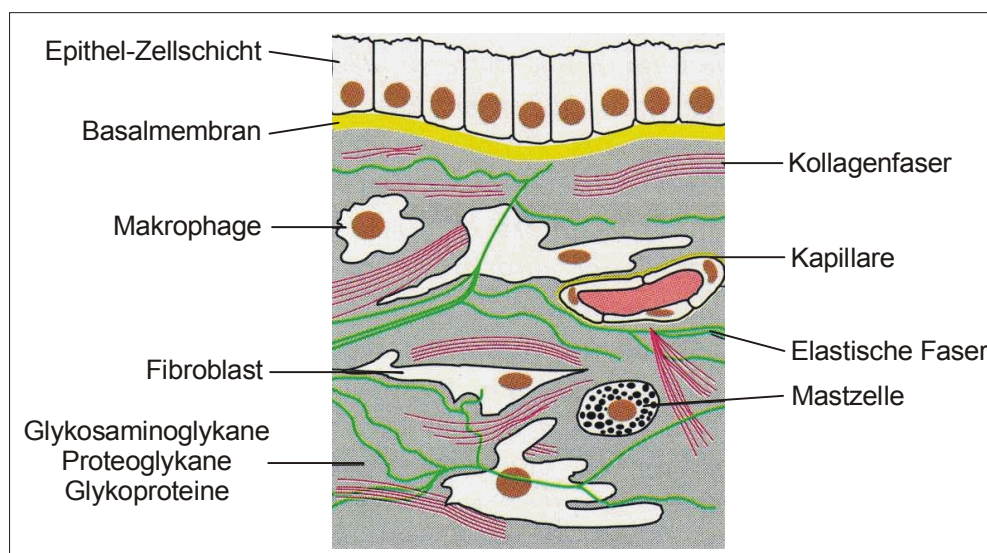


Abb.5 : Querschnitt der ECM (Alberts *et al.*, 1989)

Die ECM ist jedoch kein inertes, stabiles Gewebe. Zu ihrer Erhaltung ist ein fein reguliertes, dynamisches Gleichgewicht aus Matrixaufbau und Matrixabbau notwendig. Dieses dynamische Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle für die physiologischen Funktionen der extrazellulären Matrix und der in sie eingebetteten Zellen. Die an der Degradierung der ECM beteiligten Proteinase werden nach Art ihres katalytischen Zentrums in fünf Klassen eingeteilt : Serinproteinase, Cysteinproteinase, Aspartatproteinase, Threoninproteinase und Metalloproteinase. Vor allem die Matrix-Metalloproteinase (MMPs) spielen aufgrund ihrer breiten Substratspezifität eine wichtige Rolle beim Matrixabbau. Ihre Regulierung erfolgt einerseits durch ihre natürlichen Inhibitoren (TIMPs; tissue inhibitors of metalloproteinases), andererseits durch Aktivatorsysteme, wie z.B. das Plasmin/Plasminogen-Aktivatorsystem, welche die latenten Proteinase aktivieren. Auch bei pathologischen Prozessen kann das Gleichgewicht eine Rolle spielen. Unterliegt der Regulationsmechanismus einer Störung, so daß das Gleichgewicht in Richtung Matrixabbau verschoben wird, führt die gestörte Balance zwischen matrixabbauenden Proteinase und ihren Inhibitoren zu chronischen Veränderungen der ECM (z.B. rheumatoide Arthritis oder Osteoarthritis) (Docherty *et al.*, 1992).

## **2.4. Fibronektin in physiologischen und pathologischen Prozessen**

Fibronektine spielen in vielen physiologischen Prozessen eine große Rolle. Ein wichtiger Prozeß ist die Krebsentwicklung. So wird z.B. von bestimmten Tumorzellen kein Fibronektin mehr ausgeschüttet. Aber auch bei der Wundheilung, der Infektionsabwehr, der rheumatoiden Arthritis und der Osteoarthritis kommt dem Fibronektin große Bedeutung zu.

### **2.4.1. Wundheilung**

Essentiell für die Wundheilung ist die schnelle Reaktion des Organismus durch die Blutgerinnung. Um den Blutverlust nach einer Verletzung so gering wie möglich zu halten, ist es wichtig Defekte am Blutgefäßsystem möglichst schnell abzudichten. Die Wundheilung erfordert daher eine präzise Regulation der zeitlich abgestimmten

Freisetzung von Zelladhäsionsproteinen, Proteinasen und Wachstumsfaktoren. Fibronectin übernimmt dabei unterschiedliche Aufgaben.

Bei Auftreten einer Verletzung wird die Wunde zunächst binnen weniger Minuten durch einen Blutpfropfen, bestehend aus Fibrin, Thrombozyten, Granulozyten und Plasma-Fibronectin, verschlossen. Das Fibronectin wird dabei über das aminoternale Glutamin (Q<sup>3</sup>) durch den Faktor XIIIa mit der  $\alpha$ -Kette des Fibrins vernetzt. Die spezifischen Fibrin-Bindungsdomänen des pFn unterstützen die Bildung dieser Fibrin-Fibronectin-Fibrillen (Mosher *et al.*, 1979; Fesus *et al.*, 1986). Der temporäre Verschluss der Verletzung fördert auch den zweiten Schritt der Wundheilung, die Bildung neuen Granula-Gewebes. Durch die Fibrin-Fibronectin-Fibrillen wird die Migration von Leukozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen in das betroffene Gewebe reguliert. Fibronectin-Fragmente, welche die Zell-Bindungsdomäne enthalten, haben dabei eine haptotaktische und chemotaktische Wirkung auf die Zellen. Die Zellen bleiben dort am Blutgerinnsel haften und leiten die Bildung von neuem Gewebe ein. Der Abtransport von beschädigtem Gewebe erfolgt wiederum entlang der Fibrin-Fibronectin-Fibrillen (Grinnell, 1984; Colvin, 1989; Greiling und Clark, 1997). Bei der Ablagerung der neu gebildeten extrazellulären Matrix dient das Fibronectin als Gerüst für die Matrixkomponenten und ist zusätzlich an der Wundkontraktion und der Epithalisierung beteiligt (Clark und Colvin, 1985).

Fibronectin spielt, unabhängig von seiner Eigenschaft als Adhäsionsmolekül, auch eine Rolle bei der Immunantwort, indem es eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten zeigt (Norris *et al.*, 1982; Clark *et al.*, 1988). Fibronectin-Fragmente fungieren dagegen als Opsonine für Gewebetrümmer, die Kollagene, Fibrin, Aktin oder DNA enthalten, sowie für bestimmte Viren und Bakterien (Clark, 1990). Durch Fibronectin und Fibronectin-Fragmente wird außerdem die Sekretion von Zytokinen, wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , durch Monozyten und Makrophagen stimuliert. Sie wirken als Entzündungsmediatoren auf die Zellen des Immunsystems und regulieren so deren immunologische Aktivitäten, wie Phagozytose, Zytotoxizität, Proliferation und die Freisetzung von Proteinasen (Beezold und Lause, 1987; Beezold und Personius, 1992; Peat *et al.*, 1995; Takizawa *et al.*, 1995). Die Genexpression von MMPs wird ebenfalls durch Fibronectin-Fragmente in Fibroblasten und Chondrozyten induziert. Sie spielen eine große Rolle beim Auf- und Abbau der ECM und somit auch bei der Umwandlung von Granula-Gewebe in das ursprüngliche Gewebe, der dritten Stufe der Wundheilung (Tremble *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994; Huhtala *et al.*, 1995; Bewsey *et al.*, 1996).

### 2.4.2. Tumorbildung und Metastasierung

Der erste Schritt bei der Krebsentstehung ist die Bildung eines Primärtumors. Es ist bekannt, daß die Zellen eines Tumors von einer gemeinsamen „Ursprungszelle“ abstammen, die irgendwann - meist Jahrzehnte, bevor ein Tumor überhaupt sichtbar oder tastbar wird - erstmals vom kontrollierten Weg der Zellteilung abgekommen ist. Ferner ist bekannt, daß der Wandel zur Bösartigkeit dadurch zustande kommt, daß sich in einer solchen Zelle, genauer in einer Linie ihrer Nachkommenschaft, Mutationen anhäufen, die bestimmte Klassen von Genen betreffen: die Proto-Onkogene (Krebsgen-Vorläufer) und die Tumorsuppressorgene (tumorunterdrückende Gene). In ihrer normalen Form steuern sie den Lebenszyklus einer Zelle. Hierbei regulieren sie die verwickelte Abfolge von Vorgängen, durch die sich eine Zelle vergrößert und bei Bedarf teilt. Mutiert ein Proto-Onkogen in der Regulator- oder Strukturregion, wird zu viel von seinem wachstumsfördernden Protein synthetisiert oder dieses ist übermäßig aktiv. Das Proto-Onkogen ist dann zu einem krebsbegünstigenden Onkogen mutiert, welches die Zelle zu übermäßiger Zellteilung anregt. Demgegenüber können auch Tumorsuppressorgene zur Krebsentstehung beitragen, sie werden dabei durch Mutationen inaktiviert. Als Folge verliert die Zelle Tumorsuppressor-Proteine und damit entscheidene Wachstumsinhibitoren. Auf diese Weise wird den Zellen auch die Fähigkeit, auf wachstumshemmende Signale ihrer Nachbarzellen zu reagieren, entzogen. Beispielsweise vermag der Botenstoff TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) das Wachstum verschiedenartiger normaler Zellen zu unterbinden. Manche Dickdarmkarzinome sprechen jedoch nicht mehr darauf an, weil das Gen für den zuständigen Oberflächenrezeptor inaktiviert wurde (Weinberg, 1996).

Der zweite Schritt der Krebsentwicklung ist durch die Bildung von Sekundärtumoren gekennzeichnet. Zur Ausbildung dieser Metastasen müssen sich in weiteren Genen einer Tumorzelle Mutationen bilden. Bis eine sich vom Primärtumor absondernde Krebszelle an anderer Stelle eine Tochtergeschwulst bilden kann, hat sie mehrere natürliche Barrieren zu überwinden.

Sie muß zuerst umliegendes Gewebe durchbrechen und in eines der Blutgefäße eindringen, die als Kapillarnetz den ursprünglichen Tumor durchwachsen und ihn versorgen. Mit dem Blutstrom gelangt sie zunächst in eine Vene und bleibt schließlich, falls sie die dortige Turbulenz und den Angriff der Immunabwehr übersteht, in einem



anderen Kapillarnetz hängen. Dort muß sie wiederum in das umliegende Gewebe eindringen, sich verankern und sich teilen. Der Sekundärtumor induziert nun seinerseits die Ausbildung neuer Blutgefäße zu seiner Versorgung und kann so Ausgangspunkt neuer Metastasen werden (Crawford und Matrisian, 1994).

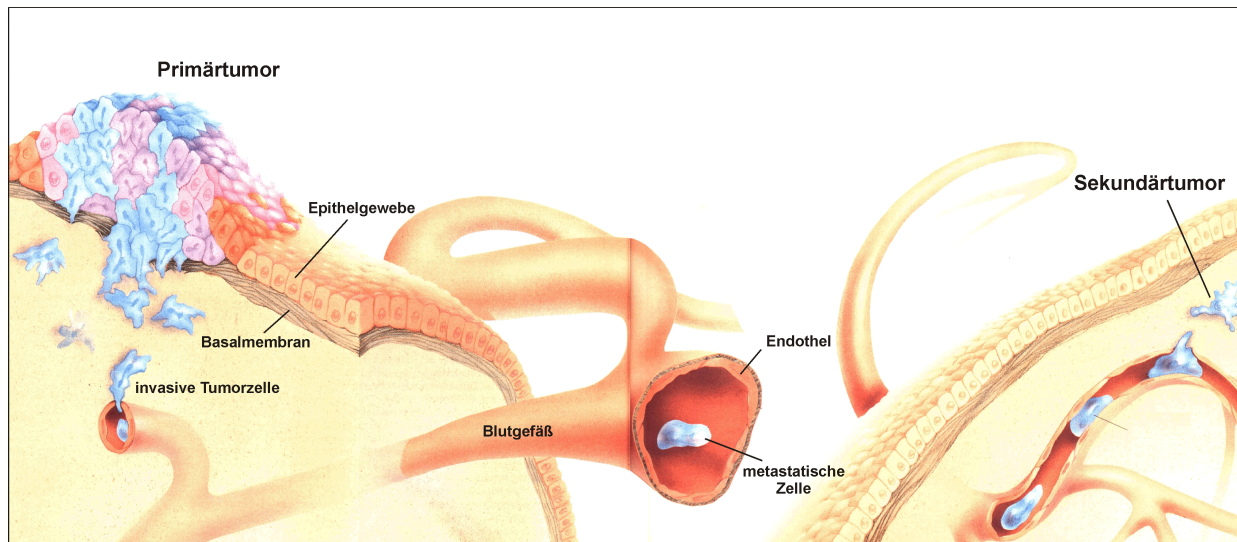


Abb.6 : Schematische Darstellung der Metastasierung von Tumorzellen (Ruoslathi, 1996)

Fibronektin spielt bei mehreren dieser Prozesse eine Rolle. Bei der Metastasierung muß die mutierte Krebszelle sich zunächst aus dem Tumorgewebe lösen. Schon 1973 fand Hynes heraus, daß Tumorzellen kein intaktes Zelloberflächen-Fibronektin mehr synthetisieren (Hynes, 1973). Dieses Verhalten konnte später für Zervixkarzinome, Melanome, Fibrosarkome, Astrozytome und Lymphome bestätigt werden. Im Gegensatz dazu existieren jedoch auch Tumore (Histiozytome, Fibroadenome und Sarkome), die normale Mengen an Fibronektin sezernieren (Humphries, 1994). Es handelt sich dabei um mutiertes Fibronektin, welches seine Zelladhäsionseigenschaften verloren hat und sich nicht zu Fibrillen verkettet. Zusätzlich wird in Tumorzellen eine Disregulierung der Expression von Integrinen beobachtet, wodurch es zu einer Veränderung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt (Beauvais *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1997; Saiki, 1997). Außerdem synthetisieren Tumorzellen Proteinasen, welche in der Lage sind sowohl Integrine als auch Fibronektin zu spalten (Schmitt *et al.*, 1992). Alle Faktoren beeinflussen die Wechselwirkung zwischen Fibronektin und seinen Rezeptoren und somit auch die Kontrolle über die Position und die Migration der Tumorzelle.

Weiteren Einfluß nimmt das Fibronectin auf die Prozesse der Invasion in das Blutgefäßsystem und der Extravasation in gesundes Gewebe. In beiden Fällen dienen Fibronectin und Fibronectin-Fragmente als Matrix für die Migration und wirken als Chemotaxine bzw. Haptotaxine auf die Tumorzellen (Furcht *et al.*, 1984; Aznavoorian *et al.*, 1990). Für die Invasion in den Blutkreislauf muß die Zelle zudem die Basalmembran der Gefäße, welche zu einem großen Teil aus Typ IV-Kollagen besteht, durchdringen. Dazu werden Proteinasen, sogenannte Typ IV-Kollagenasen, benötigt. Es wurde gezeigt, daß definierte Fibronectin-Fragmente in der Lage sind, die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zu induzieren (Homandberg *et al.*, 1997). Diese wiederum stimulieren die Sezernierung von Typ IV-Kollagenasen, wie z.B. Stromelysin 1 (MMP-3). Desweiteren enthält Fibronectin selbst latente Proteinasen, darunter eine Typ IV-Kollagenase, welche das proteolytische Potential der Tumorzelle erhöhen können.

### **2.4.3. Rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis**

Bei der rheumatoiden Arthritis und der Osteoarthritis handelt es sich um chronische Krankheitsformen, bei denen eine Schädigung bzw. eine Reduktion des Gelenkknorpelgewebes auftritt.

Während es normalerweise im Alter zu einer Knorpelverdickung kommt, findet sich bei der Osteoarthritis ein Verlust an Knorpelgewebe. Als Ursachen für die Herausbildung einer Osteoarthritis gelten :

1. Alterung des Bindegewebes
2. angeborene Prädisposition
3. Gelenkanomalien
4. Biochemische Anomalien des Knorpelgewebes
5. entzündliche Prozesse in der Gelenkinnenhaut

Die Symptome finden sich besonders in Hüft- und Kniegelenken. Es handelt sich dabei um die Schädigung der belasteten Gelenkflächen (Knorpel) und die Deformierung des Knochensubstrats.

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine Entzündung der Gelenke. Es können zahlreiche Gelenke sowohl beidseitig als auch in oberen und unteren Extremitäten befallen sein. Neben der Schädigung des Gelenkknorpelgewebes kommt es zusätzlich zu einer Entzündung der gelenknahen Gewebe und der Sehnenscheiden.

Fibronectin kommt bei beiden Krankheitsformen eine große Bedeutung zu. In den Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Osteoarthritis bzw. rheumatoider Arthritis ist die Konzentration von Fibronectin und Fibronectin-Fragmenten stark erhöht (Carnemolla *et al.*, 1984; Carsons *et al.*, 1985; Dutu *et al.*, 1986; Griffiths *et al.*, 1989; Xie *et al.*, 1992). Die Relevanz dieser Beobachtung wird deutlich, weil Fibronectin-Fragmente in der Lage sind die MMP-Expression im Gelenkknorpel zu erhöhen und die Synthese von Proteoglykanen zu inhibieren. Beide Aktivitäten führen dann zu einer Schädigung des Gelenkknorpelgewebes (Homandberg *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1993).

Homandberg *et al.* identifizierten ein aminoterminales 29 kDa-Fragment des Fibronectins, welches über das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin an Chondrozyten bindet und die Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 bewirkt (Homandberg *et al.*, 1994; Homandberg *et al.*, 1998). Diese Zytokine erhöhen wiederum die Expression von MMP-3 (Stromelysin 1) und vermindern die Proteoglykan-Synthese (Homandberg *et al.*, 1997; Homandberg, 1999). Ein interessanter Aspekt ist, daß das Fibronectin-Fragment hauptsächlich die MMP-13-Expression induziert. MMP-13 ist jedoch wiederum in der Lage, natives Fibronectin zu fragmentieren und so die eigene Produktion zu verstärken (Okada *et al.*, 1986; Homandberg *et al.*, 1986; Xie *et al.*, 1994; Bewsey *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung des proteolytischen Potentials und somit des Abbaus von Knorpelgewebe ist die Freisetzung der latenten Fibronectin-Proteinasen.

#### **2.4.4. Muskeldystrophie**

Die X-chromosomale Muskeldystrophie ist eine der häufigsten monogen bedingten Erkrankungen bei männlichen Individuen. Muskeldystrophien (*Dystrophia musculorum progressiva*) werden in Abhängigkeit von klinischer Erscheinung, dem Erbgang sowie Ausprägung der Muskelschwäche in verschiedenen Formen klassifiziert. Muskeldystrophien sind also eine Gruppe von genetisch bedingten Erkrankungen, die mit fortschreitendem Untergang der Skelettmuskulatur einhergehen. Der Körper versucht den Muskulaturverlust mit verstärkten Aufbau von Fett - und Bindegewebe zu kompensieren.

Eine Hauptklasse der Muskelschwund-Erkrankung ist die progressive Typ-Duchenne Dystrophie. Durch eine oder mehrere Mutationen des Dystrophin-Gens, welches auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms liegt und ca. 2,6 Millionen Basenpaare umfaßt, wird die Synthese von Dystrophin verhindert. Dystrophin (3600 AS) ist ein Gerüstprotein, welches für die mechanische Stabilität von Muskelfaserzellen verantwortlich ist. Es verbindet die Innenseite der Zellmembran mit dem Zytoskelett. Das Fehlen dieses Proteins führt zu einer überhöhten Membrandurchlässigkeit, die den Einstrom gefährlicher Substanzen (z.B. Proteinasen) in die Muskelfasern und den Ausstrom wichtiger Bestandteile (z.B. Kreatinkinase) bewirkt, und somit zur Degeneration der Muskelfasern. Eine weitere Form der Erkrankung ist die Typ-Becker-Kiener Dystrophie. Bei diesem Typ kommt es ebenfalls zu Mutationen im Dystrophin-Gen, die Synthese des Proteins wird jedoch nicht verhindert. Es wird jedoch ein verkürztes Dystrophin-Molekül sezerniert, welches die Aufgaben des intakten Proteins nur unvollständig übernehmen kann. Die Krankheit verläuft in diesem Fall gutartiger und führt zu einer höheren Lebenserwartung als bei der Typ-Duchenne Dystrophie (Sewry, 2000; Urtizbera, 2000).

Neben der Dystrophin-Expression werden noch viele andere Faktoren während des Krankheitsverlaufes beeinflusst. So kann z.B. die Synthese von Sarkoglykanen, von Integrinen, von Dysferin, von Laminin oder von Calpain gestört sein. Der Begriff Muskeldystrophie wird dadurch zu einem Gruppennamen für eine Vielzahl ähnlicher Krankheitsbilder (Kissel und Mendell, 1999).

Besonders interessant war die Entdeckung erhöhter proteolytischer Aktivität in von Muskeldystrophie befallenen Muskelfasern. Durch immunologische Nachweise konnten dafür zunächst bei Hühnern und Mäusen und später auch bei Menschen die Kathepsine A, B, C, H und vor allem Kathepsin D verantwortlich gemacht werden. Während in gesunden Muskelfasern nur sehr geringe Mengen an aktivem Kathepsin D detektiert wurden, konnte in erkrankten Patienten eine signifikante Erhöhung dieser Aktivität nachgewiesen werden (Iodice *et al.*, 1972; Noda *et al.*, 1981; Whitaker *et al.*, 1983; Gopalan *et al.*, 1987). Kathepsin D ist seinerseits verantwortlich für die Freisetzung der latenten Fibronektin-Proteinasen (Planchenault *et al.*, 1990; Emod *et al.*, 1990; Lambert Vidmar *et al.*, 1991a; Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Diese können das proteolytische Potential erhöhen und an der Degenerierung des Muskelgewebes beteiligt sein.

### 3. Zielsetzung

Fibronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, welches sowohl im Blutplasma als auch auf Zelloberflächen vorkommt. Es besteht aus zwei nahezu identischen Untereinheiten, die je nach ihren Bindungseigenschaften in verschiedene Domänen unterteilt werden. Die große Anzahl von Bindungsaffinitäten zu extrazellulären Makromolekülen, Zellen, DNA oder Bakterien ist wichtig für die Beteiligung des Fibronectins an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Wundheilung, Metastasierung, embryonaler Entwicklung, Thrombose und bakterieller Infektion (Clark und Colvin, 1985; Akiyama *et al.*, 1987; Hynes, 1989; Brown *et al.*, 1993; Humphries, 1993). Im Gegensatz zu diesen Eigenschaften haben diverse Studien gezeigt, daß Fragmente des Fibronectins völlig andere Funktionen als das intakte Protein haben können. So konnten einige Fragmente für die Förderung des Gewebeumbaus und die Hemmung des Endothelzellenwachstums verantwortlich gemacht werden. Andere stimulieren die Expression von MMPs, TNF- $\alpha$ , TIMP-1 und uPA (De Petro *et al.*, 1983; Homandberg *et al.*, 1986 Beezhold *et al.*, 1992; Tremble *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994; Bewsey *et al.*, 1996; Homandberg *et al.*, 1998).

Nachdem 1986 erstmals proteolytisch aktive Fibronectin-Fragmente beschrieben wurden, gelang es bis heute fünf dieser Fragmente zu isolieren (Keil-Clouha und Planchenault, 1986; Emod *et al.*, 1990; Planchenault *et al.*, 1990; Lambert Vidmar *et al.*, 1991a und b; Boudjennah *et al.*, 1996; Unger und Tschesche, 1999). Nach ihrer Substratspezifität werden sie als Fibronectinase, Fn-Typ IV-Kollagenase, Fn-Gelatinase, Fn-Lamininase und Fn Kollagenase bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine Serin-, zwei Metallo- und zwei Aspartatproteinasen.

Die beschriebenen Fibronectin-Proteinasen wurden bisher nur in geringen Mengen durch Isolierung aus humanem Plasma-Fibronectin gewonnen und waren daher keiner vollständigen Charakterisierung zugänglich. Ziel dieser Arbeit war es, die Fibronectinase, die Fn-Typ IV-Kollagenase und die Fn-Gelatinase in *Escherichia coli* zu klonieren und zu exprimieren. Die Proteine sollten durch geeignete Faltungsmethoden in ihre biologisch aktive Form gebracht werden und somit einer vollständigen Charakterisierung zur Verfügung stehen. Abb. 7 zeigt die schematische Darstellung und die Lage der zu klonierenden Proteinasen innerhalb des Fibronectin-Moleküls.

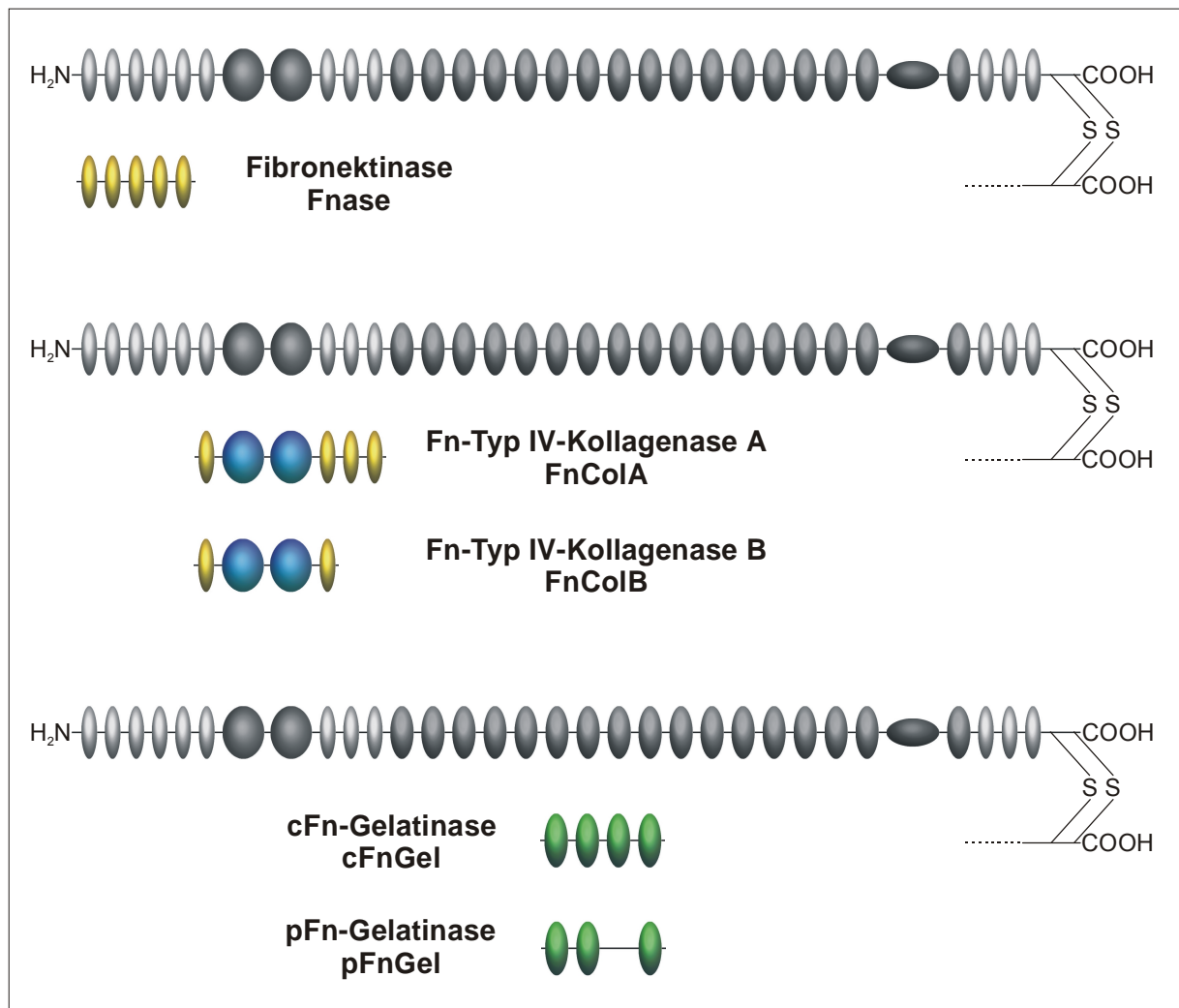


Abb. 7 : Schematische Darstellung und Lage der zu klonierenden Fibronectin-Proteinasen

Für das Verständnis der Funktionen der Fibronectin-Proteinasen hat die Kenntnis über ihre Substratspezifität eine essentielle Bedeutung. Bisher wurden Fragmente des Fibronectins entdeckt, die an pathologischen Prozessen wie Osteoarthritis oder rheumatoider Arthritis beteiligt sind. Eine genaue Identifizierung und Charakterisierung konnte jedoch nicht erfolgen. Da auch für die Fn-Proteinasen erst wenige Substrate bekannt waren, sollten neue Substrate gefunden werden, durch die eine Zuordnung der proteolytisch aktiven Fragmente zu physiologischen oder pathologischen Prozessen möglich ist. Ferner sollte die Hemmwirkung humaner Inhibitoren auf die Fn-Proteinasen untersucht werden.

Ein noch nicht beschriebenes Protein ist die cFn-Gelatinase, da aus Zelloberflächen-Fibronectin bisher keine aktive Gelatinase isoliert werden konnte. Die Klonierung dieses Enzyms sollte somit das mögliche Auftreten einer weiteren Fn-Proteinase aufklären.

## 4. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.1. Klonierung der Fibronektin-Proteinasen

Die latenten Fibronektin-Proteinasen waren bisher nur durch Spaltungs- und Autoprocessingprozesse aus humanem Plasma-Fibronektin zugänglich. Aufgrund der geringen Ausbeuten dieser Methode konnten die Enzyme nur unvollständig charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurden daher für die Fibronektinase, die Fn-Typ IV-Kollagenase und die Fn-Gelatinase einfache Expressions- und Aktivierungssysteme etabliert, welche die Proteinase in ausreichender Menge zur Verfügung stellten. Sie konnten somit effizient biochemischen Untersuchungen zur Aufklärung wichtiger Eigenschaften zugeführt werden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die cDNA-Klone der verschiedenen kodierenden Plasmide in den adäquaten *E. coli*-Systemen.

Plasmidsystem	<i>E. coli</i>	Resultierende AS-Sequenz
Fnase / pCR™2.1	[INVαF']	Fibronektinase
Fnase / pET-11a	[JM83]	Fibronektinase
Fnase / pET-11a	[HMS174(DE3)]	Fibronektinase
Fnase / pET-11a	[BL21(DE3)]	Fibronektinase
FnColA / pCR™2.1	[INVαF']	Fn-Typ IV-Kollagenase A
FnColA / pET-11a	[JM83]	Fn-Typ IV-Kollagenase A
FnColA / pET-11a	[HMS174(DE3)]	Fn-Typ IV-Kollagenase A
FnColA / pET-11a	[BL21(DE3)]	Fn-Typ IV-Kollagenase A
FnColB / pCR™2.1	[INVαF']	Fn-Typ IV-Kollagenase B
FnColB / pET-12b	[JM83]	Fn-Typ IV-Kollagenase B
FnColB / pET-12b	[HMS174(DE3)]	Fn-Typ IV-Kollagenase B
FnColB / pET-12b	[BL21(DE3)]	Fn-Typ IV-Kollagenase B
pFnGel / pCR™2.1-TOPO	[INVαF']	pFn-Gelatinase
pFnGel / pET-12b	[JM83]	pFn-Gelatinase
pFnGel / pET-12b	[HMS174(DE3)]	pFn-Gelatinase
pFnGel / pET-12b	[BL21(DE3)]	pFn-Gelatinase
cFnGel / pCR™2.1-TOPO	[INVαF']	cFn-Gelatinase
cFnGel / pET-12b	[JM83]	cFn-Gelatinase
cFnGel / pET-12b	[HMS174(DE3)]	cFn-Gelatinase
cFnGel / pET-12b	[BL21(DE3)]	cFn-Gelatinase

Tab. 2 : Für die Protein-Expression erzeugte Plasmidsysteme

## **4.2. Expression und Charakterisierung der Fibronektinase**

Zur rekombinanten Darstellung der Fibronektinase wurde zunächst die kodierende cDNA mittels PCR aus dem vorhandenen Plasmid pFH6 / pAT153 selektiv amplifiziert. Das erhaltene cDNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1™ einkloniert und durch Sequenzierung als korrekt identifiziert. Die Fibronektinase-cDNA wurde daraufhin in den Expressionsvektor pET-11a kloniert und das entstandene Plasmid in die *E. coli*-Stämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] eingeschleust. Es wurden somit zwei potentielle Expressionssysteme erhalten, die das exprimierte Protein intrazellulär als unlösliches Proteinaggregat ablagern. Nach dem Zellaufschluß erfolgte daher eine Solubilisierung der sogenannten *inclusion bodies*, die in einer völligen Denaturierung des Proteins resultierte. Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und Gelfiltration an Sephacryl S-100 konnte die rekombinante Fibronektinase bis zur Homogenität gereinigt und durch einen immunologischen Nachweis identifiziert werden. Die Faltung des Proteins erfolgte durch ein Redox-System, bestehend aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol. Durch dieses *oxido shuffling*-System wurde das Protein in seiner korrekten biologischen Konformation erhalten. Die Aktivierung konnte durch Inkubation für 48 h bei 37°C in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Ionen erreicht werden.

Eine Überprüfung der korrekten Faltung und Aktivierung wurde mit dem bisher einzigen Substrat, dem humanen Plasma-Fibronectin, in Zymogrammen vorgenommen. Die rekombinante Fibronektinase wurde so als 22 kDa großes aktives Protein nachgewiesen. Eine Bestimmung der Spaltungsspezifität erfolgte ebenfalls mit Fibronectin als Substrat. Drei Spaltfragmente konnten durch automatisierten Edman-Abbau identifiziert und damit die Spaltstellen R<sup>450</sup>-G<sup>451</sup>, R<sup>1274</sup>-F<sup>1275</sup> und R<sup>2149</sup>-V<sup>2150</sup> bestimmt werden. Die Fibronektinase spaltete demnach nach basischen Arginin-Resten; die P<sub>2</sub>-Positionen waren dabei durch hydrophobe, die P<sub>3</sub>-Positionen durch hydrophile Aminosäure-Reste besetzt.

Fibronektinase kann *in vitro* durch Spaltung von Fibronectin mit Kathepsin D generiert werden. Eine erhöhte Kathepsin D-Produktion wurde auch bei der Muskeldystrophie beobachtet. Um einen Zusammenhang zwischen diesen Vorgängen zu thematisieren, wurden Spaltversuche von Muskelproteinen mit der Fibronektinase durchgeführt. So konnten erstmals zwei neue Substrate für die Fibronektinase nachgewiesen werden, sowohl Aktin als auch Myosin wurden degradiert. Bei der Aktin-Spaltung konnten außerdem zwei Spaltstellen identifiziert werden. Der mögliche Zusammenhang der Fibronektinase mit dem Krankheitsverlauf des Muskelschwundes war somit gegeben.



### **4.3. Expression und Charakterisierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase**

Die Metallo-Proteinase Fn-Typ IV-Kollagenase wurde in zwei Varianten kloniert, dem vollständigen Enzym FnColA und einer verkürzten Variante FnColB. Die entsprechenden cDNA-Fragmente wurden durch PCR aus dem Plasmid pFH134 / pAT153 amplifiziert. Zur Sicherung der amplifizierten cDNAs wurden die Amplifikate mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR™2.1 einkloniert. Die durch DNA-Sequenzierung identifizierten cDNA-Fragmente wurden dann mit pET-Vektoren (pET-11a bzw. pET-12b) ligiert und mit den erhaltenen Plasmiden die *E. coli*-Expressionstämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] transformiert. Die resultierenden Expressionssysteme produzierten die rekombinanten Proteinase in *inclusion bodies*, nach deren Aufschluß sie in denaturierter Form vorlagen. Die Reinigung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose und Gelfiltration an Sephacryl S-100 bis zur Homogenität. Die biologisch aktive Konformation der FnCol-Varianten wurde durch das *oxido shuffling*-System Glutathion/Dithiothreitol erreicht.

Erste Aktivitätstests mit Gelatin-Zymogrammen zeigten eine Prozessierung beider Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten, wobei aktive Fragmente von 20 und 24 kDa detektiert wurden. Desweiteren wurde eine geringere proteolytische Aktivität für Fragmente mit 40, 43 und 66 kDa beobachtet. Als weitere Substrate für FnColA und FnColB konnten die Kollagene vom Typ II und IV identifiziert werden. Typ II-Kollagen ist ein Hauptbestandteil des Knorpelgewebes, welches bei Arthritis-Erkrankungen vermehrt abgebaut wird, Typ IV-Kollagen kommt in Basalmembranen vor, die hauptsächlich bei der Metastasierung degradiert werden. Ferner waren die Fn-Typ IV-Kollagenasen in der Lage,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein sowie die oxidierte Insulin B-Kette und das synthetische Mca-Peptid proteolytisch zu spalten.

Die Spaltungsspezifität wurde mit der Insulin B-Kette als Substrat ermittelt. Nach der Degradierung erhaltene Spaltfragmente wurden durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Bei den Spaltstellen handelt es sich um die Peptidbindungen H<sup>5</sup>-L<sup>6</sup>, H<sup>10</sup>-L<sup>11</sup>, A<sup>14</sup>-L<sup>15</sup> und Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup>. Die Hydrolyse erfolgte also immer auf der N-terminalen Seite des Leucins. Ferner wurde im Gegensatz zur isolierten Fibronectin-Typ IV-Kollagenase für das rekombinante Enzym eine weitere Spaltstelle an der Bindung F<sup>25</sup>-Y<sup>26</sup> identifiziert. Die detektierten Spaltstellen sind in Abb. 8 dargestellt.

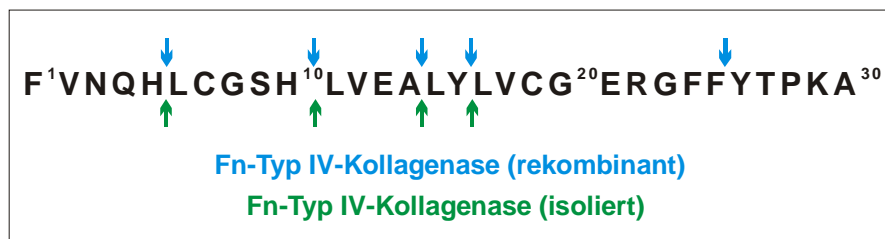


Abb. 8 : Schematische Darstellung der Insulin B-Spaltstellen durch rekombinante und isolierte Fn-Typ IV-Kollagenase

Da es sich bei der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase um eine Metalloproteinase handelt, wurden bekannte MMP-Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung gegenüber der rekombinanten Proteinase überprüft. Eine Inhibierung des Enzyms konnte mit EDTA, Batimastat, TIMP-2 und TIMP-4 erreicht werden. Die Hemmung durch TIMP-2 stand im Gegensatz zum Verhalten der isolierten Fn-Typ IV-Kollagenase. Diese wurde weder durch bTIMP-2 (bovine TIMP-2) noch durch idTIMP-2 (inhibitory domain TIMP-2) inhibiert.

Abb. 9 zeigt die Hemmkurven der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenase mit Batimastat, bTIMP-2 und idTIMP-4. bTIMP-2 zeigt dabei eine stärkere Hemmwirkung als Batimastat. Die Hemmkurven wurden durch Verwendung des synthetischen Mca-Peptides fluoreszenzphotometrisch aufgenommen.

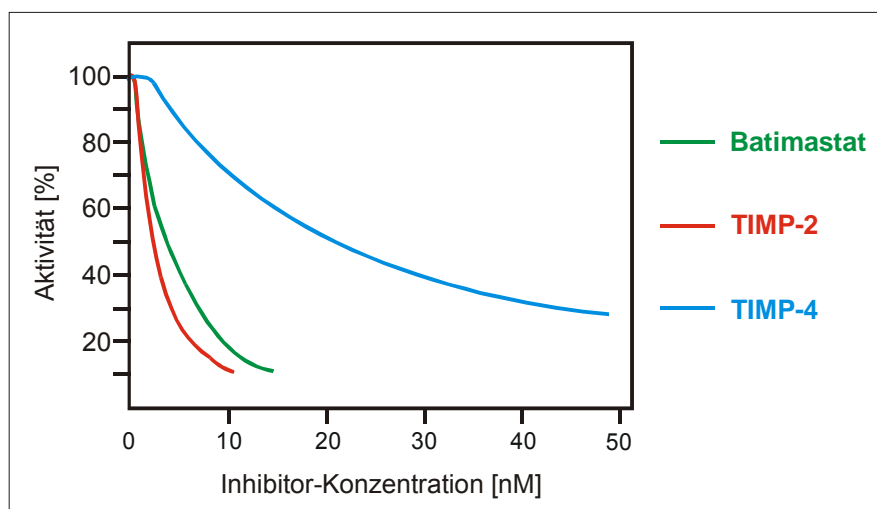


Abb. 9 : Inhibierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase durch TIMP-2, TIMP-4 und Batimastat

#### 4.4. Expression und Charakterisierung der Fibronektin-Gelatinase

Neben der bekannten Fn-Gelatinase aus Plasma-Fibronektin (pFnGel) sollte eine zusätzliche Variante aus Zelloberflächen-Fibronektin (cFnGel) kloniert werden. Zur cDNA-Amplifizierung der Aspartatproteinasen durch PCR wurde das Plasmid pFH154 / pAT153 verwendet. Während die cFnGel-cDNA direkt amplifiziert wurde, mußte die pFnGel-cDNA in zwei Fragmenten produziert werden, die später miteinander ligiert wurden. So konnte die für das 8. Typ III-Modul kodierende Sequenz ausgeschlossen werden. Nach der TA-Klonierung der erhaltenen Fragmente in den pCR2.1™-TOPO-Vektor erfolgte die Ligation mit dem Expressionsvektor pET-12b und die Transformation der *E. coli*-Stämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)]. Die so erhaltenen Expressionssysteme produzierten die rekombinanten Proteine in Form von *inclusion bodies* in signifikanter Menge. Die Aufreinigung erfolgte wie bei der Fibronektinase durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und durch Gelfiltration an Sephacryl S-100. Durch das Fixieren der Proteine an Q-Sepharose und durch das Entfernen von denaturierenden Detergenzien konnte eine Faltung in die biologisch korrekten Konformationen erreicht werden.

Durch Zymographie mit den bekannten Substraten Gelatin und Fibronektin konnte für die pFn-Gelatinase eine Abbaubande bei 32 kDa detektiert werden. Die cFn-Gelatinase wies dagegen keine Aktivität auf. Da aus Zelloberflächen-Fibronektin noch nie eine Gelatinase isoliert wurde, ist davon auszugehen, daß das 8. Typ II-Modul die Ausbildung eines aktiven Zentrums verhindert. Neben den bekannten Substraten der Fn-Gelatinase konnten keine weiteren identifiziert werden.

Die Bestimmung der Spaltungsspezifität erfolgte durch Degradierung der oxidierten Insulin B-Kette. Die Identifizierung der erhaltenen Peptide durch automatisierten Edman-Abbau ermöglichte die Bestimmung folgender Spaltstellen : E<sup>13</sup>-A<sup>14</sup>, Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup> und F<sup>24</sup>-F<sup>25</sup>. Die Ergebnisse zeigen, daß die Fibronektin-Gelatinase, ähnlich wie retrovirale Aspartatproteinasen, vornehmlich Peptidbindungen von aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren spaltet (Abb. 10).

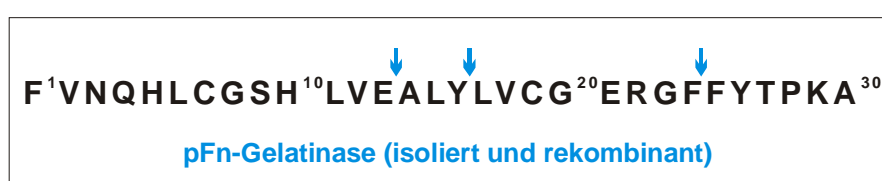


Abb. 10 : Schematische Darstellung der Insulin B-Spaltstellen durch Fibronektin-Gelatinase

## 5. Geräte und Materialien

### 5.1. Geräte

Autoklav	Webeco Modell CS-Lab/IDK, Webeco, Lüdenscheid
Blotapparatur	Trockenblotapparatur Biometra, Göttingen
Clean Bench	DLF/Bss 6.KI.IIA B. V., Clean Air Technik, Woerden
DNA-Sequenziergerät	LI-COR Sequencer, MWG Biotech, Ebersberg
Elektrophoresekammer	Eigenbau, Universität Bielefeld
Fotoapparat	Nikon F3, Nikon AG, Tokio
Fraktionssammler	2211 Superrac, LKB, München
Gefriertrocknung	WKF L2, WKF, Darmstadt
HPLC-Anlage	Applied Biosystems, San Jose
Imaging System	Biophotonics Bp-MX/ITI7x2, MWG Biotech, Ebersberg
Inkubator	New Brunswick Scientific Co.Inc., Edison, New Jersey
Lumineszenz-Photometer	LS50B, Perkin-Elmer GmbH, Düsseldorf
Peristaltische Pumpe	Peristaltic-PUMP-1, Pharmacia, Freiburg
pH-Meter	PHM 62 pH-Meter, Radiometer, Kopenhagen
Photometer	Photometer 1101 M, Eppendorf, Hamburg
Proteinsequenziergerät	modularer Flüssigphasensequencer mit PTH-online-Identifizierung, Knauer, Berlin
Rollinkubator	Eigenbau, Universität Bielefeld
Schüttler	E. Bühler, KL-2, Tübingen
Schreiber	Rec 102, Pharmacia-LKB, Freiburg
Speed Vacuum-Uniequip	Univapo 150 H Concentrator Zentrifuge, Martinsried
Temperierbad	U4 electronic, Juchheim Labortechnik, Seelbach
Thermocycler (PCR)	Mini Cyclor Modell PTC-150-16, MJ Research, Inc. Watertown, Massachusetts (USA)
Ultrafiltrationskammer	Amicon, Ousterhous (USA)
Ultra-Turrax	Typ 18-10, Jahnke & Kunkel KG, IKA Werk, Staufen
Vortex	Vortex-Genie, Bender-Hobein AG, Zürich
Wasseraufbereitung	Millipore-Q-Filtrationsanlage, Millipore, Neu Isenburg
Zentrifugen	Sorvall RC 2/5B , Du Pont de Nemours, Bad Nauheim Biofuge A, Heraeus, Hanau

## **5.2. Materialien**

### **5.2.1. Materialien für Säulenchromatographien**

Aquapore RP300	Applied Biosystems, San Jose, Usa
DEAE-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Sephacryl S-100	Pharmacia, Freiburg

### **5.2.2. Antikörper und Antikörperkonjugate**

Mouse-anti-human Fibronectin (N-terminal) monoclonal antibody, Chemicon International Inc., Temecula, California

Mouse-anti-human Fibronectin (gelatin binding domain) monoclonal antibody, Clone IST-10, Chemicon International Inc., Temecula, California

Mouse-anti-human Fibronectin (mid molecule) monoclonal antibody, Clone 875A51, Chemicon International Inc., Temecula, California

Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma, Steinheim

### **5.2.3. Standards**

DNA 1kb-Leiter	BRL, Eggenstein
High Molecular Weight Marker	HMW Calibration Kit, Pharmacia, Freiburg
Low Molecular Weight Marker	LMW Calibration Kit, Pharmacia, Freiburg
Wide Range Protein Standard	Mark 12™, Anamed, Offenbach

### **5.2.4. Proteine und Peptide**

Aktin	ICN, Eschwege
BSA	Sigma, München
$\alpha$ -Casein	Fluka Chemica-Biochemica, Neu-Ulm
$\beta$ -Casein	Fluka Chemica-Biochemica, Neu-Ulm
Fibronektin	Dipl. Chem. P. M. Dißmann, Universität Bielefeld

Gelatin	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
Myosin	ICN, Eschwege
TIMP-2 (bovine)	Dr. J. J. Calvete, Tierärztliche Hochschule Hannover
TIMP-2 (inhibitory domain)	Dr. M. Farr, Universität Bielefeld
TIMP-4 (inhibitory domain)	Dipl. Chem. B. Stratmann, Universität Bielefeld
Typ II-Kollagen	Sigma, München
Typ IV-Kollagen	Sigma, München
DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln <sup>D</sup> -Arg-OH	Bachem, Bubendorf (Schweiz)
Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH <sub>2</sub>	Bachem, Bubendorf (Schweiz)

### 5.2.5. Oligonukleotide (MWG-Biotech)

Fnase-For	5'-AAG CAT ATG AGG CAG GCT CAG CAA ATG G-3'
Fnase-Rev	5'-CAC GGA TCC CTA CCT CTC ACA CTT CCA CTC-3'
FnCol-For	5'-GTT CGT CAT ATG GTT TAC CAA CC-3'
FnColA-Rev	5'-TTC GAC GGA TCC TCA TGA GCT TG-3'
FnColB-Rev	5'-GTC ATC GTC GAC TCA CTG ATC TCG-3'
FnGel-For	5'-AAG GGC CAT ATG GAG AGC CCC AAA-3'
FnGel-Rev	5'-CAA TAA GTC GAC TCA CTC TCT GCC ATT AA-3'
Xma-For	5'-GAC AGA ACC CGG GTC TTG ATT CC-3'
Xma-Rev	5'-GAG GAA CAC CCG GGA TGA TGG T-3'

### 5.2.6. DNA-modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase	Pharmacia, Freiburg
BamHI	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>Deep Vent</i> <sup>®</sup> DNA-Polymerase	Promega, Madison (USA)
EcoRI	New England Biolabs, Beverly (USA)
NdeI	New England Biolabs, Beverly (USA)
Sall	New England Biolabs, Beverly (USA)
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison (USA)
<i>Tth</i> <sup>®</sup> DNA-Polymerase	Promega, Madison (USA)
XmaI	New England Biolabs, Beverly (USA)

**5.2.7. Chemikalien**

Acrylamid (30 %ige Lösung)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
BCIP	Sigma, München
Coomassie Blue	Serva, Heidelberg
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	Biomol, Hamburg
Glycin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Serva, Heidelberg
IPTG	Biomol, Hamburg
NBT	Sigma, München
SDS	Serva, Heidelberg
Select Peptone	Gibco Brl, Eggenstein
Select Yeast Extract	Gibco Brl, Eggenstein
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, München
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	Biomol, Hamburg

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck, Darmstadt bezogen.

**5.3. Sonstiges**

Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Dialysierschlauch	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
PVDF-Membran	Millipore, Bedford (USA)
QIAgen <sup>TM</sup> -Spin Plasmid Kit	QIAgen GmbH, Hilden
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
TA-Cloning Kit	Invitrogen
UF-Kammer-Membranen	Amicon, Ousterhous (USA)

#### **5.4. Bakterienstämme**

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind Sicherheitsstämme für das Arbeiten in Genlaboratorien der Sicherheitsstufe S1. Die Wirtstämme wurden gentechnisch durch Mutationen so verändert, daß sie nur in Vollmedien und nicht in Minimalmedien oder drop-out Medien wachsen, so daß ein Überleben außerhalb der Laborbedingungen ausgeschlossen wird. Eine Deletion im Rekombinationsgen dieser *E. coli*-Stämme verhindert, daß eine Rekombination zwischen chromosomaler DNA und rekombinanter DNA erfolgen kann. Durch diese Mutation im Rekombinationsgen besitzen die Bakterien auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung. Außerdem tragen die verwendeten Bakterienstämme kein Fertilitätsplasmid mehr und können somit keine DNA durch Konjugation weitergeben.

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme und pET-Vektoren wurden von der Firma Novagen (Madison, USA) bezogen und sind im Phänotyp antibiotikasensitiv (Ampicillin). Bei der Benennung des Genotyps werden nur die Gene aufgeführt, die gegenüber dem Wildtyp verändert wurden.

##### **5.4.1. *Escherichia coli* [INV $\alpha$ F']**

Genotyp : F' *endA1, recA1, hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Phi$ 80 lacZ*  
 $\Delta$ M15 (*lacZYA-argF*), U169  $\lambda^-$

Der *E. coli*-Stamm [INV $\alpha$ F'] wird für die Transformation von Ligationsansätzen aus der TA-Klonierung und zur Vermehrung von Plasmid-DNA eingesetzt. Er ermöglicht mit einem  $\alpha$ -komplementationsfähigen Vektor eine Insertionskontrolle über eine Blau-Weiß-Selektion : Kloniert man ein DNA-Fragment in das  $\beta$ -Galactosidasegen (*lacZ*) des pCR<sup>TM</sup>II-Vektors, so sind diese Rekombinationen genotypisch *lacZ* und produzieren keine aktive  $\beta$ -Galactosidase. Sie können deshalb das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) nicht zu einem blauen Indigofarbstoff umsetzen. Die Plaques solcher Klone bleiben also farblos. Klone mit rezykliertem Vektor besitzen eine aktive  $\beta$ -Galactosidase und färben das X-Gal blau.



#### 5.4.2. *Escherichia coli* [JM83]

Genotyp : *ara*, *rpsL*,  $\Delta(lac-pro AB)$ ,  $\Phi80lacZ\Delta M15$

Der *E. coli*-Stamm [JM 83] ist ein sogenannter „*high-copy*“-Stamm, in dem die Plasmide in großer Anzahl vorliegen. Deshalb eignet er sich neben der Möglichkeit zur Etablierung von Ligationsansätzen besonders zur Anreicherung von Plasmiden.

#### 5.4.3. *Escherichia coli* [HMS174(DE3)]

Genotyp : K12,  $F^-$ , *recA*, *hsdR* ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ),  $Rif^R$ ,  $\lambda$ (DE3)

Der *E. coli*-Stamm [HMS174(DE3)] gehört zur Familie der *E. coli* K12 und dient in Kombination mit pET-Expressionsvektoren als Wirt eines pET-Expressionssystems. HMS174 ist rekombinationsdefizient und trägt zur Selektion ein Rifampicin-Resistenzgen. Außerdem ist im Chromosom des Bakterienstammes der Bakteriophage DE3 integriert. Dieses lysogene  $\lambda$ -Derivat beinhaltet das T7 RNA-Polymerasegen, welches unter Kontrolle des induzierbaren starken *lacUV5*-Promotors steht. Zur Induktion der Polymerase gibt man IPTG zu der wachsenden Bakterienkultur.

#### 5.4.4. *Escherichia coli* [BL21(DE3)]

Genotyp :  $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>b</sub>* ( $r_b^- m_b^-$ ), *gal*, *dcm*,  $\lambda$ (DE3)

Der *E. coli*-Stamm [BL21(DE3)] ist ein Wirtstamm für die Genexpression. Er besitzt wie der Stamm [HMS174(DE3)] für die Proteinproduktion eine chromosomale Kopie des Gens für die T7 RNA-Polymerase. Als Wirt dienen die Lysogene des  $\lambda$ -Bakteriophagen (DE3). Die DNA dieses Phagen enthält Fragmente, die für den Promotor des *lacUV5* codieren, sowie für den Repressor des *lac* Operons und für die T7 RNA-Polymerase. Durch IPTG ist der *lacUV5* Promotor induzierbar und somit wird durch Zugabe von IPTG zu einer wachsenden Zellkultur die T7 RNA-Polymerase induziert, die dann die in das Plasmid integrierte Ziel-DNA transkribiert. Um eine Degradierung der rekombinanten Proteine während der Aufarbeitung zu verhindern, fehlt dem Stamm [BL21(DE3)] sowohl die *ompT* „outer membrane“-Protease als auch die *lon*-Protease.

## 5.5. Vektoren

Die verwendeten Vektoren vermitteln dem zur Transformation eingesetzten *E. coli*-Stamm eine Ampicillin-Resistenz, so daß die transformierten Bakterienklone selektiert werden können. Die Vektoren zur Plasmidanreicherung tragen auch einen Teil des  $\beta$ -*Lactamase*-Gens, das in Verbindung mit dem [INV $\alpha$ F']-Stamm über die  $\alpha$ -Komplementation eine Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-Substraten ermöglicht. Bei den Expressionsplasmiden besteht diese Möglichkeit nicht.

### 5.5.1. pCR™2.1-Vektor und pCR™2.1-TOPO-Vektor

Die Vektoren pCR™2.1 (Abb. 11) und pCR™2.1-TOPO (Abb. 12) werden für die TA-Klonierung eingesetzt. Die TA-Klonierung beruht auf dem Prinzip, daß einige in der PCR verwendeten DNA-Polymerasen unabhängig vom Template während der PCR ein zusätzliches Adenosin an die 3'-Enden des Amplifikats anhängen. Die linearen pCR™-Vektoren besitzen an ihren 5'-Enden einen T-Überhang, der die direkte Ligation mit dem PCR-Produkt ermöglicht. Somit ist die direkte Klonierung von PCR-Produkten ohne vorherigen Verdau durch Restriktionsenzyme in die pCR™-Vektoren möglich. Die Vektoren besitzen ein Kanamycin- und ein Ampicillinresistenzgen, eine „multiple cloning site“, sowie das *lacZ*-Gen für die Blau-Weiß-Selektion. Der pCR™2.1-TOPO-Vektor hat zusätzlich an den Enden gebundene Topoisomerasen, die den Ligationsprozeß katalysieren.

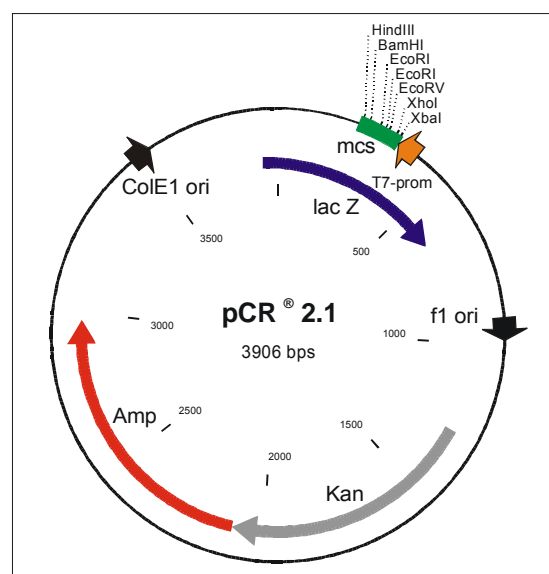


Abb. 11 : Schematische Plasmidkarte  
des Vektors pCR™2.1

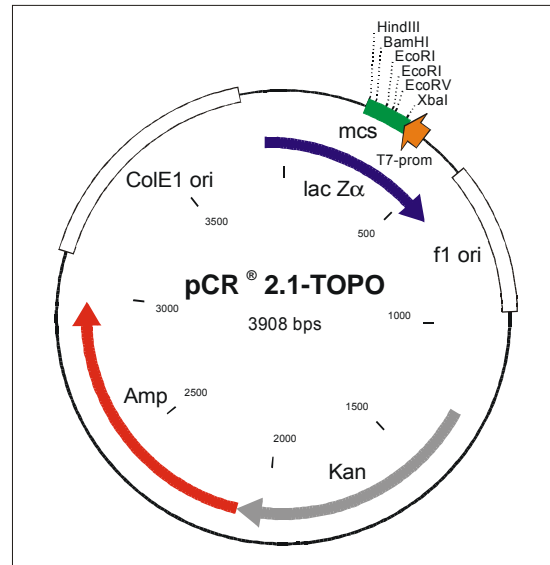


Abb. 12 : Schematische Plasmidkarte  
des Vektors pCR™2.1-TOPO

### 5.5.2. pET-11a-Vektor

Der pET-11a-Vektor (Abb. 13) ermöglicht in Verbindung mit den *E. coli*-Stämmen [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] die Expression rekombinanter Proteine. Die Expression wird durch IPTG, welches an den lac-Repressor bindet und damit die Anlagerung der T7-Polymerase an den T7-lac-Promotor ermöglicht, induziert. Neben dem Ampicillinresistenzgen verfügt der pET11a-Vektor über eine vielseitige „multiple cloning site“.

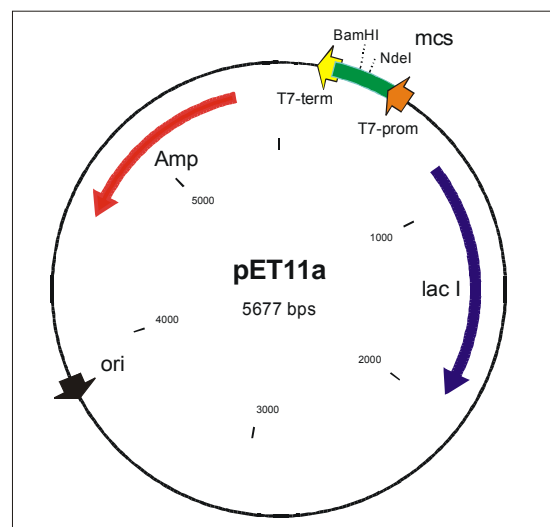


Abb. 13 : Schematische Plasmidkarte  
des Vektors pET-11a

### 5.5.3. pET-12b-Vektor

Der pET-12b-Vektor (Abb. 14) ermöglicht wie der pET-11a-Vektor in Kombination mit den *E. coli*-Stämmen [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] die Expression rekombinanter Proteine. Der pET12b-Vektor besitzt den T7-Promotor, den T7-Terminator, den Replikationsursprung und die kodierende Sequenz für das  $\beta$ -Lactamasegen. Im Gegensatz zum Plasmid pET11a besitzt dieser Vektor eine N-terminale *ompT*-Sequenz für den möglichen Export des Zielproteins in das Periplasma der Wirtszelle.

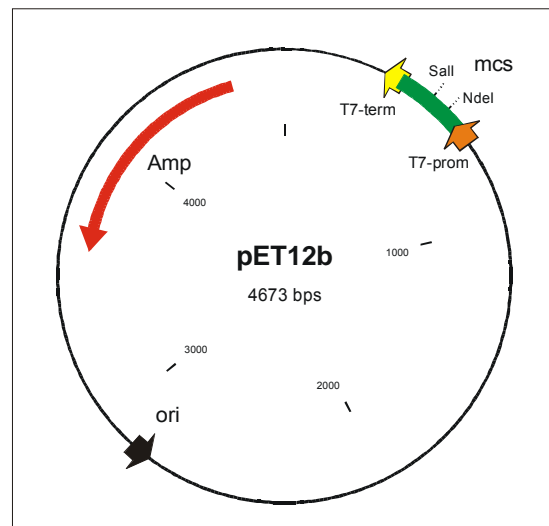


Abb. 14 : Schematische Plasmidkarte  
des Vektors pET-12b

## 6. Methoden

### 6.1. Gentechnische Methoden

Um eine Kontamination der Bakterienkulturen und Materialien mit Fremd-DNA oder Fremdorganismen zu vermeiden, werden alle gentechnischen Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Gefäße, Arbeitsgeräte und Nährmedien werden daher vor Benutzung autoklaviert. Ist ein Selektionsmarker, wie eine Antibiotikaresistenz, vorhanden, erfolgt die Aufzucht der Bakterien unter Selektionsdruck.

#### **6.1.1. Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNA-Fragmenten durch aufeinanderfolgende Polymerase-Reaktionen. Voraussetzungen sind neben einer DNA-Polymerase zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotidprimer. Ihre Sequenzen sind so gewählt, daß sie komplementär zu jeweils einem der Bereiche sind, die das anzureichernde DNA-Fragment (Template) begrenzen. Werden Primer eingesetzt, welche nicht in allen Basen komplementär zur eingesetzten DNA sind, so erfolgt eine *in-vitro-Mutagenese* im Randbereich der Originalsequenz. Dieses ermöglicht die Einführung von Start- und Stopcodons sowie von Restriktionsstellen in die zu amplifizierende DNA. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang des Templates bei 95 °C denaturiert, bevor beiderseits der Zielsequenz die Oligonukleotidprimer über Basenpaarung an die entstandenen homologen Einzelstränge angelagert werden (Annealing). Eine DNA-Polymerase synthetisiert in einer Primerverlängerungsreaktion bei 72 °C dann unter Verwendung der vier Desoxyribonukleotide komplementäre Stränge an den DNA-Matrizen. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus aus Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese läßt sich die Zielsequenz exponentiell amplifizieren.

Die verwendete hitzestabile *Deep Vent*®-Polymerase zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate bei der Replikation aus, da sie ein „*proof-reading*“-System besitzt, mit dem sie jede angefügte Base überprüft und bei einer Fehlpaarung durch ihre 3'→5'-Exonukleaseaktivität wieder entfernt. Da sie jedoch kein überstehendes Adenosin an das amplifizierte DNA-Fragment anhängt, welches zur TA-Klonierung in den pCR<sup>TM</sup>2.1-Vektor benötigt wird, muß eine Nachbehandlung des PCR-Ansatzes mit der *Tth*®-Polymerase erfolgen.

- PCR-Reaktionsansatz : 2,0 µl Template-DNA (1-10 ng)  
0,5 µl forward-Primer (50 µM)  
0,5 µl reverse-Primer (50 µM)  
1,0 µl dNTPs (10 mM)  
5,0 µl 10× *Deep Vent*®-Puffer  
0,2 µl *Deep Vent*®-Polymerase (1U)  
40,8 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
→ mit 50 µl Paraffin überschichten

- Standard-PCR-Programm :

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	60 s	95 °C
2. Denaturierung	45 s	95 °C
3. Annealing	60 s	46 °C + 0,2 °C/Zyklus
4. Polymerisation	60 s + 1 s/Zyklus	72 °C
5. Wiederholung	39 × zu Schritt 2	
6. Extension	5 min	72 °C
7. Ende		4 °C

- *Tth*®-Nachbehandlung : 0,2 µl *Tth*®-Polymerase (1U) zufügen und 10 min bei 72°C inkubieren

→ DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen (6.1.8.)

→ DNA-Extraktion aus Agarosegelen (6.1.9.)

### 6.1.2. *E. coli* Übernachtskulturen

Die Anzucht von *E. coli*-Bakterien zu Übernachtskulturen (üN-Kulturen) erfolgt durch Animpfen von 5 ml LB-Medium mit einem Klon einer LB-Plattenkultur oder 5 µl einer Tiefkühlkultur. Da die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide eine Antibiotikaresistenz (gegen Ampicillin) aufweisen, wird dem Nährmedium Ampicillin zugesetzt und die Anzucht erfolgt unter Selektionsdruck.

- 5 ml LB-Medium mit 5µl Amp<sup>200</sup>-Lsg. versetzen
- Animpfen mit Zellen eines *E. coli*-Stammes
- Inkubation über Nacht bei 37°C im Rollinkubator

→ Isolierung von Plasmid-DNA (6.1.4. und 6.1.5.)

→ Tiefkühlkulturen (6.1.3.)

#### Verwendete Lösungen :

LB-Medium :                                    10 g/l Trypton  
    5 g/l Hefe-Extrakt (Pepton)  
    10 g/l NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Ampicillin<sup>200</sup>-Lsg. :                                    200 mg Ampicillin<sup>200</sup>-Na/ml 70 %igem Ethanol

#### **6.1.3. Tiefkühlkulturen**

Zur Langzeitlagerung von Bakterien werden Tiefkühlkulturen angelegt. Das zugesetzte Glycerin verhindert dabei die Zellschädigung, die das Medium durch Kristallisation bei tiefen Temperaturen hervorrufen würde. Die Kultur kann bei -20°C (Kurzzeitlagerung) oder -80°C (Langzeitlagerung) aufbewahrt werden.

- 1,5 ml einer üN-Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellpellet in 500 µl LB-Medium resuspendieren
- Addition von 500 µl 87 %igem Glycerin und vorsichtig mischen
- Lagerung bei -20°C oder -80°C

#### 6.1.4. Alkalische Mini-Lyse (Maniatis *et al.*, 1989)

Die Alkalische Mini-Lyse dient der schnellen Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien. Bei dieser Methode werden die *E. coli*-Zellen lysiert, die Plasmid-DNA im alkalischen Milieu denaturiert und chromosomale DNA sowie Proteine der Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt. Durch darauffolgende RNase-Behandlung wird die verbliebene RNA hydrolysiert und die Plasmide durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

- 1,5 ml üN-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführen
  - Zellen 5 min bei 5000 rpm abzentrifugieren; Überstand verwerfen
  - Zellpellet in 100 µl AI-Lösung 1 resuspendieren
  - Inkubation 5 min bei RT (Zell-Lyse)
  - Addition von 200 µl AI-Lsg.2; Inkubation 5 min bei 0°C
  - Addition von 150 µl AI-Lsg.3 ; vortexen ; Inkubation 5 min bei 0°C
  - *E. coli*-Bestandteile 10 min bei 11000 rpm abzentrifugieren
  - Plasmidtragenden Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
  - Addition von 10 µl RNase-Lösung ; vortexen
  - Inkubation 30 min bei 37°C
- Phenolextraktion (6.1.6.)  
→ Ethanol-fällung (6.1.7.)

#### Verwendete Lösungen :

AI-Lösung 1 :	25 mM Tris/HCl pH 8,0 1 % (w/v) Glucose 10 mM EDTA 2 mg/ml Lysozym 0,5 mg/ml RNase in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
AI-Lösung 2 :	0,2 N NaOH 1 % (W/V) SDS
AI-Lösung 3 :	3 M Kaliumacetat-Lösung pH 4,8



### 6.1.5. Plasmidisolierung nach „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“

Diese Methode wurde von der Firma QIAGEN entwickelt, um Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad, z.B. für Sequenzierungen, aus Flüssigkulturen zu isolieren. Die Isolierung basiert auf einer modifizierten Alkalischen Lyse. Dabei wird die Eigenschaft von Plasmid-DNA ausgenutzt, in einem Puffer mit hoher Konzentration an chaotropen Salzen an eine Siliziummembran zu binden, welche unter diesen Bedingungen keine RNA oder Proteine bindet. Nach Reinigung der Membran durch zwei Waschvorgänge wird die Plasmid-DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder salzfreiem Puffer von der Membran eluiert. Diese Präparationsmethode eignet sich für die Aufarbeitung von bis zu 100 µg DNA aus 5 ml *E. coli*-Kultur.

Eine Arbeitsvorschrift und die verwendeten Puffer werden von der Firma QIAGEN im „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“-Plasmid Kit bereitgestellt.

### 6.1.6. Phenolextraktion (Maniatis *et al.*, 1989)

Bei der Phenolextraktion werden Proteinverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen beseitigt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft des Phenols reichern sich die Proteine in der organischen Phase an, während die Plasmid-DNA in der wässrigen Phase bleibt.

- zu 1 Volumen DNA-Lsg. Addition von 1 Volumen Phenol-Lösung
- Gemisch kurz vortexen
- 7 min bei 7000 rpm zentrifugieren (Phasentrennung)
- obere wässrige Phase vorsichtig abpipetieren  
→ Ethanol-fällung (6.1.7.)

#### Verwendete Lösungen :

Phenol-Lösung :	1 kg Phenol
	1 l Chloroform
	41,6 ml Isoamylalkohol
	1,65 g 8-Hydroxychinolin
	mit 10 mM Tris/HCl auf pH 7,5 einstellen

### 6.1.7. Ethanolfällung

Die Ethanolfällung von DNA-Präparationen dient der Abtrennung von anorganischen Verunreinigungen und der Konzentrierung der DNA. Ethanol dehydratisiert das DNA-Moleküle und bewirkt so eine Fällung der DNA bei tiefen Temperaturen. Außerdem werden mit diesem Verfahren die Verunreinigungen an Phenol aus der vorangegangenen Phenolextraktion entfernt.

- zu 1 Volumen DNA-Lösung Addition von 2 Volumen Ethanol (96 % ; -20°C)
- gut mischen (schütteln)
- 15 min bei -20°C inkubieren (DNA-Fällung)
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet mit 100 µl Ethanol (70 % ; -20°C) waschen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 min unter Clean-bench trocknen lassen
- Pellet in entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufnehmen

### 6.1.8. DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen (Maniatis *et al.*, 1989)

Die DNA-Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung, Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphodiester-rückgrats wandern die anionischen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Geschwindigkeit von der Ladung, Größe und Konformation (superhelikal, zirkulär, linear) abhängt. Unterstützt durch die Kapillarstruktur der Agarosematrix ergibt sich annähernd eine logarithmische Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit zum Molekulargewicht.

Die Elektrophorese wird in einer horizontalen Elektrophoresekammer nach Standardvorschrift bei 80 mA durchgeführt. Die DNA-Proben werden im Verhältnis 4:1 mit BPB-Sucrose-Lösung versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard (1 kb DNA-Leiter). Die DNA-Fragmente werden anschließend mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiniumbromid) angefärbt, das sich zwischen den einzelnen Basenpaaren doppelsträngiger DNA einlagert und mit einzelsträngigen RNA- bzw. DNA-Fragmenten Komplexe bildet. Auf einem Transilluminator werden die DNA-Banden durch Bestrahlung von UV-Licht (302 nm) durch Fluoreszenz (509 nm) sichtbar.

Verwendete Lösungen :

TBE-Puffer :	90 mM Tris/HCl    pH 8,4 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
BPB-Sucrose-Lösung. :	0,05 % (w/v) Bromphenolblau 60 % (w/v) Sucrose in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Ethidiumbromid-Lösung :	1 µg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

**6.1.9. DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ der Firma QIAGEN. Das entsprechende Gelstück wird nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid aus dem Gel ausgeschnitten und bei 50 °C in QX1-Puffer gelöst. Die erhaltene Lösung wird auf eine „*QIAquick Spin Column*“ mit einer Silicamembran gegeben und die DNA durch Zentrifugation an die Membran gebunden. Nach einem Waschschrift mit einem ethanolhaltigen Puffer wird die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. 5 µl der DNA-Lösung werden zur Überprüfung des Reinheits- und Konzentrationsgrades in einem Agarosegel analysiert.

Eine Arbeitsvorschrift und die verwendeten Puffer werden von der Firma QIAGEN im „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ bereitgestellt.

**6.1.10. TA-Klonierung**

Für die TA-Klonierung wurde von der Firma Invitrogen ein *TA Cloning Kit* zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in Plasmid-Vektoren entwickelt. Die Methode beruht darauf, daß die für die PCR-Reaktion verwendeten Polymerasen, wie *Taq*- oder *Tth*-*Polymerase*, am 3'-Ende des Amplifikates ein überstehendes Adenosin anhängen. Dieser 3'-A-Überhang dient zur Einführung des DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor, der an den komplementären 3'-Enden überstehende Thymin besitzt.

Bei der TA-Ligation werden die komplementären Enden des PCR-Produktes und des Vektors pCR™2.1 bzw. pCR™2.1-TOPO in einer „sticky end“-Ligation miteinander verknüpft. Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase des Phagen T4 werden die Phosphodiester-Bindungen der benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen des spontan über AT-Basenpaarung an den Vektor angelagerten PCR-Produktes gebildet. Mit Hilfe dieser Technik ist also eine direkte Insertion von PCR-Amplifikaten in bestimmte Vektorsysteme möglich, ohne die DNA-Fragmente enzymatisch zu modifizieren. Nach der Ligation kann sofort eine Transformation von *E. coli*-Bakterien mit der Plasmid-DNA erfolgen.

- Ligationsansatz : 6 µl PCR-Produkt  
2 µl pCR™II-Vektor (25 ng/µl)  
1 µl T4-Ligase (1U)  
1 µl 10× T4-Ligase-Puffer
- über Nacht bei 14°C inkubieren

Die Transformation mittels *TA Cloning Kit* ist ein Verfahren, um DNA in Wirtszellen einzubringen. Transformationskompetente Zellen besitzen die Fähigkeit Plasmide an ihrer Oberfläche zu adsorbieren. Die *E. coli*-Bakterien werden bei 0°C mit der Plasmid-DNA inkubiert, wobei sich die Plasmide an die Bakterienzellwand anlagern. Durch einen Hitzeimpuls bei 42°C wird die Zellmembran permeabel gemacht, so daß die Fremd-DNA in die Zellen eindringen kann. Nach der Transformation werden die *E. coli*-Zellen bei 37°C regeneriert und auf einem geeigneten Selektionsmedium ausgestrichen.

- kompetente Zellen [INVαF'] („One Shot™ Cells“) auf Eis auftauen
- Addition von 2µl β-Mercaptoethanol (0,5 M); vorsichtig mischen
- Addition eines Ligationsansatzes; vorsichtig mischen
- 30 min bei 0°C inkubieren (Adsorption)
- 45 s bei 42°C inkubieren (Membran-Permeabilität)
- 2 min auf Eis abkühlen
- Addition von 250 µl SOC-Medium
- 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubieren (Regeneration)
- je 50 µl X-Gal-Lösung auf LB<sup>Amp</sup>-Platten auftragen
- je 200 µl Kultur auf LB<sup>Amp</sup>-X-Gal-Platten ausstreichen
- LB<sup>Amp</sup>-Platten bei 37°C über Nacht inkubieren

→ Selektion von positiven Klonen (6.1.11.)

Verwendete Lösungen :

SOC-Medium :	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 1,8 g KCl in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,0
X-Gal-Lösung :	20 mg/ml X-Gal in 100%igem DMF

**6.1.11. Selektion von positiven Klonen**

Nach einem durchgeführten Gentransfer ist es notwendig, den Bakterienklon mit dem gewünschten Gen zu isolieren. Positive Klone besitzen eine Antibiotikaresistenz, welche durch ein Gen vermittelt wird, das auf dem einklonierten Vektor liegt. Daher wachsen auf antibiotikumhaltigen Nährböden nur diejenigen Bakterien, welche entweder den Vektor mit einklonierter Fremd-DNA oder den rezyklierten Vektor aufgenommen haben. Einige Vektoren ermöglichen über ein sogenanntes Kontrollgen eine weitere Selektionierung. Der pCR<sup>TM</sup>2.1-Vektor enthält ein Gen, welches für den N-Terminus der  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Auf dem Chromosom des Rezipientenstammes [INV $\alpha$ F'] liegt die für den C-Terminus kodierende Region. Durch  $\alpha$ -Komplementation der beiden Fragmente wird das Enzym aktiviert. Die aktive  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), mit dem die LB<sup>Amp</sup>-Platten beschichtet werden, zu einem blauen Indigofarbstoff.

Bei denjenigen Klonen, die die Fremd-DNA im Vektor aufgenommen haben, wird die  $\alpha$ -Komplementation aufgehoben. Diese Kolonien bleiben daher auf der LB<sup>Amp</sup>-Platte farblos. Die so selektierten Klone werden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung genauer charakterisiert.

**6.1.12. Restriktion von DNA**

Die Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) sind in der Lage spezifische palindrome DNA-Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren zu erkennen und den DNA-Strang an dieser Stelle zu hydrolysieren. Mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme werden

Vektoren und DNA-Inserts auf eine Ligation vorbereitet oder an Plasmiden nach erfolgter Transformation eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Für die hier beschriebenen Klonierungsexperimente werden die Restriktionsenzyme *Sall*, *NdeI*, *EcoRI* und *BamHI* verwendet.

- Restriktionsansatz :     5,0 µl wäßr. DNA-Lösung  
                              1,0 µl 10× Restriktionspuffer  
                              0,2 µl Restriktionsenzym 1  
                              0,2 µl Restriktionsenzym 2  
                              3,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Inkubation 90 min bei 37°C

→ DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen (6.1.8.)

### 6.1.13. DNA-Sequenzierung

Die Nukleinsäure-Sequenzierungen (Sanger *et al.*, 1977) wurden zunächst an dem „GATC 1500 Direct Blotting Electrophoresis“ DNA-Sequencer (GATC, Konstanz) mit Dioxigenin-markierten Oligonukleotiden durchgeführt (Durchführung M.O. Luther, Biochemie I, Universität Bielefeld). Später erfolgten die Sequenzierungen an einem „A.L.F.-DNA-Sequencer“ (Pharmacia Biotech, Schweden) und dem „LI-COR Sequencer“ (MWG Biotech) mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden beziehungsweise an dem „ABI-DNA-Sequencer“ (Perkin-Elmer) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Durchführung Dr. W. Engelhard, IIT, Universität Bielefeld). Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sequenzierprimer können die entstandenen DNA-Fragmente über einen Laser detektiert werden, so daß die Empfindlichkeit gegenüber dem ersten Verfahren erhöht ist.

### 6.1.14. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Tang *et al.*, 1994)

Damit *E.coli*-Zellen in einer Transformation Plasmide aufnehmen können, müssen sie durch Behandlung mit RbCl- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen in einen kompetenten Übergangszustand gebracht werden, welcher die Anlagerung von Plasmid-DNA ermöglicht. Die Zellen werden so auf eine Transformation vorbereitet.

- 200 ml LB-Medium mit 2 ml üN-Kultur eines Zellstammes animpfen
- Kultivierung bei 37°C bis eine OD<sub>578</sub> von 0,5 erreicht ist
- Kultur 10 min auf Eis abkühlen
- je 10 ml Kultur in vorgekühlte SM24-Zentrifugenröhrchen überführen
- Zellen 10 min bei 5000 rpm und 4°C pelletieren; Überstand verwerfen
- alle weiteren Schritte auf Eis !
- Pellet in 1 ml Transformationspuffer A (4°C) vorsichtig resuspendieren
- Lösung in gekühltes Eppendorfgefäß überführen
- Zellen 5 min bei 5000 rpm pelletieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml Transformationspuffer B (4°C) resuspendieren
- Kultur 30 min auf Eis inkubieren (Aufbrechen der Zellverbände)
- Zellen 5 min bei 5000 rpm pelletieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 200 µl Transformationspuffer B (4°C) resuspendieren
- 200 µl Glycerin zugeben; vorsichtig mischen

→ bei -78°C einfrieren (Lagerung)

→ Klonierung in Expressionsvektoren (6.1.15.)

#### Verwendete Lösungen :

Transformationspuffer A :	10 mM MOPS	pH 7,0
	10 mM RbCl	
	steril filtrieren	
Transformationspuffer B :	10 mM MOPS	pH 6,5
	10 mM RbCl	
	50 mM CaCl <sub>2</sub>	
	steril filtrieren	

### 6.1.15. Klonierung in Expressionsvektoren

Um ein DNA-Insert zu exprimieren ist es notwendig es in einen Expressionsvektor zu klonieren und in einem geeigneten *E. coli* Expressionsstamm zu vermehren. Mit den verwendeten pET-Expressionsvektoren ist es möglich die Expression einer klonierten DNA zu regulieren. Durch das *lac*-Operon in ihrem Promotor ist die Expression durch Zugabe von IPTG gezielt induzierbar. Direkt hinter dem Promotor befindet sich eine sogenannte „multiple cloning site“, d.h. eine Reihe von Restriktionsstellen, welche die Insertion eines DNA-Fragmentes über eine „sticky end“-Ligation ermöglicht. Dazu

werden sowohl der Vektor als auch das DNA-Insert durch Restriktionsenzyme linearisiert. Der Vektor wird außerdem noch mit Hilfe Alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine intramolekulare Religation zu verhindern.

Bei der Ligation werden Insert- und Vektor-DNA „*sticky end*“ kovalent verknüpft. Die DNA-Ligase des Phagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen der benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen des mit dem Vektor zusammengelagerten Inserts. Die Ausbeute der Ligationsreaktion ist abhängig vom Verhältnis Insert zu Vektor. Die größte Effektivität wird bei äquimolarem Ansatz erreicht. Ein weiterer die Ausbeute der Ligation bestimmender Faktor ist die DNA-Gesamtkonzentration. Um ein optimales Ergebnis bei der Ligation zu erreichen, wird das Verhältnis Insert zu Vektor in verschiedenen Ligationsansätzen variiert.

- Reaktionsansatz :
  - 1,0  $\mu\text{l}$  10 $\times$  T4-Ligase-Puffer
  - 0,5  $\mu\text{l}$  T4-Ligase
  - x  $\mu\text{l}$  Insert-DNA
  - y  $\mu\text{l}$  linearisierter Vektor
  - (8,5-x-y)  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Inkubation über Nacht bei 14°C

Anschließend werden mit dem Ligationsansatz kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Zellmembran der kompetenten Zellen wird in Verbindung mit einem Hitzeschock für Plasmid-DNA permeabel. Die aufgenommene DNA wird im weiteren von der Bakterienzelle wie zelleigene DNA behandelt, bei der Zellteilung repliziert und an beide Tochterzellen weitervererbt.

- kompetente Zellen auf Eis auftauen; 3  $\mu\text{l}$  DMSO zugeben
- Ligationsansätze zugeben und vorsichtig mischen
- Inkubation 30 min auf Eis
- 1 min bei 42°C inkubieren (Hitzeschock)
- Kultur 2 min auf Eis regenerieren
- Addition von 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium
- Inkubation 1 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator
- 200  $\mu\text{l}$  Kultur auf LB<sup>Amp</sup>-Platten ausstreichen
- Inkubation ün bei 37°C



## 6.2. Proteinchemische Methoden

### 6.2.1. Genexpression in *E. coli*-Zellen

Viele eukaryotische Proteine von industriellem und pharmazeutischem Interesse lassen sich durch ihre geringe natürliche Verfügbarkeit nicht in ausreichenden Mengen gewinnen. Mit Hilfe der Genklonierung und Expression in Gastorganismen läßt sich das gewünschte rekombinante Protein jedoch in ausreichender Menge rekombinant herstellen. Expressionen in *E. coli*-Zellen sind möglich, solange das Protein für seine biologische Aktivität keine Glykosylierung benötigt. Auf diese Weise entsteht eine äußerst kostengünstige Methode zur Herstellung rekombinanter Proteine, welche jedoch in großen Mengen nur in denaturierter, also biologisch inaktiver Form isoliert werden. Es sind daher noch Aufarbeitungsschritte zur Faltung des Proteins in seine aktive Konformation erforderlich. Kleinere Mengen sind über das Periplasma auch in nativer Form erhältlich.

Vor der Induktion der Expression wird die Expressionskultur bis zu einem exponentiellen Wachstum kultiviert. In dieser Phase liegt zum einen eine ausreichend große Anzahl an *E. coli*-Zellen vor, zum anderen finden die Zellen optimale Bedingungen zur Expression vor.

- 750 ml LB-Medium werden in einem Fernbachkolben autoklaviert und anschließend mit 750 µl Amp<sup>200</sup> versetzt
- je Fernbachkolben wird mit 7,5 ml einer üN-Kultur der Expressionskultur angeimpft
- bei 37°C im Schüttelinkubator inkubieren, bis eine OD<sub>578</sub> von ca. 0,6 erreicht ist
- Expressionskultur mit 300 µl IPTG induzieren
- 4 h bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubieren

→ Expressionskontrolle (6.2.2.)

→ Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „inclusion bodies“ (6.2.3.)

#### Verwendete Lösungen :

IPTG-Lösung : 1 M IPTG in H<sub>2</sub>O

### 6.2.2. Expressionskontrolle

Zur Kontrolle wird der Expressionskultur vor und in stündlichen Abständen nach der Induktion eine Probe entnommen. Die Proben werden denaturiert und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Eine erst nach der Induktion auftretende Proteinbande, die mit der Zeit stärker wird, deutet auf die Expression eines rekombinanten Proteins hin. Die aus der Basensequenz der klonierten cDNA berechnete Größe des Proteins kann als erster Hinweis auf dessen Expression hinweisen.

- vor und stündlich nach der Induktion entnimmt man der Expressionskultur eine Probe von 1 ml
- Proben 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 300 µl Laemmli-Puffer resuspendieren und 10 min auf 100°C erhitzen

→ SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (6.2.4.)

#### Verwendete Lösungen :

Laemmli-Puffer :	50 mM Tris/HCl	pH 6,8
	1% (w/v) SDS	
	8 M Harnstoff	
	30 mM NaCl	
	1% (v/v) β-Mercaptoethanol	
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau	

### 6.2.3. Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „*inclusion bodies*“

Nach der Genexpression erhält man durch Zentrifugation ein Zellpellet. Um ein rekombinantes Protein zu isolieren, wird zunächst durch Lysozym das Mureingerüst der Bakterienzellwand enzymatisch abgebaut. Man erhält die sogenannten „Spheroplasten“, die noch von der Zellmembran umgeben sind. Diese wird dann durch Zugabe einer Lösung mit hohem Salz- und Detergenzgehalt aufgelöst. Das rekombinante Protein liegt jetzt in sogenannten *inclusion bodies* (*ibs*) vor, welche auf Grund ihrer hohen spezifischen Dichte durch Zentrifugation von dem Großteil der anderen Zellbestandteile abgetrennt werden können. Die *ibs*, welche zum Großteil aus

Oligomeren des rekombinanten Proteins bestehen, sind unter physiologischen Pufferbedingungen nicht löslich. Ihre Solubilisierung erfolgt durch Behandlung mit starken Denaturierungsmitteln, wie 6 M Harnstoff und  $\beta$ -Mercaptoethanol.

- 4 h nach der Induktion wird die Bakteriensuspension in 1l-Tubes überführt
- 20 min bei 5000 rpm zentrifugieren; Überstand vorsichtig abdekantieren
- Pellet in 70 ml Zellysepuffer pro g Pellet suspendieren und im Ultra-Turrax homogenisieren
- pro ml Zellysepuffer 0,02 mg Lysozym zugeben
- 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubieren
- 2,6 g NaCl und 1 ml Triton X-100 zugeben und 10 min auf Eis rühren
- Homogenisat in 250 ml-Tubes überführen; 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 20 ml Waschpuffer I pro g Pellet im Ultra-Turrax resuspendieren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 20 ml Waschpuffer II pro g Pellet im Ultra-Turrax resuspendieren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 50 ml Aufschluß-Puffer mit Ultra-Turrax resuspendieren
- über Nacht bei Raumtemperatur rühren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren; evtl. entstandenes Pellet verwerfen
- Überstand (ib-Lösung) bei 4°C lagern

#### Verwendete Lösungen :

Zellysepuffer :	100 mM Tris/HCl    pH 8,5 20 mM EDTA 2mg/100 ml Lysozym in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Waschpuffer I :	50 mM Tris/HCl    pH 8,5 1 M Harnstoff 1,5 % (v/v) Triton X-100 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Waschpuffer II :	50 mM Tris/HCl    pH 8,5 1 M Harnstoff in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Aufschluß-Puffer :	50 mM Tris/HCl    pH 8,5 8 M Harnstoff 0,2 M NaCl 150 mM $\beta$ -Mercaptoethanol in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

#### 6.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteingemische entsprechend der Größe der Proteine auftrennen. Das Prinzip ist, wie bei der DNA-Gelelektrophorese, die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld.

Die zu untersuchende Probe wird vor der Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Zum einen wird so die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen, zum anderen lagern sich die SDS-Moleküle an die Aminosäuren an. Die Proteine erhalten auf diese Weise eine negative Ladung, die proportional ihrer molaren Masse ist. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit ausschließlich nach ihrer Größe und der Porengröße der Gelmatrix (Weber *et al.*, 1969).

Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgt bei geringerer Empfindlichkeit (ab 2 µg Protein) durch Coomassie-Blue-Färbung und bei hoher Empfindlichkeit (ab 0,02 µg Protein) durch Silberfärbung. Die Größen der aufgespaltenen Proteine werden durch Vergleich mit einem Proteinstandard, der Proteine bekannter Größe enthält, bestimmt.

Als Gelmatrix wird ein Polyacrylamid(PAA)-Gel mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzungsreagenz verwendet. Durch Variation der Acrylamidkonzentration lässt sich die Porengröße des Gels festlegen. Die Polymerisation des Acrylamids wird radikalisch mit Ammoniumperoxid (APS) gestartet.

##### Vorschrift für ein 10%iges PAA-Gel :

- 6 ml Gelpuffer, 3ml Acrylamidlösung und eine Spatelspitze APS mischen
- Gel-Lösung zwischen zwei durch Spacer getrennte und mit einer Silikondichtung versehenen Glasplatten gießen
- Teflonkamm zur Taschenbildung einsetzen
- Polymerisation ca. 30 min
- Teflonkamm und Silikondichtung entfernen und Gel in eine Elektrophorese-Kammer einspannen
- Kammer mit Elektrodenpuffer befüllen
- Proben in Geltaschen einpipettieren

Die Wahl des Probenpuffers richtet sich nach den Bedingungen, unter denen die Elektrophorese durchgeführt werden soll. Für reduzierende Bedingungen wird den Proben Laemmli-Puffer zugesetzt. Die Disulfidbrücken der Proteine werden dann durch

das enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert und globuläre Proteine werden in ihre Untereinheiten getrennt. Unter nichtreduzierenden Bedingungen wird dem Laemmli-Puffer kein  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt. Zur Vorbereitung zur Elektrophorese werden die Proben im Verhältnis 10:1 mit Probenpuffer gemischt und 10 min auf 100°C erhitzt (Denaturierung). Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front die untere Gelkante erreicht. Bei Coomassie-Blue-Färbung verwendet man 8  $\mu$ l eines Molekulargewichtstandards (LMW-Marker), bei Silberfärbung 2  $\mu$ l.

#### Verwendete Lösungen :

Gelpuffer :	1,5 M Tris/HCl	pH 9,4
	4 % (w/v) SDS	
	0,25 % (v/v) TEMED	
Acrylamidlösung :	30 % (v/v) Acrylamid/H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	0,9 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid/H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
Elektrodenpuffer :	25 mM Tris/Glycin	pH 8,6
	0,1 % (w/w) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
LMW-Marker :	Phosphorylase B	94.000 Da
	Albumin	67.000 Da
	Ovalbumin	43.000 Da
	C-Anhydrase	30.000 Da
	Trypsininhibitor	20.100 Da
	$\alpha$ -Lactalbumin	14.400 Da

#### **6.2.5. Coomassie-Blue-Färbung**

*Coomassie Blue* lagert sich an Arginin-Reste von Proteinen an und wird sichtbar nach Auswaschen von überschüssigem Farbstoff. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit lässt sich zu der Färbelösung Natriumpikrat zusetzen.

- Gel oder PVDF-Membran in einer Coomassie-Blue-Lösung ca. 30 min färben
- Gel oder PVDF-Membran solange in H<sub>2</sub>O waschen, bis der Hintergrund entfärbt ist und die Banden gut sichtbar sind

Verwendete Lösungen :

Coomassie-Blue-Lösung :            0,1% (w/v) Coomassie-Blue in Fixierlösung  
 evtl. 0,1 M Natriumpikrat

### 6.2.6. Silberfärbung von PAA-Gelen (Heukeshoven und Dernick, 1988)

Bei der Silberfärbung bilden Ag<sup>+</sup>-Ionen Komplexe mit Asp-, Glu- und Cys-Resten der Proteine. Durch Formaldehyd im alkalischen Milieu wird das Ag<sup>+</sup>-Ion der Komplexe zu elementarem Silber, welches im Gel sichtbar wird, reduziert.

- Gel 10 min in Fixierlösung schütteln
- Gel 3 min in wässriger Lösung von Farmers Reducer inkubieren
- Gel bis zur vollständigen Entfärbung in H<sub>2</sub>O waschen
- Gel 20 min in 0,1 %iger Silbernitrat-Lösung inkubieren
- Gel dreimal 30 s in H<sub>2</sub>O waschen
- Gel in 2,5 %ige Natriumcarbonat-Lösung geben
- 150  $\mu$ l 35 %ige Formaldehydlösung zugeben
- bei gewünschter Farbintensität Färbung mit 10 %iger Essigsäure stoppen

Verwendete Lösungen :

Fixierlösung :                          5:5:1 (v/v/v) Ethanol/Wasser/Essigsäure

Farmers Reducer :                    16 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O  
 10 g/l K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]

### 6.2.7. Immobilisierung von Proteinen durch Elektroblothing

Das Elektroblothing ist ein Verfahren, mit dem gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen und somit immobilisiert werden. Die Bindung der Proteine an die Blotmembran (bestehend aus Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)) erfolgt durch ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen.

- SDS-Gelelektrophorese der Proteinprobe
- 2 Blot-Filterpapiere für 10 min in Blotpuffer oder Sequenzierpuffer inkubieren
- Blot-Membran für 10 min in Ethanol inkubieren
- Blot-Sandwich blasenfrei zusammenlegen :
  1. Filterpapier
  2. PAA-Gel
  3. Blot-Membran
  4. Filterpapier
- Blotsandwich mit PAA-Gel zur Kathode orientiert in Blotapparatur legen
- bei 150 mA blotten; Dauer richtet sich nach Proteingröße : 1 min pro kDa MW  
→ Mikrosequenzierung nach Edman (6.2.8.)

→ Immunologischer Nachweis von Proteinen (6.2.9.)

#### Verwendete Lösungen :

Blotpuffer :                                      25 mM Tris/HCl      pH 8,7  
    190 mM Glycin  
    10% Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Sequenzierpuffer :                              50 mM Borsäure/NaOH    pH 9,0  
    20 % (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 6.2.8. Mikrosequenzierung nach Edman (Reinke *et al.*, 1991)

Für die Mikrosequenzierung nach Edman genügen ca. 10 µg Protein, um Sequenzen von 20 bis 30 Aminosäuren des Proteins zu ermitteln. Diese Anzahl an Aminosäuren reicht in der Regel aus, um die Identität eines Proteins zweifelsfrei zu ermitteln. Beim automatisierten Edman-Abbau baut ein Sequenzierer die Proteine vom N-Terminus sukzessive ab und identifiziert die Aminosäuren als Derivate in einer angeschlossenen HPLC-Anlage.

### 6.2.9. Immunologischer Nachweis von Proteinen (Blake *et al.*, 1984)

Der immunologische Nachweis von Proteinen oder Proteinfragmenten (Western Blot) erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die die immobilisierten Proteine komplexieren. Diese werden in einem weiteren Schritt mit einem mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugierten 2. Antikörper detektiert. Das chromophore Substrat NBT/BCIP wird dann von der Alkalischen Phosphatase gespalten und an der Stelle des Protein-Antikörper-2.Antikörper-Komplexes erscheint eine dunkle Bande.

- LMW-Marker von der Blot-Membran abtrennen und nach der Coomassie-Blue Methode färben
- Blot-Membran 30 min in Blockier-Lösung inkubieren
- 5 µl spezifische Antikörperlösung (2 mg/ml) zugeben und über Nacht schütteln
- Blot-Membran dreimal 10 min mit TBST-Puffer waschen
- Blot-Membran 2h in TBST-Puffer mit 2µl anti Maus-IgG-AP-Konjugat inkubieren
- Blot-Membran zweimal 10 min mit TBST-Puffer waschen
- Blot-Membran zweimal 10 min mit AP-Puffer waschen
- Blot-Membran in Färbelösung inkubieren, bis die Banden deutlich sichtbar sind
- Blot-Membran trocknen und unter Lichtausschluß aufbewahren

#### Verwendete Lösungen :

TBST-Puffer :                      20 mM Tris/HCl      pH 7,5  
   500 mM NaCl  
   0,5 % Tween 20 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Blockier-Lösung :                      2 % BSA in TBST-Puffer

AP-Puffer :                              100 mM Tris/HCl      pH 9,5  
   100 mM NaCl  
   5 mM MgCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Färbelösung :                              70 µl NBT und 35 µl BCIP in 20 ml AP-Puffer



### 6.2.10. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wird bevorzugt zur ersten Reinigung des „*ib*-Aufschlusses“ verwendet, da ein - im Vergleich zu anderen Chromatographien - relativ großes Probenvolumen eingesetzt werden kann.

Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, daß Proteine aufgrund ihrer Nettoladung an eine geladene Säulenmatrix binden. Je nach Stärke der Wechselwirkungen, die von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers und dem isoelektrischen Punkt des Proteins abhängen, können die Proteine dann mit einem ansteigenden Salzgradienten oder pH-Gradienten eluiert werden. In dieser Arbeit wurden als Ionenaustauschmaterialien DEAE-Sephrose, ein schwacher Anionenaustauscher, und Q-Sephrose, ein starker Anionenaustauscher, eingesetzt. Regeneration, Beladen und Waschen des Säulenmaterials wurden nach Standardvorschrift (Manual Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,7 M NaCl.

### 6.2.11. Gelfiltration

Bei der Gelfiltration wird eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe und Form (Stokes Radius) unabhängig von ihrer Ladung erreicht. Die stationäre Phase der Säule besteht aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten, quervernetzten Polymers mit definierter Porengröße wie Dextran, Agarose oder Polyacrylamid.

Die Trennung beruht darauf, daß größere Proteine die Säule schneller durchlaufen als kleinere, da kleinere Proteine in die Gelkügelchen hineindiffundieren können und somit verzögert eluiert werden.

Für die Durchführung wird eine Sephacryl S-100-Säule (l=85 cm, Ø=3 cm, V=600 ml) mit maximal 5 ml Probe beladen. Die Chromatographie erfolgt bei 4 °C und mit einer Flußrate von 12 ml/h. Das Eluat wird fraktioniert gesammelt.

#### Verwendete Lösungen :

Gelfiltrationspuffer :	50 mM Tris/HCl	pH 8,5
	4 M Harnstoff	
	200 mM NaCl	
	40 mM $\beta$ -Mercaptoethanol in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

### 6.2.12. „Reversed Phase“-HPLC (Fallon *et al.*, 1987)

Bei der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wird die mobile Phase unter hohem Druck durch die Säule gepumpt. Durch die Verwendung von verfeinerten Säulenmaterialien und deren dichter Packung werden bessere Trennleistungen und Retentionszeiten erreicht. Die RP-HPLC („Reversed Phase“-HPLC) ist eine Variante der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie. Im Gegensatz zur konventionellen Methode ist bei ihr die stationäre Phase jedoch unpolarer als die mobile. Die RP-HPLC wird zur Isolierung von Insulin-Spaltprodukten eingesetzt. Die Trennung der Peptide erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten.

RP-HPLC-Programm :

Zeit [min]	Parameter
0 – 5	0 % Puffer B
5 – 55	0-50 % Puffer B, linear
55 – 65	50-100 % Puffer B, linear
65 – 70	100 % Puffer B
70 – 75	100-0 % Puffer B, linear

Verwendete Lösungen :

Puffer A : 0,1 % TFA (v/v) in H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub>

Puffer B : 80 % (v/v) Acetonitril  
0,09 % TFA (v/v) in H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub>

### 6.2.13. *In vitro*-Faltung von rekombinanten Proteinen

Denaturierte Polypeptidketten falten sich *in vitro* spontan unter physiologischen Pufferbedingungen. Es bestehen grundsätzlich sehr viele Möglichkeiten einer Faltung, jedoch nur eine von ihnen führt zur korrekten biologisch aktiven Konformation. Um den Anteil der Fehlfaltungen möglichst gering zu halten, werden *in vitro* Faltungen bei sehr geringen Proteinkonzentrationen und bei niedrigen Temperaturen durchgeführt. Sind für die korrekte dreidimensionale Struktur des Proteins auch Disulfidbrücken verantwortlich, wird die richtige Verbrückung durch ein Redox-System unterstützt (6.2.14.).

Die Fibronectin-Gelatinasen (pFnGel und cFnGel) weisen keine Disulfidbrücken auf. Sie werden nach der Aufreinigung an Q-Sepharose-Material gebunden, um eine räumliche Trennung der einzelnen Moleküle zu erreichen. Danach werden dem Bindungspuffer in einem linearen Gradienten die denaturierenden Reagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol und Harnstoff entzogen. Die Elution erfolgt mittels eines NaCl-Gradienten (0 - 0,7 M), das Eluat wird anschließend gegen TRIS-Puffer dialysiert und kann dann für Aktivitätstests eingesetzt werden.

#### Verwendete Lösungen :

TRIS-Puffer :	50 mM Tris/HCl	pH 7,5
	200 mM NaCl	
	0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	0,005 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

#### **6.2.14. *In vitro* Faltung durch das Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol (modifiziert nach Buchner *et al.*, 1992)**

Die Proteine Fibronectinase und Fibronectin-Typ IV-Kollagenase enthalten mehrere Disulfidbrücken. Um eine korrekte Verbrückung der Cysteine zu erreichen wird für die Faltung ein Redoxsystem bestehend aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol verwendet. Dieses sogenannte *oxido-shuffling-system* ermöglicht sowohl die Knüpfung von Disulfidbrückenbindungen als auch deren Aufbrechen bei einer Fehlfaltung.

5 ml der aufgereinigten Proben werden zunächst gegen TRIS-Puffer dialysiert und anschließend schnell in dem 50-fachen Volumen an GSSG-Puffer verdünnt. Nach viertägiger Inkubation bei 4 °C werden die Proben durch Ultrafiltration auf 5 ml eingeeengt und wiederum gegen TRIS-Puffer dialysiert. Anschließend können die Proben für Aktivitätstests eingesetzt werden.

Verwendete Lösungen :

GSSG-Puffer :	50 mM Tris/HCl	pH 7,5
	200 mM NaCl	
	0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>	
	0,1 M L-Arginin	
	10 mM Glutathion (oxidiert)	
	3 mM DTT	
	0,005 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

**6.2.15. Ultrafiltration**

Die Ultrafiltration dient zur schonenden Konzentrierung gelöster Proteine unter gleichbleibenden Pufferbedingungen. Durch einen Überdruck ( $p(N_2) = 3 \text{ bar}$ ) wird die verdünnte Proteinlösung bei 4 °C über eine asymmetrische Membran (YM3-Membran), welche für Proteine undurchlässig ist, filtriert und so konzentriert.

**6.2.16. Zymographie (Heussen und Dowdle, 1980)**

Die Zymographie mittels eines PAA-Substratgels dient als Aktivitätsnachweis für Proteine, die das entsprechende Substrat spezifisch spalten. Sie unterscheidet sich von der SDS-PAGE dadurch, daß dem PAA-Gel zusätzlich ein potentiell Substrat (Gelatin, Fibronectin, Casein u.s.w.) zugesetzt wird. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel über Nacht zur Renaturierung in TRIS-Puffer inkubiert und anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt. Dabei wird das gesamte Gel aufgrund des Substrates blau gefärbt und nur die Stellen, an denen das Gelatin gespalten wurde, also die diskreten Proteinbanden der aktiven Fragmente, bleiben farblos.

- 12 mg Substrat in 7,5 ml Gelpuffer unter Aufkochen lösen und abkühlen lassen
  - 1,25 ml H<sub>2</sub>O, 3,75 ml Acrylamidlösung (30 %) und APS zugeben
  - Proben mit Substratgel-Laemmli-Puffer mischen und auf Gel auftragen
  - Gelelektrophorese bei 20 mA durchführen
  - Gel zweimal 30 min mit 2,5 % (w/v) Triton X-100 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen
  - Gel dreimal 1 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen
  - Gel über Nacht bei 37°C in TRIS-Puffer inkubieren
- Coomassie-Blue-Färbung (6.2.5.)





### 7.1.2. TA-Klonierung des PCR-Amplifikates in den pCR™2.1-Vektor

Nach der Auftrennung des PCR-Reaktionsansatzes durch DNA-Gelelektrophorese wurde das 726 bp große Amplifikat mit dem „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ isoliert und gereinigt (6.1.9.). Das Fragment wurde anschließend mittels TA-Klonierung (6.1.10.) mit dem linearisierten pCR™2.1-Vektor ligiert und das entstandene Plasmid in Zellen des *E. coli*-Stammes [INVαF'] eingeschleust. Die Blau/Weiß-Selektion ermöglichte die Identifizierung von potentiellen Rekombinanten, da die in das Plasmid eingebrachte DNA die kodierende Sequenz des β-Galactosidasegens unterbrach. Mit Hilfe von X-Gal konnten die positiven Bakterienkolonien selektiert werden, die in Übernachtkulturen vermehrt wurden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA der entsprechenden *E. coli*-Kulturen isoliert und einer Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *NdeI* und *BamHI* unterzogen. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden zur Größenbestimmung durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 16).

Abb. 16 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse der in den PCR™2.1-Vektor insertierten cDNA.

Bahn 1 : 1 kb-Leiter

Bahn 2 : Plasmid-DNA nach Restriktion mit *EcoRI*

Bahn 3 : Plasmid-DNA nach Restriktion mit *NdeI/BamHI*

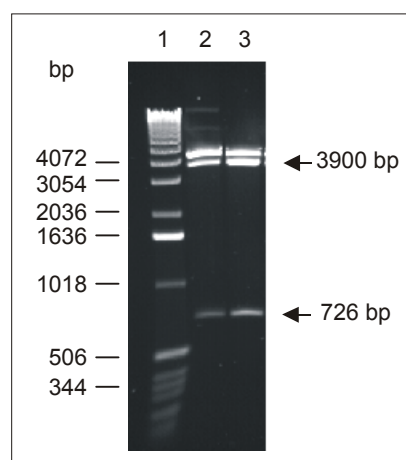


Abb. 16 zeigt neben der Bande des linearisierten pCR™2.1-Vektors bei ca. 3900 bp ein weiteres Fragment mit einer Größe von 726 bp, welches durch Restriktion sowohl mit *EcoRI* als auch mit *NdeI/BamHI* entsteht. Die durch PCR amplifizierte Fibronectinase-DNA wurde also in den pCR™2.1-Vektor ligiert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die *NdeI*- und *BamHI*-Spaltstellen an den Enden der DNA eingefügt und von den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erkannt wurden.

### 7.1.3. DNA-Sequenzierung des Fnase/pCR™2.1-Plasmids

Um die erhaltene Insert-DNA auf die korrekte Abfolge der Basensequenz zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierung (6.1.13.) des mit dem pCR™2.1-Vektor ligierten PCR-Produktes durchgeführt. Die Insert-DNA konnte so auf eventuelle Mutationen, Deletionen oder Insertionen überprüft werden. Nicht zuletzt sollte die erfolgreiche Einführung der Schnittstellen, Start- und Stopcodons bestätigt werden.

Die durchgeführte Sequenzierung bewies die korrekte Klonierung des DNA-Fragmentes in den pCR™2.1-Vektor mit den entsprechenden Schnittstellen, Start- und Stopcodons. Ein Sequenzvergleich mit der bekannten Sequenz des Fibronektins ergab eine vollständige Übereinstimmung in allen Basen (Kornbliht *et al.*, 1983).

### 7.1.4. Klonierung der Fibronektinase-cDNA in Expressionsvektoren

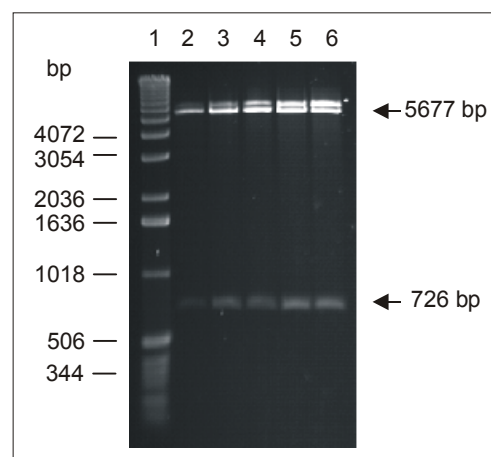
Für die bakterielle Expression der Fibronektinase war es notwendig, das entsprechende cDNA-Fragment in einen induzierbaren T7-Expressionsvektor zu klonieren. Zu diesem Zweck wurde das für die Fibronektinase kodierende Fragment mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* aus dem pCR™2.1-Vektor gespalten und isoliert. Gleichzeitig wurde auch der Expressionsvektor pET-11a mit der Enzymkombination *NdeI/BamHI* linearisiert und durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase vor Religation geschützt. Die Ligationsansätze aus Fibronektinase-cDNA und linearisiertem Vektor wurden verwendet, um kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes [JM83], ein „high copy“-Stamm, der eine große Anzahl an Plasmiden bereitstellt und so die Kontrolle der Transformation erleichtert, zu transformieren.

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden in Übernachtskulturen vermehrt und ihre Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* wurden die Plasmide auf eine erfolgreiche Ligation und Transformation untersucht.

Abb. 17 zeigt das Agarosegel der Restriktionsanalyse von fünf erfolgreich rekombinierten Fnase/pET-11a-Klonen mit den Banden der Fibronektinase-cDNA (726 bp) und des linearisierten Vektors (5677 bp).



Abb. 17 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionskontrolle der Fibronektinase im pET-11a-Vektor durch die Enzyme *NdeI* und *BamHI*.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2-6 : Restriktion von Fnase/pET-11a



Zur Expression der Fibronektinase wurden kompetente Zellen der *E. coli* Expressionsstämme [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] mit den erhaltenen Plasmiden transformiert. Die Analyse von potentiellen rekombinanten Klonen erfolgte wiederum durch Restriktionskontrolle mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* und bestätigte die erfolgreiche Transformation beider Expressionsstämme.

Für die Expression der Fibronektinase standen somit die folgenden zwei potentiellen Expressionssysteme zur Verfügung :

**Fnase / pET-11a / [BL21(DE3)]**

**Fnase / pET-11a / [HMS174(DE3)]**

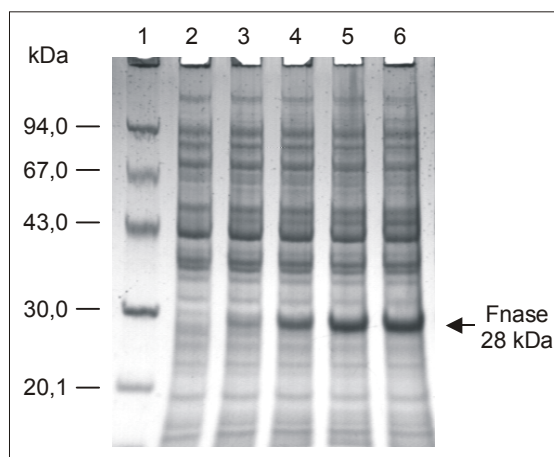
## **7.2. Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronektinase**

### **7.2.1. Expression von Fibronektinase in *E. coli***

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung der für die Fibronektinase kodierenden cDNA wurden die erhaltenen Expressionssysteme in Testexpressionen daraufhin untersucht, ob sie die Fibronektinase korrekt produzieren.

Die entsprechenden Klone wurden dazu in 50 ml Kulturen kultiviert und die Genexpression bei einer optischen Dichte von 0,6 mit IPTG induziert. Vor der Induktion und 1, 2, 3 und 4 Stunden nach der Induktion wurde den Kulturen jeweils 1 ml Probe entnommen. Diese Proben wurden pelletiert, in Lämmli-Puffer aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 18).

Abb. 18 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Genexpression von Fnase/pET-11a/[BL21(DE3)] nach Coomassie-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion  
Bahn 3-6 : Kulturproben 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion



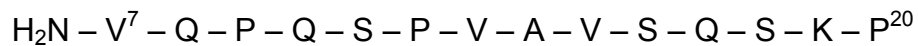
Das PAA-Gel der Expressionskontrolle zeigt die deutliche Bande eines überexprimierten Proteins. Das abgeschätzte Molekulargewicht von 28 kDa stimmt gut mit dem für die Fibronectinase berechneten Molekulargewicht von 27,2 kDa überein, wobei das Maximum der Expression nach 3-4 h erreicht ist. Das gleiche Ergebnis wurde auch für das Expressionssystem Fnase/pET-11a/[HMS174(DE3)] erreicht, so daß für die Produktion der Fibronectinase zwei funktionierende Systeme zur Verfügung standen.

Für die Produktion der rekombinanten Fibronectinase in größeren Mengen wurden Großexpressionen im 4,5 l-Maßstab mit dem Expressionssystem Fnase/pET-11a/[BL21(DE3)] durchgeführt. Vier Stunden nach Induktion wurde die Expression durch Zentrifugation der Bakterienkultur gestoppt. Nach Zellaufschluß konnten so durchschnittlich 2,3 g Rohprotein pro Liter Bakterienkultur isoliert werden.

### 7.2.2. Identifizierung des Genproduktes durch N-terminale Sequenzierung

Für den Identitätsnachweis des überexprimierten 28 kDa-Proteins wurde eine Probe der Expressionskultur gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Coomassie-Blue gefärbt, die entsprechende Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten und der Sequenzierung mittels automatisiertem Edman-Abbau zugeführt. Wie schon in der Literatur beschrieben (Lambert Vidmar, 1991a) war auch hier der N-Terminus der Fibronectinase blockiert. Erst durch Spaltung mit Bromcyan erhielt man ein Fragment, welches für die Sequenzanalyse zugänglich war.

Für die ersten 14 Aminosäuren wurde folgende Sequenz erhalten :



Der ermittelte N-Terminus entspricht einer Region in der Nähe des N-Terminus des Fibronektins und somit der Fibronektinase. Die Sequenz V<sup>7</sup>-P<sup>20</sup> stimmt zu 100 % mit der bekannten Fibronektin-Sequenz überein (Garcia-Pardo *et al.*, 1983). Somit konnte das überexprimierte 28 kDa-Protein eindeutig als Fibronektinase identifiziert werden.

### 7.2.3. Reinigung der rekombinanten Fibronektinase

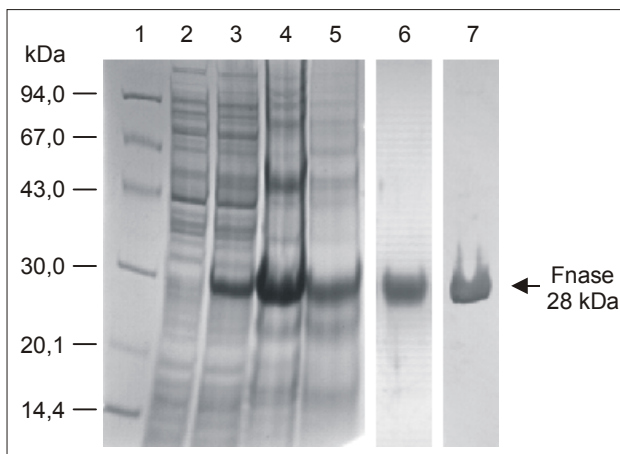
Nach der erfolgreichen Etablierung der Expressionssysteme für die Fibronektinase mußte ein Verfahren zur Reinigung entwickelt werden, welches das rekombinante Protein in ausreichender Quantität und Reinheit für Aktivierungs- und Charakterisierungsexperimente zur Verfügung stellt. In den gewählten Wirt-Vektor-Systemen wird das rekombinante Protein intrazellulär in Form von *inclusion bodies* abgelagert. Nach der Zellyse und mehreren Waschschrinen mit einem 1 M Harnstoff-Puffer konnte die *inclusion body*-Fraktion mit der Fibronektinase unter denaturierenden Bedingungen in einem Aufschluß-Puffer ( 8 M Harnstoff und 150 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) solubilisiert werden (Abb. 19, Bahn 4).

Zur weiteren Vorreinigung des rekombinanten Proteins wurde eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose gewählt. Die denaturierte Fibronektinase konnte unter alkalischen Bedingungen (pH 8,5) an den schwachen Anionenaustauscher gebunden werden. Mit Hilfe von Waschschrinen und unter Verwendung eines Salzgradienten (0-0,7 M NaCl) zur Elution konnten weitere Fremdproteine abgetrennt und die Fibronektinase weiter angereichert werden (Abb. 19, Bahn 5). Ein weiterer Vorteil der Ionenaustauschchromatographie ist die hohe Kapazität des Säulenmaterials, so daß große Mengen rekombinanter Proteine aufgearbeitet werden konnten.

Über eine Gelfiltration an Sephacryl S-100 erfolgte schließlich die Reinigung der Fibronektinase bis zur Homogenität. Abb. 19 (Bahn 6) zeigt das vollständig von Fremdproteinen befreite Expressionsprodukt. Die Lagerung der zusammengeführten Fibronektinase-haltigen Fraktionen konnte über mehrere Monate bei 4 °C erfolgen.

Abb. 19 : Reinigung der Fibronektinase

- Bahn 1 : LMW-Marker
- Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion
- Bahn 3 : Kulturprobe nach Induktion
- Bahn 4 : *inclusion body*-Aufschluß
- Bahn 5 : Fnase nach DEAE-Sepharose
- Bahn 6 : Fnase nach Sephacryl S-100
- Bahn 7 : Western-Blot der Fnase



#### 7.2.4. Immunologischer Nachweis der Fibronektinase

Der immunologische Nachweis der Fibronektinase erfolgte im Western-Blot mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die N-terminale Region von Plasma-Fibronectin („*mouse-anti-human fibronectin (N-terminal) monoclonal antibody*“, Chemicon International Inc., Temecula, California).

Eine Probe der vereinigten Fnase S-100-Fractionen wurde zunächst durch Elektroblothing auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit dem monoklonalen Antikörper komplexiert. Durch einen mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugierten 2. Antikörper wurde dieser Komplex erkannt und durch das chromophore Substrat NBT/BCIP detektiert. Abb. 19 (Bahn 7) zeigt im Western-Blot eine Protein-Bande, die in ihrer Größe der Fibronektinase-Bande im PAA-Gel entspricht.

Die Fibronektinase konnte somit nach der Expression in *E. coli* durch das oben beschriebene Reinigungssystem homogen erhalten werden. Durch die N-terminale Sequenzierung und den immunologischen Nachweis wurde das Expressionsprodukt eindeutig als das Zielprotein identifiziert.

### **7.3. Faltung und Charakterisierung der rekombinanten Fibronektinase**

#### **7.3.1. Faltung von Fnase durch das Redoxsystem Gluthation/Dithiothreitol**

Um die denaturierte rekombinante Fibronektinase in ihrer biologisch aktiven Konformation zu erhalten, mußte zunächst eine Methode zur korrekten Faltung entwickelt werden. Desweiteren war eine autolytische Prozessierung (2.2.1.) notwendig, um das renaturierte Enzym zu aktivieren.

Die Fibronektinase enthält 10 Disulfidbrücken. Um die korrekte Verbrückung der Cysteine zu erreichen, wurde für die Faltung ein Redox-System, bestehend aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol, verwendet. Dieses sogenannte *oxido-shuffling*-System ermöglicht sowohl die Knüpfung einer Disulfidbrückenbindung als auch deren Aufbrechen bei einer energetisch ungünstigen Fehlfaltung. Die gereinigten Proteinfraktionen wurden dazu mit dem Faltungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt und vier Tage bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch Ultrafiltration konzentriert und gegen TRIS-Puffer dialysiert. Bei der Analyse der Faltungsreaktionen durch SDS-PAGE konnte keine definierte Bandenstruktur sondern nur eine diffuse Bande (22-27 kDa) detektiert werden. Diese Beobachtung ist zum einen auf die hohe statistische Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung aufgrund der hohen Anzahl von Disulfidbrücken zurückzuführen, zum anderen besteht die Möglichkeit einer vorzeitigen Prozessierung, die eine Reihe von Proteinfragmenten ähnlichen Molekulargewichts hervorbringen kann. Auch nach der Aktivierung der Fibronektinase ( $\text{Ca}^{2+}$ , 48 h, 37°C) konnten keine definierten Banden im PAA-Gel nachgewiesen werden.

Eine detaillierte Beschreibung der Prozessierung durch SDS-PAGE und Aminosäure-Sequenzierung war somit nicht möglich. Ferner mußte durch eventuelle Fehlfaltungen ein Ausbeuteverlust an aktivem Enzym erwartet werden. Die Überprüfung der korrekten Faltung und Prozessierung mußte somit über Aktivitätstests mit einem bekannten Substrat erfolgen.

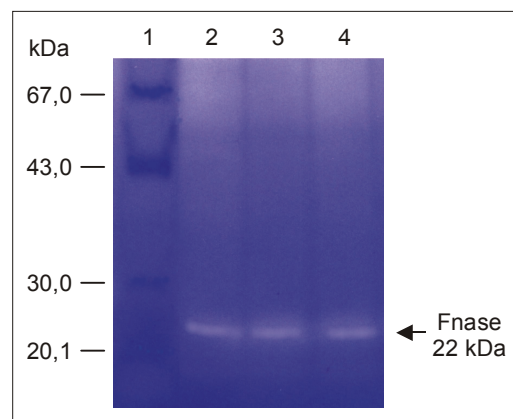
### 7.3.2. Charakterisierung der Substratspezifität

#### 7.3.2.1. Spaltung von Fibronectin

Das bisher einzige bekannte Substrat der Fibronectinase ist das Fibronectin, wodurch auch die Namensgebung resultierte (Lambert Vidmar *et al.*, 1991a). Um die Faltung und Aktivierung der rekombinanten Fibronectinase zu überprüfen, wurden daher Zymogramme mit humanem Plasma-Fibronectin als Substrat angefertigt. Mit Hilfe dieser Substratgele konnte ferner das Molekulargewicht von eventuell aktiven Proteinfragmenten bestimmt werden.

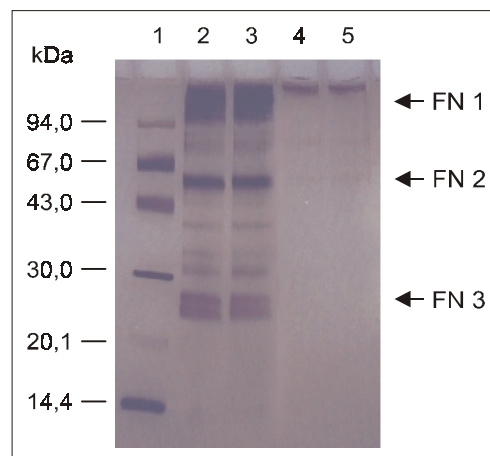
Abb. 20 zeigt ein Zymogramm mit einpolymerisiertem Plasma-Fibronectin. Als Proben dienten drei aktivierte Faltungsansätze. Bei allen untersuchten Proben wurde eine deutliche Abbaubande bei ca. 22 kDa detektiert, welche dem bekannten Molekulargewicht der Fibronectinase entspricht (Lambert Vidmar, 1991a; Unger, 1998). Diese Methode der Faltung und Aktivierung führte bei etwa 60% der Reaktionsansätze zum Erfolg. Somit konnte die Fibronectinase erstmals rekombinant in aktiver Form erhalten und für weitere Substrattests bereitgestellt werden.

Abb. 20 : 10%iges Fibronectin-Zymogramm nach Coomassie-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2-4 : Fnase-Faltungsansätze



Für die Charakterisierung von Proteinase-Spaltungsspezifitäten werden in der Regel die oxidierten Ketten des Insulins eingesetzt. Die Peptide besitzen eine ungefaltete Struktur und sind somit für proteolytische Enzyme leicht zugänglich. Da jedoch mit der rekombinanten Fibronectinase keine Spaltung der Insulin A- und Insulin B-Kette erzielt werden konnte, wurde für die Bestimmung der Spaltungsspezifität gereinigtes humanes Plasma-Fibronectin verwendet.

Abb. 21 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle des Fibronectin-  
Abbaus durch Fibronectinase nach Silber-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2-3 : Fibronectin nach Inkubation mit Fnase  
für 16 h bei 37°C  
Bahn 4-5 : Fibronectin nach Inkubation ohne Fnase  
für 16 h bei 37°C



Das Fibronectin wurde für 16 h mit aktiver Fibronectinase bei 37°C inkubiert. In Abb. 16 (Bahn 2 und 3) ist ein deutlicher Abbau des Plasma-Fibronectins zu erkennen, bei dem Spaltprodukte verschiedener Größen detektiert werden. Drei dieser Protein-Fragmente waren für die Sequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau zugänglich (FN1, FN2 und FN3). Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Fragment	AS-Sequenz
FN1 (120 kDa) pFn	-G-R-W-K-C-D <sup>455</sup> - -T <sup>444</sup> -C-F-G-Q-L-R-G-R-W-K-C-D <sup>455</sup> -
FN2 (60 kDa) pFn	-V-P-G-T-S-T <sup>2155</sup> - -E <sup>2143</sup> -E-P-L-Q-F-R-V-P-G-T-S-T <sup>2155</sup> -
FN3 (27 kDa) pFn	-F-T-N-I-G-P-D <sup>1281</sup> - -P <sup>1268</sup> -P-P-T-D-L-R-F-T-N-I-G-P-D <sup>1281</sup> -
bekannte Fragmente (Unger, 1998)	AS-Sequenz
120 kDa pFn	-G-R-W-K-C-D <sup>455</sup> - -T <sup>444</sup> -C-F-G-Q-L-R-G-R-W-K-C-D <sup>455</sup> -
60 kDa pFn	-V-P-G-T-S-T <sup>2155</sup> - -E <sup>2143</sup> -E-P-L-Q-F-R-V-P-G-T-S-T <sup>2155</sup> -
43 kDa pFn	-A-A-V-Y-Q-P <sup>296</sup> - -G <sup>284</sup> -P-F-T-D-V-R-A-A-V-Y-Q-P <sup>296</sup> -

Tab. 3 : Ermittlung der Spaltungsspezifität der Fibronectinase durch Sequenzvergleich der erhaltenen pFn-Spaltprodukte mit der AS-Sequenz von Fibronectin.

Die Sequenzvergleiche der N-Termini der erhaltenen Fragmente mit der bekannten AS-Sequenz des Fibronektins (Tab. 3) zeigt, daß die Spaltung des Fibronektins jeweils nach einem Arginin-Rest erfolgt. Die Fragmente FN1 und FN2 wurden auch schon bei der Charakterisierung von isolierter nativer Fibronektinase gefunden (Unger, 1998). Die ermittelten Sequenzen lassen desweiteren den Schluß zu, daß für die erfolgreiche Spaltung in P<sub>2</sub>-Position hydrophobe und in P<sub>3</sub>-Position hydrophile Aminosäure-Reste benötigt werden.

### 7.3.2.2. Spaltung von Aktin und Myosin

Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität zeigten, daß andere ECM-Bestandteile, wie Typ II-, Typ IV- oder denaturiertes Typ I-Kollagen, sowie die synthetischen Mca- und DNP-Peptide und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein keiner Proteolyse durch die Fibronektinase unterliegen.

Der Zusammenhang zwischen der Fibronektinase und den Muskelproteinen Aktin und Myosin ergab sich über die Aspartatproteinase Kathepsin D. Eine Spaltung von humanem Plasma-Fibronektin mit Kathepsin D bewirkt die Freisetzung von Fibronektinase (Lambert Vidmar, 1991a). Eine weitere Rolle spielt das Kathepsin D bei der Muskeldystrophie. Bei dieser Muskelschwund-Erkrankung tritt Kathepsin D in erhöhter Konzentration auf und wird für den Abbau des Muskelgewebes verantwortlich gemacht (Iodice *et al.*, 1972; Noda *et al.*, 1981; Whitaker *et al.*, 1983; Gopalan *et al.*, 1987). Da diese Eigenschaften in einem konkreten Zusammenhang stehen können, wurden Spaltungen der Muskelproteine Aktin und Myosin mit der rekombinanten Fibronektinase durchgeführt.

Die Muskelkontraktion kommt durch Wechselwirkung von Aktin und Myosin zustande. Ein Muskel besteht aus Muskelfasern, in deren Innern parallel zueinander die Myofibrillen liegen. Myofibrillen setzen sich aus Sarkomeren zusammen, den kontraktile Einheiten des Muskels. Sarkomere bestehen aus zwei miteinander wechselwirkenden Proteinfilamenten: dicke Filamente und dünne Filamente. Die dicken Filamente bestehen hauptsächlich aus Myosin. Ein Myosinmolekül ist aus sechs Untereinheiten aufgebaut: zwei schwere Ketten sind über eine lange Strecke helikal umeinander gewunden und enden am N-Terminus in globulären Strukturen. Diese bilden mit jeweils zwei leichten Ketten den Kopf des Moleküls. Die dünnen Filamente enthalten zum Großteil Aktin, ein 43 kDa großes Protein.



Die Spaltung von Myosin und Aktin erfolgte bei 37°C. Nach 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 3 h wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 22 und Abb. 23).

Abb. 22 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle des Myosin-Abbaus durch Fibronektinase nach Silber-Färbung.  
 Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2 : Kontrolle : Myosin nach 180 min Inkubation bei 37°C  
 Bahn 3-9 : Myosin nach Inkubation mit Fnase für 1, 5, 15, 30, 60, 120 und 180 min bei 37°C

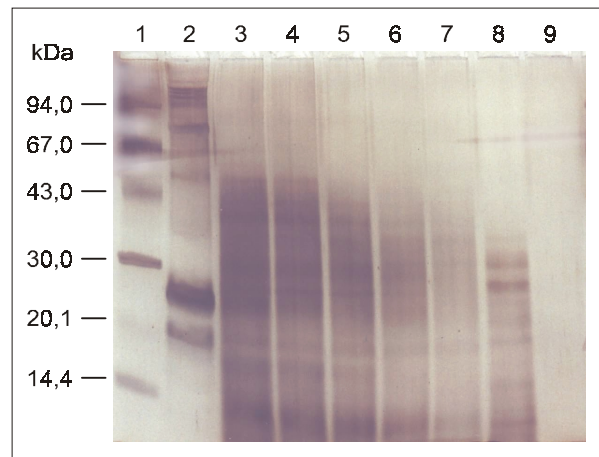
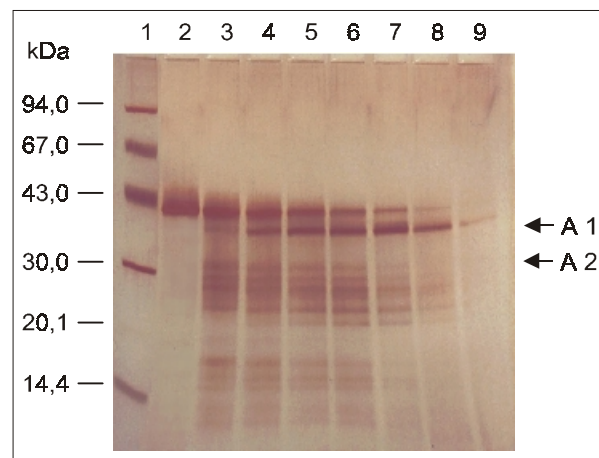


Abb. 23 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle des Aktin-Abbaus durch Fibronektinase nach Silber-Färbung.  
 Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2 : Kontrolle : Aktin nach 180 min Inkubation bei 37°C  
 Bahn 3-9 : Aktin nach Inkubation mit Fnase für 1, 5, 15, 30, 60, 120 und 180 min bei 37°C



Sowohl bei Myosin als auch bei Aktin ist ein Abbau der Proteine zu erkennen. Die Spaltung der Substrate durch die Fibronektinase ist schon nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 min deutlich sichtbar. Nach ca. 3 h kommt es bei beiden Muskelproteinen zur vollständigen Degradierung. Bei der Aktin-Spaltung konnten nach einer Inkubationszeit von 5 min zwei Spaltprodukte (A1 und A2) in ausreichender Menge für eine N-terminale Sequenzierung gewonnen werden. Die Sequenzvergleiche mit der bekannten Sequenz des Aktins (Harris *et al.*, 1992) sind in Tab. 4 aufgeführt.

Fragment	AS-Sequenz
A1 (38 kDa) Aktin	-G-M-G-Q-K-D <sup>53</sup> - -R <sup>41</sup> -H-Q-G- <u>V-M-V</u> -G-M-G-Q-K-D <sup>53</sup> -
A2 (31 kDa) Aktin	-V-A-P-E-E-H <sup>103</sup> - -S <sup>91</sup> -F-Y-N- <u>E-L-R</u> -V-A-P-E-E-H <sup>103</sup> -

Tab. 4 : Ermittlung der Spaltungsspezifität der Fibronektinase durch Sequenzvergleich der erhaltenen Aktin-Spaltprodukte mit der AS-Sequenz von Aktin (Harris *et al.*, 1992).

Die durch das Fragment A2 ermittelte Spaltstelle entspricht in ihrer Aminosäuresequenz der Spaltungsspezifität beim Fibronektin-Verdau. Wiederum erfolgte die Proteolyse hinter einem Arginin-Rest mit einer hydrophoben Aminosäure in P<sub>2</sub>-Position sowie einer hydrophilen Aminosäure in P<sub>3</sub>-Position. Die zweite Spaltstelle liegt dagegen hinter einem Valin, flankiert von einem Methionin und einem weiteren Valin in P<sub>2</sub>- bzw. P<sub>3</sub>-Position.

Es konnte somit erstmals gezeigt werden, daß die Fibronektinase in der Lage ist die Muskelproteine Aktin und Myosin zu degradieren, wobei zwei Spaltstellen bestimmt wurden. Das bei der Muskeldystrophie vermehrt auftretende Kathepsin D, welches für die Freisetzung der Fibronektinase aus Fibronektin verantwortlich ist, und die ermittelte Substratspezifität der Fibronektinase lassen darüber hinaus auf eine Beteiligung der Fn-Proteinase im Krankheitsverlauf des Muskelschwundes schließen (Schnepel und Tschesche, 2001).

## 7.4. Klonierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-cDNA

### 7.4.1. PCR-Amplifizierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-cDNA

Zu Beginn der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-Klonierung stand das cDNA-Fragment pFH134 im *E. coli* Plasmid-Vektor pAT153 (Kornblihtt *et al.*, 1985). Das Plasmid pFH134/pAT153 enthält die kodierende Sequenz für die Gelatin/Kollagen-Bindungsdomäne des Fibronectins, in der die latente Fn-Typ IV-Kollagenase lokalisiert ist. Um die Klonierung der cDNA in Expressionsvektoren zu ermöglichen, sollten durch gezielte Mutationen in den Oligonukleotid-Primern künstliche Spaltstellen, sowie Start- und Stop-Codons an den Termini der Ziel-DNA eingefügt werden. Außerdem sollte die Proteinase in zwei Varianten kloniert werden, die als FnColA (komplettes Enzym) und FnColB (verkürzte Variante) bezeichnet werden. Dazu wurde ein Sense-Primer (FnCol-For) synthetisiert, der sowohl eine *NdeI*-Schnittstelle als auch ein Start-Codon beinhaltet. Desweiteren wurden zwei Antisense-Primer (FnColA-Rev und FnColB-Rev) verwendet, in deren Sequenz ein Stop-Codon sowie eine *BamHI*- bzw. eine *Sall*-Spaltstelle eingefügt war.

FnCol-For :            5'-GTT CGT **CAT ATG** GTT TAC CAA CC-3'  
   *NdeI* Start            FnCol →

FnColA-Rev :            5'-TTC GAC **GGA TCC TCA** TGA GCT TG-3'  
   *BamHI* Stop            FnColA →

FnColB-Rev :            5'-GTC ATC **GTC GAC TCA** CTG ATC TCG-3'  
   *Sall*            Stop            FnColB →

Die cDNAs von FnColA und FnColB wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert und lieferten DNA-Fragmente von 948 bp (Abb. 24) bzw. 675 bp (Abb. 25).

Abb. 24 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des FnColA-PCR-Produktes.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2-4 : FnColA-PCR-Amplifikate

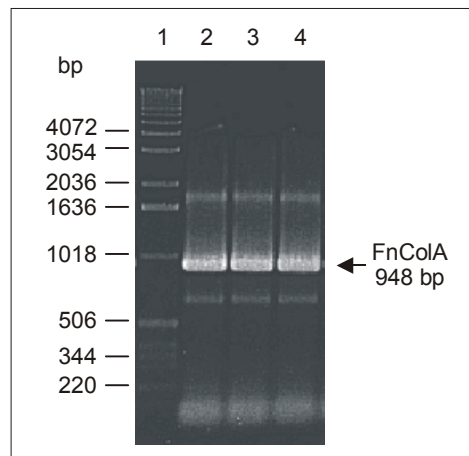
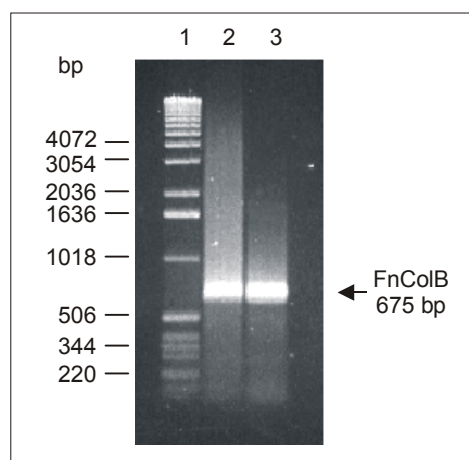


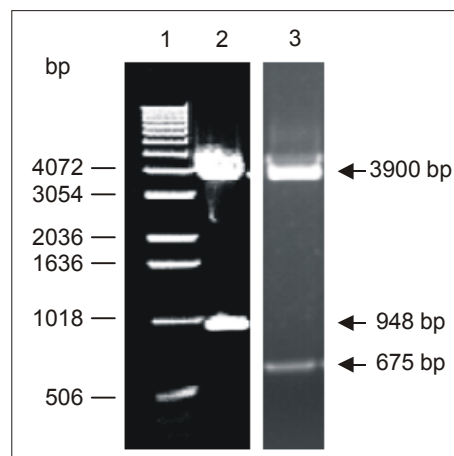
Abb. 25 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des FnColB-PCR-Produktes.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2+3 : FnColB-PCR-Amplifikate



#### 7.4.2. TA-Klonierung der PCR-Amplifikate in den pCR™2.1-Vektor

Zur Sicherung der amplifizierten cDNAs wurden die Amplifikate mittels TA-Klonierung (6.1.10) in den Vektor pCR™2.1 einkloniert. Die Methode beruht darauf, daß die für die PCR-Reaktion verwendeten Polymerasen, wie *Taq*- oder *Tth*-Polymerase, am 3'-Ende des Amplifikates ein überstehendes Adenosin anhängen. Dieser 3'-A-Überhang dient zur Einführung des DNA-Fragmentes in den linearisierten Vektor, der an den komplementären 3'-Enden überstehende Tymine besitzt. Mit Hilfe dieser Technik ist eine direkte Insertion von PCR-Amplifikaten in Vektoren möglich, ohne die DNA-Fragmente enzymatisch zu modifizieren. Nach der Ligation erfolgt eine Transformation von *E. coli*-Bakterien des Stammes [INV $\alpha$ F']. Anhand des X-Gal-Tests konnten erfolgreich transformierte Klone selektiert und durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Nde*I/*Bam*HI bzw. *Nde*I/*Sal*I näher charakterisiert werden. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden zur Größenbestimmung durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 26).

Abb. 26 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse der in den pCR™ 2.1-Vektor insertierten cDNA-Fragmente.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2 : FnColA nach Restriktion mit *NdeI/BamHI*  
 Bahn 3 : FnColB nach Restriktion mit *NdeI/SalI*



Das Agarosegel zur Restriktionsanalyse in Abb. 26 zeigt bei der Restriktion des Plasmides FnColA/pCR™2.1 die Bande des linearisierten Vektors bei ca. 3900 bp und die FnColA-Bande bei 948 bp (Bahn 2). Die Klonierung des für die Fn-Typ IV-Kollagenase A kodierenden cDNA-Fragmentes verlief also erfolgreich, außerdem konnte die korrekte Insertion der *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen nachgewiesen werden. Auch bei der Restriktion des Plasmides FnColB/ pCR™2.1 mit den Enzymen *NdeI* und *SalI* wurde ein Fragment mit der korrekten Größe von 675 bp erhalten (Bahn 3). Die für die Fn-Typ IV-Kollagenase B kodierende cDNA konnte somit ebenfalls erfolgreich kloniert werden.

#### 7.4.3. DNA-Sequenzierung der FnColA/pCR™ 2.1- und FnColB/pCR™ 2.1-Plasmide

Für die spätere Expression ist die korrekte Nukleotidabfolge der klonierten Fn-Typ IV-Kollagenasen eine wichtige Voraussetzung. Da die cDNA-Fragmente durch PCR synthetisiert wurden, mußten Deletionen und Insertionen, die durch die Fehlerrate thermostabiler Polymerasen auftreten können, ausgeschlossen werden. Daher wurde eine DNA-Sequenzierung (6.1.13.) der mit dem pCR™ 2.1-Vektor ligierten PCR-Produkte durchgeführt und die Insert-DNA so auf eventuelle Mutationen überprüft.

Die durchgeführte Sequenzierung bewies die korrekte Klonierung der cDNA-Fragmente in den pCR™ 2.1-Vektor mit den entsprechenden Schnittstellen und den Start- und Stopcodons. Sequenzvergleiche mit der bekannten Sequenz des Fibronektins ergaben eine vollständige Übereinstimmung aller Basen (Kornbliht *et al.*, 1983).

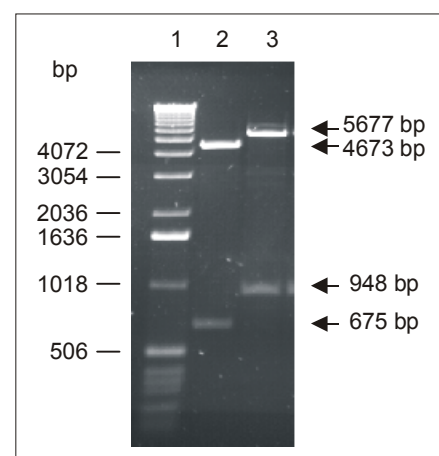
#### 7.4.4. Klonierung der Fn-Typ IV-Kollagenase-cDNAs in Expressionsvektoren

Die kodierenden cDNA-Fragmente für die Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B konnten mit den Enzymkombinationen *NdeI/BamHI* bzw. *NdeI/SalI* aus dem pCR™2.1-Vektor gespalten und isoliert werden. Als Expressionsvektor wurde für FnColA der Vektor pET-11a gewählt. Für FnColB wurde eine *SalI*-Spaltstelle benötigt und daher der pET-12b-Vektor verwendet. Beide Vektoren wurden mit der entsprechenden Enzymkombination linearisiert und mit den cDNA-Fragmenten ligiert. Mit den Ligationsansätzen erfolgte die Transformation von kompetenten Zellen des „high copy“-Stammes [JM83].

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden zur Überprüfung der Transformation in Übernachtskulturen vermehrt und ihre Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* bzw. *SalI* wurden die Plasmide auf eine erfolgreiche Ligation und Transformation untersucht.

Abb. 27 zeigt die Restriktionsanalyse erfolgreich rekombinierter Klone. Bahn 2 enthält die Banden des linearisierten pET-12b Vektors (4673 bp) und des FnColB-Fragmentes bei 675 bp. Bahn 3 zeigt die erfolgreiche Restriktion des FnColA-Plasmides mit der pET-11a-Bande (5677 bp) und dem FnColA-Fragment (948 bp).

Abb. 27 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionskontrolle der Klonierung von FnColA und FnColB in pET-Vektoren.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2 : Restriktion von FnColB/pET-12b mit *NdeI/SalI*  
 Bahn 3 : Restriktion von FnColA/pET-11a mit *NdeI/BamHI*



Zur Expression der Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten wurden kompetente Zellen der *E. coli* Expressionsstämme [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] mit den erhaltenen Plasmiden transformiert. Die Analyse von potentiellen rekombinanten Klonen erfolgte wiederum durch Restriktionskontrolle mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* bzw. *Sall* und bestätigte die erfolgreiche Transformation beider Expressionsstämme.

Für die Expression von FnColA und FnColB standen somit folgende potentielle Expressionssysteme zur Verfügung :

**FnColA / pET-11a / [BL21(DE3)]**

**FnColA / pET-11a / [HMS174(DE3)]**

**FnColB / pET-12b / [BL21(DE3)]**

**FnColB / pET-12b / [HMS174(DE3)]**

## **7.5. Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronectin-Typ IV-Kollagenasen A und B**

### **7.5.1. Expression von FnColA und FnColB in *E. coli***

Die erhaltenen potentiellen pET-Expressionssysteme sollten zunächst in Testexpressionen auf die korrekte Produktion der Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B untersucht werden. Außerdem sollte der zeitliche Verlauf der Expression verfolgt und so das Expressionsmaximum ermittelt werden. Entsprechende Klone von FnColA und FnColB wurden dazu in 50 ml Kulturen angezogen und die Genexpression bei einer optischen Dichte von 0,6 mit IPTG induziert. Vor der Induktion und jede Stunde nach der Induktion wurde den Kulturen jeweils 1 ml Probe entnommen. Diese Proben wurden pelletiert, die Zellpellets in Lämmli-Puffer aufgeschlossen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 28 und 29).

Abb. 28 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Genexpression von FnColA/pET-11a/[BL21(DE3)] nach Coomassie-Färbung.

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion

Bahn 3-6 : Kulturproben 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion

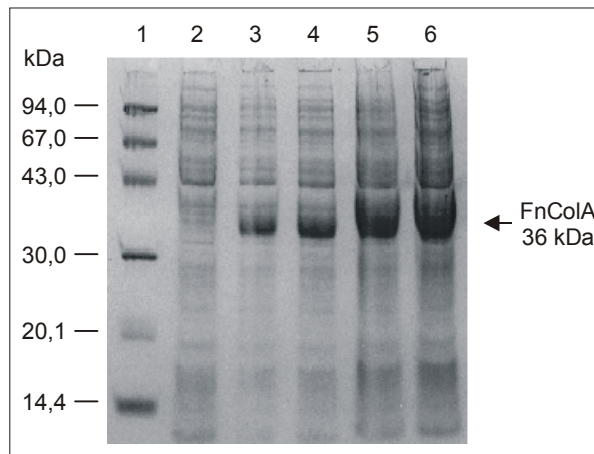
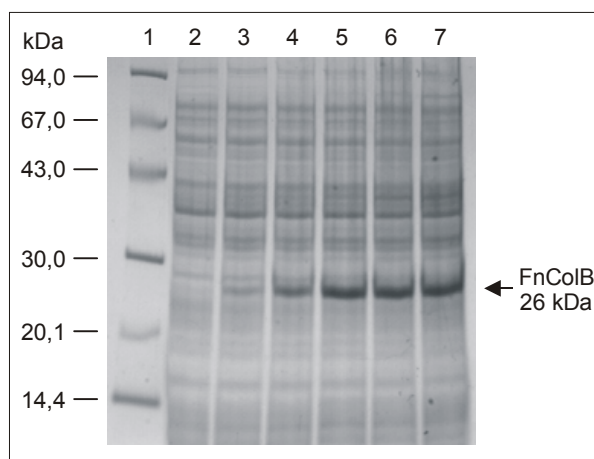


Abb. 29 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Genexpression von FnColB/pET-12b/[BL21(DE3)] nach Coomassie-Färbung.

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion

Bahn 3-6 : Kulturproben 1, 2, 3, 4 und 5 h nach Induktion



Beide untersuchten Expressionssysteme zeigen die Überexpression eines rekombinanten Proteins. Für das System FnColA/pET-11a/[BL21(DE3)] wurde ein 36 kDa Protein erhalten, welches mit der berechneten Größe für FnColA genau übereinstimmte. Bei der Verwendung von FnColB/pET-12b/[BL21(DE3)] gelang die Expression eines 26 kDa Proteins, dessen Größe ebenfalls mit dem für FnColB berechneten Molekulargewicht von 25,4 kDa korrelierte. Das Maximum der Expression konnte für beide Expressionssysteme auf ca. 3 h nach Induktion bestimmt werden. Für die entsprechenden Expressionssysteme in dem *E. coli*-Stamm [HMS174(DE3)] konnten die gleichen Ergebnisse erzielt werden, so daß für die Produktion der Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B je zwei exprimierende Systeme zur Verfügung standen.

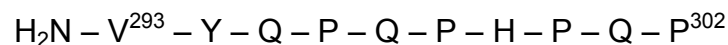
Die Großexpressionen für die Produktion der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten wurden aufgrund der etwas höheren Ausbeute mit den Expressionssystemen im *E. coli*-Stamm [BL21(DE3)] durchgeführt. 3,5 h nach Induktion wurden die Expressionen durch Zentrifugation der Bakterienkulturen gestoppt. Nach Zellaufschluß konnten so durchschnittlich 1,5 g Rohprotein pro Liter Bakterienkultur isoliert werden.



### 7.5.2. Identifizierung der Genprodukte durch N-terminale Sequenzierung

Um die erhaltenen rekombinanten Proteine als die Fibronectin-Typ IV-Kollagenasen zu identifizieren, wurde eine Sequenzierung der N-Termini durchgeführt. Die 3 h nach Expressionsinduktion genommenen Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die entsprechenden Banden konnten nach Coomassie-Färbung ausgeschnitten und dem automatisierten Edman-Abbau zugeführt werden.

Sowohl für FnColA als auch für FnColB konnten folgende 10 N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden :



Die ermittelte Sequenz entspricht dem N-Terminus der Gelatin/Kollagen-Bindungsdomäne von Plasma-Fibronectin. Die gleiche Abfolge von Aminosäuren wurde außerdem von Lambert Vidmar *et al.* bei der Beschreibung der nativen Fn-Typ IV-Kollagenasen ermittelt (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Die rekombinante Produktion von FnColA und FnColB konnte somit nachgewiesen werden.

### 7.5.3. Reinigung der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B

In den gewählten pET-Expressionssystemen werden die rekombinanten Proteine in Form von *inclusion bodies* abgelagert. Diese wurden zunächst durch zwei Waschschrte von der Zellmasse getrennt und dann unter denaturierenden Bedingungen in einem Aufschlußpuffer (8 M Harnstoff, 150 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) solubilisiert. Abb. 30 und Abb. 31 (Bahn 4) zeigen die stark angereicherten FnColA- und FnColB-Fraktionen. Die erhaltenen Lösungen konnten danach für weitere Reinigungsschritte eingesetzt werden.

Eine weitere Abtrennung von Fremdproteinen wurde durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose erreicht. Die rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B wurden dazu unter schwach alkalischen Bedingungen (pH 8,0) an das Anionenaustausch-Material gebunden und durch Elution mit einem Salzgradienten (0,3-0,8 M NaCl) von Verunreinigungen getrennt. Die Bahn 5 in Abb. 30 und Abb. 31 zeigt die durch SDS-PAGE aufgetrennten vereinigten Proteinfractionen.

Mit Hilfe einer Gelfiltration an Sephacryl S-100 konnten die Proteine schließlich von letzten Verunreinigungen befreit und bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 30 und Abb. 31, Bahn 6).

Für die rekombinanten Fibronektin-Typ IV-Kollagenasen A und B konnten somit Reinigungssysteme etabliert werden, welche die Proteine in ausreichender Quantität und Reinheit für folgende Faltungsexperimente zur Verfügung stellten.

Abb. 30 : Reinigung der Fn-Typ IV-Kollagenase A

- Bahn 1 : LMW-Marker
- Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion
- Bahn 3 : Kulturprobe nach Induktion
- Bahn 4 : *inclusion body*-Aufschluß
- Bahn 5 : FnCoIA nach Q-Sepharose
- Bahn 6 : FnCoIA nach Sephacryl S-100
- Bahn 7 : Western-Blot von FnCoIA

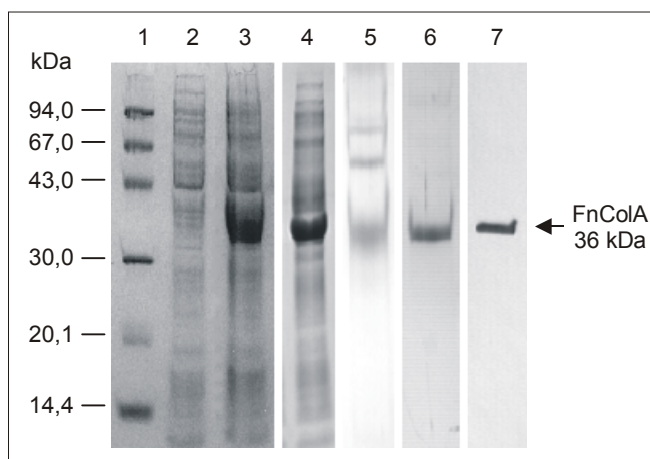
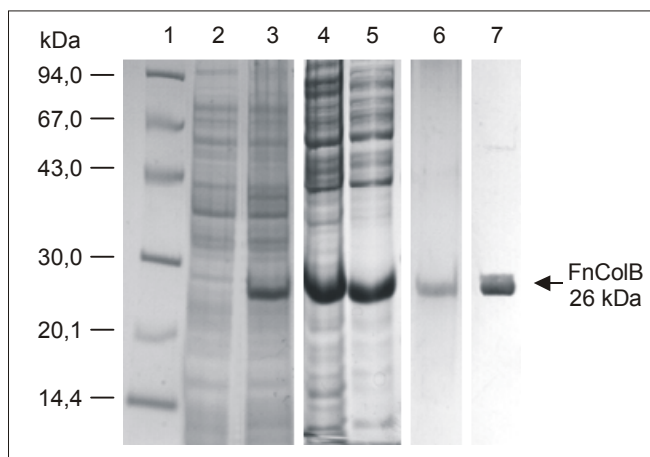


Abb. 31 : Reinigung der Fn-Typ IV-Kollagenase B

- Bahn 1 : LMW-Marker
- Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion
- Bahn 3 : Kulturprobe nach Induktion
- Bahn 4 : *inclusion body*-Aufschluß
- Bahn 5 : FnCoIB nach Q-Sepharose
- Bahn 6 : FnCoIB nach Sephacryl S-100
- Bahn 7 : Western-Blot von FnCoIB



#### **7.5.4. Immunologischer Nachweis von FnColA und FnColB**

Der immunologische Nachweis der Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B wurde im Western-Blot mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen ein Epitop in der Gelatin/Kollagen-Bindungsdomäne von Plasma-Fibronectin („*mouse-anti-human fibronectin (gelatin binding domain) monoclonal antibody*“, Clone IST-10, Chemicon International Inc., Temecula, California) durchgeführt.

Die auf einer PVDF-Membran immobilisierten Proben der vereinigten FnColA- und FnColB-Fractionen wurden mit dem monoklonalen Antikörper komplexiert. Durch einen mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugierten 2. Antikörper wurde dieser Komplex erkannt und durch das chromophore Substrat NBT/BCIP detektiert. Abb. 30 bzw. Abb. 31 (Bahn 7) zeigt im Western-Blot eine Protein-Bande, die in ihrer Größe der jeweiligen Fn-Typ IV-Kollagenase-Bande im PAA-Gel entspricht.

Beide Fibronectin-Typ IV-Kollagenase-Varianten konnten somit nach der Expression in *E. coli* durch das beschriebene Reinigungssystem homogen erhalten werden. Durch die N-terminale Sequenzierung und den immunologischen Nachweis mit einem monoklonalen Antikörper wurden die Expressionsprodukte eindeutig als die entsprechenden Zielproteine identifiziert.

### **7.6. Faltung und Charakterisierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenasen A und B**

#### **7.6.1. Faltung von FnColA und FnColB durch das Redoxsystem**

##### **Glutathion/Dithiothreitol**

Nach der Expression und Reinigung der Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten A und B lagen die Proteine in denaturierter Form vor. Um die enzymatisch aktiven Konformationen zu erhalten, mußte eine Methode zur korrekten Faltung gefunden werden. Aufgrund der hohen Anzahl an Disulfidbrücken (FnColA: 12, FnColB: 8) wurde zur korrekten Verbrückung der Cysteine für die Faltung ein Redox-System, bestehend aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol, verwendet. Dieses sogenannte *oxido-shuffling*-System ermöglicht sowohl die Knüpfung von Disulfidbrücken als auch deren Aufbrechen bei einer energetisch ungünstigen Fehlfaltung.

Die gereinigten Protein-Fractionen wurden dazu mit dem Faltungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt und fünf Tage bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch Ultrafiltration konzentriert und gegen TRIS-Puffer dialysiert. Die Analyse der Faltungsreaktionen durch SDS-PAGE zeigte, wie auch bei der Fibronektinase beobachtet, keine definierte Bandenstruktur sondern nur diffuse Banden (20-24 kDa) und sehr schwache Banden von ca. 40, 43 und 66 kDa. Diese Beobachtung ist wiederum auf die hohe statistische Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung aufgrund der hohen Anzahl von Disulfidbrücken zurückzuführen. Die Größe der erhaltenen Fragmente läßt andererseits auf die von Lambert Vidmar beschriebene Prozessierung schließen, die schon während der Faltung einsetzt und eine Reihe von Proteinfragmenten ähnlichen Molekulargewichts hervorbringen kann (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Die größeren Fragmente deuten auf eine Oligomerisierung der Proteinfragmente während der Faltungsreaktion hin.

Eine detaillierte Beschreibung der Prozessierung durch SDS-PAGE und Aminosäure-Sequenzierung war mit den erhaltenen Proben somit nicht möglich. Die Überprüfung der korrekten Faltung und Prozessierung mußte somit über Aktivitätstests mit einem bekannten Substrat erfolgen.

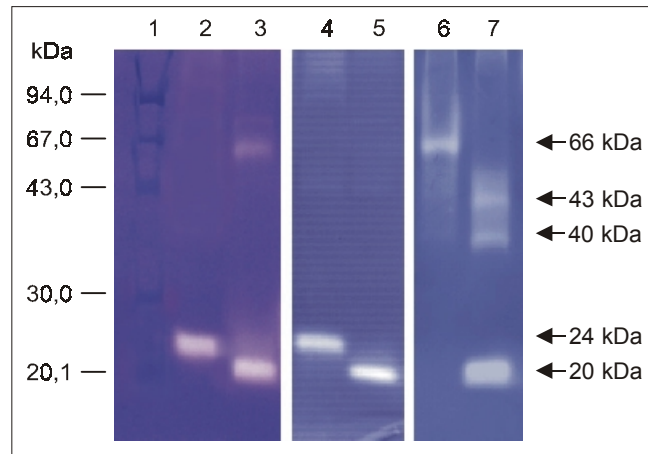
### **7.6.2. Charakterisierung der Substratspezifität**

Als Substrate der Fibronektin-Typ IV-Kollagenasen waren bislang denaturiertes Typ I-Kollagen (Gelatin) und Typ IV-Kollagen bekannt (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Zur Kontrolle der proteolytischen Aktivität wurden Proben der Faltungsansätze in Gelatin-Zymogrammen analysiert.

#### **7.6.2.1. Spaltung von Gelatin**

Abb. 32 zeigt Zymogramme mit einpolymerisiertem Gelatin. Als Proben dienten in den Bahnen 2 und 3 FnColA-Faltungsansätze, in den Bahnen 4-7 FnColB-Faltungsansätze. Mit Hilfe dieser Substratgele konnten ferner die Molekulargewichte von aktiven Proteinfragmenten bestimmt werden.

Abb. 32 : 10%iges Gelatin-Zymogramm nach  
Coomassie-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2-3 : FnColA-Faltungsansätze  
Bahn 4-7 : FnColB-Faltungsansätze



Durch die Zymogramme in Abb. 32 wurden zwei aktive Hauptprodukte mit Molekulargewichten von 20 und 24 kDa detektiert. Desweiteren ist eine geringere proteolytische Aktivität für Fragmente mit 40, 43 und 66 kDa nachgewiesen worden. Die Fragmente mit einem geringeren Molekulargewicht als die klonierten Proteine entstehen dabei wahrscheinlich durch die von Lambert Vidmar beschriebene Autoprozessierung, während die größeren Fragmente auf Oligomerisierung zurückzuführen sind. Sowohl für FnColA als auch für FnColB wurden nach den Faltungsexperimenten die gleichen proteolytisch aktiven Fragmente erhalten.

In folgenden Experimenten zur Bestimmung der Spaltungsspezifität wurden Proben des 20 kDa- und 24 kDa-Fragmentes eingesetzt und miteinander verglichen. Beide Fragmente wiesen sowohl dieselbe Substrat- und Spaltungs-Spezifität als auch dieselben Inhibierungseigenschaften auf. Da die Fragmente aus beiden klonierten Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten generiert werden können, wurde in folgenden Experimenten das 20 kDa-Fragment verwendet und als FnCol bezeichnet.

### 7.6.2.2. Spaltung von Kollagenen

Als bekanntes Substrat der Fn-Typ IV-Kollagenase und für die Namensgebung verantwortlich ist das Typ IV-Kollagen (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Typ IV-Kollagen ist der Hauptbestandteil der Basalmembranen. Es bildet eine Netzwerk-Struktur aus, mit der andere Basalmembran-Komponenten, wie Laminin, Nidogen, Heparin oder Zellen Wechselwirkungen eingehen können. Bisher wurden fünf Gene entdeckt, die für die Basalmembran-Kollagenfamilie kodieren (Glanville, 1987).

Typ IV-Kollagen-Moleküle sind Heterotrimere bestehend aus zwei  $\alpha$ 1-Ketten und einer  $\alpha$ 2-Kette. Jede der Ketten ist ca. 1700 Aminosäuren lang und enthält drei verschiedene Domänen : die N-terminale Cystein-reiche Domäne (7S), eine zentrale tripelhelikale Domäne und eine nichthelikale Domäne (NC1) am C-Terminus. Typ IV-Moleküle sind in ein Netzwerk eingebunden, welches sich von den Fibrillen der fibrillären Kollagene unterscheidet. In diesem Netzwerk sind manche Moleküle über die 7S-Region kovalent quervernetzt, andere durch Wechselwirkungen ihrer NC1-Domänen verknüpft. Seitliche Assoziationen, die zwischen tripelhelikalen Bereichen entstehen, wurden ebenfalls beobachtet (Timpl, 1989).

Um die Degradation von Typ IV-Kollagen durch die rekombinante Fibronectin-Typ IV-Kollagenase zu testen, wurde Typ IV-Kollagen mit einer Konzentration von 1 mg/ml über einen Zeitraum von 16 h mit aktiver FnCol bei 37°C inkubiert. Zu den unter Abb. 33 angegebenen Zeiten wurden dem Ansatz Proben entnommen, durch Zugabe von EDTA in Lämmli-Puffer abgestoppt und durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 33).

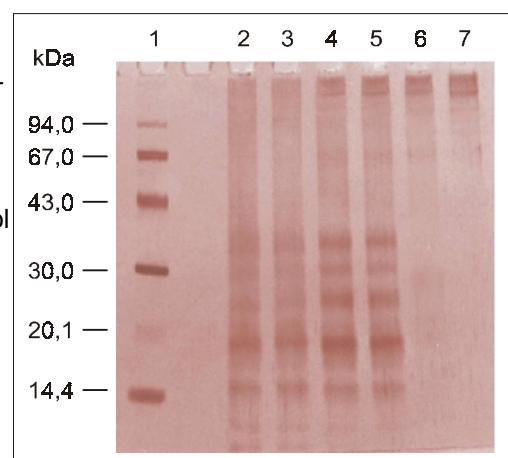
Abb. 33 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle des Typ IV-Kollagen-Abbaus durch FnCol nach Silber-Färbung.

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2-5: Typ IV-Kollagen nach Inkubation mit FnCol für 16 h, 6 h, 1 h und ½ h bei 37°C

Bahn 6 : Kontrolle :Typ IV-Kollagen nach 16 h Inkubation bei 37°C

Bahn 7 : Kontrolle :Typ IV-Kollagen nach 16 h Inkubation bei 4°C



Das PAA-Gel in Abb. 33 macht deutlich, daß die aktive rekombinante Fn-Typ IV-Kollagenase in der Lage war Typ IV-Kollagen zu degradieren. Bereits nach 30 min traten Zerfallsbanden im Bereich von 15-35 kDa auf, die nach längerer Inkubation immer schwächer wurden. Ein Vergleich mit den Kontrollen in den Bahnen 6 und 7 zeigt, daß das Typ IV-Kollagen nach 6 h Inkubation mit FnCol schon vollständig abgebaut wurde.

Als weiteres Substrat für die rekombinante Fn-Typ IV-Kollagenase wurde Typ II-Kollagen getestet. Typ II-Kollagen gehört wie die Kollagene des Typs I, III, V und XI zur Familie der fibrillären Kollagene. Sie zeichnen sich durch die Bildung von Fibrillen in vielen unterschiedlichen Geweben aus. Typ II-Kollagen besteht aus drei gleichen Ketten ( $\alpha 1(\text{II})$ ), von denen jede etwa 1000 Aminosäuren enthält. Es ist lokalisiert in Gelenkknorpeln, Bandscheiben und Glaskörpern.

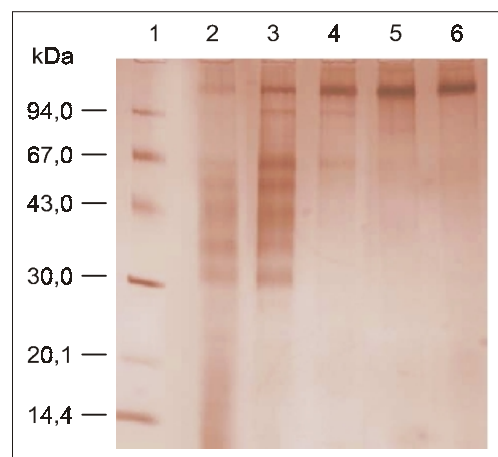
Um das rekombinante Enzym auf die Fähigkeit der Degradation von Typ II-Kollagen zu überprüfen, wurde eine Lösung des Kollagens (0,5 mg/ml) mit FnCol bei 37°C inkubiert. Nach ½, 1, 6 und 16 h wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und die Spaltung durch EDTA in Lämmli-Puffer gestoppt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert (Abb. 34).

Abb. 34 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle des Typ II-Kollagen-Abbaus durch FnCol nach Silber-Färbung.

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2-5: Typ II-Kollagen nach Inkubation mit FnCol für 16 h, 6 h, 1 h und ½ h bei 37°C

Bahn 6 : Kontrolle :Typ II-Kollagen nach 16 h Inkubation bei 37°C



Die Analyse der Typ II-Kollagen-Spaltung zeigte das Auftreten erster schwacher Abbaubanden (94 kDa und 65 kDa) nach ca. 1h. Im weiteren Verlauf der Spaltung wurden weitere Spaltprodukte mit Molekulargewichten von 30 bis 50 kDa beobachtet. Durch Vergleich mit der Kontrollprobe in Bahn 6 konnte nach 16 stündiger Inkubationsdauer ein vollständiger Abbau des Typ II-Kollagens detektiert werden. Typ II-Kollagen konnte somit erstmals als Substrat für die Fn-Typ IV-Kollagenase nachgewiesen werden.

Die Substratspezifität der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase macht das Enzym zu einem potentiellen proteolytischen Bestandteil von pathologischen Prozessen. Im Krebsgeschehen kommt es im Laufe der Metastasierung zu einem Abbau der Typ IV-Kollagen-haltigen Basalmembran. Bei Arthritis-Erkrankungen beobachtet man das Auftreten von Fibronectin-Fragmenten und den Abbau von Typ II-Kollagen haltigem Knorpelgewebe.

### 7.6.2.3. Spaltung der Insulin B-Kette

Die Bestimmung der Spaltungsspezifität der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase erfolgte durch Spaltungsexperimente mit der oxidierten B-Kette des Insulins. Sie enthält alle wesentlichen Aminosäuren und besitzt eine ungefaltete Struktur, die alle Peptidbindungen für Proteinasen zugänglich macht.

Die Spaltung der Insulin B-Kette durch FnCol wurde für fünf Stunden bei 37°C durchgeführt. Die entstandenen Peptide wurden anschließend durch RP-HPLC isoliert und mittels automatisierten Edman-Abbaus identifiziert (Abb. 35).

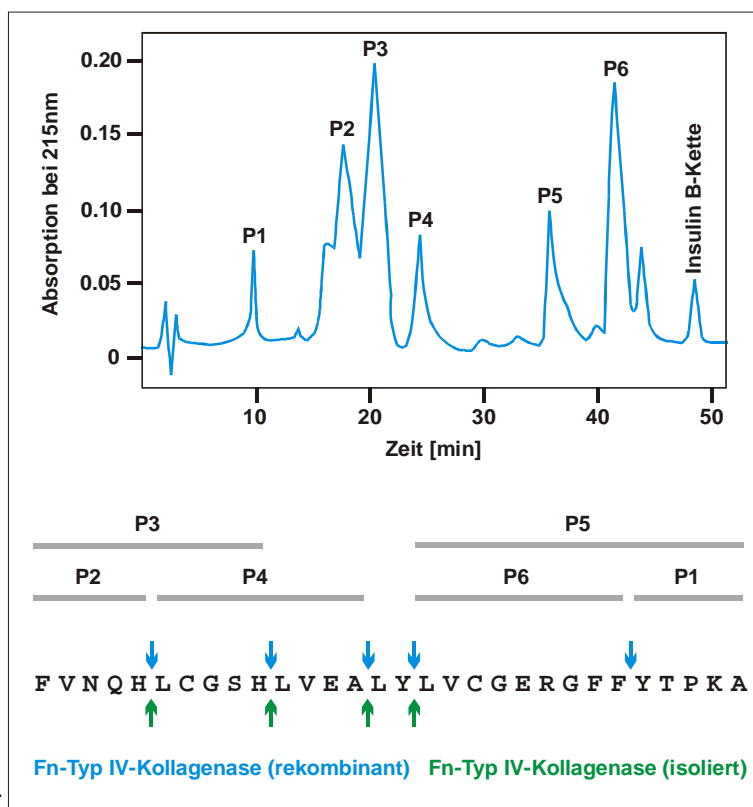


Abb. 35 : Elutionsprofil der erhaltenen Peptide durch RP-HPLC und Bestimmung der Spaltungsspezifität durch Edman-Abbau.

Durch die Identifizierung der erhaltenen Peptide (P1-P6) konnten fünf Spaltstellen innerhalb der Insulin B-Kette bestimmt werden. Vier der Spaltstellen wurden auch für die isolierte Fn-Typ IV-Kollagenase identifiziert (Unger, 1998). Es handelt sich dabei um die Peptidbindungen  $H^5-L^6$ ,  $H^{10}-L^{11}$ ,  $A^{14}-L^{15}$  und  $Y^{16}-L^{17}$ . Die Hydrolyse erfolgte also immer auf der N-terminalen Seite des Leucins. Ferner wurde für die rekombinante Fibronectin-Typ IV-Kollagenase eine weitere Spaltstelle an der Bindung  $F^{25}-Y^{26}$  identifiziert.



#### 7.6.2.4. Weitere Spaltungsexperimente

Für weitere Spaltungsexperimente wurden die Substrate Plasma-Fibronektin, DNP-Oktapeptid, Typ I-Kollagen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein eingesetzt. Sowohl humanes Plasma-Fibronektin als auch das zur Aktivitätsbestimmung von Metalloproteinasen eingesetzte DNP-Oktapeptid wurden nicht von der Fibronektin-Typ IV-Kollagenase degradiert. Auch das Typ I-Kollagen, welches zu den fibrillären Kollagenen gehört und in Haut-, Sehnen- und Knochengewebe Fibrillen ausbildet, konnte nicht als Substrat der Fn-Typ IV-Kollagenase identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung der Caseine als Substrat eine proteolytische Aktivität detektiert werden. Caseine sind Hauptbestandteile des Milcheiweißes. Es handelt sich um schwefelhaltige Glykoproteine mit einem hohen Phosphatgehalt, deren verschiedene Fraktionen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) Mizellen ausbilden. Zur Zymographie wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein in 10%ige PAA-Gele einpolymerisiert und Proben der Faltungsansätze von FnColA und FnColB aufgetragen. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und Färbung der Substratgele mit Coomassie Blue wurden die gleichen Banden wie bei der Verwendung von Gelatin als Substrat erhalten. Die Zymogramme entsprachen den Substratgelen in Abb. 32.

#### 7.6.2.5. Inhibierung der rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenase

Da es sich bei der Fibronektin-Typ IV-Kollagenase um eine Metalloproteinase handelt, wurden bekannte MMP-Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung gegenüber dem Enzym getestet.

Untersucht wurden EDTA, welches zur Komplexierung des Zink-Ions im aktiven Zentrum dient, und Batimastat, ein synthetischer Inhibitor für Metalloproteinasen. Desweiteren wurden verschiedene Mitglieder einer natürlichen MMP-Inhibitor-Familie (TIMPs; „tissue inhibitor of metalloproteinases“) für Hemmversuche eingesetzt. Es handelt sich dabei um TIMP-1 (Farr, 1998), bTIMP-2 (bovine TIMP-2),  $\Delta$ TIMP-2 (idTIMP-2; „inhibitory domain of TIMP-2“) (Farr *et al.*, 1999) und idTIMP-4 („inhibitory domain of TIMP-4; Stratmann, 2000). Die Inhibierungsexperimente wurden im Mca-Peptid-Test nach 15 min Inkubation von Proteinase und Inhibitor durchgeführt.

Erwartungsgemäß erwies sich EDTA als sehr guter Inhibitor für die Fn-Typ IV-Kollagenase. Das Zink-Ion des aktiven Zentrums wurde spontan komplexiert und die Aktivität ging komplett verloren. TIMP-1 zeigte dagegen keine Hemmwirkung auf das Enzym. Die Hemmkurven von bTIMP-2, idTIMP-4 und Batimastat sind in Abb. 36 dargestellt.

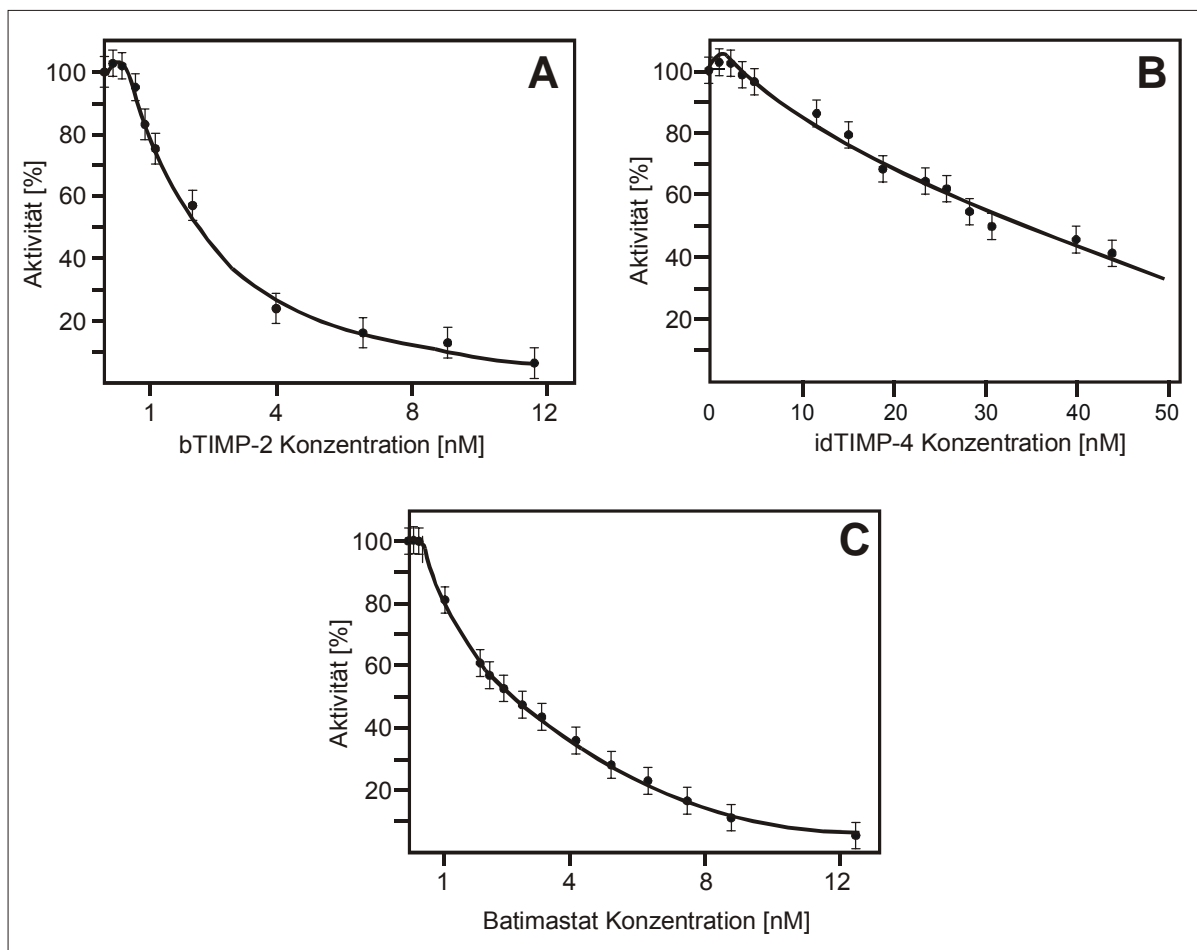


Abb. 36 : Inhibierung der Fibronektin-Typ IV-Kollagenase durch **A)** bTIMP-2  
**B)** idTIMP-4  
**C)** Batimastat

Auffällig ist, daß TIMP-2 eine etwas bessere Hemmwirkung als Batimastat zeigte, TIMP-4 dagegen eine wesentlich schlechtere. Während TIMP-2 schon im niederen nanomolaren Bereich inhibierte, lag die TIMP-4-Konzentration ca. 20 mal höher. Eine weitere interessante Beobachtung war der Unterschied zwischen rekombinanter und isolierter Fn-Typ IV-Kollagenase. Im Gegensatz zum rekombinanten Enzym konnte die aus Plasma-Fibronectin isolierte Proteinase nicht durch TIMP-2 gehemmt werden.

## 7.7. Klonierung der Fibronectin-Gelatinase-cDNA

### 7.7.1. PCR-Amplifizierung der Fibronectinase-cDNAs

Für die Klonierung der Fibronectin-Gelatinase stand das cDNA-Fragment pFH154 im *E. coli* Plasmid-Vektor pAT153 zur Verfügung (Kornblihtt *et al.*, 1985). Das Plasmid pFH154/pAT153 umfaßt die kodierende Sequenz für die Typ III-Module 6-15 des Zelloberflächen-Fibronectins (cFn). Die aus Plasma-Fibronectin isolierte Fn-Gelatinase besteht jedoch nur aus den Typ III-Modulen 6,7 und 9. Beim 8. Typ III-Modul handelt es sich um die Extra-Domäne A, die nicht im Plasma-Fibronectin enthalten ist. Es wurden daher zwei Varianten der Fn-Gelatinase kloniert, zum einen die cFn-Gelatinase (cFnGel), bestehend aus den Typ III-Modulen 6-9, zum anderen die pFn-Gelatinase (pFnGel).

Die Klonierung von cFnGel konnte direkt aus dem Plasmid pFH154/pAT153 erfolgen. Für die Amplifizierung der kodierenden cDNA durch PCR wurde ein Sense-Oligonukleotid-Primer (FnGel-For) synthetisiert, der ein Start-Codon und eine *NdeI*-Spaltstelle enthält. Durch Mutationen im Antisense-Primer (FnGel-Rev) wird ein Stop-Codon und eine *Sall*-Spaltstelle in das PCR-Amplifikat eingefügt.

Für die Klonierung von pFnGel mußte eine andere Strategie gewählt werden, da die für das 8. Typ III-Modul kodierende cDNA nicht mit amplifiziert werden sollte. Es wurden daher zwei weitere Oligonukleotid-Primer konstruiert (Xma-For und Xma-Rev), welche die Amplifizierung von zwei cDNA-Fragmenten ermöglichen. Das erste Fragment (P1) umfaßt die kodierende cDNA der Typ III-Module 6 und 7, das zweite Fragment (P2) kodiert für Typ III-Modul 9. Diese beiden cDNA-Fragmente sollten dann später über die *XmaI*-Schnittstelle miteinander ligiert werden.

FnGel-For :             5'-AAG GGC **CAT ATG** GAG AGC CCC AAA-3'  
                                       *NdeI* Start             FnGel →

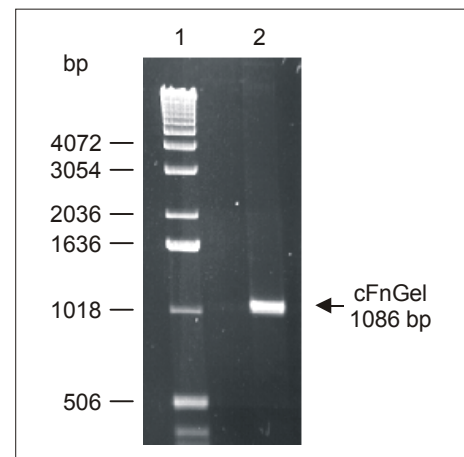
FnGel-Rev :             5'-CAA TAA **GTC GAC TCA** CTC TCT GCC ATT AA-3'  
                                       *Sall*     Stop             FnGel →

Xma-For : 5'-GAC AGA A CC CGG GTC TTG ATT CC-3'  
*Xma* pFnGel →

Xma-Rev : 5'-GAG GAA CAC CCG GGA TGA TGG T-3'  
*Xma* pFnGel →

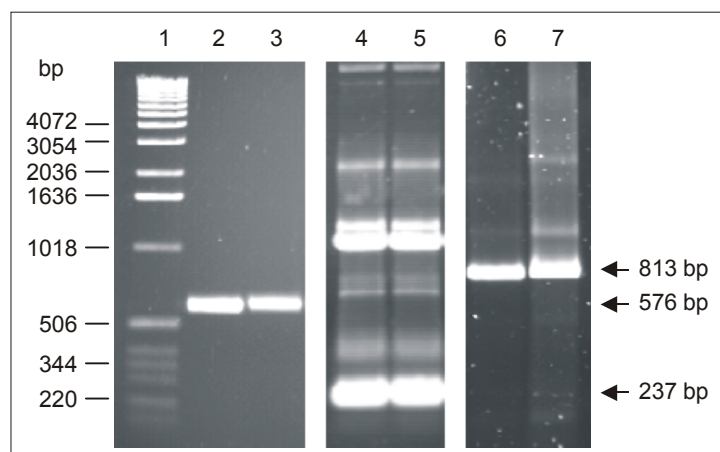
Die Ziel-DNA der cFn-Gelatinase wurde in einer PCR-Reaktion amplifiziert und lieferte ein aus 1086 bp bestehendes DNA-Fragment (Abb. 37).

Abb. 37 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des cFnGel-PCR-Produktes.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2 : cFnGel-PCR-Amplifikat



Für die pFn-Gelatinase wurden in einer ersten PCR-Reaktion die oben beschriebenen Fragmente P1 und P2 mit einer Größe von 576 bp bzw. 237 bp erhalten (Abb. 38, Bahnen 2-5). Diese Fragmente wurden in einer „sticky end“-Ligationsreaktion über die *Xma*-Schnittstelle zusammengefügt und zu einer weiteren PCR-Reaktion mit den Primern FnGel-For und FnGel-Rev eingesetzt. Die Bahnen 6 und 7 in Abb. 38 zeigen das amplifizierte 813 bp große DNA-Fragment, welches der für die pFn-Gelatinase kodierenden cDNA entspricht.

Abb. 38 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis der pFnGel-PCR-Produkte.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2+3 : P1-PCR-Amplifikate  
 Bahn 4+5 : P2-PCR-Amplifikate  
 Bahn 6+7 : pFnGel-PCR-Amplifikate



### 7.7.2. TA-Klonierung der PCR-Amplifikate in den pCR™2.1-TOPO-Vektor

Die PCR-Reaktionsansätze wurden durch DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Amplifikate der cFn-Gelatinase (1086 bp) und der pFn-Gelatinase (813 bp) mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ isoliert und gereinigt (6.1.9.). Die Fragmente wurden anschließend mittels TA-Klonierung (6.1.10.) mit dem linearisierten pCR™2.1-TOPO-Vektor in einer „sticky end“-Ligation miteinander verknüpft und die entstandenen Plasmide in Zellen des *E. coli*-Stammes [INVαF'] eingeschleust. Mit Hilfe der Blau/Weiß-Selektion konnten potentielle Rekombinante identifiziert werden, da die in das Plasmid eingebrachten DNA-Fragmente die kodierende Sequenz des  $\beta$ -Galactosidasegens unterbrechen. Durch Verwendung des Farbstoffes X-Gal konnten die positiven Bakterienkolonien selektiert und in Übernachtskulturen vermehrt werden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA der entsprechenden *E. coli*-Kulturen isoliert und einer Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *NdeI* und *BamHI* unterzogen. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden zur Größenbestimmung durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 39).

Abb. 39 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse der in den pCR™2.1-TOPO-Vektor insertierten cDNA.

Bahn 1 : 1 kb-Leiter

Bahn 2 : cFnGel nach Restriktion mit *EcoRI*

Bahn 3 : cFnGel nach Restriktion mit *NdeI/Sall*

Bahn 4 : pFnGel nach Restriktion mit *EcoRI*

Bahn 5 : pFnGel nach Restriktion mit *NdeI/Sall*

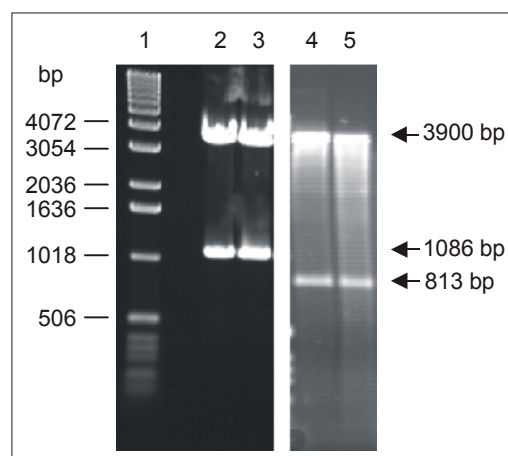


Abb. 39 zeigt neben der Bande des linearisierten pCR™2.1-TOPO-Vektors bei ca. 3900 bp das cFnGel-Fragment mit einer Größe von 1086 bp (Bahn 2 und 3) und das 813 bp große pFn-Fragment (Bahn 4 und 5). Beide Fragmente entstehen durch Restriktion sowohl mit *EcoRI* als auch mit *NdeI/BamHI*. Die durch PCR amplifizierten Fn-Gelatinase-DNAs wurden erfolgreich in den pCR™2.1-TOPO-Vektor ligiert. Außerdem wurde gezeigt, daß die *NdeI*- und *BamHI*-Spaltstellen an den Enden der DNA eingefügt und von den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erkannt werden.

### 7.7.3. DNA-Sequenzierung der pFnGel/pCR™ 2.1-TOPO- und cFnGel/pCR™ 2.1-TOPO-Plasmide

Um die erhaltenen Plasmide auf die korrekte Abfolge der Basensequenz zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierung (6.1.13.) der mit dem pCR™ 2.1-TOPO-Vektor ligierten PCR-Produkte durchgeführt. Die Insert-DNAs sollten so auf eventuelle Mutationen, Deletionen oder Insertionen überprüft werden. Nicht zuletzt sollte die erfolgreiche Einführung der Schnittstellen, Start- und Stopcodons bestätigt werden.

Die durchgeführte Sequenzierung bewies die korrekte Klonierung des kodierenden DNA-Fragmentes der cFnGelatinase in den pCR™ 2.1-TOPO-Vektor mit den entsprechenden Schnittstellen, Start- und Stopcodons. Ein Sequenzvergleich mit der bekannten Sequenz des Fibronektins ergab eine vollständige Übereinstimmung in allen Basen (Kornbliht *et al.*, 1983). Das gleiche Ergebnis wurde für die klonierte pFn-Gelatinase-DNA erhalten, wobei zusätzlich die durch die *XmaI*-Schnittstelle erhaltenen stillen Mutationen bestätigt wurden.

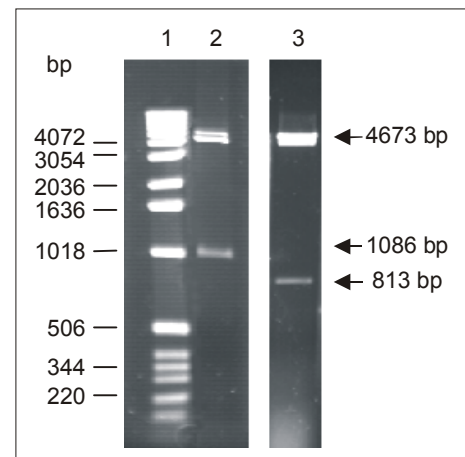
### 7.7.4. Klonierung der Fibronektin-Gelatinase-cDNAs in Expressionsvektoren

Für die Expression der Fn-Gelatinase-Varianten war es notwendig, die entsprechenden cDNA-Fragmente in einen induzierbaren T7-Expressionsvektor zu klonieren. Aus diesem Grund wurden die für cFnGel und pFnGel kodierenden Fragmente mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *Sall* aus dem pCR™ 2.1-TOPO-Vektor gespalten und isoliert. Gleichzeitig wurde auch der Expressionsvektor pET-12b mit der Enzymkombination *NdeI/Sall* linearisiert und durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase vor Religation geschützt. Die Ligationsansätze aus cFnGel- bzw. pFnGel-cDNA und linearisiertem Vektor wurden verwendet, um kompetente Zellen des „high copy“ *E. coli*-Stammes [JM83] zu transformieren.

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden zur Überprüfung der Transformation in Übernachtskulturen vermehrt und ihre Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *Sall* wurden die Plasmide auf eine erfolgreiche Ligation und Transformation untersucht.

Abb. 40 zeigt das Agarosegel der Restriktionsanalyse jeweils eines erfolgreich rekombinierten cFnGel/pET-12b- bzw. pFnGel/pET-12b-Klons. Neben den Banden der Fn-Gelatinase-Varianten bei 1086 bp und 813 bp konnte auch die Bande des linearisierten Vektors (4673 bp) detektiert werden.

Abb. 40 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionskontrolle von cFnGel und pFnGel im pET-12b-Vektor durch die Enzyme *NdeI* und *Sall*.  
 Bahn 1 : 1 kb-Leiter  
 Bahn 2 : Restriktion von cFnGel/pET-12b  
 Bahn 3 : Restriktion von pFnGel/pET-12b



Um die Expression von cFn-Gelatinase und pFn-Gelatinase zu ermöglichen, wurden kompetente Zellen der *E. coli* Expressionsstämme [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] mit den erhaltenen Plasmiden transformiert. Die Analyse von potentiellen rekombinanten Klonen erfolgte wiederum durch Restriktionskontrolle mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* und bestätigte die erfolgreiche Transformation beider Expressionsstämme.

Für die Expression der Fibronektin-Gelatinase-Varianten standen somit folgende potentielle Expressionssysteme zur Verfügung :

**cFnGel / pET-12b / [BL21(DE3)]**

**cFnGel / pET-12b / [HMS174(DE3)]**

**pFnGel / pET-12b / [BL21(DE3)]**

**pFnGel / pET-12b / [HMS174(DE3)]**

## 7.8. Expression, Reinigung und Identifizierung der rekombinanten Fibronektin-Gelatinasen

### 7.8.1. Expression von pFnGel und cFnGel in *E. coli*

Nach der erfolgreichen Klonierung und Sequenzierung der für die Fibronektin-Gelatinasen kodierenden cDNAs wurden die erhaltenen Expressionssysteme in Testexpressionen daraufhin untersucht, ob cFnGel und pFnGel korrekt produziert werden.

Die entsprechenden Klone wurden dazu in 50 ml Kulturen kultiviert und die Genexpression bei einer optischen Dichte von 0,6 mit IPTG induziert. Vor der Induktion und 1, 2, 3 und 4 Stunden nach der Induktion wurde den Kulturen jeweils 1 ml Probe entnommen. Diese Proben wurden pelletiert, in Lämmli-Puffer aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 41 und 42).

Abb. 41 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Genexpression von cFnGel/pET-12b/[BL21(DE3)] nach Coomassie-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion  
Bahn 3-6 : Kulturproben 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion

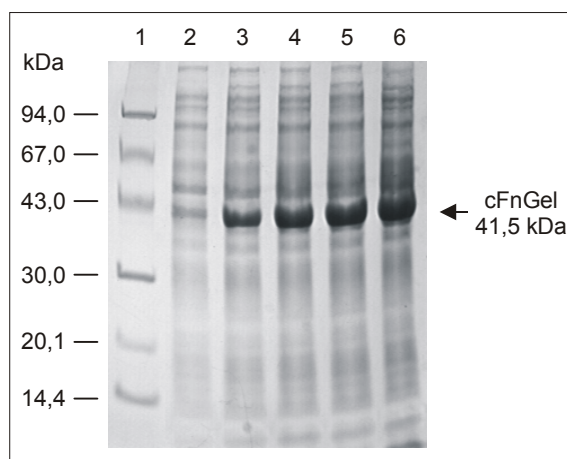
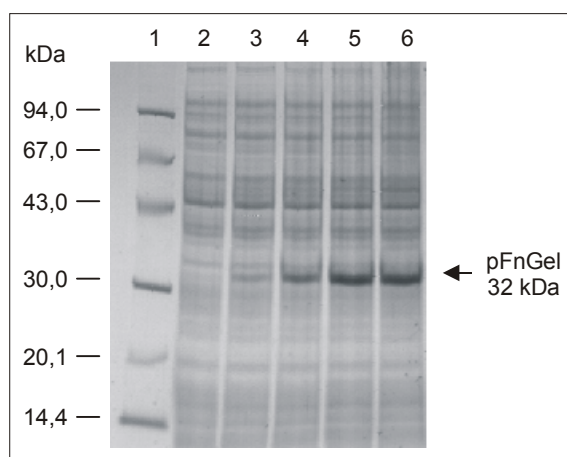


Abb. 42 : 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der Genexpression von pFnGel/pET-12b/[BL21(DE3)] nach Coomassie-Färbung.  
Bahn 1 : LMW-Marker  
Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion  
Bahn 3-6 : Kulturproben 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion





Die PAA-Kontrollgele in Abb. 41 und 42 weisen deutliche Banden von überexprimierten Proteinen auf. Die abgeschätzten Molekulargewichte von 41,5 kDa bzw. 32 kDa stimmen gut mit den berechneten Werten für die cFn-Gelatinase (40,8 kDa) bzw. pFn-Gelatinase (31,3 kDa) überein. Beide Expressionssysteme erreichen ein Maximum der Expression nach ca. 3 h. Das gleiche Ergebnis wurde auch für die Expressionssysteme cFnGel/pET-12b/[HMS174(DE3)] und pFnGel/pET-12b/[HMS174(DE3)] erhalten, so daß für die Produktion der jeweiligen Fibronectin-Gelatinase je zwei funktionierende Systeme zur Verfügung standen.

Für die Produktion der rekombinanten Fn-Gelatinase-Varianten in größeren Mengen wurden Großexpressionen im 4,5 l-Maßstab mit den Expressionssystemen im *E. coli*-Stamm [BL21(DE3)] durchgeführt. 3,5 h nach Induktion wurden die Expressionen durch Zentrifugation der Bakterienkulturen gestoppt. Nach Zellaufschluß konnten so durchschnittlich 1,8 g (cFnGel) bzw. 1,6 g (pFnGel) Rohprotein pro Liter Bakterienkultur isoliert werden.

### 7.8.2. Identifizierung der Genprodukte durch N-terminale Sequenzierung

Für den Identitätsnachweis der überexprimierten Proteine wurden Proben der Expressionskulturen durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Coomassie-Blue gefärbt, die entsprechenden Banden der zu sequenzierenden Proteine ausgeschnitten und der Sequenzierung mittels automatisierten Edman-Abbaus zugeführt.

Für beide rekombinanten Fn-Gelatinasen konnten erwartungsgemäß die gleichen N-terminalen Sequenzen ermittelt werden. Sie umfassen folgende Aminosäuren :



Die ermittelte Aminosäuresequenz entspricht dem in der Literatur beschriebenen N-Terminus der Fibronectin-Gelatinase (Unger und Tschesche, 1999). Es handelt sich dabei um den N-Terminus des 6. Typ III-Moduls des Fibronectins. Die Sequenz E<sup>1074</sup>-T<sup>1084</sup> stimmt zu 100 % mit der bekannten Fibronectin-Sequenz überein (Kornblihtt *et al.*, 1984). Somit konnten die überexprimierten 41,5 kDa- und 32 kDa-Proteine als Fibronectin-Gelatinasen identifiziert werden.

### 7.8.3. Reinigung der rekombinanten Fibronektin-Gelatinasen

Um die Fibronektin-Gelatinasen in ausreichender Menge und Reinheit für Faltungs- und Charakterisierungsexperimente zu erhalten, mußten Verfahren zur Reinigung der rekombinanten Proteine entwickelt werden. In den gewählten Wirt-Vektor-Systemen werden die Proteine intrazellulär in Form von *inclusion bodies* abgelagert. Nach der Zellyse und mehreren Waschschritten mit einem 1 M Harnstoff-Puffer konnten die *inclusion body*-Fraktionen mit den Fn-Gelatinase-Varianten unter denaturierenden Bedingungen in einem Aufschluß-Puffer ( 8 M Harnstoff und 150 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) solubilisiert werden (Abb. 43, Bahn 4 und Abb. 44, Bahn 4).

Eine weitere Vorreinigung der rekombinanten Proteine wurde durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose erreicht. Die denaturierten Fibronektin-Gelatinasen konnten unter nahezu neutralen Bedingungen (pH 7,5) an den schwachen Anionenaustauscher gebunden werden. Mit Hilfe von Waschschrritten und unter Verwendung eines Salzgradienten (0,2-0,6 M NaCl) zur Elution konnten weitere Fremdproteine abgetrennt und die jeweilige Variante der Fn-Gelatinase weiter angereichert werden (Abb. 43, Bahn 5 und Abb. 44, Bahn 5). Ein weiterer Vorteil der Ionenaustauschchromatographie ist die hohe Kapazität des Säulenmaterials, sodaß große Mengen rekombinanter Proteine aufgearbeitet werden konnten.

Über eine Gelfiltration an Sephacryl S-100 erfolgte schließlich die Aufreinigung der Fibronektin-Gelatinasen bis zur Homogenität. Abb. 43 (Bahn 6) und Abb. 44 (Bahn 6) zeigen die vollständig von Fremdproteinen befreiten Expressionsprodukte. Eine Lagerung der zusammengeführten FnGelatinase-haltigen Fraktionen konnte über mehrere Monate bei 4 °C erfolgen.

Abb. 43 : Reinigung der cFn-Gelatinase.

- Bahn 1 : LMW-Marker
- Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion
- Bahn 3 : Kulturprobe nach Induktion
- Bahn 4 : *inclusion body*-Aufschluß
- Bahn 5 : cFnGel nach DEAE-Sepharose
- Bahn 6 : cFnGel nach Sephacryl S-100
- Bahn 7 : Western-Blot von cFnGel

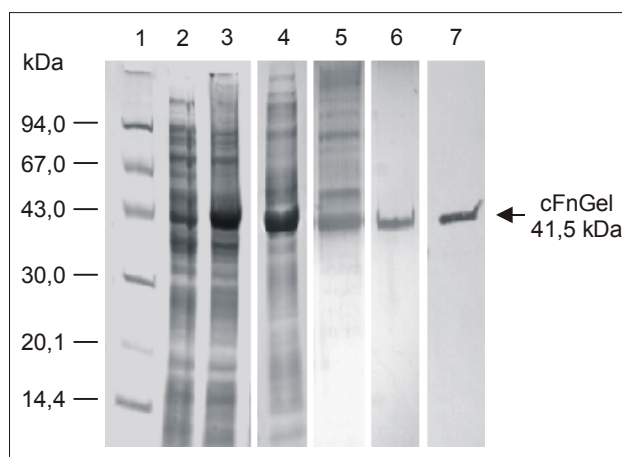
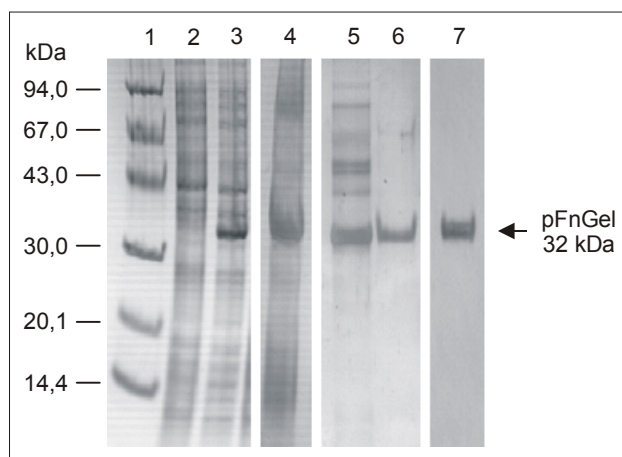


Abb. 44 : Reinigung der pFn-Gelatinase.

- Bahn 1 : LMW-Marker
- Bahn 2 : Kulturprobe vor Induktion
- Bahn 3 : Kulturprobe nach Induktion
- Bahn 4 : *inclusion body*-Aufschluß
- Bahn 5 : pFnGel nach DEAE-Sepharose
- Bahn 6 : pFnGel nach Sephacryl S-100
- Bahn 7 : Western-Blot von pFnGel



#### 7.8.4. Immunologischer Nachweis von pFnGel und cFnGel

Der immunologische Nachweis der Fn-Gelatinasen aus Plasma- und Zelloberflächen-Fibronectin erfolgte im Western-Blot mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen ein Epitop im 7. Typ III-Modul von Plasma-Fibronectin („*mouse-anti-human fibronectin (mid molecule) monoclonal antibody*“, Chemicon International Inc., Temecula, California).

Proben der vereinigten cFnGel bzw. pFnGel S-100-Fractionen wurden zunächst durch Elektroblothing auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit dem monoklonalen Antikörper komplexiert. Durch einen mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugierten 2. Antikörper wurde dieser Komplex erkannt und durch das chromophore Substrat NBT/BCIP detektiert. Abb. 43 bzw. Abb. 44 (Bahn 7) zeigt im Western-Blot eine Protein-Bande, die in ihrer Größe der jeweiligen Fn-Gelatinase-Bande im PAA-Gel entspricht.

Sowohl die cFn-Gelatinase als auch die pFn-Gelatinase konnten somit nach der Expression in *E. coli* durch das oben beschriebene Reinigungssystem homogen erhalten werden. Durch die N-terminale Sequenzierung und den immunologischen Nachweis mit einem monoklonalen Antikörper wurden die Expressionsprodukte eindeutig als die entsprechenden Zielproteine identifiziert.

## **7.9. Faltung und Charakterisierung der rekombinanten Fibronektin-Gelatinasen**

### **7.9.1. Faltung von pFnGel und cFnGel an Q-Sepharose**

Nach der Reinigung wurden die rekombinanten Fibronektin-Gelatinasen Faltungsexperimenten unterzogen, um die denaturierten Proteine in ihrer biologisch aktiven Konformation zu erhalten.

Auf die Faltungsmethode des *oxido-shuffling*-Systems konnte aufgrund der fehlenden Disulfidbrücken verzichtet werden. Eine *in vitro* Faltung durch Dialyse, bei der die denaturierenden Reagenzien Harnstoff und  $\beta$ -Mercaptoethanol langsam aus der Proteinlösung entfernt wurden, führte jedoch nicht zum Erfolg. Durch die räumliche Nähe der Moleküle neigten diese zur Aggregation und präzipitierten im Dialyseschlauch. Um die Fn-Gelatinasen erfolgreich zu renaturieren, wurden die gereinigten Proteine an Q-Sepharose-Material gebunden. Dieser Schritt diente der räumlichen Trennung der einzelnen Moleküle, so daß eine Aggregation vermieden werden konnte. Dem Puffer wurden dann durch lineare Gradienten die denaturierenden Reagenzien entzogen um eine spontane Faltung unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (0-0,7 M NaCl). Nach der Dialyse der Protein enthaltenden Fraktionen gegen TRIS-Puffer wurden die gefalteten Fibronektin-Gelatinasen mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 45). Im Gegensatz zu den anderen klonierten Fibronektin-Proteinasen fand hier keine Prozessierung statt, so daß definierte Banden detektiert werden konnten.

Für die Charakterisierung von Substrat- und Spaltungsspezifitäten standen die Fn-Gelatinasen pFnGel und cFnGel somit in homogen gefalteter Form zur Verfügung.

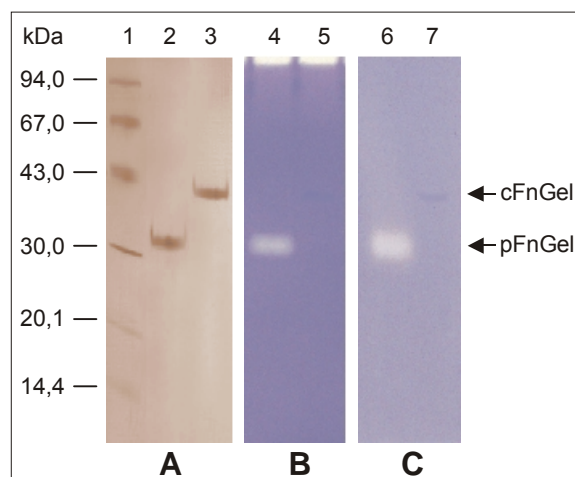
### **7.9.2. Charakterisierung der Substratspezifität**

Um die Aktivität und die Substratspezifität der Fibronektin-Gelatinasen zu überprüfen, wurden verschiedene Substrate zu Spaltungsexperimenten verwendet. Die Kollagene vom Typ I, II und IV sowie die Muskelproteine Aktin und Myosin und die synthetischen Mca- und DNP-Peptide konnten nicht als potentielle Substrate identifiziert werden. Für erste Aktivitätstests wurden daher die bekannten Substrate Gelatin und Plasma-Fibronektin verwendet. Zur Ermittlung der Spaltungsspezifität diente die oxidierte Insulin B-Kette.

### 7.9.2.1. Spaltung von Gelatin und Plasma-Fibronektin

Die aus der korrekten Faltung resultierende proteolytische Aktivität der Fibronektin-Gelatinasen konnte durch Zymographie nachgewiesen werden. Abb. 45 zeigt Substratgele mit einpolymerisiertem Gelatin und Plasma-Fibronektin.

Abb. 45 : **A)** 10%iges PAA-Gel der gefalteten Fn-Gelatinasen nach Silber-Färbung.  
**B)** 10%iges Gelatin-Zymogramm der Fn-Gelatinasen nach Coomassie-Färbung.  
**C)** 10%iges Fibronektin-Zymogramm der Fn-Gelatinasen nach Coomassie-Färbung.  
 Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2+4+6 : pFnGel  
 Bahn 3+5+7 : cFnGel



In den Bahnen 4 und 6 sind deutliche Abbaubanden der pFn-Gelatinase detektiert worden. Die Banden hatten ein Molekulargewicht von 32 kDa, welches dem des exprimierten Proteins entspricht. Die Faltung der Proteinase an Q-Sepharose verlief also erfolgreich und resultierte in proteolytischer Aktivität gegen Gelatin und Fibronektin. Für die cFn-Gelatinase konnte dagegen weder gegen Gelatin noch gegen Fibronektin enzymatische Aktivität detektiert werden. Da die Faltungsmethode bei der pFn-Gelatinase jedoch erfolgreich war, sollte auch in diesem Fall von einer korrekten Faltung ausgegangen werden können. Die Entwicklung der proteolytischen Eigenschaften wird daher wahrscheinlich durch das 8. Typ III-Modul, welches der pFn-Gelatinase fehlt, behindert. Zelloberflächen-Fibronektin enthält somit keine latente Gelatinase, die durch Spaltung oder Prozessierung freigesetzt werden kann.

Durch die PAA-Gelelektrophorese in Abb. 45 (Bahnen 1-3) sollten die Fn-Gelatinasen ferner auf die Bildung von Dimeren untersucht werden. Durch ihre Verwandtschaft zu den retroviralen Aspartatproteinasen, die durch Dimerbildung zwei Aspartatreste in einem katalytischen Zentrum zusammenbringen, wurde für die Fibronektin-Proteinase das gleiche Verhalten vermutet. Entsprechende Banden konnten jedoch nicht detektiert werden, so daß es sich vermutlich um instabile Komplexe handelt, die unter SDS-PAGE-Bedingungen aufbrechen und sich (im Zymogramm) erst später wieder zusammenlagern.

### 7.9.2.2. Spaltung der Insulin B-Kette

Die oxidierte B-Kette des Insulins diente als Substrat zur Bestimmung der Spaltspezifität der rekombinanten pFn-Gelatinase. Die Spaltung der Insulin B-Kette erfolgte für drei Stunden bei 37°C. Die durch Proteolyse entstandenen Peptidfragmente wurden anschließend durch RP-HPLC getrennt und durch automatisierten Edman-Abbau identifiziert (Abb. 46).

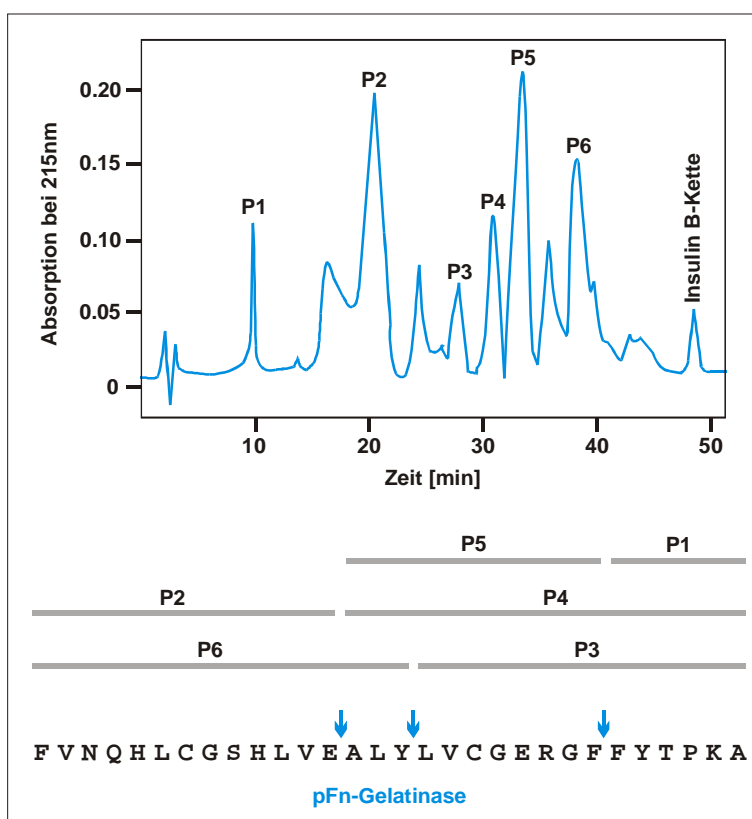


Abb. 46 : Elutionsprofil der erhaltenen Peptide durch RP-HPLC und Bestimmung der Spaltspezifität durch Edman-Abbau.

Aus dem Spaltungsansatz von pFn-Gelatinase und Insulin B-Kette konnten sechs Peptidfragmente (P1-P6) identifiziert werden. Bei den daraus ermittelten Spaltstellen handelt es sich um die Bindungen E<sup>13</sup>-A<sup>14</sup>, Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup> und F<sup>24</sup>-F<sup>25</sup>. Die gleiche Spaltspezifität wurde auch mit der isolierten Fn-Gelatinase bestimmt (Unger und Tschesche, 1999).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Fibronectin-Gelatinase vornehmlich Peptidbindungen von aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren spaltet. Das gleiche Verhalten wurde auch für retrovirale Aspartat-Proteinasen beobachtet, so daß die durch Sequenzvergleich ermittelte Sequenzhomologie der Proteinasen durch ihre Spaltspezifität bestätigt wird (Dunn, 1991; Katz und Skalka, 1994).

## 8. Diskussion und Ausblick

Eine Vielzahl von Studien beschreibt Eigenschaften von Fibronectin-Fragmenten, die im Gegensatz zu den Eigenschaften des Gesamtmoleküls stehen. Während intaktes Fibronectin mit seinen nahezu identischen Untereinheiten die Adhäsion des Proteins an Makromoleküle sowie an Zellen vermittelt und dadurch an verschiedensten biologischen Prozessen beteiligt ist, sind für Fibronectin-Fragmente häufig gegensätzliche Charakteristika beobachtet worden (Hynes, 1989). So sind definierte Fragmente in der Lage, die Expression von MMPs, TIMP-1, uPA und Zytokinen zu erhöhen (Beezhold *et al.*, 1992; Tremble *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994; Bewsey *et al.*, 1996; Homandberg *et al.*, 1998). Andere Fragmente konnten für die Förderung des Gewebeumbaus oder für die Hemmung des Endothelzellenwachstums verantwortlich gemacht werden (De Petro *et al.*, 1983; Homandberg *et al.*, 1986).

Eine weitere interessante Gruppe von Subfragmenten besitzt proteolytische Aktivität gegen Makromoleküle wie Gelatin, Fibronectin, Typ IV-Kollagen und Laminin (Lambert Vidmar *et al.*, 1991a und b; Imhoff *et al.*, 1990). Drei dieser kryptischen Proteinasen wurden zur näheren Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit kloniert und exprimiert. Es handelt sich dabei um die Serinproteinase Fibronectinase (Fnase), die Metalloproteinase Fn-Typ IV-Kollagenase (FnCol) und die Aspartatproteinase Fn-Gelatinase (FnGel).

### 8.1. Fibronectinase

Bei der Fibronectinase handelt es sich um eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Serinproteinase, die sowohl durch PMSF als auch durch EDTA gehemmt werden kann. Sie wurde erstmals 1991 von Lambert Vidmar beschrieben und 1998 von Unger weiter charakterisiert (Lambert Vidmar *et al.*, 1991a; Unger, 1998). Zur Generierung des Enzyms mußte zunächst nach der Methode von Vuento und Vaheri Fibronectin aus humanem Blutplasma isoliert werden (Vuento und Vaheri, 1979). Durch Spaltung des Plasma-Fibronectins mit Kathepsin D entstand u.a. ein 70 kDa Fragment, aus welchem durch weitere Prozessierungsschritte die Fibronectinase generiert wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist der große zeitliche Aufwand bis zur endgültigen Isolierung. Außerdem werden nur geringe Ausbeuten erzielt und die Instabilität der Proteinase erschwert die Charakterisierung. Um die Fibronectinase auf effektivem Weg zugänglich zu machen, wurden *E. coli*-Expressionssysteme entwickelt.

### 8.1.1. Etablierung eines Expressionssystems

*Escherichia coli* gilt als bewährter Wirtsorganismus für die Darstellung rekombinanter Proteine. Die *E. coli*-Bakterien zeichnen sich durch eine einfache Handhabung und hohe Effizienz aus (Hockney, 1994). Nach erfolgreicher Amplifizierung durch PCR wurde die Fibronectinase-cDNA zunächst mittels TA-Kloning in den *E. coli*-Vektor pCR™2.1 kloniert. Da diese Methode eine direkte Einführung des PCR-Produktes in linearisierte Vektoren ermöglicht, also keine Ausbeute verringernde Modifizierung der cDNA erfordert, erwies sich die Klonierungsstrategie als effizient. Alle weiteren Klonierungen von PCR-Amplifikaten wurden daher unter Verwendung dieses Verfahrens durchgeführt. Die erhaltenen Plasmide sind außerdem sofort für eine DNA-Sequenzierung zugänglich. Die klonierte Fnase-cDNA stimmte bei einem Sequenzvergleich mit der bekannten pFn-Sequenz in allen Basen überein.

Für die Expression der Fibronectinase wurde das induzierbare *E. coli* T7-Polymerase-pET-System gewählt. Die Transkription des rekombinanten Proteins wird hier durch den T7-Promotor im pET-Vektor kontrolliert. Mit der in den pET-11a-Vektor klonierten Fnase-cDNA wurden die *E. coli* Stämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] transformiert. So wurden zwei Expressionssysteme erhalten, welche die rekombinante Fibronectinase in hoher Ausbeute als Rohprotein produzieren.

Ein Nachteil des *E. coli*-pET-Systems ist die Aggregation der Expressionsprodukte zu *inclusion bodies*, die nur unter denaturierenden Bedingungen zu solubilisieren sind. Nach der Entwicklung eines Reinigungsverfahrens, durch das die Fibronectinase in zwei Chromatographieschritten bis zur Homogenität gereinigt werden konnte, mußte das rekombinante Protein durch Entzug der denaturierenden Agenzien in seine native Konformation gefaltet werden. Ein Problem stellte dabei die hohe Anzahl von 10 Disulfidbrücken dar. Die Faltung wurde daher in einem *oxido-shuffling*-System durchgeführt, welches die korrekte Knüpfung von Disulfidbrückenbindungen katalysiert. Da es sich bei diesem Verfahren um eine sehr zeit- und kostenaufwendige Technik handelt, wurden auch andere Faltungsstudien durchgeführt, die jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führten.



Die anschließende SDS-PAGE-Analyse verdeutlichte das Problem der Faltung. Statt einer definierten Proteinbande konnte nur noch eine diffuse Bandenstruktur (22-27 kDa) detektiert werden, für die es zwei mögliche Erklärungen gibt. Zum einen kann es bei der hohen Anzahl der Cysteine zu diversen Fehlfaltungen kommen, die zwar alle das gleiche Molekulargewicht besitzen, durch verschiedene Konformationen aber unterschiedliches Laufverhalten während der Elektrophorese zeigen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der vorzeitigen Prozessierung der Fibronectinase. Zur Aktivierung des Enzyms sind zwei autoproteolytische Schritte notwendig, die eventuell schon während der Faltung auftreten können. Nach der Aktivierung beobachtet man jedoch noch immer die diffuse Bandenstruktur, so daß die Erklärung über die Fehlfaltungen wahrscheinlicher ist. Dies bringt auch eine starke Senkung der Ausbeute mit sich. Zwar konnte die rekombinante Fibronectinase in ausreichender Menge für Substrattests bereitgestellt werden, die Gewinnung von korrekt gefaltetem Enzym in großer Ausbeute und Reinheit für Kristallisationsexperimente wurde jedoch nicht erreicht.

Eine Alternative zur Umgehung der Faltungsprozedur ist die Wahl eines eukaryontischen Expressionssystems, welches das Expressionsprodukt in nativer Form produziert. Erste Versuche mit dem Hefe-Stamm *Pichia Pastoris* resultierten zwar in der Expression der Fibronectinase, das Enzym unterlag jedoch nicht der gewünschten Prozessierung und konnte somit nicht aktiv gewonnen werden (Kintscher, 2000).

### 8.1.2. Charakterisierung der Fibronectinase

Die Überprüfung der Aktivierung erfolgte in Fibronectin-Zymogrammen. Für die aktive Fibronectinase konnte ein Molekulargewicht von 22 kDa bestimmt werden, welches dem des isolierten Enzyms entspricht (Lambert Vidmar *et al.*, 1991a). Es konnte also nachgewiesen werden, daß ein Teil des exprimierten Proteins korrekt gefaltet und prozessiert wurde. Somit stand erstmals aktive rekombinante Fibronectinase für die Charakterisierung zur Verfügung.

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fibronectinase wurde in vorhergehenden Arbeiten ein pH-Optimum von 7,2 bestimmt (Unger, 1998). Für nachfolgende Spaltungsversuche wurden daher ideale Pufferbedingungen zur Entfaltung der vollen Aktivität eingestellt. Fibronectinase war nicht in der Lage, Insulin zu degradieren. Zur Bestimmung der Spaltungsspezifität wurde daher das bisher einzige bekannte Substrat, das Plasma-

Fibronectin, eingesetzt. Aus einer Reihe von Spaltprodukten (25-150 kDa) konnten drei Fragmente durch Sequenzierung der N-Termini identifiziert werden. Die daraus resultierenden Spaltstellen lagen alle hinter Arginin-Resten, die in P<sub>2</sub>-Position durch hydrophobe und in P<sub>3</sub>-Position durch saure bzw. amphotere Aminosäuren flankiert waren.

Die größte Sequenzhomologie zu anderen Serinproteinasen besitzt die Fibronectinase zu der Gruppe der Pro-Hormon-Konvertasen, die zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Proteinasen gehören. Die Spaltungsspezifitäten unterscheiden sich allerdings, die Pro-Hormon-Konvertasen spalten ausschließlich hinter Paaren von basischen Aminosäuren (Barret, 1994; Siezen und Leunissen, 1997). Die primäre Spaltungsspezifität entspricht dagegen eher den Trypsin-ähnlichen Proteinasen, welche auch hinter basischen Aminosäuren spalten. Bezüglich der Aminosäuren in P<sub>2</sub>- bzw. P<sub>3</sub>-Position zeigen sie jedoch unterschiedliche Spezifität. Ein weiteres Indiz für die Verwandtschaft der Fibronectinase mit Trypsin-ähnlichen Proteinasen ist das pH-Optimum von 7,2. Die meisten Trypsin-ähnlichen Proteinasen wie Trypsin, Kallikrein oder Faktor Xa weisen ein pH-Optimum zwischen 7 und 8 auf, während die Pro-Hormon-Konvertasen, zu denen die größte Sequenzhomologie besteht, ihre volle Aktivität im sauren Bereich um pH 6 entfalten (Antonov, 1993; Barret, 1994).

Da für die Fibronectinase bislang nur humanes Plasma-Fibronectin und seine Fragmente als Substrat bekannt waren, sollten neue Substrate gefunden werden, um die Rolle des Enzyms in physiologischen oder pathologischen Prozessen näher zu bestimmen. Ein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf des Muskelschwundes konnte zunächst über das Kathepsin D hergestellt werden. In Gewebeproben von Patienten mit Muskeldystrophie wurde eine erhöhte Kathepsin D-Konzentration detektiert, verbunden mit einem starken Rückgang des Muskelgewebes (Iodice *et al.*, 1972; Noda *et al.*, 1981; Whitaker *et al.*, 1983; Gopalan *et al.*, 1987). Die *in vitro* Generierung der Fibronectinase wird durch die Spaltung von Fibronectin mit Kathepsin D eingeleitet, so daß die Fibronectinase eine Rolle bei der Muskeldystrophie spielen könnte. Das rekombinante Enzym wurde daher auf die Fähigkeit zur Degradierung von Muskelproteinen untersucht. Sowohl Aktin als auch Myosin konnten nach kurzer Zeit abgebaut werden und somit erstmals als Substrate der Fibronectinase identifiziert werden. Bei der Aktinspaltung konnten zusätzlich zwei Spaltstellen bestimmt werden, von denen jedoch nur eine der bisher bekannten Spezifität entsprach (E-L-R). Die zweite Spaltung erfolgte nach der Aminosäuresequenz V-M-V.

Durch die Identifizierung der beiden neuen Substrate ergibt sich für die Fibronectinase eine mögliche Rolle im pathologischen Prozeß der Muskeldystrophie. Für weitere Untersuchungen ist daher die Entwicklung spezifischer Antikörper für die aktive Fibronectinase unerlässlich. Durch solche Antikörper können Gewebeproben auf das Vorkommen des aktiven Enzyms untersucht werden. Eine immunhistologische Doppelfärbung von Kathepsin D und Fibronectinase gibt Aufschluß über das räumliche und zeitliche Auftreten der Proteinase und kann so den Beweis für die Involvierung der Fibronectinase in den Muskelabbau erbringen (Schnepel und Tschesche, 2001).

Für die Strukturaufklärung der bisher unbekanntenen aktiven Konformation werden größere Mengen des Proteins benötigt. Dies kann jedoch durch die schon beschriebenen Faltungsprobleme nicht auf diesem Weg erfolgen, vielmehr müssen entweder andere Faltungsstrategien entwickelt werden oder die Entwicklung effizienter eukaryontischer Expressionssysteme erfolgen.

## **8.2. Fibronectin-Typ IV-Kollagenase**

Bei der Fn-Typ IV-Kollagenase handelt es sich um eine Metalloproteinase, die 1991 von Lambert Vidmar beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit erstmals rekombinant dargestellt wurde. Sie wird wie die Fibronectinase aus dem N-terminalen 70 kDa-Fragment des humanen Plasma-Fibronectins, welches durch Proteolyse mit Kathepsin D entstanden ist, generiert. Durch Inkubation bei 37°C in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Ionen entsteht ein 45 kDa-Fragment, welches der Kollagen-Bindungsdomäne von pFn entspricht. Durch Einwirkung von Fibronectinase wird C-terminal ein 5 kDa-Peptid abgespalten und es entsteht die aktive 40 kDa große Fn-Typ IV-Kollagenase A (FnColA). In einem weiteren autokatalytischen Schritt wird durch Abspaltung eines 13 kDa großen C-terminalen Fragmentes die verkürzte Fn-Typ IV-Kollagenase B (FnColB) gebildet (Lambert Vidmar *et al.*, 1991b). Bei der Generierung dieser Metalloproteinase ergeben sich die gleichen Probleme wie bei der Fibronectinase. Zum einen ist die Ausbeute sehr gering, zum anderen ist das Enzym instabil und kann somit nicht gelagert werden. Eine leichte Zugänglichkeit sollte daher die rekombinante Darstellung durch geeignete Expressionssysteme gewährleisten.

### 8.2.1. Etablierung eines Expressionssystems

Die Fibronectin-Typ IV-Kollagenase wurde in zwei Varianten dargestellt, dem Gesamt-Enzym FnColA und der verkürzten Variante FnColB. Voraussetzung für die rekombinante Darstellung war die spezifische Anreicherung der kodierenden cDNAs aus dem Plasmid pFH134/pAT153 mittels PCR-Technik. Die erhaltenen Amplifikate wurden in den *E. coli*-Vektor pCR™2.1 des TA-Kloning-Kits kloniert und über DNA-Sequenzierung charakterisiert. Die erhaltenen Sequenzen zeigten eine völlige Übereinstimmung mit der publizierten Fibronectin-Sequenz (Kornblihtt *et al.*, 1983).

Für die Expression wurde wie bei der Fibronectinase das induzierbare *E. coli* T7-Polymerase-pET-System gewählt. Die FnColA-cDNA wurde in den Vektor pET-11a kloniert, für FnColB wurde eine Sall-Schnittstelle benötigt und daher der Vektor pET-12b verwendet. Mit den erhaltenen Plasmiden wurden die *E. coli* Stämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] transformiert und so je zwei Expressionssysteme erhalten, welche die rekombinanten Fn-Typ IV-Kollagenase-Varianten in hoher Ausbeute als Rohproteine produzieren. Die im Vergleich zu den isolierten Proteinase niedrigeren Molekulargewichte sind dabei auf fehlende Glykosylierung zurückzuführen. In der Nähe des aktiven Zentrums befinden sich drei potentielle Glykosylierungsstellen (Abb. 4).

Zur Reinigung der in denaturierter Form vorliegenden Expressionsprodukte wurde ein chromatographisches Verfahren entwickelt, welches eine Anreicherung der Proteine in homogener Form erlaubte. In einer früheren Arbeit wurde die Expression von FnColA mit einem N-terminalen *His-Tag* als Fusionsanteil beschrieben. Dies diente der einfachen Reinigung, unterdrückte jedoch später die Entwicklung proteolytischer Aktivität (Schnepel, 1997). Schwierigkeiten ergaben sich wie bei der Fibronectinase auch hier bei der Faltung der Proteine. Die hohe Anzahl an Cysteinen (24 bei FnColA; 16 bei FnColB) erforderte den Einsatz des *oxido-shuffling*-Systems aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol.

Bei der Überprüfung der Faltung durch SDS-PAGE konnten keine definierten Proteinbanden mehr detektiert werden. Für beide Varianten wurde eine diffuse Bandenstruktur bei 20-24 kDa erhalten. In diesem Fall kann die Begründung nicht allein

in einer hohen Zahl von Fehlfaltungen liegen, da beide exprimierten FnCol-Varianten ein höheres Molekulargewicht besitzen. Wie von Lambert Vidmar beschrieben entsteht FnColB durch Autoprozessierung aus FnColA. Aber auch die verkürzte Variante ist nicht stabil, sondern zerfällt weiter. Für das Auftreten der diffusen 20-24 kDa Bande muß daher angenommen werden, daß die rekombinanten Fn-Typ-IV-Kollagenasen nicht stabil sind und schon während der Faltung prozessieren. Daraufhin wurde versucht die Autolyse durch Zusatz von Inhibitoren zu unterdrücken. Dies gelang durch Verwendung von EDTA, resultierte jedoch später in totalem Aktivitätsverlust. Der Einsatz von Batimastat und TIMP-2 hatte dagegen keinen Erfolg. Durch den aus der Faltung resultierenden Ausbeuteverlust konnte die Fn-Typ IV-Kollagenase zwar in ausreichender Menge für Substrattests bereitgestellt werden, die Gewinnung von korrekt gefaltetem Enzym in großer Ausbeute für Kristallisationsexperimente oder für die Herstellung von Antikörpern wurde jedoch nicht erreicht.

### **8.2.2. Charakterisierung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase**

Um die Faltungsansätze von FnColA und FnColB auf ihre proteolytische Aktivität und die während der Faltung aufgetretene Prozessierung zu überprüfen, wurden Zymogramme mit Gelatin als Substrat angefertigt. Es wurden dabei zwei aktive Hauptfragmente von 20 und 24 kDa detektiert. Desweiteren konnten einige größere Fragmente mit einer schwächeren Aktivität beobachtet werden, die wahrscheinlich durch Oligomerisierung entstehen. Die Hauptfragmente hatten jeweils ein geringeres Molekulargewicht als die klonierten Proteine, zudem entstanden aus beiden FnCol-Varianten genau diese Fragmente. Es muß also von einer Prozessierung ausgegangen werden, die sowohl für FnColA als auch für FnColB auf gleichem Weg abläuft. Zwischen dem 20 kDa- und dem 24 kDa-Fragment konnte kein Unterschied bei der Aktivität, Substratspezifität oder Spaltungsspezifität festgestellt werden. Aufgrund der Molekulargewichte der Fragmente wurde folgendes Modell für die Prozessierung aufgestellt (Abb. 47).

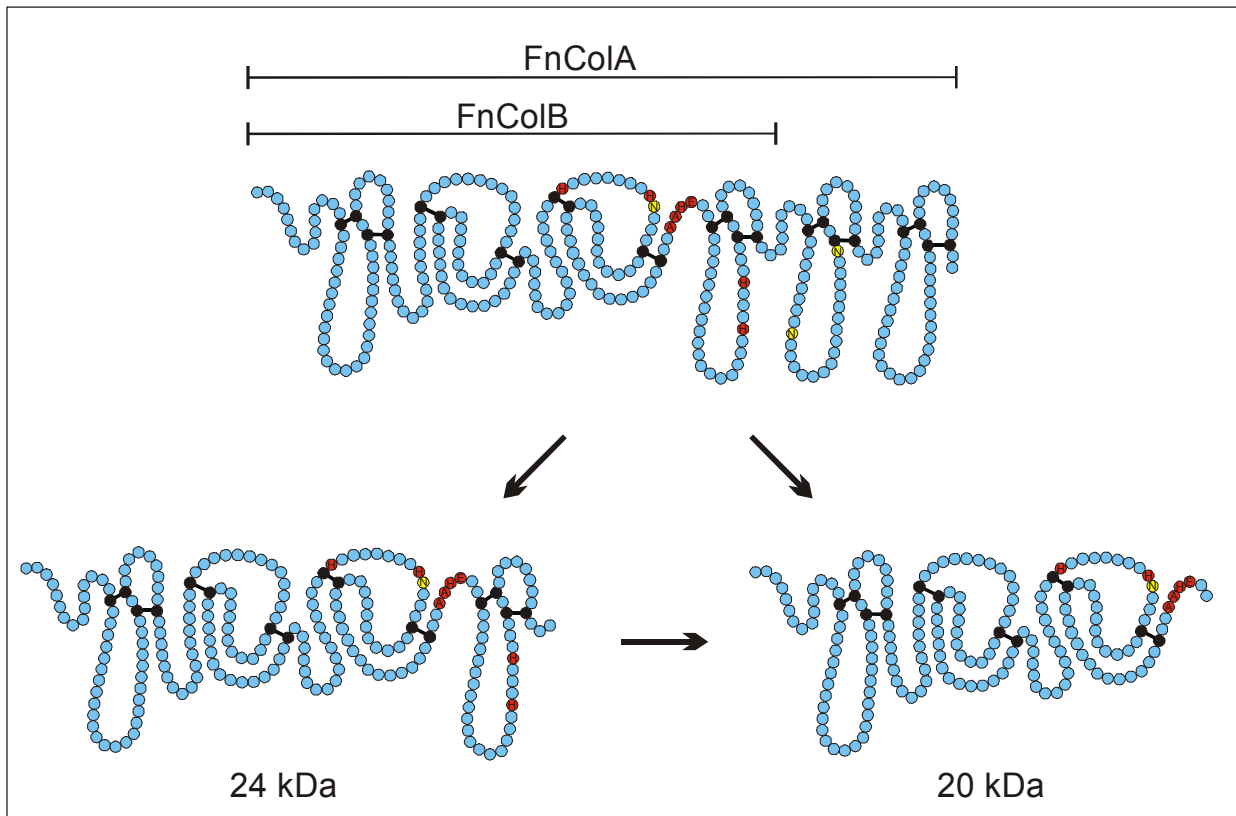


Abb. 47 : Modell für die Prozessierung von FnColA und FnColB zu proteolytisch aktiven 20 und 24 kDa-Fragmenten.

Bei einem Sequenzvergleich der Fn-Typ IV-Kollagenase mit anderen Metalloproteinasen zeichnete sich eine große Homologie zu den Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) ab, da auf der N-terminalen Seite des katalytischen Zentrums zwei Fibronectin-Typ II-Module lokalisiert sind (Abb. 48). Diese vermitteln wie im Fibronectin die Bindungsaffinität zu Gelatin und Kollagen.

FnCol	CTSEGR	RDNMK	WCGTTQ	NYDADQ	KFGFCP	-----	MAAHE	EI	C	TT	N	EG	V	MYRIGDQ	WDKQ	HDMGH		
MMP-2	CTSAGR	SDGKM	WCATT	ANYDD	DRK	WGFCP	DQGYSLFLV	AAHE	FG	H	AM	G	LE	H	SQDPGAL	MAPIYTYTK		
MMP-9	CTSEGR	GDGRL	WCATT	SNF	SD	KKWGFCP	DQGYSLFLV	AAHE	FG	H	AL	G	LD	H	SSVPEAL	MYPMYRFTE		
Metzinkine								HE	XX	H	XX	G	XX	H				
MMP-1	GGNLAHA	FQPGPG	GIGGDA	HFEDE	DERWTN	NFREYNL	HRV	AAHE	LG	H	SL	G	LS	H	STDIGAL	MYPSYTFSG		
MMP-3	GNVLAHA	YAPGPG	INGDA	HFDDE	QWTKD	TTGTN	FLV	AAHE	IG	H	SL	G	LF	H	SANTEAL	MYPLYHSLT		
MMP-7	NTLAHA	FAPGTG	LGGDA	HFEDE	DERWTD	GSSSLG	INFLYA	ATHE	LG	H	SL	G	MG	H	SSDPNAV	MYPTYGN		
MMP-8	NGILAHA	FQPGQ	GIGGDA	HFEDE	AEETW	TNTS	ANYN	FLV	AAHE	FG	H	SL	G	LA	H	SSDPGAL	MYPNYAFRE	
MMP-10	GHSLAHA	YPPGPG	LYGDI	HFDDE	KWTE	DASG	TN	FLV	AAHE	LG	H	SL	G	LF	H	SANTEAL	MYPLYNSFT	
MMP-11	GILAHAF	FPKTH	REGDV	HFDY	DETWT	IGDDQ	GTDL	LQV	AAHE	FG	H	VL	G	LQ	H	TTAAKAL	MSAFYTFRY	
MT1-MMP	LAHA	YFP	GNIGD	THF	DSAE	PWTV	RNED	LNGN	DIFLV	AVHE	LG	H	AL	G	LE	H	SSDPSAI	MAPFYQWMD

Abb. 48 : Sequenzvergleich von Fn-Typ IV-Kollagenase (C<sup>434</sup>-H<sup>492</sup>) mit Vertretern der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

Die Sequenz des katalytischen Zentrums mit dem Zink-Bindungsmotiv der Metzinkine weist vier homologe Aminosäurereste (AAHE) inklusive des ersten Histidinrestes zwischen den Typ II- und den Typ I-Modulen der Fn-Typ IV-Kollagenase auf. Die zwei weiteren, für die Koordination des Metallions wichtigen Histidine des Metzinkin-Zink-Bindungsmotives (-HexxHxxGxxH-) existieren jedoch nicht an den entsprechenden Stellen der Fibronectin-Sequenz. In räumlicher Nähe befinden sich aber vier weitere Histidinreste (H<sup>421</sup>, H<sup>429</sup>, H<sup>488</sup> und H<sup>492</sup>), die möglicherweise für die Koordination des Zinkions verantwortlich sind. Für die Histidin-Reste 421 und 429 spricht das Modell der Prozessierung in Abb. 47, da die Histidine 488 und 492 im aktiven 20 kDa-Fragment nicht mehr vorhanden sind.

Die Spaltungsspezifität wurde durch die Degradierung der oxidierten Insulin B-Kette bestimmt. Wie auch bei der isolierten Fn-Typ IV-Kollagenase konnten die Spaltstellen H<sup>5</sup>-L<sup>6</sup>, H<sup>10</sup>-L<sup>11</sup>, A<sup>14</sup>-L<sup>15</sup> und Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup>, also die N-terminale Seite des Leucins identifiziert werden. Die rekombinante Fn-Typ IV-Kollagenase wies jedoch noch eine weitere Spaltstelle (F<sup>25</sup>-F<sup>26</sup>) auf (Abb. 49). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Spezifität kann aus der Glykosylierung des nativen Enzyms resultieren. Es gibt drei potentielle Glykosylierungsstellen (N<sup>430</sup>, N<sup>528</sup> und N<sup>542</sup>) in der Nähe des katalytischen Zentrums (Abb. 4 und Abb. 47), welche durch sterische Gründe eine unterschiedliche Spaltungsspezifität hervorrufen können.

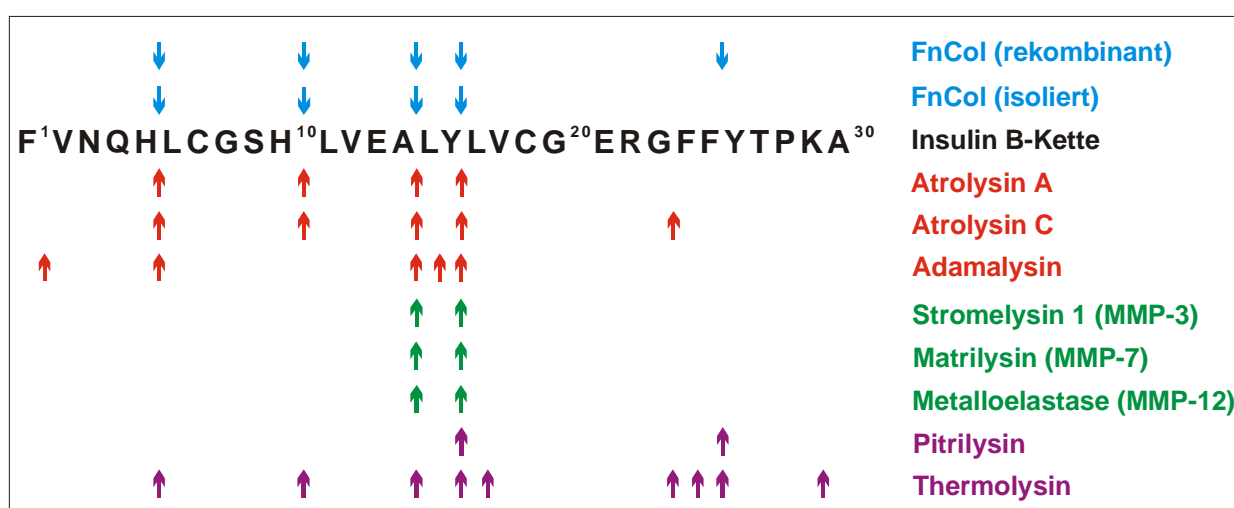


Abb. 49 : Spaltungsspezifität der Fn-Typ IV-Kollagenase gegenüber der Insulin B-Kette im Vergleich zu anderen Metalloproteinasen (Barrett, 1995; Bjarnason *et al.*, 1988; Cheng und Zisper, 1979; Fox *et al.*, 1986; Kruzell und Kress, 1985; Mohihara und Tsuzuki, 1966; Wilhelm *et al.*, 1993; Woessner und Taplin, 1988).

Abb. 49 zeigt einen Vergleich der Spaltungsspezifität der Fn-Typ IV-Kollagenase mit der anderer Metalloproteinasen. Die primäre Spezifität liegt auf der N-terminalen Seite von Leucin. Ähnliche Eigenschaften wurden für die Schlangengiftmetalloproteinasen Atrolysin A, Atrolysin C und Adamalysin gefunden. Die Gelatinasen A und B, zu denen die Fn-Typ IV-Kollagenase die größte Sequenzhomologie hat, spalten dagegen vorzugsweise auf der C-terminalen Seite des Glycins (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Inhibierungsstudien mit den natürlichen Inhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) ergaben einen interessanten Unterschied zwischen der rekombinanten und der isolierten Fn-Typ IV-Kollagenase. Zwar konnten beide Varianten durch EDTA und Batimastat gehemmt werden, bei der rekombinanten Proteinase konnte im Gegensatz zur isolierten jedoch auch eine Inhibierung durch TIMP-2 festgestellt werden. Die untersuchten TIMP-Varianten (bTIMP-2 und idTIMP-2) zeigten dabei die gleichen Ergebnisse und stellten sich sogar als bessere Inhibitoren als Batimastat heraus. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede bei der Inhibierung kann, wie die unterschiedliche Spaltungsspezifität, ebenfalls aus der Glykosylierung des nativen Proteins resultieren. Die fehlenden Kohlenhydrat-Reste können eine räumliche Annäherung des Inhibitors an die rekombinante Fn-Typ IV-Kollagenase ermöglichen. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die inhibitorische Domäne des TIMP-4 (idTIMP4) als potentieller Inhibitor der Fn-Typ IV-Kollagenase identifiziert werden. TIMP-1 zeigte dagegen keine Hemmwirkung.

Eine große Rolle für die biologische Relevanz der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase könnte die Substratspezifität für die Kollagene spielen. Neben dem bekannten Substrat Typ IV-Kollagen war die Proteinase auch in der Lage Kollagen vom Typ II zu degradieren. Typ IV-Kollagen ist Hauptbestandteil der Basalmembranen, welche u.a. die Blutgefäße umschließt. Bei der Metastasierung von Tumorgewebe sondert der Primärtumor zunächst maligne Zellen ab, die über das Blutgefäßsystem in andere Gewebe eindringen. Zur Überwindung der Basalmembran-Barriere sind also vor allem Typ IV-Kollagenasen erforderlich. Ein Nachweis für die Involvierung der Fn-Typ IV-Kollagenase in pathologische Prozesse der Metastasierung konnte jedoch bisher noch nicht erfolgen. Die Substratspezifität zu Typ II-Kollagen könnte bei chronischen Erkrankungen wie Osteoarthritis oder rheumatoider Arthritis eine Rolle spielen. Bei diesen Krankheitsformen tritt eine Schädigung bzw. eine Reduktion des



Gelenkknorpelgewebes auf. Typ II-Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil des Knorpelgewebes, außerdem wurde in Gewebeproben von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis eine erhöhte Konzentration von Fibronectin-Fragmenten festgestellt (Homandberg *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1993). Sollte eines dieser Fragmente als Fn-Typ IV-Kollagenase identifiziert werden, wäre sie in der Lage zum proteolytischen Potential und somit zur Schädigung des Knorpelgewebes beizutragen.

Ein weiteres Ziel ist die Strukturaufklärung der Fibronectin-Typ IV-Kollagenase und ihrer aktiven Fragmente. Dies lässt sich jedoch aufgrund der geringen Ausbeute und der Prozessierung nicht mit der hier entwickelten Methode verwirklichen. Vielmehr müssen andere Expressionssysteme etabliert werden, die größere Ausbeuten liefern und das Protein in korrekt gefalteter Form bereitstellen. Auf diese Weise könnte auch der Mechanismus der Prozessierung aufgeklärt werden. Mit der Bereitstellung größerer Mengen wären die entstehenden Fragmente für eine C-terminale Sequenzierung zugänglich und könnten somit genau identifiziert werden.

### **8.3. Fibronectin-Gelatinase**

Die Fibronectin-Gelatinase ist eine Aspartatproteinase, die durch Pepstatin A und PMSF inhibiert werden kann. Sie wurde erstmals 1990 von Planchenault *et al.* nach der Spaltung von Plasma-Fibronectin mit Kathepsin D isoliert. Die aktive Proteinase wird aus einem 190 kDa-Fragment generiert, wobei der genaue Mechanismus bis heute nicht aufgeklärt werden konnte (Planchenault *et al.*, 1990; Unger und Tschesche, 1999). Um die Fibronectin-Gelatinase in großen Mengen verfügbar zu machen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Expressionssystem entwickelt, welches die rekombinante Darstellung im Wirtsorganismus *Escherichia coli* ermöglicht.

### 8.3.1. Etablierung eines Expressionssystems

Fibronectin-Gelatinase wurde bisher nur aus Plasma-Fibronectin (pFn) isoliert. Eine entsprechende Proteinase aus Zelloberflächen-Fibronectin (cFn), welche zusätzlich die Extra-Domäne B (ED-B) enthält, ist nicht bekannt. Da das für die Amplifizierung der FnGel-cDNA kodierende Plasmid pFH154/pAT153 auch die DNA der ED-B (8. Typ III-Modul) enthält, wurde die Fn-Gelatinase in zwei Varianten kloniert. Die erste Variante entspricht einer bislang unbekanntem cFn-Gelatinase. Damit sollte die Möglichkeit geklärt werden, ob Zelloberflächen-Fibronectin in der Lage ist, eine aktive Gelatinase freizusetzen. Durch Amplifizierung von zwei Einzelfragmenten und darauf folgende Ligation der Amplifikate wurde die cDNA der pFn-Gelatinase erhalten.

Die Sicherung der PCR-Amplifikate erfolgte durch TA-Klonierung in den pCR™2.1-TOPO-Vektor. Als Expressionssystem wurde das bewährte pET-12b-System mit den *E. coli*-Stämmen [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] verwendet. Die Proteine konnten so mit Molekulargewichten von 41,5 kDa (cFnGel) und 32 kDa (pFnGel) überexprimiert werden.

Da beide Fn-Gelatinase-Varianten in ihrer Aminosäuresequenz keine Cysteine enthalten, konnte bei der Faltung auf den Einsatz eines oxido-shuffling-Systems verzichtet werden. Um die native Konformation der Proteine zu erreichen, wurden sie an eine Q-Sepharose-Matrix gebunden. Die Moleküle unterlagen so einer räumlichen Trennung und konnten durch Entzug der denaturierenden Detergenzien nativiert werden. Die Elution mit einem Salzgradienten lieferte die gefalteten Fn-Gelatinasen. Untersuchungen zur Aktivität ergaben jedoch nur für die pFn-Gelatinase eine proteolytische Eigenschaft. Für die cFn-Gelatinase konnte dagegen keine Aktivität nachgewiesen werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß keine kryptische Gelatinase im Zelloberflächen-Fibronectin enthalten ist. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich die Extra-Domäne B, dieses 8. Typ III-Modul könnte aus sterischen Gründen die Bildung eines aktiven Zentrums verhindern.

### 8.3.2. Charakterisierung der Fibronektin-Gelatinase

Die gefalteten Fn-Gelatinasen wurden in Zymogrammen auf ihre Aktivität hin geprüft, wobei Gelatin und Plasma-Fibronectin als bekannte Substrate verwendet wurden. Für pFnGel konnte dabei eine Bande bei 32 kDa detektiert werden, cFnGel zeigte dagegen keine Aktivität. Als weiteres Substrat konnte die oxidierte Insulin B-Kette identifiziert werden, die später zur Bestimmung der Spaltungsspezifität eingesetzt wurde.

Ihre größte Sequenzhomologie hat die Fn-Gelatinase zu den retroviralen Aspartatproteinasen (HIV-1 und HIV-2). Diese nehmen eine Ausnahmestellung unter den sauren Proteinase ein. Während die Aspartatproteinasen normalerweise aus zwei ähnlichen Domänen bestehen, von denen jede jeweils einen der zwei katalytischen Aspartatreste enthält, sind die retroviralen Proteinase Dimere aus identischen Untereinheiten. Jede Untereinheit besitzt einen katalytischen Aspartatrest (DTG-Sequenz) und steuert diesen an der Kontaktfläche zum katalytischen Zentrum bei (Barrett, 1995; Dunn, 1991; Fitzgerald und Springer, 1991). Fn-Gelatinase besitzt in ihrer Primärstruktur ebenfalls nur eine DTG-Sequenz. Frühere Untersuchungen von Unger beschäftigten sich daher schon mit der Dimerisierung bei der isolierten Fn-Proteinase. Der Nachweis gelang jedoch nur mittels Kopplungsreagenzien, was einen Verlust der Aktivität zur Folge hatte (Unger, 1998). Auch im Fall der rekombinanten Fn-Gelatinase konnten keine Dimere nachgewiesen werden. Sowohl im PAA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen als auch in den Zymogrammen wurden keine entsprechenden Banden detektiert. Die dimeren Strukturen sind also anscheinend so instabil, daß es bei der Zymographie erst nach der Elektrophorese zu einer Anlagerung und somit zur Entfaltung der proteolytischen Aktivität kommt.

Die Spaltungsspezifität der Fn-Gelatinase wurde durch Spaltung der oxidierten Insulin B-Kette ermittelt. Nach Aufreinigung der Spaltprodukte durch RP-HPLC und deren Identifizierung durch automatisierten Edman-Abbau konnten folgende Spaltstellen bestimmt werden (Abb. 50):

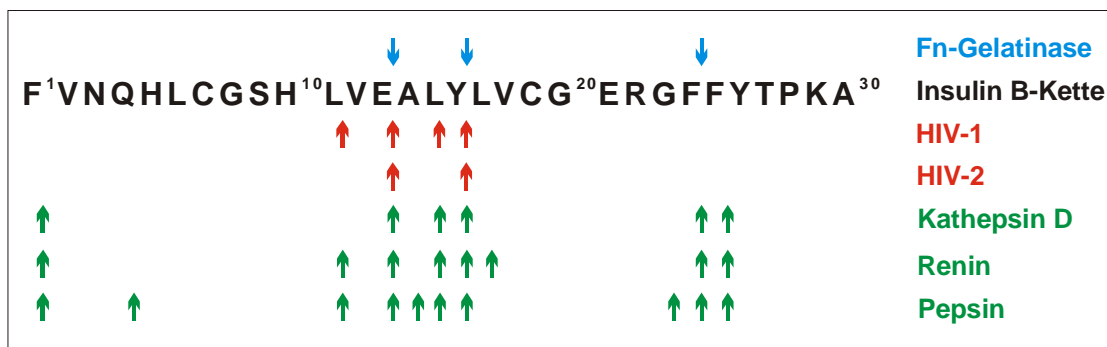


Abb. 50 : Spaltungsspezifität der Fn-Gelatinase gegenüber der Insulin B-Kette im Vergleich zu anderen Aspartatproteinasen (Fish, 1957; Katz und Skalka, 1994; Press *et al.*, 1959; Sanger und Tuppy, 1951).

Die Fn-Gelatinase war dabei in der Lage, die Bindungen E<sup>13</sup>-A<sup>14</sup>, Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup> und F<sup>24</sup>-F<sup>25</sup> zu spalten. Der Vergleich mit anderen Aspartatproteinasen zeigt wiederum die Verwandtschaft zu den retroviralen Proteinasen. Auch diese spalten spezifisch die Bindungen E<sup>13</sup>-A<sup>14</sup> und Y<sup>16</sup>-L<sup>17</sup>. Die Spaltung der F<sup>24</sup>-F<sup>25</sup>-Bindung findet bei der Insulin B-Kette nicht statt, sie wurde jedoch im Alzheimer Amyloid Vorläufer Protein und im pro-Interleukin 1 $\beta$  nachgewiesen (Tomasselli *et al.*, 1991). Andere Aspartatproteinasen, wie Kathepsin D, Renin oder Pepsin, weisen ebenfalls eine ähnliche Spaltungsspezifität auf. Die vorrangige Spezifität für die C-terminale Seite von aromatischen Aminosäuren konnte durch Verwendung synthetischer Peptide von Unger bestätigt werden (Unger, 1998).

Aussagen über die physiologische Relevanz der Fibronectin-Gelatinase können bis jetzt nicht gemacht werden, da die Substratspezifität mit Gelatin und Plasma-Fibronectin keine Zuordnung zu definierten Prozessen zulässt. Ziel muß es daher zunächst sein, aktive Fn-Gelatinase in bestimmten Geweben oder Körperflüssigkeiten nachzuweisen, um auf ihre biologische Funktion zu schließen. Der Nachweis mit Antikörpern könnte dabei mit Schwierigkeiten verbunden sein, da auch inaktive Subfragmente des Fibronectins (Beispiel: cFnGel) detektiert werden. Durch die Etablierung des Expressionssystems besteht zudem die Möglichkeit zur strukturellen Aufklärung des Proteins. Fn-Gelatinase wird mit Hilfe der *E. coli*-Expression in hoher Ausbeute produziert und kann somit für Kristallisationsexperimente und anschließende Röntgenstrukturanalyse verwendet werden. Da über die Struktur von Fibronectin sehr wenig bekannt ist, wäre die Strukturanalyse dieser drei zusammenhängenden Typ III-Module sehr interessant.

## 9. Literatur

- Abe, Y., Tsutsui, T., Mu, J., Kosugi, A., Yagita, H., Sobue, K., Niwa, O., Fujiwara, H., Hamaoka, T., A defect in cell-to-cell adhesion via integrin-fibronectin interactions in a highly metastatic tumor cell line (1997) *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 64-71.
- Akiyama, S.K., Yamada, K.M., Fibronectin (1987) *Adv. Enzymmol.* **57**, 1-57.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1989) *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc., New York, London, 802-824.
- Antonov, V.K., Chemistry of proteolysis (1993) Springer Verlag, Berlin.
- Aznavoorian, S., Stracke, M.L., Krutzsch, H., Schiffmann, E., Liotta, L.A., Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1427-1438.
- Barret, A.J., Proteolytic enzymes: serin and cystein peptidases (1994) *Methods Enzymol.* **244**.
- Barret, A.J., Proteolytic enzymes: aspartatic and metallo peptidases (1995) *Methods Enzymol.* **248**.
- Beauvais, A., Erickson, C.A., Goins, T., Craig, S.E., Humphries, M.J., Thiery, J.P., Dufour, S., Changes in the fibronectin-specific integrin expression pattern modify the migratory behavior of sarcoma S180 cells in vitro and in the embryonic environment (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 699-713.
- Beezhold, D.H., Personius, C., Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes (1992) *J. Leukoc. Biol.* **51**, 59-64.
- Beezhold, D.H., Lause, D.B., Stimulation of rat macrophage interleucin-1 secretion by plasma fibronectin (1987) *Immunol. Invest.* **16**, 437-449.

- Bewsey, K.E., Wen, C., Purple, C., Homandberg, G.A., Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin-1 mRNA and protein in bovine chondrocytes in monolayer culture (1996) *Biochem. Biophys. Acta* **1317**, 55-64.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., Matrix metalloproteinases: A review (1993) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 197-250.
- Bjarnason, J.B., Hamilton, D., Fox, J.W., Studies of the mechanism of hemorrhage production by 5 proteolytic hemorrhage toxins from *Crotalus atrox* venom (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 121-129.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel, J., Gotschli, E.C., A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots (1984) *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Boudjennah, L., Dalet-Fumeron, V., Ylatupa, S., Pagano, M., Immunopurification and characterization of a collagenase/gelatinase domain issued from basement membrane fibronectin (1996) *FEBS Letters* **391**, 52-56.
- Boudjennah, L., Dalet-Fumeron, V., Pagano, M., Expression of collagenase/gelatinase activity from basement-membrane fibronectin - Isolation after limited proteolysis of a bovine lens capsule and molecular definition of this thiol-dependent zinc metalloproteinase (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 246-254.
- Brown, L.F., Dubin, D., Lavigne, L., Logan, B., Dvorak, H.F., van de Water, L., Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing (1993) *Amer. J. Pathol.* **142**, 793-801.
- Buchner, J., Pastan, I., Brinkmann, U., A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies (1992) *Analyt. Biochem.* **205**, 263-270.

- Carnemolla, B., Cutolo, M., Castellani, P., Balza, E., Raffanti, S., Zardi, L., Characterization of synovial fluid fibronectin from patients with inflammatory diseases and healthy subjects (1984) *Arthritis Rheum.* **27**, 913-921.
- Carsons, S., Lavietes, B.B., Diamond, H.S., Kinney, S.G., The immunoreactivity, ligand and cell binding characteristics of rheumatoid synovial fluid fibronectin (1985) *Arthritis Rheum.* **28**, 601-612.
- Cheng, Y.S.E., Zisper, D., Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli* (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4698-4706.
- Clark, R.A.F., Wikner, N.E., Doherty, D.E., Norris, D.A., Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12115-12123.
- Clark, R.A.F., Colvin, R.B., Wound Repair (1985) in: Plasma fibronectin: structure and function (ed. By McDonagh, J.), Marcel Dekker, New York, 197-263.
- Clark, R.A.F., Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin (1990) *J. Invest. Dermatol.* **94**, 1285-1345.
- Colvin, R.B., Fibronectin in wound healing (1989) in: *Fibronectin* (ed. by Mosher, D.F.), Academic Press, San Diego, 213-254.
- Crawford, H.C., Matrisian, L.M., Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression (1994) *Invasion Metastasis* **14**, 234-245.
- De Petro, G., Barlati, S., Vartio, T., Vaheri, A., Transformation-enhancing activity in plasma of tumor patients: relationship with fibronectin fragments (1983) *Int.J.Cancer* **31**, 157-162.
- Docherty, A.J.P., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S., Murphy, G., The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors : prospects for treating degenerative tissue diseases (1992), *TIBTECH* **10**, 200-207.

- Dunn, B.M., Structure and function of the aspartic proteinases (1991) Plenum Press, New York.
- Dutu, A., Vlaicu-Rus, V., Bolosiu, H.D., Parasca, I., Cristea, A., Fibronectin in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases (1986) *Med. Intern.* 21, 61-68.
- Emod, I., Lafaya, P., Planchenault, T., Lambert Vidmar, S., Imhoff, J., Keil-Dlouha, V., Potential proteolytic activity of fibronectin: Fibronectin laminase and its substrate specificity (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 129-135.
- Fallon, A., Booth, R.F.G., Bell, L.D., Applification of HPLC in biochemistry (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam.
- Farr, M., Klonierung, Expression und Charakterisierung verschiedener „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (1998) Dissertation, Universität Bielefeld.
- Farr, M., Pieper, M., Calvete, J., Tschesche, H., The N-terminus of collagenase MMP-8 determines superactivity and inhibition: a relation of structure and function analyzed by biomolecular interaction analysis (1999) *Biochemistry* **38**, 7332-7338.
- Fesus, L., Metsis, M.L., Muszbek, L., Kotelianski, V.E., Transglutaminase-sensitive glutamine residues of human plasma fibronectin revealed by studying its proteolytic fragments (1986) *Eur. J. Biochem.* **154**, 371-374.
- Fish, J.C., Activity and specificity of rennin (1957) *Nature* **180**, 345.
- Fitzgerald, P.M.D., Springer, J.P., Structure and function of retroviral proteases (1991) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 299-320.
- Fox, J.W., Campbell, R., Beggerly, L., Bjarnason, J.B., Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Hat-c and Hat-d from *Crotalus atrox* venom (1986) *Eur. J. Biochem.* **156**, 65-72.



- Furcht, L.T., McCarthy, J.B., Palm, S.L., Basara, M.L., Enestein, J., Peptide fragments of laminin and fibronectin promote migration (haptotaxis and chemotaxis) of metastatic cells (1984) in: Basement membranes and cell movement (ed. by Panter, R., Whelan, J.) Pitman Press, London, 130-145.
- Garcia-Pardo, A., Pearlstein, E., Frangione, B., Primary structure of human plasma fibronectin. The 29 kDa NH<sub>2</sub>-terminal domain (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12670-12674.
- George, E.L., Georges-Lebouesse, E.H., Patel-King, R.S., Rayburn, H., Hynes, R.O., Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin (1993) *Development* **119**, 1079-1091.
- Glanville, R.W., Structure and function of collagen types (1987), Academic Press Inc., 43-79.
- Gopalan, P., Dufresne, M.J., Warner, A.H., Thiol protease and cathepsin D activities in selected tissues and cultured cells from normal and dystrophic mice (1987) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 124-129.
- Greiling, D., Clark, R.A.F., Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix (1997) *J. Cell. Sci.* **110**, 861-870.
- Griffiths, A.M., Herbert, K.E., Perrett, D., Scott, D.L., Fragmented fibronectin and other synovial fluid proteins in chronic arthritis: their relation to immune complexes (1989) *Clinica Chimica Acta* **184**, 133-146.
- Grinnell, F., Fibronectin and woundhealing (1984) *J. Cell. Biochem.* **26**, 107-116.
- Harris, D.E., Warshaw, D.M., Periasamy, M., Nucleotide sequences of the rabbit alpha-smooth-muscle and beta-non-muscle actin mRNAs (1992) *Gene* **112**, 265-266.

- Heukeshoven, J., Dernick, R., Improved silver staining procedure for fast staining in Phastsystem development unit, staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (1988) *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Heussen, C., Dowdle, E.B., Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates (1980) *Anal.Biochem.* **102**, 196-202.
- Hockney, R.C., Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli (1994) *Trends. Biotechnol.* **12**, 456-463.
- Homandberg, G.A., Hui, F., Wen, C., Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 325-331.
- Homandberg, G.A., Meyers, R., Xie, D.L., Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3597-3604.
- Homandberg, G.A., Hui, F., Arg-Gly-Asp-Ser analogs suppress cartilage chondrolysis activities of integrin-binding and non-binding fibronectin fragments (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 40-48.
- Homandberg, G.A., Hui, F., Wen, C., Purple, C., Bewsey, K., Koepp, H., Huch, K., Harris, A., Fibronectin fragment induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines (1997) *Biochem. J.* **321**, 751-757.
- Homandberg, G.A., Wen, C., Hui, F., Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid (1998) *Osteoarthritis and Cartilage* **6**, 231-244.
- Homandberg, G.A., Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments (1999) *Frontiers in Bioscience* **4**, 713-730.
- Hooper, N.M., Families of zinc metalloproteinases (1994) *FEBS Letters* **354**, 1-6.

- Huhtala, P., Humphries, M.J., McCarthy, J.B., Tremble, P.M., Werb, Z., Damsky, C.H., Cooperative signaling by  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 867-879.
- Humphries, M.J., Fibronectin and cancer: Rationales for the use of antiadhesives in cancer treatment (1993) *Cancer Biol.* **4**, 293-299.
- Hynes, R.O., Alternation of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3170-3174.
- Hynes, R.O., Fibronectins (1989) Springer-Verlag, New York.
- Imhoff, J.M., Blondeau, X., Planchenault, T., Emod, I., Collagenase activation of latent matrix-degrading proteinases from human plasma fibronectin (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 137-144.
- Iodice, A.A., Chin, J., Perker, S., Weinstock, I.M., Cathepsins A, B, C, D and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chickens (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 166-174.
- Jarnagin, W.R., Rockey, D.C., Koteliansky, V.E., Wang, S., Bissell, D.M., Expressions of variant fibronectins in wound healing. Cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 2037-2048.
- Katz, R.A., Skalka, A.M., The retroviral enzymes (1994) *Annu.Rev.Biochem.* **63**, 133-173.
- Keil-Dlouha, V., Planchenault, T., Potential proteolytic activity of human plasma fibronectin (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5377-5381.
- Kintscher, J., Klonierung, Expression und Charakterisierung der Fibronektinase aus *Pichia Pastoris* (2000) Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Kissel, J.T., Mendell, J.R., Muscular dystrophy: historical overview and classification in the genetic era (1999) *Semin.Neurol.* **19**, 5-7.

- Knight, C.G., Willenbrock, F., Murphy, G., A novel cumarin-labeled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases (1992) *FEBS Letters* **206**, 263-266.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E., Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3218-3222.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E., Human fibronectin: cell specific alternative mRNA splicing generates polypeptide chains differing in the number of internal repeats (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 5853-5868.
- Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E., Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene (1985) *EMBO J.* **4**, 1755-1759.
- Kruzel, M., Kress, L.F., Separation of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake)  $\alpha$ -proteinase from serin proteinase and hemorrhagic factor activities (1985) *Anal. Biochem.* **151**, 471-478.
- Lambert Vidmar, S., Lottspeich, F., Emod, I., Planchenault, T., Keil-Dlouha, V., Latent fibronectin-degrading serine proteinase activity in N-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (1991a) *Eur. J. Biochem.* **201**, 71-77.
- Lambert Vidmar, S., Lottspeich, F., Emod, I., Imhoff, J.-M., Keil-Dlouha, V., Collagen-binding domain of human plasma fibronectin contains a latent type IV-collagenase (1991b) *Eur. J. Biochem.* **201**, 79-84.
- MacLeod, J.N., Burton-Wurster, N., Nian Gu, D., Lust, G., Fibronectin mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15, and I-10 protein segments (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18954-18960.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Mohihara, K., Tsuzuki, H., Proteolytic substrate specificity and some elastolytic properties of a thermostable bacterial proteinase (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 215-218.
- Mohri, H., Fibronectin and integrins interaction (1996) *J. Investig. Med.* **44**, 429-441.
- Morrison, P.R., Edsall, J.T., Miller, S.G., Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma (1948) *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3103-3109.
- Mosesson, M.W., Amrani, D.L., The structure and biologic activities of plasma fibronectin (1980) *Blood* **56**, 145-158.
- Mosher, D.F., Schad, P.E., Kleinman, H.D., Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 781-787.
- Nickeleit, V., Kaufman, A.H., Zagachin, L., Dutt, J.E., Foster, C.S., Colvin, R.B., Healing corneas express embryonic fibronectin isoforms in the epithelium, subepithelial stroma and endothelium (1996) *Am. J. Pathol.* **149**, 549-558.
- Noda, T., Isogai, K., Katunuma, N., Tarumoto, Y., Ohzeki, M., Effects of cathepsin B, H, and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (line 413) of in vivo administration of E-64- (N-[N-(L-3-transcarboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methyl-butylamine) *J. Biochem. (Tokyo)* (1981) **90**, 893-896.
- Norris, D.A., Clark, R.A.F., Swigart, L.M., Huff, J.C., Weston, W.L., Howell, S.E., Fibronectin fragments are chemotactic for human peripheral blood monocytes (1982) *J. Immunol.* **129**, 1612-1613.
- Okada, Y., Nagase, H., Harris Jr, E.D., A metallo-proteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14245-14255.
- Owens, R.J., Kornblihtt, A.R., Baralle, F.E., Fibronectin, the generation of multiple polypeptides from a single gene (1986) *Oxf. Surv. Eucaryot. Genes* **3**, 141-160.

- Peat, E.B., Augustine, N.H., Drummond, W.K., Bohnsack, J.F., Hill, H.R., Effects of fibronectin and group B streptococci on tumor necrosis factor- $\alpha$  production by human culture-derived macrophages (1995) *Immunology* **84**, 440-445.
- Planchenault, T., Lambert Vidmar, S., Imhoff, J., Blondeau, X., Emod, I., Lottspeich, F., Keil-Dlouha, V., Potential proteolytic activity of human plasma fibronectin: Fibronectin gelatinase (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 117-128.
- Potts, J.R., Campbell, I.D., Fibronectin structure and assembly (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 648-655.
- Press, E.M., Porter, R.R., Cebra, J., The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen (1959) *Biochem. J.* **74**, 501-514.
- Reinke, H., Fischer, S., Reimann, F., Tschesche, H., Direct microsequencing of blotted and covalently attached proteins in a cross-flow reaction chamber (1991) in: *Methods in protein sequence analysis* (ed. by Jörnvall, H., Hoög, J.O., Gustavsson, A.M.), Birkhäuser Verlag, Basel, 55-66.
- Ruoslathi, E., Vaheri, A., Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma (1975) *J. Exp. Med.* **141**, 497-504.
- Ruoslathi, E., Wie Krebs sich ausbreitet (1996) *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin*, 18-19, VOD Heidelberg.
- Sanger, F., Tuppy, H., The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin (1951) *Biochem. J.* **49**, 481-490.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.A., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase (1988) *Science* **239**, 487.
- Saiki, I., Cell adhesion molecules and cancer metastasis (1997) *Jpn. J. Pharmacol.* **75**, 215-242.
- Schmitt, M., Jänicke, F., Graeff, H., Tumor-associated proteases (1992) *Fibrinolysis* **6**, 3-26.
- Schnepel, J., Klonierung und Expression der Gelatin-Bindungsdomäne aus Fibronectin und aus der Gelatinase A in *E. coli* (1997) Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Schnepel, J., Tschesche, H., The proteolytic activity of the recombinant cryptic human fibronectin-type IV-collagenase from *E. coli* expression (2000/1) *J. Prot. Chem.*, im Druck.
- Schnepel, J., Tschesche, H., Substrate specificity of recombinant cryptic human fibronectinase : A possible role in muscular dystrophy (2001), Manuskript liegt vor und wird eingereicht.
- Schwarzbauer, J.E., Patel, R.S., Fonda, D., Hynes, R.O., Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript (1987) *EMBO J.* **6**, 2565-2557.
- Sewry, C.A., Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy (2000) *Microsc. Res. Tech.* **48**, 142-154.
- Siezen, R.J., Leunissen, J.A.M., Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serin proteases (1997) *Protein Sci.* **6**, 501-523.
- Stratmann, B., (2000) Universität Bielefeld, Persönliche Mitteilung.

- Takizawa, T., Nishinarita, S., Kitamura, N., Hayakawa, J., Kang, H., Tomita, Y., Mitamura, K., Yamagami, K., Horie, T., Interaction of cell-binding domain of fibronectin with VLA-5 integrin induces monokine production in cultured human monocytes (1995) *Clin. Exp. Immunol.* **101**, 376-382.
- Tang, X., Nakata, Y., Hai Ou, L., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokohama, K., The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli* (1994) *Nucl. Ac. Res.* **22**, 2857-2858.
- Timpl, R., Structure and biological activity of basement-membran proteins (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 487-502.
- Tomasselli, A.G., Hui, J.O., Adams, L., Chosay, J., Lowery, D., Greenberg, B., Yem, A., Deibel, M.R., Zurcher-Neely, H., Heinrickson, R.L., Actin, troponin C, Alzheimer amyloid precursor protein and pro-interleukin 1 $\beta$  as substrates of the protease from human immunodeficiency virus (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14548-15553.
- Tremble, P.M., Damsky, C.H., Werb, Z., Fibronectin fragments, but not intact fibronectin, signaling through the fibronectin receptor, induced metalloproteinase gene expression in fibroblasten (1992) *Matrix* **1**, 212-214.
- Unger, J., Tschesche, H., The proteolytic activity and cleavage specificity of fibronectin-gelatinase and fibronectin-lamininase (1999) *J. Prot. Chem.* **18**, 403-411.
- Unger, J., Isolierung und Charakterisierung proteolytisch aktiver Fibronektin-Fragmente (1998) Dissertation, Universität Bielefeld.
- Urtizbera, J.A., Therapies in muscular dystrophy: current concepts and future prospects (2000) *Eur. Neurol.* **43**, 127-132.
- Vuento, M., Vaheri, A., Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions (1979) *Biochem. J.* **183**, 334-337.
- Vuorio, E., de Crombrughe, B., The family of collagen genes (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 837-872.



- Weber, K., Osborne, M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelectrophoresis (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Weinberg, R.A., Wie Krebs entsteht (1996) *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin*, 7-17, VOD Heidelberg.
- Wennerberg, K., Lohikangas, L., Gullberg, D., Johansson, S., Fässler, R.,  $\beta$ 1 Integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 227-238.
- Whitaker, J.N., Bertorini, T.E., Mendell, J.R., Immunocytochemical studies of cathepsin D in human skeletal muscle (1983) *Ann. Neurol.* **13**, 133-142.
- Wilhelm, S.M., Shao, Z.H., Housley, T.J., Seperack, P., Baumann, A.P., Smith, Z.G., Woessner, J.F., Matrix metalloproteinase-3 (Stromelysin-1): identification as the cartilage acid metalloproteinase and effect of pH on the catalytic properties and calcium affinity (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21906-21913.
- Woessner, J.F., Taplin, C.J., Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of rat uterus (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16918-16925.
- Xie, D.L., Meyers, R., Homandberg, G.A., Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid (1992) *J.Rheumatol.* **19**, 1448-1452.
- Xie, D.L., Homandberg, G.A., Fibronectin fragments bind to and penetrate cartilage tissue resulting in proteinase expression and cartilage damage (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1182**, 189-196.
- Xie, D.L., Hui, F., Meyers, R., Homandberg, G.A., Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 205-212.
- Yamada, K.M., Fibronectin domains and receptors (1989) in: *Fibronectin* (ed. by Mosher, D.F.), Academic Press, San Diego, 47-121.