

## 9. ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHUNGEN ZU KOLLAGEN IV

### 9.1. Struktur und Faltung von Kollagen

Kollagene sind Proteine eukaryontischer Organismen, die aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind. Sie werden in verschiedene Typen eingeteilt, die in unterschiedlichen Geweben und Organen vorkommen (Kielty *et al.*, 1993). Die Primärstruktur dieser Ketten ist eine Folge von Triplets der Form  $-\text{[Gly-Pro-Hyp]}_n-$ . Eine einzelne Kollagenkette bildet eine linksgängige Polyprolin-II-Helix (Sekundärstruktur). Drei Kollagenketten bilden als Tertiärstruktur eine Kollagentripelhelix, die eine rechtsgängige Schraube mit einer Ganghöhe (*pitch*) von 8 nm darstellt. Die Seitenketten der Aminosäuren X und Y auf der Oberfläche der Tripelhelix (Zylindermantel) bilden wiederum eine linksgängige Schraube mit einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Ganghöhe von 0,9 nm (Eble, 1994; Traub & Piez, 1971). Die Struktur der Tripelhelix wurde von RICH und CRICK 1955 vorgeschlagen (Rich & Crick, 1955). Die Analyse der Kristallstruktur eines kollagenen Peptides (Auflösung 1,9 Å) durch die Gruppe um Helen BERMAN bestätigte 1994 eindrucksvoll die originalen Koordinaten (Bella *et al.*, 1994).

Die Tripelhelix von Kollagenen zeigt einen charakteristischen Circular dichroismus im Fern-UV mit einem positiven Extremum bei 221 nm (Engel, 1987). Nach thermischer Denaturierung von Kollagen wird eine Inversion des Signals gemessen, so daß die Faltung durch Messung des Circular dichroismus bei dieser Wellenlänge analysiert werden kann (**R12**).

Die Seitenketten der Tripelhelix sind stark zum Lösungsmittel exponiert. Der Modus der Stabilisierung der Tripelhelix ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gly der einen Kette und Pro in der X-Position der angrenzenden Ketten, Stabilisierungen durch hochgeordnete Wasserbrücken (*water bridges*) und induktive Effekte der Hydroxylgruppen der Hydroxyproline vorgeschlagen (Stetefeld *et al.*, 2003). Das *crosslinking* der selektierten Kollagenketten durch trimere Oligomerisierungsdomänen (NC-Domänen, nicht-kollagene Domänen) (Engel, 2004; Engel & Kammerer, 2000) oder Disulfidbrücken (Barth *et al.*, 2003a; Barth *et al.*, 2003b) begünstigt deren Stabilisierung und die Einstellung des Kettenregisters.

Allgemein beginnt die Faltung der Tripelhelix mit einer durch die Oligomerisierungsdomänen begünstigten Nukleation (trimolekulare Reaktion), was eine sehr hohe effektive Konzentration der Ketten bedingt (Boudko *et al.*, 2002). Die

Geschwindigkeit der Faltung von Kollagen ist durch die *cis* → *trans*-Isomerisierung der Prolylbindungen bestimmt, da in der intakten Tertiärstruktur nur die *trans*-Konformation vorliegt (Bächinger *et al.*, 1980). Die hohe Lösungsmittelzugänglichkeit der Seitenketten der Prolinreste ließ eine Beschleunigung der Kollagenfaltung durch PPlasen (Cyp18) erwarten (Bächinger, 1987). Aus Experimenten zur limitierten Proteolyse faltender Kollagenketten konnte gezeigt werden, daß die Faltung der Tripelhelix vom C- zum N-Terminus verläuft, wobei Nukleationen auch an beiden Termini auftreten können (Frank *et al.*, 2003). Von PROCKOP und ENGEL wurde ein Reißverschlußmodell der Kollagenfaltung (*zipper-like model*) vorgeschlagen (Engel & Prockop, 1991).

Transitionskurven der thermischen und chemischen Entfaltung von Kollagen und kollagenen Peptiden zeigten, daß dieser Prozeß kooperativ und meist reversibel ist (Ausnahme zum Beispiel Col2 von Kollagen XIV, **R13**). Die Transitionskurven der Entfaltung und Faltung zeigen jedoch eine Hysterese. Aus systematischen Untersuchungen der Faltung von Kollagen III und daraus hergestellten tryptischen kollagenen Peptiden verschiedener Kettenlänge zeigten ENGEL und BÄCHNIGER, daß der langsame Prozeß der Nukleation (*annealing*) und die Hysterese auf sehr langsame Schritte der Umlagerung / Umorientierung mißgefalteter Regionen des Moleküls zurückzuführen sind. Mit kürzerer Kettenlänge der Fragmente nimmt die Hysterese ab (Engel & Bächinger, 2000).

### 9.2. Kollagen IV als Bestandteil der Basalmembran

Die Basalmembran ist eine spezielle schichtartige Struktur der extrazellulären Matrix und trennt in allen Organen den Parenchymanteil (Epithel- und Endothelzellen, Muskelzellen und Muskelfasern, Nervengewebe) vom organspezifischen Bindegewebe (Stroma) ab. Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen IV, Laminin, Nidogen / Entaktin und Perlecan. Kollagen IV hat eine Länge von ca. 400 nm und ist ein Glykoprotein. Die heteromere Tripelhelix wird aus zwei  $\alpha$ 1-Ketten und einer  $\alpha$ 2-Kette gebildet, wobei auch andere Isoformen bekannt sind. Die einzige N-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratkette befindet sich in der N-terminalen 7S-Domäne. Die Tripelhelix von Kollagen IV besitzt einen sehr hohen Glykosylierungsgrad, wobei  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 → 2)-D-galactopyranosyl-Reste O-glykosidisch an 5-Hydroxylysinreste gebunden sind. Lysinreste in Y-Stellung

werden zu 95 % von Lysin-5-hydroxylase hydroxyliert, von denen 80-90 % glykosyliert werden (Eble, 1994; Kielty *et al.*, 1993).

Kollagen IV unterscheidet sich von interstitiellen Kollagenen durch die Ausbildung netzartiger Strukturen. Am N-Terminus werden in der 30 nm langen 7S-Domäne vier Tripelhelices durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent vernetzt. Diese Verknüpfungen werden durch intermolekulare Aldolnetzungsprodukte ergänzt, die aus Lysin- und 5-Hydroxylysinresten nach deren Oxidation durch Lysyloxidase entstehen. Die Tripelhelix von Kollagen IV hat eine Länge von 360 nm. Am C-Terminus befindet sich die NC1-Domäne, die aus zwei NC1 $\alpha$ 1-Untereinheiten und einer NC1 $\alpha$ 2-Untereinheit aufgebaut ist (Eble, 1994; Kielty *et al.*, 1993). Die Struktur dieser Domäne wurde 2002 aufgeklärt (Than *et al.*, 2002). Die NC1-Domänen zweier Tripelhelices können kovalent über eine ungewöhnliche Met-Lys-Brücke verbunden werden und bilden ein sogenanntes Dimer. Ferner können die Tripelhelices von Kollagen IV lateral assoziieren (Eble, 1994). Das aus diesen Möglichkeiten der Verknüpfung der Ketten resultierende Netzwerk von Kollagen IV bildet das Grundgerüst der *Lamina densa* der Basalmembran.

### 9.3. Untersuchungen zur thermischen Stabilität des Bindungsbereiches des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) an Kollagen IV

Integrine sind membranständige Zelladhäsionsmoleküle, die Zell-Matrix-Kontakte gewährleisten und bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Eble, 1994; Humphries *et al.*, 2003). Das Integrin  $\alpha_1\beta_1$  (VLA1) bindet an Kollagen IV (Vandenberg *et al.*, 1991). Untersuchungen der Bindung dieses Integrins an durch limitierte Proteolyse hergestellte Fragmente von Kollagen IV (F1, F2, F3, F4 und TL1) zeigten, daß diese Wechselwirkung durch die Aminosäuren Asp461 der beiden  $\alpha_1$  und Arg461 der  $\alpha_2$ -Kette essentiell bestimmt wird (**R14**). Der Bindungsbereich des Integrins  $\alpha_1\beta_1$  (VLA1) an Kollagen IV liegt daher im N-terminalen Teil des Moleküls zwischen zwei Disulfidknoten [Disulfidknoten I der  $\alpha_1$ -Ketten (Cys454), Disulfidknoten II der  $\alpha_1$ -Ketten (Cys487, Cys490) und  $\alpha_2$ -Ketten (Cys486, Cys488)].

Die Untersuchung der thermischen Stabilität der proteolytischen Fragmente F1, F4 und TL1 wurde mittels Fern-UV Circular dichroismus untersucht (**R14**). Das Fragment F1 zeigte zwei Transitionen des Entfaltungsprozesses mit  $T_m^1 = 37$  °C und  $T_m^2 = 49$  °C. Die Faltung des thermisch denaturierten Fragmentes F1 zeigte

ebenfalls zwei Transitionen, wobei eine Hysterese zur Entfaltung nur für den ersten Transitionsbereich gemessen wurde. Das Fragment F4 entspricht dem tripelhelikalen Teil zwischen den beiden Disulfidknoten und zeigt bei der thermischen Entfaltung nur noch die Transition mit  $T_m = 51$  °C. Somit konnten erstmals stabilere lokale Bereiche der Tripelhelix von Kollagen IV nachgewiesen werden, die keine Hysterese der Faltung im Vergleich zur Entfaltung aufweisen. Das Fragment TL1 entspricht der C-terminalen Hälfte des Fragmentes F4. Trotz tripelhelikaler Struktur besitzt es eine geringere thermische Stabilität. Untersuchungen der thermischen Stabilität von Modellpeptiden von Kollagen IV, die auf der Grundlage der Struktur der Bindungsstelle der Integrine synthetisiert wurden, konnten die Messungen und Interpretationen der Ergebnisse der natürlichen Präparate bestätigen (Sacca *et al.*, 2002a).

#### *9.4. Bestimmung des Rasters der Kollagenketten im Bereich der Bindungsstelle des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) (R15)*

Für die Synthese von Modellpeptiden zur Inhibition der Bindung von Integrinen an Kollagen IV war es von Interesse, den Raster der drei Einzelketten der Tripelhelix im Bereich des Disulfidknotens zu bestimmen. Kollagen IV besitzt zwischen den Disulfidknoten der Integrinbindungsstelle nur einen Tryptophanrest in der  $\alpha_2$ -Kette in Position 479. Aus Betrachtungen der Primärstruktur und bekannten Daten zum FRET zwischen den intrinsischen Fluorophoren von Proteinen wurden die Phe461 der beiden  $\alpha_1$ -Ketten als Donormoleküle und Trp479 der  $\alpha_2$ -Kette als Akzeptormolekül für einen FRET im Fragment F2 in Betracht gezogen. Kollagen ist ein relativ starres Molekül. Es konnte gezeigt werden, daß zwischen den im Fragment F2 vorhandenen Tyrosinresten und Trp479 kein FRET besteht. Die vorhandenen Tyrosinreste wurden nitriert um eine optische Perturbation einzuschränken. Der mittlere Abstand zwischen den beiden Donoren und dem Akzeptor wurde nach Messung der Energietransfereffizienz nach FÖRSTER bestimmt (Förster, 1948). Aus dem Modell der Tripelhelix von Kollagen und den Übergangsmomenten der Aromaten konnte der Orientierungsfaktor  $\kappa$  der Förster'schen Gleichung spezifiziert werden, was eine genauere Abschätzung der Abstände der FRET-Paare erlaubte und die konformative Anordnung  $\alpha_1'\alpha_1\alpha_2$  favorisierte. Die Anordnung  $\alpha_1\alpha_2\alpha_1'$  konnte definitiv ausgeschlossen werden. Die Anordnung  $\alpha_2\alpha_1'\alpha_1$  ähnelt konformativ der Anordnung  $\alpha_1'\alpha_1\alpha_2$ .

Neuere Studien der Bestimmung des Kettenregisters mit Modellpeptiden konnten diese Messungen im wesentlichen bestätigen (Sacca *et al.*, 2002a). Die Tripelhelix der Modellpeptide mit dem Register  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1'$  zeigte eine geringere Thermostabilität. Damit wurde eine wesentliche Grundlage zum rationalen Wirkstoffdesign der Integrinbindung an Kollagen IV mit Relevanz zu medizinischen Aspekten der Wundheilung und Tumorinvasion geschaffen (Sacca *et al.*, 2002b).