

Design von Decorin-basierten Peptiden, die an Kollagen I binden, und ihr Potenzial als Adhäsionssequenzen in Biomaterialien

Stefania Federico, Benjamin F. Pierce, Susanna Piluso, Christian Wischke, Andreas Lendlein und Axel T. Neffe*

Abstract: Das Nachbilden der Bindungsepitope von Protein-Protein-Wechselwirkungen mithilfe kleiner Peptide ist wichtig bei der Entwicklung modularer biomimetischer Systeme. Hier beschreiben wir eine Strategie zum Design solcher bioaktiver Peptide, ohne dass Strukturdaten des Proteinkomplexes benötigt werden, und weisen den Effekt der Inkorporierung solcher Adhäsionssequenzen in komplexen Biomaterialsystemen nach. Dazu wurde die hochrepetitive Struktur von Decorin analysiert. Für dessen innere sowie äußere Oberfläche wurden repräsentative Peptide identifiziert und synthetisiert. Nur Peptide auf Basis der inneren Oberfläche binden an Kollagen. Das Peptid mit der höchsten Bindungsaaffinität für Kollagen I führte zu einer geringeren Diffusionsgeschwindigkeit eines gekupelten Farbstoffs in einem Kollagengel. Dimere des Peptids ermöglichen eine physikalische Vernetzung von Kollagen, wodurch der Speichermodul eines Gels stark erhöht werden konnte. Dies belegt das Potenzial der Peptide für das Design von Biomaterialien für die regenerative Medizin.

Ein detailliertes Verständnis von wesentlichen biologischen Interaktionen wie Protein-Protein-Wechselwirkungen bei Zell-Matrix-Kontakten, der makromolekularen Organisation der extrazellulären Matrix (EZM) sowie der Pathogenese von Erreger-induzierten oder degenerativen Erkrankungen bildet die Grundlage, um diese Interaktionen bei der Entwicklung von Biomaterialien und Wirkstoffen zu nutzen.^[1] Bisher basiert die Identifizierung von Adhäsionssequenzen für Anwendungen in Biomaterialien häufig auf Zufallsmethoden wie der Phagen-Display-Strategie^[2] oder auf einem Versuchs- und-Irrtums-Ansatz durch Screening von Sequenzen aus Komponenten der EZM.^[3] Im Unterschied dazu sind bei der Wirkstoffentwicklung rationale Methoden fest etabliert, die Strukturinformationen von Komplexen der Bindungspartner nutzen. Computer-gestützte Analysen und experimentelle Methoden können dann bei der Identifizierung der Bin-

dungsepitope helfen.^[4] Dieser Ansatz wird hier auf das rationale Design Kollagen-bindender Peptide mit Relevanz für Biomaterial-Anwendungen übertragen. Trotz der erheblichen Fortschritte in der medizinische Chemie, chemischen Biologie und Biochemie greifen Biomaterialwissenschaftler interessanterweise bisher nur auf wenige Motive für biomimetisches Design zurück, so z. B. auf RGD-Peptide oder enzymatisch spaltbare Peptide.^[5] Es werden jedoch Motive mit größerer Diversität und Spezifität benötigt, um neuartige Materialfunktionen wie eine zellspezifische Bindung oder eine molekulare Strukturierung von Polymeren^[6] ähnlich der EZM^[7] zu realisieren. Die EZM ist ein Hydrogel, das durch reversible supramolekulare Bindungen zusammengehalten wird, wobei Kollagen der Hauptproteinbestandteil der EZM ist. Die räumliche Ausrichtung des Kollagens in der EZM wird durch Decorin, ein kleines Proteoglycan mit Leucinreichen Wiederholungseinheiten (leucine rich repeats, LRR), mitorganisiert. Decorin bindet an Kollagenfasern und kontrolliert in der EZM die Faserbildung,^[8] deren genauer Mechanismus bisher nicht bekannt ist.^[9]

Hier wird das rationale Design von Peptiden, die die beiden gegensätzlichen Seiten des hufeisenförmigen Decorins repräsentieren, genutzt, um das Bindungsepitop einzugrenzen (Abbildung 1A). Das Peptid mit der höchsten Bindungsaaffinität zu Kollagen I wurde daraufhin als spezifische Adhäsionssequenz verwendet, und zwar einerseits durch Konjugation mit Fluorescein als Modellwirkstoff und andererseits als Dimer, das als physikalischer Vernetzer wirkt. Der hier verfolgte Ansatz, 1) eine biologisch wichtige Interaktion zwischen zwei Makromolekülen zu analysieren und zu verstehen, daraus 2) ein spezifisches Bindungsepitop abzuleiten^[10] und 3) das Bindungsepitop zum Design einer Funktion in einem Material einzusetzen, kann als allgemeingültige Strategie für das biomimetische Design von Materialien dienen.

Decorin besteht aus einem Proteinteil, der aus 12 LRRs aufgebaut ist.^[9] Jede der Wiederholungseinheiten enthält etwa 24 (21–30) Aminosäuren. Decorin ist mit drei N-Glycanen funktionalisiert und enthält darüber hinaus eine Glycosaminoglycan-Kette nahe dem N-Terminus.^[11] Die Röntgenkristallstruktur des Decorins (pdb-Eintrag 1XKU; Abbildung 1A, I) zeigt parallele β -Faltblattstrukturen auf der konkaven Oberfläche (innere Oberfläche, IO). Die konvexe Oberfläche (äußere Oberfläche, AO) weist 3_{10} -Helices, Polyprolin-II-Helices und kurze β -Stränge oder ungeordnete Sequenzen auf.^[12] Homologie-Modeling und Dockingstudien lassen darauf schließen, dass Decorin mit seiner IO an Kollagen bindet.^[13] Diese Vermutung wurde durch Mutationsstudien gestützt, in denen Änderungen der IO zum Verlust

[*] Dr. S. Federico, Dr. B. F. Pierce, Dr. S. Piluso, Dr. C. Wischke, Prof. Dr. A. Lendlein, Dr. A. T. Neffe
Institut für Biomaterialforschung und Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT), Helmholtz-Zentrum Geesthacht
Kantstraße 55, 14513 Teltow (Deutschland)
E-Mail: axel.neffe@hzg.de
Dr. S. Federico, Dr. S. Piluso, Prof. Dr. A. Lendlein, Dr. A. T. Neffe
Institut für Chemie, Universität Potsdam
14476 Potsdam-Golm (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details der Experimente und die Charakterisierung der Verbindungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505227> zu finden.

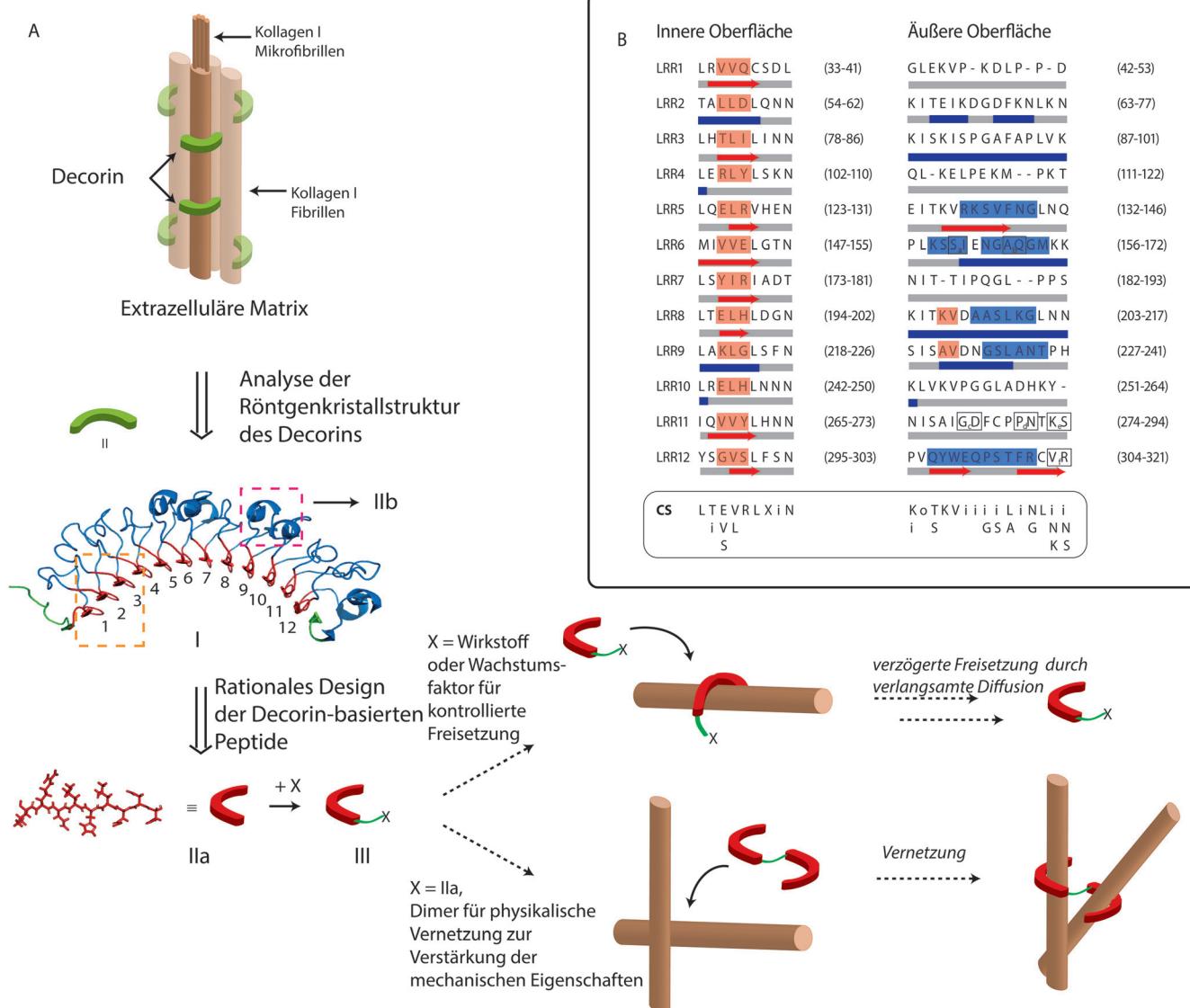


Abbildung 1. A) Decorin (grün) trägt zur räumlichen Organisation von Kollagen-I-Fasern in der EZM bei. Konsensussequenzen der IO (rot, gelbe Box) und der AO (blau, rote Box) des Decorins (I) wurden identifiziert. Repräsentative Peptide (IIa, IIb) wurden synthetisiert und auf ihre Bindungsaffinität zu Kollagen untersucht. Eine stark bindende Peptidsequenz (IIa) wurde kovalent mit einem Farbstoff verknüpft oder dimerisiert (III), um so einen makroskopisch wirksamen Effekt zu erzielen. B) Alignment der Peptidsequenzen der IO und der AO. Die Balken unterhalb des Buchstabencodes zeigen die vorhergesagten Sekundärstrukturen der Peptidsequenzen an (rote Pfeile = β -Faltblatt, blaue Linien = α -Helices). Die farbig hervorgehobenen Buchstaben korrespondieren mit der Sekundärstruktur in der Röntgenstruktur (rot = β -Faltblatt, blau = α -Helices). Rahmen weisen auf das Streichen von Aminosäuren bei der Entwicklung der Konsensussequenzen (CS, unterer Rand) hin.

der Kollagenbindung führten.^[14] Interessanterweise ist die IO auch an der Dimerisierung von Decorin beteiligt.^[15] Wegen der sich wiederholenden Sequenzen der einzelnen Loops ist es wahrscheinlich, dass mehrere Wiederholungseinheiten zur Bindung an Kollagen beitragen und/oder dass die Bindungsaffinität durch Rebinding-Effekte verstärkt wird. Unsere Strategie (Abbildung 1A) bestand darin, zunächst die Konsensussequenzen für die IO- und AO-Wiederholungseinheiten zu identifizieren, anschließend Peptide zu synthetisieren, die für die Konsensussequenzen repräsentativ sind, und in der Folge die Bindungsaffinität der Peptide zu Kollagen zu quantifizieren, um so die Bindungsepitope zu bestimmen.

Decorin wurde anhand der Röntgenstruktur in eine IO und eine AO unterteilt, um das lokale Alignment der Wiederholungseinheiten durchführen zu können. Die sich nicht wiederholenden Peptidsequenzen der N- und C-Termini wurden dabei nicht berücksichtigt.^[12] Die Wiederholungssequenz der IO besteht aus neun Aminosäuren, die den größeren Teil der allgemeinen LRR-Konsensussequenz ($L_{xx}L_xL_{xx}N_xL$) umfassen, die an verschiedenen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist.^[16] Die AO-Sequenzen waren 12–21 Aminosäuren lang. Das durchgeführte manuelle Alignment der Peptidsequenzen beruhte auf einer Kategorisierung der Aminosäureseitenketten als hydrophob

(V, L, I, F, W, M, C), hydrophil (G, A, S, T, Q, N, P, Y), sauer (D, E) oder basisch (K, H, R). Diese Einteilung folgt den Beobachtungen von Rose et al.,^[17] berücksichtigt jedoch auch Ladungen. Die Frequenzanalyse der Aminosäure(kategorien) an den einzelnen Positionen ergab die Konsensussequenzen für die IO und die AO (Abbildung 1B). Entscheidungen über die Insertion von Leerstellen in Peptidsequenzen mit weniger als 15 Aminosäuren oder Streichen von Aminosäuren in den Wiederholungseinheiten mit mehr als 15 Aminosäuren (Abbildung 1B) wurden auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur getroffen (Abbildung 1A, **I**). Peptide, die die Konsensussequenzen der IO und der AO repräsentieren (Tabelle 1), wurden nun durch Mikrowellen-unterstützte Festphasensynthese (Abbildung 2) mit einem Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Verfahren hergestellt und per Umkehrphasen-(RP)-HPLC gereinigt (Reinheit aller Peptide > 95 %). Das korrekte Molekulargewicht der synthetisierten Peptide wurde mit MALDI-TOF-MS bestätigt. Die Peptide wurden weiterhin mit TOCSY-, NOESY- und HSQC-NMR-Spektroskopie charakterisiert.^[18]

Die Bindung der Peptide an Kollagen wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) studiert (Abbildung 3). Die Peptide oder Decorin (aus Rindergelenkknorpel) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen über einen Biacore-CM5-Chip geleitet, auf dem 4000 RU Rinderkollagen I immobilisiert war. Die Dissoziationskonstanten K_D wurden durch einen Angleich der Kurven an ein 1:1-Bin-

Tabelle 1: Übersicht über die synthetisierten Peptide IO1–6 und AO1/2, ihre vorhergesagten Sekundärstrukturen sowie die ermittelten Dissoziationskonstanten für die Bindung zu immobilisiertem Kollagen I (bestimmt per SPR).^[a]

	Analyt	k_{on} [$\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
	Decorin	2465	8×10^{-6}	3.5×10^{-9}
IO1	LTELRLSNN █ → █	k.B.f.	k.B.f.	k.B.f.
IO2	LSELRLHEN	3.0	1×10^{-4}	3.4×10^{-5}
IO3	LTELHLDNN █ → █	2.7	4×10^{-4}	1.6×10^{-4}
IO4	LSELRLHNN	22	5×10^{-3}	2.2×10^{-4}
IO5	LSELRLHAN	6.6	1×10^{-4}	1.9×10^{-5}
IO6	LRELHLNNN	15 300	3×10^{-3}	1.7×10^{-7}
AO1	KITKVEAASLKGNN	k.B.f.	k.B.f.	k.B.f.
AO2	KITKIEGAFAKNLNN	k.B.f.	k.B.f.	k.B.f.

[a] Rote Pfeile: β -Strang, blaue Linien: α -Helices, k.B.f.: keine Bindung festgestellt. Werte wurden unabhängig gerundet.

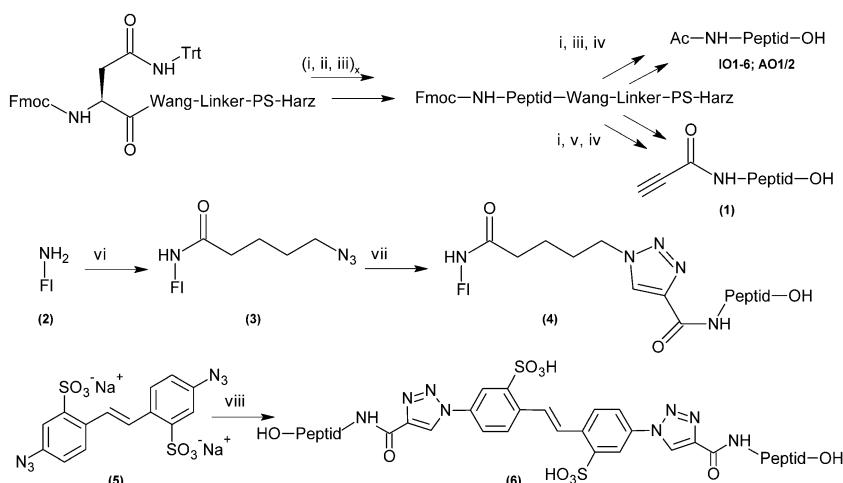


Abbildung 2: Synthese der Peptide IO1–6 und AO1/2 sowie des propionyierte Peptides 1; Synthese des Peptid-Fluorescein-Adduktes 4 und des dimeren Peptides 6. i) 20 % (v/v) Pipridin in NMP; ii) 10 Äquiv. DIPEA, 5 Äquiv. PyBop, 5 Äquiv. Fmoc-Aminosäure-OH; iii) 10 % (v/v) Ac_2O in NMP; iv) TFA/TIPS/H₂O 95:2.5:2.5 (v/v); v) 10 Äquiv. DIPEA, 5 Äquiv. PyBop, 5 Äquiv. Propionsäure; vi) 5-Azidopentansäure, EDC; vii) 1 und CuCl in PBS; viii) 2 Äquiv. 1 und CuCl in PBS. EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, DIPEA = Di-isopropylethylamin, FI-NH₂ = 5-Aminofluorescein, NMP = N-Methylpyrrolidon, PBS = Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung, PyBop = Benzotriazol-1-yl-oxytrityrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure, TIPS = Triisopropylsilan, Trt = Trityl.

dungsmodell bestimmt ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Für Kollagen wurden mehrere Epitope mit unterschiedlichen Bindungskonstanten für die Bindung an Decorin beschrieben. Daher gibt das im

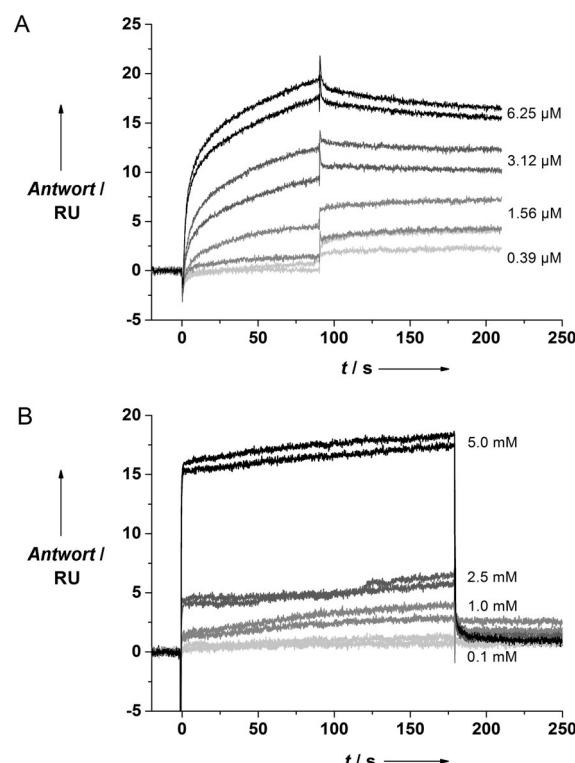


Abbildung 3: SPR-Graphen von A) Decorin und B) IO6 zeigen eine konzentrationsabhängige Bindung zu immobilisiertem Kollagen I.

Einklang mit der Literatur^[19] genutzte 1:1-Modell eine gemittelte Bindungsaffinität wieder. Der K_D -Wert für Decorin und Kollagen war im unteren nanomolaren Bereich ($3.5 \times 10^{-9} \text{ M}$) wie in der Literatur beschrieben,^[20] während die K_D -Werte der Peptide abgeleitet von der IO des Decorins im Bereich von 170 nm bis 220 μM lagen (Tabelle 1). Die k_{off} -Werte der bindenden Peptide befanden sich alle bei 5×10^{-3} bis $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, während die k_{on} -Werte stärker variierten. Von den untersuchten Peptiden zeigte IO6 die niedrigste Dissoziationskonstante für die Bindung zu Kollagen I. Diese Sequenz enthält das Motiv RELH. Dieses wurde als mögliche Komplementärsequenz zu GDRGE beschrieben, einer Sequenz, die in der $\alpha 1$ -Kette der Kollagene I, II und III vorkommt.^[13] Ein wichtiges Resultat der SPR-Experimente war, dass mit nur einer Ausnahme alle untersuchten Peptidsequenzen der IO starke Bindung an Kollagen I zeigten, während die Peptide der AO keine Bindung aufwiesen.

Im nächsten Schritt wurden Experimente durchgeführt, die die molekulare Erkennung der Peptide und des Kollagens in Biomaterial-Anwendungen demonstrieren sollten. Zunächst wurde IO6, das von den betrachteten Peptiden den niedrigsten K_D -Wert für die Bindung zu Kollagen I zeigte, kovalent an einen Farbstoff gebunden. Dies wurde durch die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition von propionyliertem IO6 (**1**; Abbildung 2) mit *N*-(5'-Azidopentanoyl)-5-aminofluorescein unter Bildung von **4** erreicht. Eine wässrige Lösung von **4** wurde in ein Kollagengel injiziert (Abbildung 4A). Als Kontrollen wurden einerseits **4** in einem Hyaluronangel und andererseits die physikalische Mischung von Peptid und Fluoresceinamin sowie von Fluoresceinamin alleine in Kollagengelen untersucht. Die Diffusion wurde mit einem Digital Imaging System (UVP) verfolgt. Die Diffusion von **4** war dabei signifikant langsamer in Kollagen als in Hyaluronan und ebenfalls langsamer als die von Fluoresceinamin (mit oder ohne freies Peptid). Dies belegt, dass die N-terminale Funktionalisierung des Peptides die molekulare Erkennung von Kollagen nicht behindert. Darüber hinaus verlief die Freisetzung von **4** aus einem Kollagengel in einer wässrige Phase langsamer als diejenige von freiem Fluoresceinamin, wie Studien in einem Glaskammermodell mit definierter Größe der Grenzfläche zeigten (siehe Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Da beide analysierten Verbindungen – Farbstoff und Farbstoff-Peptid-Konjugat – ein Molekulargewicht von $< 2 \text{ kDa}$ aufweisen und somit die freie Diffusion in Kollagengelen gegeben ist,^[21] kann die verlangsamte Freisetzung der Peptid-vermittelten Bindung des Konjugates an die Kollagenmatrix zugeordnet werden. Daher können die hier vorgestellten Peptide möglicherweise für eine verzögerte Freisetzung bioaktiver Substanzen genutzt werden.^[22]

Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Peptiddimmer als physikalischer Vernetzer zwischen Kollagensträngen agieren und so den Speichermodul von Kollagengelen erhöhen kann. Dazu wurde das IO6-Dimer **6** durch Reaktion von **1** mit 4,4'-Diazidostilben-2,2'-disulfonsäure-Dinatriumsalz (Abbildung 2) hergestellt. Rheologische Untersuchungen von Kollagengelen mit dem Dimer (Abbildung 4B) zeigten erhöhte Speicher- und Verlustmoduln als bei reinem Kollagen oder Mischungen aus Kollagen und **1**.

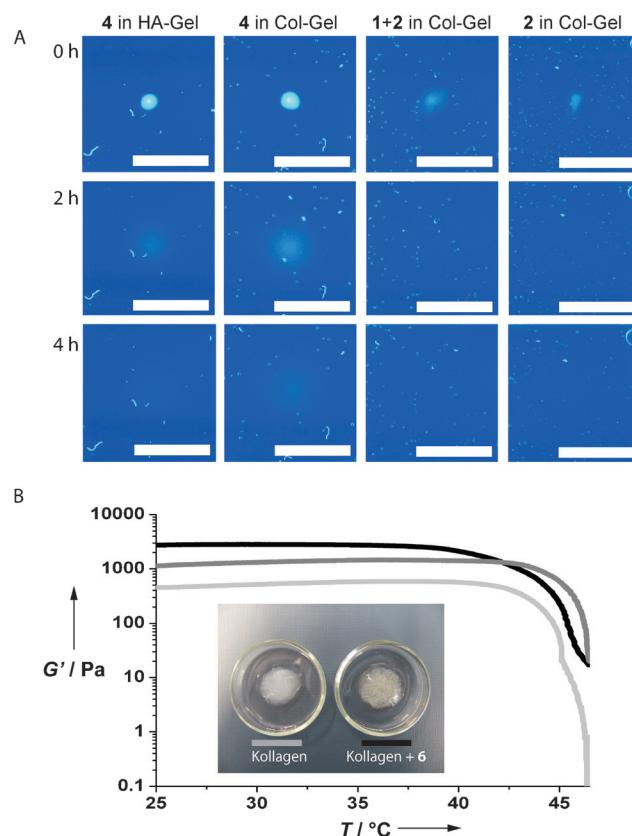


Abbildung 4. Untersuchung der Eignung des Peptides IO6 für die Vergrößerung der Diffusion von Sonden in einem Kollagengel sowie des IO6-Dimers für die Erhöhung des Speichermoduls eines Kollagengels. A) Diffusionsversuch in Hyaluronan(HA)- und Kollagen(Col)-Gelen. **1:** Propionyliertes IO6, **2:** Fluoresceinamin, **4:** propionyliertes **1**, gekuppelt an **2**. Maßstabsbalken: 1 cm. B) Rheologisches Verhalten eines Kollagengels (hellgrau, ■), eines Kollagengels, gemischt mit propionyliertem IO6 (**1**) (dunkelgrau, ■), sowie eines Kollagengels, gemischt mit dem IO6-Dimer **6** (schwarz, ■). Das Bild zeigt ein Kollagengel (links, hellgraue Kurve) und ein Kollagengel, gemischt mit dem Dimer (rechts, schwarze Kurve); Durchmesser der Glasschalen = 4 cm.

Dies kann unter Bestätigung der oben genannten Hypothese darauf zurückgeführt werden, dass die Dimere tatsächlich als Vernetzer des Kollagens wirken. Solche Effekte können von Interesse für die Einstellung der mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen sowie für die Erhöhung von Gewebestabilität sein. Als Kontrollexperiment (siehe Hintergrundinformationen und Abbildung S1) wurde das Propionsäureaddukt von 4,4'-Diazidostilben-2,2'-disulfonsäure ohne Peptidanteil einem Kollagengel zugesetzt. Dies führte nicht zu einer Änderung des maximalen Speichermoduls des Gels, sodass ausgeschlossen werden kann, dass das konjugierte aromatische System als Vernetzer wirkt. Dementsprechend stützen die rheologischen Experimente die Hypothese, dass die Verstärkung der Kollagengele auf dem Effekt der Peptidsequenzen beruht.

Fazit: Die Entwicklung der Konsensussequenzen aus einem Protein mit einer sich stark wiederholenden Sequenz ermöglichte die Identifizierung von Adhäsionspeptiden mit Relevanz als Bindungsepitop in Protein-Protein-Wechselwirkungen. Mithilfe dieser Sequenzen ließen sich funktionale

Biomaterialsysteme realisieren, die auf einer molekularen Erkennung gemäß biomimetischen Konzepten beruhen. Darüber hinaus konnten experimentelle Belege für das Bindungsepitop für die Anbindung von Decorin an Kollagen erlangt werden. Die vorgestellte Strategie der Identifizierung von Adhäsionspeptiden wird vermutlich am effizientesten bei Proteinen mit hochrepetitiver Struktur anwendbar sein; falls jedoch Strukturinformationen über einen biologisch relevanten Proteinkomplex zugänglich sind, wird der hier verfolgte Transfer von Methoden des Wirkstoffdesigns auf die Biomaterialwissenschaften auch darüber hinausgehend möglich sein. Die vorgestellten Beispiele für Materialfunktionen, d.h. die Einstellbarkeit der mechanischen Eigenschaften weicher Hydrogele sowie die verlängerte lokale Retention bioaktiver Substanzen, sind hochrelevant für Anwendungen in der regenerativen Medizin. Die hier vorgestellte, generelle Strategie zur Identifizierung bioaktiver Peptide kann den Zugang zu Sequenzen für unterschiedliche Zielstrukturen eröffnen.

Danksagung

Wir danken H. Schmidt für Unterstützung bei den Freisetzungsexperimenten und der Rheologie, R. Vukicevic und P. Viszokai für ausgewählte Synthesen, der Gruppe von B. Meyer (Universität Hamburg) für Hilfe bei den SPR-Experimenten, S. M. Weidner (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) für MALDI-TOF-MS-Spektren und A. Ritschel für Hilfe bei den Diffusionstests.

Stichwörter: Biomaterialien · Gele · Peptide · Protein-Protein-Wechselwirkungen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10980–10984
Angew. Chem. **2015**, *127*, 11131–11135

- [1] a) N. Huebsch, D. J. Mooney, *Nature* **2009**, *462*, 426–432; b) Q. Liu, W. Wang, L. Zhang, L. Zhao, W. Song, X. Duan, Y. Zhang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 6206–6218; c) V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
- [2] L. E. Little, K. Y. Dane, P. S. Daugherty, K. E. Healy, D. V. Schaffer, *Biomaterials* **2011**, *32*, 1484–1494.
- [3] K. Tashiro, G. C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16174–16182.
- [4] a) A. T. Neffe, B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2937–2940; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2997–3000; b) M. E. Jackrel, A. L. Cortajarena, T. Y. Liu, L. Regan, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 553–562.
- [5] J. H. Collier, T. Segura, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4198–4204.
- [6] A. Maslovskis, N. Tirelli, A. Saiani, A. F. Miller, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6025–6033.
- [7] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 659–664.
- [8] a) K. L. Hindle, J. Bella, S. C. Lovell, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, *77*, 342–358; b) P. G. Scott, P. A. McEwan, C. M. Dodd, E. M. Bergmann, P. N. Bishop, J. Bella, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15633–15638.
- [9] J. P. R. O. Orgel, A. Eid, O. Antipova, J. Bella, J. E. Scott, *PLoS One* **2009**, *4*, e7028.
- [10] E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 457–470.
- [11] M. Raspanti, M. Viola, M. Sonaggere, M. E. Tira, R. Tenni, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2087–2091.
- [12] S. Vesentini, A. Redaelli, F. M. Montevercchi, *J. Biomech. Eng.* **2005**, *38*, 433–443.
- [13] a) D. R. Keene, J. D. San Antonio, R. Mayne, D. J. McQuillan, G. Sarris, S. Santoro, R. V. Iozzo, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21801–21804; b) J. E. Scott, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8795–8799; c) I. T. Weber, R. W. Harrison, R. V. Iozzo, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31767–31770.
- [14] M. Islam, J. Gor, S. J. Perkins, Y. Ishikawa, H. P. Baechinger, E. Hohenester, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35526–35533.
- [15] a) P. G. Scott, J. G. Grossmann, C. M. Dodd, J. K. Sheehan, P. N. Bishop, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18353–18359; b) E. Schonherr, H. Hauser, L. Beavan, H. Kresse, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8877–8883; c) S. Kalamajski, A. Aspberg, A. Oldberg, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16062–16067.
- [16] a) J. Bella, K. L. Hindle, P. A. McEwan, S. C. Lovell, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2307–2333; b) C. Pierrot, A. Freville, C. Olivier, V. Souplet, J. Khalife, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 3522–3530.
- [17] G. J. Lesser, R. H. Lee, M. H. Zehfus, G. D. Rose in *Protein engineering* (Hrsg.: D. L. Oxender, C. F. Fox), Alan R. Liss, New York, **1987**, S. 175–179.
- [18] A. T. Neffe, M. Bilang, I. Grueneberg, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3482–3488.
- [19] R. Tenni, M. Viola, F. Welser, P. Sini, C. Giudici, A. Rossi, M. E. Tira, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1428–1437.
- [20] a) D. A. Carrino, P. Onnerfjord, J. D. Sandy, G. Cs-Szabo, P. G. Scott, J. M. Sorrell, D. Heinegard, A. I. Caplan, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17566–17572; b) G. Nareyek, D. G. Seidler, D. Troyer, J. Rauterberg, H. Kresse, E. Schonherr, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3389–3398; c) J. E. Paderi, A. Panitch, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2562–2566.
- [21] D. G. Wallace, J. Rosenblatt, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1631–1649.
- [22] a) J. Patterson, M. M. Martino, J. A. Hubbell, *Mater. Today* **2010**, *13*, 14–22; b) H. Takahashi, D. Letourneur, D. W. Grainger, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3281–3293.

Eingegangen am 8. Juni 2015

Online veröffentlicht am 23. Juli 2015