

**Klonierung, Expression und Charakterisierung der  
Metalloproteinase-Domäne und Disintegrin-Domäne  
von humanem ADAM 15**

**Dissertation**

**Harald-Gerhard Geppert**

Bielefeld, 2001

**Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Tschesche**

Universität Bielefeld  
Fakultät für Chemie, Biochemie I

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Tschesche

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2001

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. H. Tschesche möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und den wertvollen Anregungen, die zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Ute Reuning bedanken, die mir im Rahmen unserer Kooperation stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft entgegenbrachte und mir einen lehrreichen Forschungsaufenthalt in München ermöglichte. Darüber hinaus war ihre kritische Durchsicht des Manuskriptes von großem Wert für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Carl Blobel danke ich für die freundliche Bereitstellung des anti-Pro- und anti-Ecto-Antikörpers. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Chem. Luise Schindler und Herrn Prof. Dr. N. Sewald für die Bereitstellung einer Reihe fluorogener Peptide.

Bei Herrn Dr. Herbert Wenzel bedanke ich mich für die effektive Unterstützung bei der Erfüllung meiner Dienstobligationen und für die Bereitschaft, sich mit dem Manuskript dieser Arbeit auseinanderzusetzen.

Frau Margot Müller und Herrn Dipl.-Ing. Rainer Beckmann danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen in bürokratischen und technischen Fragen.

Bei Frau Dr. Waltraud Engelhardt und Herrn Dipl.-Biol. Frank Hecht möchte ich mich für die Sequenzierung der cDNAs, sowie bei Frau Sabine Grabolle, Frau Katharina Köster und Herrn Marc-Oliver Luther für die Sequenzierung der Proteinproben bedanken.

Weiteren Dank möchte ich dem Arbeitskreis und insbesondere Herrn Dr. Martin Farr, Herrn Dr. Carsten Schmidt, Herrn Dipl.-Chem. Andreas Kocourek und Herrn Dipl.-Chem. Martin Roderfeld für die kollegiale und motivierende Zusammenarbeit aussprechen.

Herrn Prof. Dr. K. Kleesiek danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Doch der größte Dank gilt meiner Mutter, die mich von Anfang an bei meinen naturwissenschaftlichen Ambitionen unterstützte und mir dieses Studium erst ermöglicht hat.

# INHALTSVERZEICHNIS

## Abkürzungen

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1	Die ADAMs - <i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>	2
2.2	Die Domänen der ADAMs und ihre potentiellen Funktionen	5
2.3	Das humane ADAM 15	15
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden	22
3.2	Proteinchemische Methoden	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1	Synthese und Klonierung der humanen ADAM 15-cDNA	51
4.2	Heterologe Expression von hADAM 15-Domänen in <i>Escherichia coli</i>	54
4.3	Chromatographische Reinigung der rekombinanten hADAM 15-Domänen (MP, ProMP und ProMP~Myc-6H)	57
4.4	Charakterisierung der Expressionsprodukte aus <i>Escherichia coli</i>	57
4.5	Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen die Metalloproteinase-Domäne von hADAM 15	58
4.6	<i>Pichia pastoris</i> als heterologes Expressionssystem für rekombinante hADAM 15-Fragmente: Konzept und Analyse	61
4.7	Die heterologe Expression diverser rekombinanter hADAM 15-Fragmente in <i>Pichia pastoris</i>	67
4.8	Optimierung der heterologen Expression in <i>Pichia pastoris</i>	73
4.9	Chromatographische Reinigung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente aus <i>Pichia pastoris</i>	76
4.10	Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der rekombinant in <i>Pichia pastoris</i> dargestellten hADAM 15-Fragmente	80
4.11	Expression der Ecto-Domäne und des kompletten ( <i>full length</i> ) hADAM 15-Moleküls in Säugerzellen	86
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
5.1	Expression der hADAM 15-mRNA in Karzinomzellen	92
5.2	Die Metalloproteinase-Domäne	93
5.3	Die Disintegrin-Domäne	98
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>100</b>

## ABKÜRZUNGEN

### Abkürzungen

#### Allgemeine Abkürzungen

A $\beta$	<b>beta-Amyloid</b>
Abz	<b>2-Aminobenzoyl</b>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 modules</i>
APMA	<b>4-Aminophenylmercuriacetat</b>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
BCIP	<b>5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz</b>
BPB	<b>Bromphenolblau</b>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
Dpa	<b>3-[2,4-Dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl</b>
hADAM	humanes ADAM
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ib	<i>inclusion bodies</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor-binding protein</i>
IPTG	<b>Isopropylthiogalaktosid</b>
MAD	<i>mitotic arrest deficient</i>
mADAM	murines ADAM
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MCA	<b>7-Methoxycumarin-4-yl)acetyl</b>
MDC	<i>metalloproteinase disintegrin cysteine-rich</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MTT	<b>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</b>
NBT	<b>Nitroblautetrazoliumchlorid</b>
OD	<b>Optische Dichte</b>

## ABKÜRZUNGEN

PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PKC	<i>protein kinase c</i>
PMA	<b>Phorbol-12-myristat-13-acetat</b>
PNGase	<b>Peptid-N-(N-acetyl-<math>\beta</math>-glucosaminy)-asparaginamidase</b>
PVDF	<b>Polyvinylidendifluorid</b>
RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
RT	<b>Raumtemperatur</b>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH3	<i>src homology 3</i>
SVMP	<i>snake venom metalloproteinase</i>
TACE	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPA	<b>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat</b>
TS	<b>Thrombospondin</b>
ZNS	<b>Zentralnervensystem</b>

## Abkürzungen für diverse hADAM 15-Domänen

SigEGF (Ecto)	Ecto-Domäne mit Signalpeptid (M <sup>1</sup> - S <sup>693</sup> )
SigZP ( <i>full length</i> )	Gesamtprotein (M <sup>1</sup> - L <sup>814</sup> )
ProMP	Pro- und Metalloproteinase-Domäne (T <sup>29</sup> - P <sup>419</sup> )
ProMPDis	Pro-, Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne (T <sup>29</sup> - E <sup>510</sup> )
ProEGF	Ecto-Domäne ohne Signalpeptid (T <sup>29</sup> - S <sup>693</sup> )
MP	Metalloproteinase-Domäne (D <sup>207</sup> - P <sup>419</sup> )
MPDis	Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne (D <sup>207</sup> - E <sup>510</sup> )
MPEGF	Ecto-Domäne ohne Signalpeptid und Pro-Domäne (D <sup>207</sup> - S <sup>693</sup> )

## ABKÜRZUNGEN

### Aminosäuren

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

## 1 Zusammenfassung

Durch Isolierung der Gesamt-RNA aus den beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 und der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 konnte mittels RT-PCR und Verwendung spezifischer Primer die für humanes ADAM 15 kodierende *full length*-DNA synthetisiert werden. Die anschließende DNA-Sequenzierung belegte erstmals die konstitutive Expression von hADAM 15 in diesen drei Tumorzelltypen. Durch Verwendung der *full length*-cDNA als PCR-Templat gelang die Klonierung verschiedener hADAM 15-cDNA-Fragmente, die nach Ligation in Expressionsvektoren, zur Transformation bzw. Transfektion von *E. coli* und *P. pastoris* bzw. den beiden Säugerzellen OV-MZ-6 und CHO eingesetzt wurden. Nach Etablierung der entsprechenden heterologen Expressionssysteme war die proteinchemische und zellbiologische Charakterisierung der Funktion von hADAM 15 möglich. Hierzu wurde nach Reinigung der in *E. coli* exprimierten Metalloproteinase-Domäne ein gegen diese Domäne gerichteter polyklonaler Antikörper hergestellt. Nach Reinigung des Antikörpers konnte dieser zur Detektion rekombinanter hADAM 15-Fragmente in der Western-Blot- und Kolonie-Blot-Analyse eingesetzt werden. Der Antikörper ermöglichte Aussagen über Expressionsraten, Prozessierung und Glykosylierung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente. Die heterologe Expression potentiell proteolytisch aktiver und inaktiver Varianten von hADAM 15 in *P. pastoris* erbrachte erstmals Hinweise auf eine proteolytische Aktivität des Enzyms. Nur bei heterologer Expression der Proform der potentiell aktiven Metalloproteinase-Domäne von hADAM 15 wurde die Aktivität einer konstitutiv exprimierten *P. pastoris*-Proteinase unterdrückt. Die Expression der entsprechend potentiell inaktiven Mutante der Proform der Metalloproteinase-Domäne beeinflusste die Aktivität dieser *P. pastoris*-Proteinase nicht. Zusätzlich zur Metalloproteinase-Domäne wurde in dieser Arbeit die Disintegrin-Domäne von hADAM 15 untersucht, die als einzige der bisher bekannten ADAMs ein RGD-Motiv enthält. Hierbei interessierte insbesondere die integrinantagonistische Wirkung von hADAM 15 in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6. Eine Überexpression von hADAM 15 führte in dieser Zelllinie zu einer signifikanten Unterdrückung der Adhäsion auf Vitronektin. Diese antiadhäsive Wirkung könnte auf eine Beteiligung von hADAM 15 bei der Disseminierung von Zellen in andere Gewebe hindeuten. Möglicherweise könnten die antiadhäsiven Eigenschaften von hADAM 15 - in Analogie zu anderen RGD-Disintegrinen - auch zur Induktion apoptotischer Vorgänge führen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die ADAMs - *A Disintegrin and Metalloproteinase*

Die Familie der ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinases*) umfaßt eine Gruppe membranständiger Typ I Glykoproteine (über 40 Vertreter), die sowohl in physiologische (Fertilisation, Myoblastenfusion, Neurogenese) als auch pathologische Prozesse (Arteriosklerose, Osteoarthritis, Alzheimer, Tumorgenese) involviert sind. Sie werden auch als MDCs bezeichnet und sind somit als Proteine mit einer Metalloproteinase-, Disintegrin-, und Cystein-reichen-Domäne klassifiziert. ADAMs stehen in enger Homologie zu den in Schlangengiften gefundenen SVMPs (*snake venom metalloproteinases*) der Klasse P-III. ADAMs und SVMPs gehören beide zur Familie der Adamalysine und diese wiederum zusammen mit den Familien der MMPs (*matrix metalloproteinases*), Astacinen (zuerst im Flußkrebs *Astacus astacus* beschrieben) und Serralysinen (bakterielle Proteinase) zur Superfamilie der Metzinkine. Alle Vertreter der Superfamilie der Metzinkine sind zinkabhängige Proteinase mit einem konservierten Methionin-Rest und einem Zinkbindungsmotiv **HEXXHXXGXXH** in der proteolytisch aktiven Domäne. Im allgemeinen sind ADAMs aus einem Signalpeptid, einer Pro-Domäne, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer EGF(*epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Die Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die bis zum jetzigen Zeitpunkt klonierten und charakterisierten Vertreter dieser Familie. Die ebenfalls aufgeführten ADAMTSs (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 modules*), die anstelle einer Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne mehrere TS(Thrombospondin)-Motive enthalten, stellen lösliche Vertreter der Familie der ADAMs dar.

ADAM	Alternative Bezeichnung	Charakteristika	Literatur
ADAM 1	Fertilin $\alpha$ PH-30 $\alpha$	involviert bei der Fusion von Spermatozoon und Oozyte; Pseudogen bei Primaten und Menschen	Wolfsberg et al. (1993), Perry et al. (1995), Jury et al. (1997), Jury et al. (1998)
ADAM 2	Fertilin $\beta$ PH-30 $\beta$	Interaktion mit dem Oozyten-Integrin $\alpha 6 \beta 1$	Almeida et al. (1995), Cho et al. (1998), Chen et al. (1999a), Chen et al. (1999b), Chen et al. (1999c)

ADAM	Alternative Bezeichnung	Charakteristika	Literatur
ADAM 3A	Cyritestin 1 CYRN1 tMDC I	involviert bei der Adhäsion und Fusion von Spermatozoon und Oozyte; Pseudogen beim Menschen	Linder et al. (1997), Yuan et al. (1997), Adham et al. (1998), Frayne und Hall (1998)
ADAM 3B	Cyritestin 2 CYRN2	existiert in einer membrangebundenen und löslichen Form	Adham et al. (1998)
ADAM 4	tMDC V	vorwiegend Testis-spezifische Expression	Wolfsberg et al. (1995)
ADAM 5	tMDC II	vorwiegend Testis-spezifische Expression; Pseudogen beim Menschen	Wolfsberg et al. (1995), Frayne et al. (1999)
ADAM 6	tMDC IV	vorwiegend Testis-spezifische Expression	Wolfsberg et al. (1995)
ADAM 7	EPA I	Funktion bei der Spermienreifung	Perry et al. (1995), Cornwall und Hsia (1997)
ADAM 8	CD 156 MS2	Funktion bei der Extravasation von Leukozyten und der Differenzierung von Osteoclasten	Yashida et al. (1990), Yoshiyama et al. (1997), Choi et al. (2001)
ADAM 9	MDC 9 Meltrin $\gamma$	wird in vielen Geweben exprimiert; $\alpha$ -Sekretaseaktivität; spaltet die Insulin-B-Kette, Gelatin, Fibronektin und $\beta$ -Casein; Interaktion mit SH3 Proteinen; Shedding von HB-EGF; Interaktion mit den Integrinen $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha v\beta 5$	Izumi et al. (1998), Howard et al. (1999), Koike et al. (1999), Roghani et al. (1999), Weskamp et al. (1999), Nath et al. (2000), Schwettmann und Tschesche (2001), Zhou et al. (2001)
ADAM 10	Kuzbanian KUZ MADM	wird in vielen Geweben exprimiert; notwendig für die Axon-Extension in <i>Drosophila melanogaster</i> ; $\alpha$ -Sekretaseaktivität; prozessiert NOTCH; spaltet proTNF- $\alpha$ , MBP und Typ IV Kollagen	Fambrough et al. (1996), Howard et al. (1996), Lunn et al. (1997), Pan und Rubin (1997), Rosendahl et al. (1997), Sotillos et al. (1997), Chubinskaya et al. (1998), Glynn et al. (1998), Dallas et al. (1999)
ADAM 11	MDC	Tumorsuppressorgen	Emi et al. (1993)
ADAM 12	Meltrin $\alpha$	spaltet $\alpha_2$ -Makroglobulin; IGFBP-3 und -5; bindet an $\alpha$ -Actinin-2; beteiligt an der Myoblastenfusion; wird inhibiert durch TIMP 3	Yagami-Hiromasa et al. (1995), Galliano et al. (2000), Loechel et al. (2000), Shi et al. (2000)
ADAM 13		Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit X-PACSIN2 <i>in vivo</i>	Alfandari et al. (1997), Cousin et al. (2000)
ADAM 14	ADM-1	mögliche Funktion bei der Embryonalentwicklung in <i>Caenorhabditis elegans</i>	Podbilewicz (1996)

ADAM	Alternative Bezeichnung	Charakteristika	Literatur
ADAM 15	MDC 15 Metargidin	enthält ein RGD-Motiv; Interaktion mit den Integrinen $\alpha\beta 3$ , $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 9\beta 1$	Krätzschmar et al. (1996), Lum et al. (1998), Zhang et al. (1998)
ADAM 16	MDC 16	möglicherweise involviert bei der Fertilisation von <i>Xenopus laevis</i>	Shilling et al. (1997)
ADAM 17	TACE	$\alpha$ -Sekretaseaktivität; prozessiert proTNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ -Rezeptor, NOTCH 1-Rezeptor, L-Selektin, TRANCE, HERJM- $\alpha$ ; wird inhibiert durch TIMP 3; Aktivierung durch NO möglich	Black et al. (1997), Moss et al. (1997), Amour et al. (1998), Peschon et al. (1998), Lum et al. (1999), Brou et al. (2000), Rio et al. (2000), Zhang et al. (2000), Lee et al. (2001)
ADAM 18	tMDC III ADAM 27	Spermienoberflächenprotein	Frayne et al. (1998)
ADAM 19	Meltrin $\beta$	möglicherweise eine Funktion bei der Differenzierung von Osteoblasten; spaltet $\alpha_2$ -Makroglobulin	Inoue et al. (1998), Fritsche et al. (2000), Wei et al. (2001)
ADAM 20		Testis-spezifische Expression	Poindexter et al. (1999), van Huijsduijnen (1998)
ADAM 21		Testis-spezifische Expression	Poindexter et al. (1999), van Huijsduijnen (1998)
ADAM 22	MDC 2	vorwiegend im Gehirn exprimiert	Sagane et al. (1998), Poindexter et al. (1999)
ADAM 23	MDC 3	vorwiegend im Gehirn exprimiert	Sagane et al. (1998), Poindexter et al. (1999)
ADAM 24	Testase-1	Testis-spezifische Expression	Zhu et al. (1999)
ADAM 25	Testase-2	Testis-spezifische Expression	Zhu et al. (1999)
ADAM 26	Testase-3	Testis-spezifische Expression	Zhu et al. (1999)
ADAM 28	MDC-Lm MDC-Ls eMDCII	prozessiert autokatalytisch die eigene Pro-Domäne; spaltet MBP	Roberts et al. (1999), Howard et al. (2000), Howard et al. (2001)
ADAM 29		Testis-spezifische Expression; drei Spleißvarianten	Cerretti et al. (1999a), Cerretti et al. (1999b)
ADAM 30		Testis-spezifische Expression; zwei Spleißvarianten	Cerretti et al. (1999a), Cerretti et al. (1999b)
ADAM 31		bevorzugte Expression in den Leydig-Zellen der Testis	Liu et al. (2000)
ADAMTS 1	METH1	spaltet Aggrecan zwischen Glu(1871) und Leu(1872); spaltet $\alpha_2$ -Makroglobulin	Kuno und Matsushima (1998), Kuno et al. (1999), Kuno et al. (2000), Shindo et al. (2000)

ADAM	Alternative Bezeichnung	Charakteristika	Literatur
ADAMTS 2	PCNP	als Prokollagen-N-Protease beteiligt an der Kollagenbiosynthese	Colige et al. (1997)
ADAMTS 3		Kloniert aus Hirngewebe	Nagase et al. (1997)
ADAMTS 4	Aggrecanase-1	spaltet Aggrecan zwischen Glu(373) und Ala(374); spaltet Brevican zwischen Glu(395) und Ser(396); wird inhibiert durch TIMP 3; Transkription wird durch A $\beta$ stimuliert	Tortorella et al. (1999), Matthews et al. (2000), Satoh et al. (2000), Nakamura et al. (2000), Kashiwagi et al. (2001)
ADAMTS 5	Aggrecanase-2 ADAMTS 11	spaltet Aggrecan zwischen Glu(373) und Ala(374); wird inhibiert durch TIMP 3	Abbaszade et al. (1999), Kashiwagi et al. (2001)
ADAMTS 6		vorwiegend in der Plazenta exprimiert	Hurskainen et al. (1999)
ADAMTS 7		wird in vielen Geweben exprimiert	Hurskainen et al. (1999)
ADAMTS 8		stört die Angiogenese <i>in vivo</i>	Vasquez et al. (1999)
ADAMTS 9		wird in allen bisher getesteten fötalen Geweben exprimiert	Clark et al. (2000)
ADAMTS 12		signifikante Expression nur in fötalen Lungen; spaltet $\alpha_2$ -Makroglobulin	Cal et al. (2001)

Tab. 2.1: Überblick über die bisher bekannten ADAMs und ADAMTSs.

## 2.2 Die Domänen der ADAMs und ihre potentiellen Funktionen

Die Familie der ADAMs, deren erste Vertreter Ende der 80er Jahre entdeckt wurden, weisen Strukturhomologien zu den in Schlangengiften gefundenen SVMPs der Klasse P-III auf. Aus diesem Grund wurde vermutet, daß ADAMs ähnliche Eigenschaften wie SVMPs besitzen, also möglicherweise proteolytisch aktiv oder potentielle Integrinliganden seien. Die SVMPs sind lösliche Bestandteile von Schlangenserum und werden als Proenzyme in den Giftdrüsen exprimiert und anschließend in ihre aktive Form übergeführt (Jia et al., 1996). Sie sind für die hämorrhagische Aktivität der Schlangengifte verantwortlich, welche unter anderem zu einer Degradation der Membranproteine der Blutgefäßwand führen (Markland, 1997). Eine Vielzahl dieser Schlangengiftkomponenten beeinflusst das Blutgerinnungssystem des Menschen und anderer Säuger (Markland, 1997). Einige von ihnen führen z.B. zur Degradation des Fibrinogens

oder Fibrins aber auch zur Aktivierung des Plasminogens oder des Prothrombins. Auch die Gerinnungsfaktoren V oder X können von Schlangengiften aktiviert werden. Des weiteren hemmen oder aktivieren Schlangengifte die Aggregation der Thrombozyten. Der wesentliche Unterschied zwischen ADAMs und SVMPs besteht darin, daß SVMPs lösliche Proteine mit proteolytischer Aktivität sind, wohingegen nur 70% der zur Zeit bekannten ADAMs ein potentielles Zinkbindungsmotiv aufweisen. Die bisher bekannten Vertreter der ADAMs beinhalten 800 bis 1200 Aminosäuren und sind, mit Ausnahme von Spleißvarianten und den ADAMTSs, membrangebundene Proteine die in einer Vielzahl von unterschiedlichen Spezies (Mensch, Primaten, Nagern, Amphibien, Würmern und Hefen) entdeckt worden sind. Ein Vergleich der Domänenstruktur von ADAMs, ADAMTSs, SVMPs und dem einfachsten Vertreter der MMPs, dem Matrilysin (MMP 7), ist in der folgenden Abbildung gegeben:

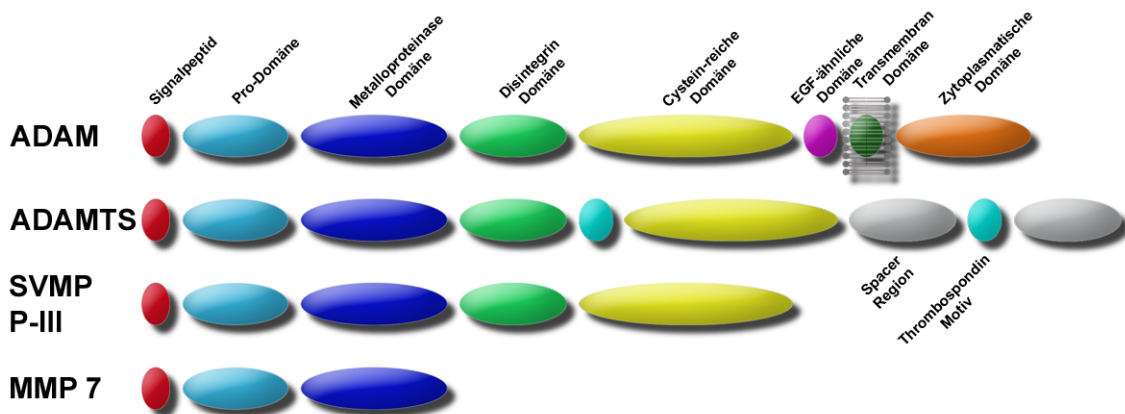


Abb. 2.1: Vergleich der Domänenstruktur von ADAMs, ADAMTSs, SVMPs (P-III) und Matrilysin.

Auffällig sind vor allem die TS-Motive innerhalb der ADAMTSs. Es sind Wiederholungen mehrerer TS1-Module, die normalerweise innerhalb multifunktionaler Proteine der extrazellulären Matrix, die Adhäsion, Motilität und das Wachstum von Zellen beeinflussen. Über die Funktion der innerhalb der Familie der ADAMTSs nur wenig konservierten Spacer-Regionen ist bisher nur wenig bekannt. Allen in der Abbildung dargestellten Proteinen ist ein Signalpeptid am N-Terminus gemeinsam, welches die Proteine in den sekretorischen Pfad durch das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat dirigiert. Es wird kurz vor der Sekretion bzw. dem Einbau in die Plasmamembran entfernt. Die Funktionen der weiteren in der Abbildung dargestellten Domänen sollen im folgenden kurz besprochen werden.

### 2.2.1 Die Pro-Domäne

Die Pro-Domäne beinhaltet im allgemeinen 200 Aminosäurereste und wird in vielen Fällen durch eine Furin-Spaltstelle RX(K/R)R von der Metalloproteinase-Domäne getrennt (Hurskainen et al., 1999). Furin oder furinartige Proteinase des Subtilisin-Typs spalten im Golgi-Apparat hinter dieser Erkennungssequenz und prozessieren somit die Proform des Moleküls, wie z.B. im Fall von **ADAM 9**, **12**, **15** und **ADAMTS 1** (Lum et al., 1998; Kuno et al., 1999; Loechel et al., 1999; Roghani et al., 1999). Dieser Vorgang ist nicht von einer proteolytischen Aktivität der Metalloproteinase-Domäne abhängig. Mutationsexperimente, bei denen der Glutamat-Rest im katalytischen Zentrum gegen Glutamin oder Alanin ausgetauscht worden ist, belegen, daß die Prozessierung trotzdem vonstatten geht. **ADAM 28** ist in diesem Zusammenhang die erste bekannte Ausnahme, denn Untersuchungen zeigten, daß die Entfernung der Pro-Domäne zumindest partiell autoproteolytisch, also in Abhängigkeit von der proteolytisch aktiven Metalloproteinase-Domäne verläuft (Howard et al., 2000). Die Pro-Domäne der ADAMs beinhaltet in vielen Fällen das von den MMPs und anderen Repolysinen bekannte *cysteine-switch*-Motiv. Es besteht aus einem in der Pro-Domäne konservierten Cystein-Rest, über dessen freie Thiolgruppe das im katalytischen Zentrum komplexierte Zink(II)ion zusätzlich koordiniert wird. Diese Komplexierung des katalytisch relevanten Zink(II)ions gewährleistet die Latenz der Proenzyme, und erst durch die Aufhebung der Wechselwirkung der freien Thiolgruppe des Cysteins mit diesem Zink(II)ion (beispielsweise durch Oxidation, Methylierung oder auch durch Interaktion mit Übergangsmetallen wie Quecksilber(II)ionen) werden die Enzyme aktiviert (van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Grams et al., 1993). Die Regulation der proteolytischen Aktivität während der Biosynthese ist notwendig um eine vorzeitige und unkontrollierte Aktivierung dieser Proteinase zu verhindern. Belege dafür, daß dieses Modell auch auf die Familie der ADAMs übertragbar ist, liefern Studien an **ADAM 12** und **17**, die zeigen, daß die Pro-Domäne die Aktivität der Metalloproteinase-Domäne inhibiert und darüber hinaus auch die korrekte Konformation des Moleküls bedingt (Loechel et al., 1999; Milla et al., 1999).

### 2.2.2 Die Metalloproteinase-Domäne

Die Metalloproteinase-Domäne der ADAMs besteht aus bis zu 200 Aminosäuren und gehört zu der Superfamilie der Metzinkine (Bode et al., 1993). Strukturell verfügen alle Metzinkine über

ein fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices in ihrer katalytisch aktiven Domäne. In dieser Domäne wird ein Zink(II)ion von drei Histidin-Resten im katalytischen Zentrum koordiniert, welche das für diese Familie typische Zinkbindungsmotiv **HEXXHXXGXXH** generieren. Die vierte Koordinationsstelle des Zink(II)ions wird von einem Wassermolekül eingenommen, so daß sich insgesamt eine tetraedrische Koordinationssphäre für das Zink(II)ion ergibt. Zusätzlich zu diesem katalytisch relevanten Zink(II)ion befinden sich auch noch ein strukturstabilisierendes Zink(II)ion und zwei bis drei strukturstabilisierende Calcium(II)ionen innerhalb dieser Domäne (Bode et al., 1999). Der Glutamat-Rest innerhalb des Zinkbindungsmotives fungiert als katalytische Base und der Glycin-Rest ermöglicht einen Umkehrpunkt in der Struktur (Jiang und Bond, 1992). Der in der Superfamilie der Metzinkine konservierte Methionin-Rest befindet sich in den meisten Fällen 20 - 30 Aminosäuren C-terminal vom Zinkbindungsmotiv und trägt wahrscheinlich zur Stabilisierung der proteolytisch aktiven Struktur bei.

Neben diesen Gemeinsamkeiten zwischen ADAMs und den übrigen Vertretern der Metzinkine existieren zwei grundlegende Unterschiede. Zum einen fehlt in fast 30% aller bisher bekannten ADAMs das funktionelle Zinkbindungsmotiv, dazu gehören die ADAMs 2 -7, 11, 14, 18, 22, 23 und 29, so daß anzunehmen ist, daß diese ADAMs keinerlei proteolytische Funktion ausüben. Zum anderen ist die Metalloproteinase-Domäne in einigen maturierten Formen der ADAMs nicht mehr existent, dazu gehören z.B. ADAM 1 und 2 (Fertilin  $\alpha$  und  $\beta$ ) (Blobel et al., 1992). Die Frage nach der Funktion und dem Verbleib nach Prozessierung der Metalloproteinase-Domäne in diesen beiden Proteinen ist bis heute unbeantwortet geblieben (Blobel, 2000). Im überwiegenden Teil (70%) der bis heute bekannten ADAMs ist das funktionelle Zinkbindungsmotiv der Metzinkine vorhanden. Das sind die ADAMs 1, 8 - 10, 12, 13, 15 - 17, 19 - 21, 24 - 26, 28, 30, 31 und die ADAMTSs 1 - 9 bzw. 12. Es ist wahrscheinlich, daß diese Proteine - oder eine ihrer prozessierten Formen - proteolytische Aktivität besitzen. Für einen Großteil dieser ADAMs und ADAMTSs steht die biochemische Charakterisierung noch aus und somit auch die Beantwortung der Frage nach ihren natürlichen Substraten und Inhibitoren.

### **2.2.2.1 Proteolytisch aktive ADAMs mit Substraten *in vivo***

Nur für eine kleine Gruppe proteolytisch aktiver ADAMs und ADAMTSs sind bisher *in vivo*-Substrate identifiziert worden. In vielen Fällen handelt es sich bei diesen Substraten um zell-

oberflächenassoziierte Proteine, die durch die proteolytische Prozessierung in einen löslichen Teil und einen weiterhin membrangebundenen Teil gespalten werden. Dieser Vorgang, das sogenannte *shedding* (*shed* = verlieren, abwerfen) führte zu einer alternativen Bezeichnung der ADAMs, die danach auch als *sheddases* bezeichnet werden. Beispielsweise ist **ADAM 9** zusammen mit dem Isotyp  $\delta$  der Proteinkinase C (PKC $\delta$ ) für das TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) stimulierte *shedding* von proHB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) verantwortlich, wobei eine direkte Interaktion von PKC $\delta$  und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM 9 vermutet wird (Izumi et al., 1998). Die Prozessierung des zelloberflächenassoziierten Rezeptors NOTCH durch **ADAM 10** (KUZ), bei der NOTCH in einen extrazellulären und intrazellulären Teil gespalten wird, ist ein wichtiger Schritt bei der lateralen Inhibierung der Neurogenese bei *Drosophila melanogaster* (Pan und Rubin, 1997; Sotillos et al., 1997). Bei der Ratte scheint ADAM 10 eine Funktion bei der Aktivierung von Homologen des NOTCH-Rezeptors zu haben, wobei diese auf den Knochen beschränkt ist und keinen Einfluß z.B. auf die Entwicklung des Knorpels zu haben scheint (Dallas et al., 1999). Das wohl bekannteste Beispiel ist die Prozessierung der membrangebundenen Proform des Zytokins TNF(*tumor necrosis factor*)- $\alpha$ , welches in Entzündungsprozesse involviert ist und dessen lösliche und somit aktive Form durch **ADAM 17** (TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*)) generiert wird (Bazzoni und Beutler, 1996; Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang Hinweise darauf, daß die Prozessierung von proTNF- $\alpha$  nicht nur auf der Zelloberfläche sondern möglicherweise schon in einem intrazellulären Kompartiment vonstatten geht. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtungen, daß sowohl ADAM 17 als auch proTNF- $\alpha$  bevorzugt in einem perinukleären Zellkompartiment lokalisiert vorliegen (Schlöndorff et al., 2000), und daß durch die Stimulation von Zellen, z.B. mit PMA (**Phorbol-12-myristat-13-acetat**), ein Reagenz welches normalerweise die *shedding*-Aktivität erhöht, ein verminderte Präsenz des auf der Zelloberfläche lokalisierten ADAM 17 zu beobachten ist. Möglicherweise wird ADAM 17 nach Stimulation mit PMA internalisiert und somit von der Zelloberfläche entfernt. (Doedens und Black, 2000). Ein Knockout der ADAM 17-Expression in Mäusen geht mit einer abnormen Entwicklung der Lungen einher, ein normalerweise äußerst Zytokin- und Wachstumsfaktor-abhängiger Prozeß. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß diese Entwicklungsdefekte nicht auf eine mangelnde Prozessierung von proTNF- $\alpha$  zurückzuführen sind, so daß die *sheddase*-Aktivität von ADAM 17 nicht nur auf proTNF- $\alpha$  beschränkt zu sein scheint (Zhao et al., 2001). **ADAMTS 2** prozessiert Prokollagen I und II, ein

essentieller Schritt bei der Ausbildung von Kollagenfasern. Ein Ausschalten der ADAMTS 2-Expression *in vivo* führt zu einer erhöhten Fragilität des Bindegewebes, welche durch die Akkumulation von Prokollagen und der Ausbildung abnormer Kollagenfasern hervorgerufen wird (Colige et al., 1997; Li et al., 2001, Tang, 2001). Die Prozessierung von Aggrecan (ein Proteoglykan und Hauptbestandteil des Knorpels) durch **ADAMTS 4** und **5** ist für die Elastizität und Festigkeit des Knorpelgewebes entscheidend (Tortorella et al., 1999).

### 2.2.2.2 Proteolytisch aktive ADAMs mit Substraten *in vitro*

Für einige Vertreter der ADAMs war es möglich *in vitro* Substrate zu identifizieren. **ADAM 9** spaltet beispielsweise die Insulin-B-Kette und mehrere synthetische Peptide (Roghani et al., 1999). Die Stimulation mit PMA führt dazu, daß ADAM 9 eine  $\alpha$ -Sekretaseaktivität gegenüber coexprimierten APP(*amyloid precursor protein*)-Analoge in COS-7 Zellen aufweist (Koike et al., 1999). Durch Zymographie konnten Gelatin,  $\beta$ -Casein und Fibronectin *in vitro* als Substrate identifiziert werden (Schwettmann und Tschesche, 2001). **ADAM 10** spaltet Typ IV Kollagen *in vitro* und prozessiert ein synthetisches Peptid, welches der proTNF- $\alpha$ -Spaltstelle nachempfunden wurde. (Lunn et al., 1997; Rosendahl et al., 1997; Millichip et al., 1998). Im Gegensatz dazu weisen neuere Untersuchungen unter Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden daraufhin, daß die Prozessierung von proTNF- $\alpha$  durch ADAM 10 nicht in den Leukozytenzelllinien Jurkat und THP-1 gefunden wird (Condon et al., 2001). **ADAM 12** spaltet  $\alpha_2$ -Makroglobulin, prozessiert IGFBP(*insulin-like growth factor-binding protein*)-3 und IGFBP-5 und wird durch TIMP(*tissue inhibitor of metalloproteinases*) 3 inhibiert (Loechel et al., 1998, Loechel et al. 2000). **ADAM 17** prozessiert den extrazellulären Teil des NOTCH 1-Rezeptors (Brou et al., 2000). Das APP wird durch die potentiellen  $\alpha$ -Sekretasen ADAM 9, 10 und 17 gespalten (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Schlöndorff und Blobel, 1999). **ADAM 19** führt zur Bildung eines kovalenten Komplexes mit und zur Spaltung von  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Wei et al., 2001). Hinweise auf die proteolytische Aktivität von **ADAM 28** gibt die Beobachtung, daß die Abspaltung der Pro-Domäne - zumindest teilweise - autoproteolytisch verläuft (Howard et al., 2000) und erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß ADAM 28 das MBP (*myelin basic protein*) spaltet (Howard et al., 2001). **ADAMTS 1** prozessiert Aggrecan und bildet einen kovalenten Komplex mit  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Kuno et al., 1999; Kuno et al., 2000). Für **ADAMTS 4** konnte Brevican, ein vorwiegend im ZNS (**Z**entral**n**ervensystem) exprimiertes Proteoglykan als *in vi-*

*tro*-Substrat identifiziert werden (Nakamura et al., 2000). ADAMTS 4 ist ebenso wie ADAMTS 5 durch die N-terminale inhibitorische Domäne von TIMP 3 hemmbar (Kashiwagi et al., 2001).

### 2.2.2.3 Die räumliche Struktur der Metalloproteinase-Domäne von ADAM 17

Die einzige bisher bekannte räumliche Struktur einer ADAM-Metalloproteinase-Domäne ist die von ADAM 17, welches zur Analyse der Struktur mit einem Hydroxamat-inhibitor kokristallisiert wurde. Vergleicht man die Struktur von ADAM 17 mit denen von MMPs, so finden sich neben Gemeinsamkeiten im räumlichen Aufbau der Substratbindungsstelle auch einige Unterschiede. Die S3'-Spezifitätstasche von ADAM 17 ist im Vergleich zu der von MMPs wesentlich tiefer ausgebildet und weist eine Verbindung zur S1'-Spezifitätstasche auf. Darüber hinaus fehlt in der Metalloproteinase-Domäne von ADAM 17 eine der für die Adamalysine typische Calcium-Bindungsstelle (siehe 2.2.2) (Maskos et al., 1998). Die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen ADAM 17 und den MMPs könnten der Grund für die Beobachtung sein, daß zwar TIMP 3 die Metalloproteinase-Domäne von ADAM 17 zu hemmen vermag (Amour et al. 1998; Lee et al., 2001), TIMP 1, 2 und 4 dazu aber nicht in der Lage sind. ADAM 10 zeigt ein ähnliches Inhibierbarkeitsprofil, da es von TIMP 1 und 3 aber nicht von TIMP 2 und 4 gehemmt wird (Amour et al., 2000). Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch der Einfluß der Disintegrin-, Cystein-reichen und EGF-ähnlichen Domäne der betreffenden ADAMs außerachtgelassen, da stets nur die Metalloproteinase-Domänen alleine untersucht wurden. Möglicherweise zeigen die Gesamtmoleküle ein anderes Verhalten gegenüber Inhibitoren und Substraten.

### 2.2.3 Die Disintegrin-Domäne

Die Disintegrin-Domäne der ADAMs zeigt sehr hohe Sequenzhomologien zu den SVMPs der Klasse P-III, besteht aus 60 bis 90 Aminosäuren und beinhaltet 6 bis 15 Cystein-Reste (Bjarnason und Fox, 1995). Die Bindung an Integrine wird durch einen 13 bis 14 Aminosäuren umfassenden *loop* vermittelt, an dessen Spitze eine für das jeweilige Disintegrin charakteristische Tripeptidsequenz lokalisiert ist. Diese Tripeptidsequenz und die sie N- und C-terminal flankierenden Aminosäuren bestimmen die Spezifität und Affinität gegenüber Integrinen. Die Disintegrin-Domänen der SVMPs der Klasse P-III enthalten in den meisten Fällen ein RGD-

Tripeptid, wodurch sie beispielsweise mit dem Plättchenintegrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  interagieren und somit die Aggregation der Thrombozyten verhindern. Man vermutet, daß der *loop* innerhalb der Disintegrin-Domäne in die „Tasche“ eines Integrin-Heterodimers hineinragt und dadurch die Wechselwirkung zwischen Disintegrin und Integrin initiiert (Wolfsberg und White, 1996). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Disintegrin-Domänen der ADAMs und SVMPs ist, daß diese Domänen bei den membranverankerten ADAMs eher Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, wohingegen sie bei den löslichen SVMPs der Klasse P-III derartige Interaktionen bevorzugt unterbinden bzw. lösen.

In mehreren *in vitro*-Studien konnten für die Disintegrin-Domänen einiger ADAMs Interaktionspartner aus der Familie der Integrine identifiziert werden. **ADAM 2** zeigt bei der Fertilisation eine Wechselwirkung mit dem Oozyten-Integrin  $\alpha\text{6}\beta\text{1}$  (Chen et al., 1999a; Chen et al., 1999b). Diese Interaktion wird durch das Tripeptid ECD im Disintegrin-Loop hervorgerufen und der darin enthaltene Aspartat-Rest ist maßgeblich an dieser Wechselwirkung zwischen Disintegrin und Integrin beteiligt (Bigler et al., 2000; Zhu et al., 2000). Ein lösliches Tripeptid und ein dagegen gerichteter Antikörper, nachempfunden dem Tripeptid-Motiv in der Disintegrin-Domäne von **ADAM 3**, vermögen beide die Adhäsion und Fusion von Spermatozoon und Oozyte zu inhibieren (Yuan et al., 1997). Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, daß hierbei auch der Glutamin-Rest an Position 7 des Disintegrin-*loops* maßgeblich beteiligt ist (Takahashi et al., 2001). Die Interaktion der Disintegrin-Domäne von **ADAM 9** mit dem Integrin  $\alpha\text{6}\beta\text{1}$  auf der Oberfläche der Fibroblastenzelllinie HT1080 führt zu einer abgerundeten Morphologie und gesteigerter Motilität dieser Zellen, im Vergleich zu ihrer Motilität auf Laminin (Nath et al., 2000). Des weiteren zeigt ADAM 9 eine RGD-unabhängige Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  auf Myelomzellen (Zhou et al., 2001). Auch für **ADAM 12** und **15** konnte eine RGD-unabhängige Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\text{9}\beta\text{1}$  gezeigt werden, die Zell-Zell-Interaktionen unterstützt (Eto et al., 2000). Humanes ADAM 15 interagiert aber auch in RGD-abhängiger Weise mit den Integrinen  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  und  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  wodurch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten induziert werden können (Zhang et al., 1998; Krätzschmar et al., 1996). **ADAM 23** interagiert mit dem Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  über einen RGD-unabhängigen Mechanismus (Cal et al., 2000).

#### 2.2.4 Die Cystein-reiche und EGF(*epidermal growth factor*)-ähnliche Domäne

Die Funktionen dieser beiden Domänen sind bis heute noch nicht gut verstanden. Die Cystein-reiche Domäne besteht aus über 160 Aminosäuren mit 10 bis 14 Cystein-Resten. Einige Cystein-reiche Domänen besitzen in einem 23 Aminosäuren umfassenden  $\alpha$ -helicalen Bereich eine Strukturhomologie zu viralen Fusionsproteinen. Zu ihnen gehören ADAM 1, 9, 11 und 12 und man vermutet, daß diese ADAMs eine Funktion bei Zell-Zell-Fusionsprozessen haben (Wolfsberg und White, 1998). Die EGF-ähnliche Domäne umfaßt ungefähr 40 Aminosäuren mit 6 Cysteinen. Möglicherweise sind diese beiden Domänen für die Interaktion der ADAMs mit anderen Proteinen verantwortlich, wie z.B. Chaperonen bei der Biosynthese oder Interaktionspartnern und Substraten auf der Zelloberfläche. Diese Wechselwirkungen führen die ADAMs möglicherweise an ihren physiologischen Wirkort und regulieren darüber hinaus auch ihre Aktivität. Unterstützt werden diese Hypothesen durch die Beobachtungen, daß die Cystein-reiche Domäne von **ADAM 17** an der Freisetzung der Pro-Domäne und beim *shedding* des Interleukin 1 Typ II-Rezeptors beteiligt ist (Milla et al., 1999; Reddy et al., 2000). Die lösliche Spleißvariante von **ADAM 12**, das sogenannte ADAM 12 S, bindet an das IGFBP-3 über seine Cystein-reiche Domäne und prozessiert dieses dann proteolytisch (Shi et al., 2000). Des weiteren unterstützt die Cystein-reiche Domäne von ADAM 12 die Adhäsion von Tumorzellen, z.B. der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (Iba et al., 1999).

#### 2.2.5 Die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne

ADAMs sind, mit Ausnahme von bestimmten Spleißvarianten und den ADAMTSs membranständige Proteine des Typs I und enthalten somit in der Nähe ihres C-Terminus eine hydrophobe Region mit der sie in der Plasmamembran verankert sind. Die Spleißvarianten von ADAM 11, 12, 17 und 28 bringen jedoch auch lösliche Formen dieser Proteine hervor, denen die Transmembran-Region und die zytoplasmatische Domäne fehlen (Emi et al., 1993; Gilpin et al., 1998; Cerretti et al., 1999; Roberts et al., 1999). Ob alle bisher klonierten ADAMs sowohl in membranverankerten als auch löslichen Formen existieren - entweder durch alternatives Spleißen oder *shedding*-Prozesse generiert - ist bis jetzt noch unbekannt.

Die zytoplasmatische Domäne der ADAMs variiert in ihrer Länge von 40 bis 250 Aminosäuren und ist möglicherweise an intrazellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Bei einigen ADAMs weist sie Prolin-reiche Sequenzabschnitte auf, die auf eine Anbindung an das Zytoskelett oder auf eine Funktion als SH(*src homology*)<sub>3</sub>-Domänen-Ligand hindeuten. **ADAM 9** und **15** interagieren z.B. mit den SH3-Domänen-tragenden Proteinen Endophilin I und SH3PX1 (Howard et al., 1999), wobei eine Auswirkung auf die intrazelluläre Prozessierung, den Transport oder die subzelluläre Lokalisation dieser beiden ADAMs vermutet wird. Eine Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von **ADAM 12** konnte mit der Protein-Tyrosin-Kinase Src, ein ebenfalls SH3-Domänen-tragendes Protein beobachtet werden, wobei es zu einer Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung kommt (Kang et al., 2000). Des Weiteren tritt ADAM 12 über seine zytoplasmatische Domäne mit dem muskelspezifischen Aktin-Bindungsprotein  $\alpha$ -Aktin-2 in Wechselwirkung, ein Vorgang, der für die Myoblastenfusion essentiell ist (Galliano et al., 2000). Ein weiteres Charakteristikum der zytoplasmatischen aber auch der Transmembran-Domäne von ADAM 12 ist eine Signalsequenz, die eine verlangsamte Prozessierung im trans-Golgi-Netzwerk bewirkt (Hougaard et al., 2000). Möglicherweise ist bei **ADAM 15** eine derartige Signalsequenz in diesen beiden Domänen ebenfalls präsent, da ADAM 15 größtenteils in einem intrazellulären Kompartiment anstatt auf der Zelloberfläche gefunden wurde (Lum et al., 1998). Auch für **ADAM 13** aus *Xenopus laevis* konnte eine Interaktion mit SH3-Domänen-tragenden Proteinen gezeigt werden (Cousin et al., 2000). Die zytoplasmatische Domäne von **ADAM 17** interagiert mit einem bei der Mitose involvierten Protein, dem sogenannten MAD(*mitotic arrest deficient*)<sub>2</sub>, wobei ein weiterer Vertreter dieser Familie, das MAD2 $\beta$  eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM 9 zeigt (Nelson et al., 1999).

### 2.2.6 ADAMs mit Thrombospondin-Motiven: Die ADAMTSs

Die löslichen ADAMTSs enthalten zwei TS-Motive, die in sich aus mehreren TS1-Modulen aufgebaut sein können. Das erste, näher am N-Terminus liegende TS-Motiv befindet sich zwischen der Disintegrin- und Cystein-reichen Domäne. Das zweite TS-Motiv wird durch eine bisher nicht näher charakterisierte Spacer-Region von der Cystein-reichen Domäne getrennt. Bei einigen ADAMTSs folgt auf das zweite TS-Motiv nochmals eine Spacer-Region (Abb. 2.1). Die TS-Motive beeinflussen zusammen mit den Spacer-Regionen die Interaktion der ADAMTSs mit ihrer Umgebung. Beispielsweise zeigen die TS-Motive von **ADAMTS 1** eine

ausgeprägte Affinität zu Heparin oder sind zusammen mit der Spacer-Region für eine starke Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix verantwortlich (Kuno et al., 1997; Kuno und Matsushima, 1998). An der Spaltung von Aggrecan durch ADAMTS 1 ist die Spacer-Region ebenfalls beteiligt (Kuno et al., 2000). Auch bei **ADAMTS 4** ist das TS-Motiv entscheidend an der Erkennung und Spaltung von Aggrecan beteiligt (Tortorella et al., 2000). Das kürzlich beschriebene **ADAMTS 12** enthält acht TS1-Module, die als ein-, drei- und viergliedrige Modulgruppierung die drei TS-Motive des Moleküls aufbauen. Eine weitere Besonderheit ist die intrazelluläre Prozessierung von ADAMTS 12 in ein 120 kDa N-terminales, proteolytisch aktives (spaltet  $\alpha_2$ -Makroglobulin *in vitro*) und ein 83 kDa C-terminales Fragment (Cal et al., 2001).

### 2.3 Das humane ADAM 15

Das humane ADAM 15 (hADAM 15, hMDC 15) oder auch Metargidin ist ein 814 Aminosäuren umfassendes Protein, dessen cDNA erstmals von Krättschmar und Kollegen (1996) beschrieben worden ist. Durch RT-PCR konnte die cDNA aus der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 kloniert werden. Anhand von Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß das Primärtranskript in vielen Geweben, wie z.B. Herz, Niere, Lunge oder auch im Skelettmuskel zu finden ist. Die alternative Bezeichnung Metargidin soll die Zugehörigkeit zu den **MET**alloproteinasen mit einem **RGD**-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne symbolisieren (**META RGiD IN**). Dieses RGD-Motiv im hADAM 15 ist einzigartig unter allen bisher bekannten ADAMs. Die Maus- und Ratten-Homologe des ADAM 15 enthalten die Tripeptidsequenz TDD (Lum et al., 1998; Bosse et al., 2000). Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über die Domänenstruktur des hADAM 15 mit seinen wichtigsten Charakteristika (rot gekennzeichnet): Modifiziertes *cysteine-switch*-Motiv GHTCALS innerhalb der Pro-Domäne; Furin-Spaltstelle **RRRR** zwischen Pro- und Metalloproteinase-Domäne; Zinkbindungsmotiv **HELGHSLGLDH** innerhalb der Metalloproteinase-Domäne, RGD-Tripeptid **RGDC** innerhalb der Disintegrin-Domäne, zwei Prolin-reiche Sequenzen **PPPPRKP** und **RPAPPPP** innerhalb der zytoplasmatischen Domäne.

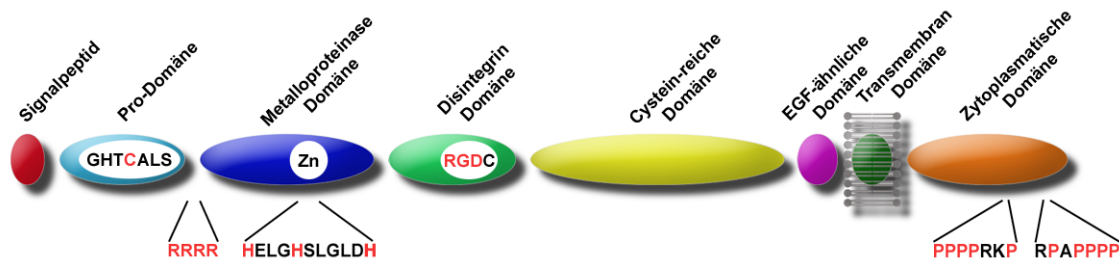


Abb. 2.2: Die Domänenstruktur von humanen ADAM 15.

### 2.3.1 Das Signalpeptid und die Pro- und Metalloproteinase-Domäne von ADAM 15

Das Signalpeptid am N-Terminus dirigiert das ADAM 15 Molekül in den sekretorischen Pfad durch das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat (Lum et al., 1998). Diesem Signalpeptid folgt die Pro-Domäne innerhalb der sich ein Cystein-Rest befindet, der für die Latenz der Metalloproteinase-Domäne über einen *cysteine-switch*-artigen Mechanismus verantwortlich sein könnte (siehe 2.2.1). Da aber das *cysteine-switch*-Motiv GHTCALS in hADAM 15 im Vergleich zum allgemeinen *cysteine-switch*-Konsensusmotiv PRCGVPD der Metzinkine modifiziert ist, kann die Regulation der proteolytischen Aktivität über diesen Mechanismus nicht uneingeschränkt angenommen werden (Birkedal-Hansen et al., 1993, McKie et al., 1997; Bode et al., 1999). Die vier Arginin-Reste zwischen der Pro- und der Metalloproteinase-Domäne sind charakteristisch für die Spaltstellen von Proprotein-Konvertasen, wie z.B. Furin. Die Aktivierung der Metalloproteinase-Domäne könnte also auch innerhalb des sekretorischen Pfades (s.o.), z.B. im Golgi-Apparat erfolgen. Für murines ADAM 15 konnte gezeigt werden, daß die Abspaltung der Pro-Domäne im trans-Golgi-Apparat erfolgt und Furin die Prozessierung des Proenzym *in vitro* mimetisch vollzieht (Lum et al., 1998). Die Metalloproteinase-Domäne enthält ein für die Metzinkine beschriebenes Zinkbindungsmotiv mit drei Histidinen und einem katalytisch wirksamen Glutamat-Rest (**HELGHSLGLDH**), so daß eine proteolytische Aktivität des Moleküls diskutiert wird.

### 2.3.2 Die Disintegrin-Domäne von ADAM 15

Die ersten Untersuchungen zur Affinität der Disintegrin-Domäne von hADAM 15 zu Integrinen wurden 1998 von Zhang und Kollegen durchgeführt. Sie fanden, daß die rekombinant als Fusi-

onsprotein in *E. coli* hergestellte Disintegrin-Domäne von hADAM 15 mit dem Integrin  $\alpha v \beta 3$  interagiert. Eine Mutante bei der das RGD-Motiv gegen ein SGA-Motiv ausgetauscht worden war, zeigte diese Wechselwirkung nicht (Zhang et al., 1998). Die Autoren stellten zudem fest, daß die N-terminal flankierende Sequenz RPT vor dem RGD-Motiv die Affinität zum Liganden kontrolliert. Wurde das RPT-Motiv gegen ein NWK-Motiv ausgetauscht, zeigte die Disintegrin-Domäne eine zusätzliche Affinität zu dem Thrombozyten-Integrin  $\alpha IIb \beta 3$ . Weitere Hinweise für eine RGD-abhängige Interaktion der Disintegrin-Domäne mit potentiellen Integrin-Liganden kamen von Nath et al. (1999). Die Autoren verwendeten in ihrem Modell keine bakteriellen Expressionsprodukte, sondern stellten den gesamten extrazellulären Teil des Proteins (die sogenannte Ecto-Domäne) in COS-7 Zellen als Fc-Fusionsprotein rekombinant her. Der C-terminale Fc-Teil ermöglichte eine effektive Reinigung über Protein A-Sepharose und die Expression in eukaryontischen Zellen sollte gewährleisten, daß das Expressionsprodukt in der nativen Konformation mit einem korrekten Disulfidbrückenmuster gewonnen wurde. Die Autoren fanden eine Interaktion mit dem Integrin  $\alpha v \beta 3$ , was die Ergebnisse von Zhang et al. (1998) bestätigte und zusätzlich eine Interaktion mit dem Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . Dabei war auffällig, daß nicht alle  $\alpha 5 \beta 1$  exprimierenden Zelllinien, die die Autoren verwendeten, diese Interaktion zeigten, sondern nur die T-Zelllinie MOLT-4. Also scheint die Interaktion zwischen der Disintegrin-Domäne von hADAM 15 mit dem Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  nicht nur Integrin- sondern auch zellspezifisch zu sein. Die Disintegrin-Integrin-Wechselwirkung nahm mit ansteigender Temperatur zu und benötigte Calcium(II)- und Magnesium(II)ionen im umgebenden Medium. Durch die Gegenwart von Mangan(II)ionen wurde die Interaktion verstärkt (Nath et al., 1999). Die Interaktion mit dem Integrin  $\alpha v \beta 3$ , welches essentiell an der Angiogenese beteiligt ist, mag im Hinblick auf die Tumorgenese von besonderem Interesse sein, da beobachtet worden ist, daß eine verstärkte Expression von  $\alpha v \beta 3$  auf Melanomzellen mit einer verstärkten Malignität einhergeht (Albeda et al., 1991; Montgomery et al., 1994). Darüber hinaus könnte, da hADAM 15 auf Endothelzellen gefunden worden ist (Herren et al., 1997), eine Interaktion von hADAM 15 mit  $\alpha v \beta 3$  die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel beeinflussen und somit einen Initiationsschritt bei der Neovaskularisierung darstellen (Nath et al., 1999). Das RGD-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne von hADAM 15 weist jedoch noch eine Besonderheit auf. Direkt hinter dem Aspartat-Rest befindet sich ein Cystein-Rest RGDC, der ansonsten nur bei nicht-RGD-Typ-Disintegrinen gefunden wurde (Krätzschar et al., 1996). Veränderungen des Oxidationszustandes des Cystein-Restes könnten die Konformation des RGD-Tripeptides verändern und somit die Affi-

nität zu potentiellen Liganden beeinflussen (Bosse et al., 2000). Neben der RGD-abhängigen Wechselwirkung mit den Integrinen  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  gibt es auch Hinweise, daß die Interaktion mit dem Integrin  $\alpha 9\beta 1$  RGD-unabhängig verläuft (Eto et al., 2000). Dabei wirkt sich die Anwesenheit von Magnesium(II)- und Mangan(II)ionen als stimulierend, die Anwesenheit von Calcium(II)ionen als inhibierend auf die Interaktion aus. Die Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix zeigt die gleiche Sensitivität gegenüber den Konzentrationen von Magnesium(II)-, Mangan(II)- und Calcium(II)ionen (Chen et al., 1999a; Eto et al., 2000).

### 2.3.3 Die Cystein-reiche Domäne von ADAM 15

Die Cystein-reiche Domäne von ADAM 15 ist hinsichtlich ihres Einflusses auf die physiologische und pathologische Funktion des Moleküls noch nicht charakterisiert worden. Ihre Beteiligung an der korrekten Prozessierung der Proform in Analogie zu der Cystein-reichen Domäne von ADAM 17 wird diskutiert (Milla et al., 1999). Die Cystein-reiche Domäne von ADAM 15 weist zudem keine hydrophobe Region auf, so daß ihre Beteiligung an Zell-Zell-Fusionsprozessen in Analogie zu Meerschweinchen- oder Rinder-Fertilin  $\alpha$ , ausgeschlossen wird (Muga et al., 1994; Krätzschar et al., 1996; Waters und White, 1997).

### 2.3.4 Die zytoplasmatische Domäne von ADAM 15

Die zytoplasmatische Domäne enthält zwei Prolin-reiche Regionen **PPPPRKP** und **RPAPPPP**, so daß eine Wechselwirkung mit SH3-Domänen-tragenden Proteinen seit der Klonierung der cDNA in Betracht gezogen wurde (Krätzschar et al., 1996). Somit könnte dieser Domäne eine Bedeutung bei der Weiterleitung intrazellulärer Signale oder eine Funktion bei der Anbindung an das Zytoskelett zukommen (Krätzschar et al., 1996). Tatsächlich wurde für die Proform von hADAM 15 gezeigt, daß sie mit den beiden SH3-Domänen-tragenden Proteinen Endophilin I und SH3PX1 interagiert (Howard et al., 1999). Die reife Form von hADAM 15 (ohne Pro-Domäne) zeigte jedoch keine Interaktion mit Endophilin I und SH3PX1. Es wird vermutet, daß die Interaktion mit der Proform die subzelluläre Lokalisation oder die Funktion von hADAM 15 beeinflußt. Diese Interaktion müßte somit noch vor dem medialen- bzw. trans-Golgi-Apparat stattfinden, da hier die Pro-Domäne entfernt wird (Lum et al., 1998). Aus diesem Grund wird eine Beeinflussung der Zell-Zell-Interaktion durch SH3-Domänen-tragende Proteine ausge-

schlossen, da hierfür die SH3-Domänen-tragenden Proteine mit der reifen Form von hADAM 15 interagieren müßten (Howard et al., 1999).

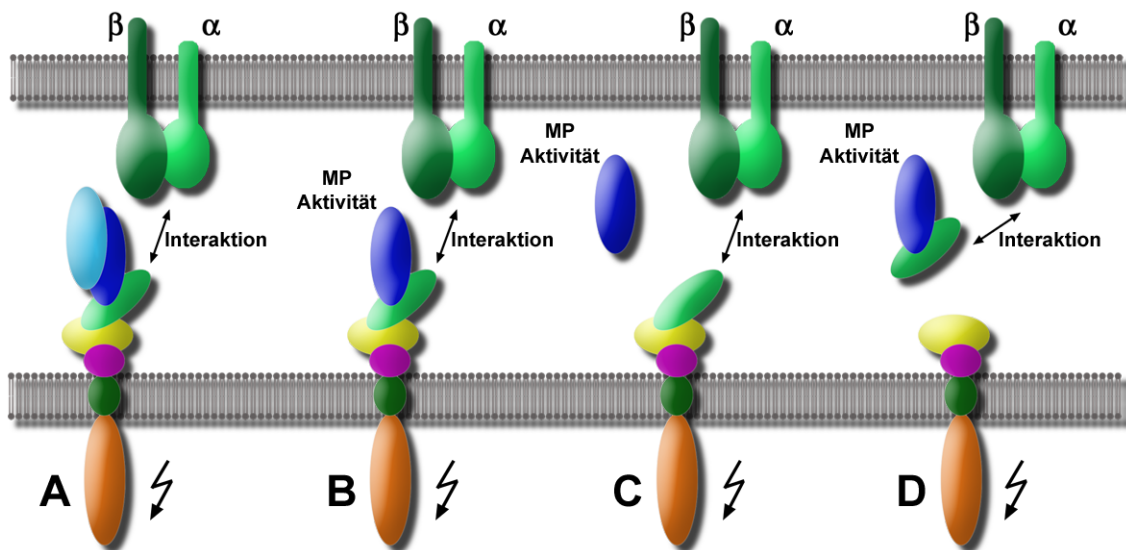
### **2.3.5 Die intrazelluläre Prozessierung von ADAM 15**

Die intrazelluläre Prozessierung von ADAM-Proteinen wurde erstmals am Beispiel des murinen ADAM 15 untersucht. Bei der Untersuchung von Mausgewebe konnte festgestellt werden, daß der Großteil des dort detektierten mADAM 15 ohne Pro-Domäne vorliegt (Lum et al., 1998). Überraschend war jedoch die Beobachtung, daß in mit mADAM 15 transfizierten COS-7 Zellen mehr als die Hälfte des prozessierten Proteins intrazellulär vorkommt. Möglicherweise befördert ein endozytotischer Vorgang das reife Protein nach der Integration in die Plasmamembran wieder in das Zellinnere zurück (Lum et al., 1998). Für ADAM 17 konnte ebenfalls gezeigt werden, daß es nach Prozessierung vorwiegend in einem intrazellulären Kompartiment lokalisiert ist (Schlöndorff et al., 2000). Ohne Erklärung blieb die Beobachtung, daß die Pro-Domäne bei auf der Zelloberfläche exprimierten mADAM 15 trotz proteolytischer Prozessierung der Furin-Spaltstelle immer noch mit dem Restprotein assoziiert bleibt und darüber hinaus an mehreren unbekannt Positionen eine proteolytische Spaltung erfährt (Lum et al., 1998).

### **2.3.6 ADAM 15 in pathologischen Prozessen**

Bisher ist die Expression von ADAM 15 mit zwei pathologischen Phänomenen korreliert worden. Einerseits konnten Herren et al. 1997 zeigen, daß das Auftreten arteriosklerotischer Läsionen mit einer verstärkten Expression von hADAM 15 einhergeht. Sie verwendeten zwei zum einen gegen die zytoplasmatische Domäne und zum anderen gegen die EGF-ähnliche Domäne gerichtete Antikörper zur immunhistochemischen Untersuchung von gesundem und pathologisch verändertem Aortagewebe von Primaten. Sie zeigten hierbei, daß nur im Fall einer arteriosklerotischen Läsion, eine Expression von ADAM 15 zu detektieren war. Neben diesen *in vivo* Untersuchungen wurde die Expression von ADAM 15 in humanen glatten Muskelzellen der Aorta und in humanen Endothelzellen der Nabelschnur *in vitro* nachgewiesen. Die Expression von ADAM 15 war konstitutiv und weder nach Aktivierung durch Zytokine oder chemotaktiver Reagenzien noch durch unterschiedliche Zelldichten zu beeinflussen. Ausgehend von den Ergebnissen der immunologischen Untersuchungen von humanen Endothelzellen der Na-

belschnur wurde die folgende Möglichkeiten für die Prozessierung und die potentiellen Funktionen von hADAM 15 vorgeschlagen (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3:** Die mögliche Prozessierungen und Interaktionen von humanen ADAM 15 (modifiziert nach Herren et al., 1997). (Die zur Darstellung der Domänen verwendeten Farben entsprechen denen bei Abbildung 2.2)

**A)** Die Disintegrin-Domäne könnte mit Integrinen anderer Zellen wechselwirken und so Zell-Zell-Kontakte und Signaltransduktionsprozesse initiieren. **B)** Durch die Freisetzung der Pro-Domäne kommt es zur Aktivierung der Metalloproteinase-Domäne, die in membrangebundener Form andere Zelloberflächenproteine der gleichen oder einer benachbarten Zellen proteolytisch prozessieren könnte. Darüber hinaus könnte die Disintegrin-Domäne mit Integrinen einer Nachbarzelle interagieren und zur Signaltransduktion beitragen. **C)** Ein weitere Möglichkeit besteht darin, daß die gesamte Metalloproteinase-Domäne zusammen mit der Pro-Domäne (hier nicht dargestellt) vom membrangebundenen Protein getrennt wird, in das umliegende Gewebe diffundiert und es dort zu einer Aktivierung der Metalloproteinase kommt. Die nun endständige Disintegrin-Domäne induziert dann möglicherweise Zell-Zell-Kontakte und Signaltransduktionsprozesse. **D)** Die letzte Alternative sieht die gemeinsame Abspaltung der Pro-, Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne vor, die möglicherweise durch ein intrazelluläres Signal initiiert wird. Durch die Disintegrin-Domäne zum Wirkort geführt, entfaltet die Metalloproteinase-Domäne nach Aktivierung dort ihr proteolytisches Potential (Herren et al., 1997).

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von hADAM 15 in pathologischen Prozessen erbrachten Böhm et al. (1999). Sie konnten durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente zeigen, daß das Knorpelgewebe im Fall einer osteoarthritischen Erkrankung eine intensive Expression der hADAM 15-mRNA aufweist. Insbesondere in den Chondrozyten ist die hADAM 15-mRNA-Produktion im Vergleich zu gesundem Gewebe merklich erhöht, die calcifizierte Zone ist jedoch annähernd frei von hADAM 15-mRNA-Transkripten. Darüber hinaus fanden sie auch einen Anstieg der hADAM 15-mRNA in Chondrosarcomazellen *in vitro*. Die Autoren stellten daraufhin die Hypothese auf, daß möglicherweise die Interaktion von hADAM 15 mit dem Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , welches ebenfalls in Chondrozyten exprimiert wird, die Anbindung des Integrins an die extrazelluläre Matrix stören könnte. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß eine Störung der Interaktion einer Zelle zur Matrix über das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  zu transformierten Zellen führt (Plantefaber und Hynes, 1989). Alternativ könnte hADAM 15 durch proteolytische Prozesse an der Umstrukturierung der Knorpel-Matrix beteiligt sein (Böhm et al., 1999).

Bei Zusammenfassung aller bisherigen Erkenntnisse über ADAM 15 kristallisieren sich folgende Merkmale heraus: ADAM 15 zeigt sowohl eine RGD-abhängige als auch RGD-unabhängige Interaktion mit einer definierten Auswahl von Integrinen. Über die zytoplasmatische Domäne wird die Interaktion mit SH3-Domänen-tragenden Proteinen vermittelt. Dies spricht zum einen für eine Beteiligung von ADAM 15 an Signaltransduktionsprozessen oder auch für eine Anbindung von ADAM 15 an das Zytoskelett. Die Prozessierung von ADAM 15 findet im Golgi-Apparat statt, wobei Proprotein-Konvertasen, wie z.B. Furin, beteiligt sind. Nur ein geringer Anteil des in der Zelle exprimierten Proteins ist tatsächlich auf der Zelloberfläche präsent, der weitaus größere Teil befindet sich intrazellulär in einem perinukleären Kompartiment. Hinweise auf eine proteolytische Aktivität der Metalloproteinase-Domäne sind bisher nicht publiziert worden.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie Agarosegelelektrophorese, Restriktionsverdau, 5'-Dephosphorylierung und 3'-Phosphorylierung von DNA, Ligationen, Herstellung transformationskompetenter *E. coli*, Lagerung von *E. coli* und *P. pastoris*, Transformation von *E. coli* und Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels der alkalischen Lyse wurden nach Angaben von Sambrook et al. (1989) oder nach Angaben des Herstellers der betreffenden Produkte durchgeführt. Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde entweder das NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit (Macherey-Nagel, 2000a) oder das Nucleobond AX Kit (Macherey-Nagel, 2000b) eingesetzt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1 Kits (Macherey-Nagel, 2000c). Die direkte Ligation von PCR-Produkten in einen Klonierungsvektor (pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> oder pGEM<sup>®</sup>-T) wurde unter Verwendung des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen, 2000) oder des pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega, 1999) durchgeführt. Für die Einführung von Punktmutationen in cDNAs wurde das Transformer<sup>™</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits (Clontech, 1994) oder eine nach Ho et al. (1989) modifizierte Methode verwendet.

##### 3.1.2 Stämme, Zelllinien und Vektoren

###### 3.1.2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* TOP10 (Invitrogen)

Genotyp F<sup>'</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR  
araD1399 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

Phänotyp Antibiotika sensitiv (Ampicillin und Kanamycin)

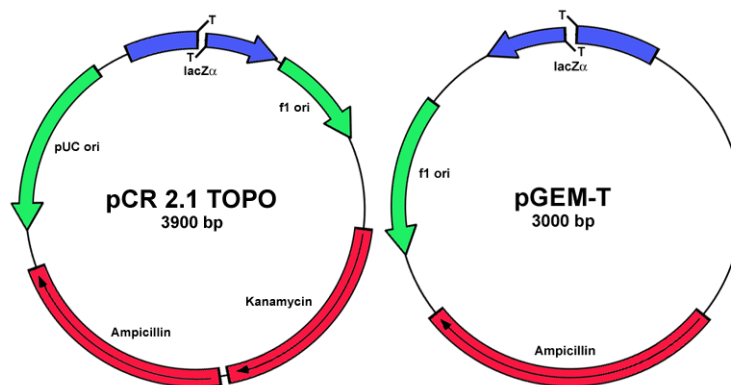
Verwendung Klonierung von PCR-Produkten in den pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen).

*E. coli* JM109 (Promega)

Genotyp  $recA1\ endA1\ gyrA96\ thi\ hsdR17\ (r_K^- m_K^+)\ relA1\ supE44\ \Delta(lac-proAB)\ [F' traD36\ proAB\ lacI^qZ\Delta M15]$

Phänotyp Antibiotika sensitiv (Ampicillin und Kanamycin)

Verwendung Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (Promega).



**Abb. 3.1:** Plasmidkarten der Vektoren pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) und pGEM-T (Promega). Beide Vektoren wurden zur Klonierung von PCR-Produkten eingesetzt, die an ihrem 3'-Ende einen A-Überhang besitzen mußten.

*E. coli* XL1 Blue (Stratagene)

Genotyp  $F' :: Tn10\ pro\ A^+B^+\ lacI^q\ \Delta(lacZ)M15/recA1\ endA1\ gyrA96\ (Nal^r)\ thi\ hsdR17\ (r_K^- m_K^+)\ supE44\ relA1\ lac$

Phänotyp Antibiotika sensitiv (Ampicillin)

Verwendung Transformation mit Expressionsvektoren für Klonierungszwecke.

*E. coli* BMH 71-18 (Clontech)

Genotyp  $thi,\ supE,\ \Delta(lac-proAB), [mutS::Tn10][F' proAB,\ lacI^qZ\Delta MIS]$

Phänotyp Antibiotika sensitiv (Ampicillin)

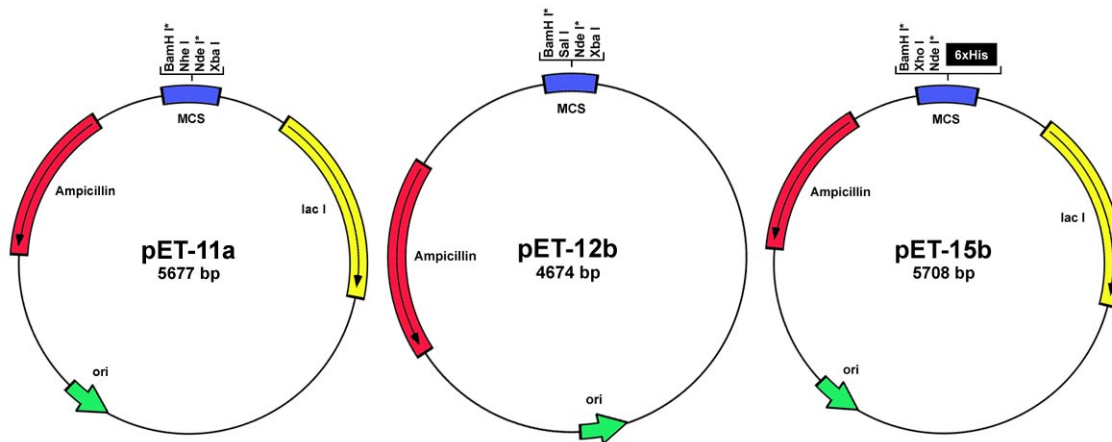
Verwendung Transformation mit Expressionsvektoren des pcDNA-Typs (Invitrogen) für Klonierungszwecke nach Mutagenesen.

*E. coli* BL21(DE3) (Stratagene)

Genotyp  $F^- ompT\ hsdS_B\ (r_B^- m_B^-)\ gal\ dcm\ (DE3)$

Phänotyp Antibiotika sensitiv (Ampicillin)

Verwendung Heterologe Expression rekombinanter Proteine durch Vektoren des pET-Typs (Novagen).



**Abb. 3.2:** Plasmidkarten der Vektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b (Novagen). Die genannten Vektoren wurden für die Expression rekombinanter hADAM 15-Fragmente in *E. coli* eingesetzt. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind mit einem \* gekennzeichnet. Im Fall des pET-15b Vektors sind die Expressionsprodukte mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-tag fusioniert.

### 3.1.2.2 *Pichia pastoris*

*P. pastoris* KM71 (Invitrogen)

Genotyp arg4 his4 aox1::ARG4

Phänotyp His<sup>-</sup> Mut<sup>S</sup>. Dieser Hefestamm zeigt unter Expressionsbedingungen (Methanol als Kohlenstoffquelle) nur langsames Wachstum, da sein AOX(Alkoholoxida-se)1-Gen durch Insertion eines fremden DNA-Fragmentes zerstört worden ist.

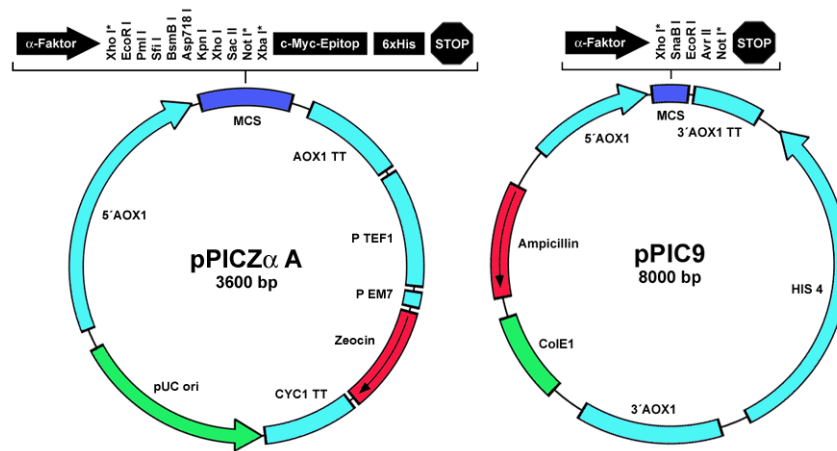
Verwendung Heterologe Expression rekombinanter Proteine durch Vektoren des pPIC-Typs (Invitrogen).

*P. pastoris* X33 (Invitrogen)

Genotyp Wildtyp

Phänotyp Mut<sup>+</sup>. Dieser Hefestamm zeigt unter Expressionsbedingungen (Methanol als Kohlenstoffquelle) schnelles Wachstum, da er über das funktionsfähige AOX1-Gen verfügt.

Verwendung Heterologe Expression rekombinanter Proteine durch Vektoren des pPIC-Typs (Invitrogen).



**Abb. 3.3:** Plasmidkarten der Vektoren der Vektoren **pPICZ $\alpha$  A** und **pPIC 9** (Invitrogen). Beide Vektoren wurden für die Expression rekombinanter hADAM 15-Fragmente in *P. pastoris* eingesetzt. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind mit einem \* gekennzeichnet. Alle Expressionsprodukte sind am N-Terminus mit der  $\alpha$ -Faktor-Sequenz fusioniert um in das Nährmedium sekretiert werden zu können. Im Falle des pPICZ $\alpha$  A Vektors sind alle über die Restriktionsstellen Xho I und Xba I klonierten Fragmente zusätzlich mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag fusioniert.

### 3.1.2.3 Humane und andere Säugerzellen

OV-MZ-6 (Möbus et al., 1992)

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde aus dem Aszites einer Patientin mit einem fortgeschrittenen serös-papillärem Zystadenkarzinom des Ovars isoliert und etabliert.

OVCAR-3 (Hamilton et al., 1983)

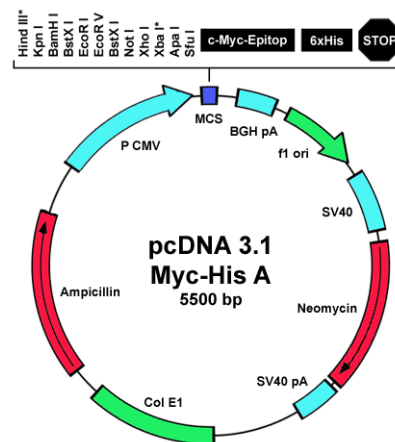
Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 wurde aus dem Aszites einer Patientin isoliert, die an einem fortgeschrittenen Adenokarzinom erkrankt war.

MDA-MB-231 (Cailleau et al., 1974)

Die humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde aus einer Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle einer Brustkrebspatientin isoliert.

CHO (*chinese hamster ovary*) (Puck, 1958)

Die Ovarialzelllinie CHO aus Hamster wird bevorzugt zur heterologen Expression rekombinanter Proteine sowohl in adhären wachsenden Zellen als auch in Suspensionskulturen eingesetzt.



**Abb. 3.4:** Plasmidkarte des Vektors **pcDNA 3.1 Myc-His A** (Invitrogen). Der Vektor wurde für die Expression rekombinanter hADAM 15 Fragmente in Säugerzellen eingesetzt. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind mit einem \* gekennzeichnet, wobei diese so gewählt wurden, daß die Expressionsprodukte mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-Tag fusioniert sind.

### 3.1.3 Expressionssysteme: *Escherichia coli* und *Pichia pastoris*

#### 3.1.3.1 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) wurde nach Transformation mit Plasmiden (pET-11a, pET-12b, pET-15b (Novagen)) die Ampicillinresistenz vermitteln und das gewünschte Gen enthalten in LB-Medium (10 g/l Peptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 0,2 mg/ml Ampicillin) zur Expression unter Schütteln bei 200 rpm (37°C) im Fernbachkolben eingesetzt. Sobald die Bakterienkultur eine optische Dichte von  $OD_{600}$  0,6 erreicht hatte, wurde durch Zusatz von 0,4 mM IPTG die heterologe Expression des rekombinanten Proteins induziert. Um eine optimale Expression zu erreichen wurden die Zellen vier Stunden bei den gegebenen Bedingungen kultiviert.

Nach Beendigung der Expression wurden 750 ml des Kulturmediums 30 min bei 4400 g (4°C) zentrifugiert, die Zellen geerntet und der Überstand verworfen. Nach Resuspension (Ultraturax) der Zellen in 150 ml Aufschlußpuffer (20 mM TRIS, pH 8, 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM Benzamidin-HCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mg/100ml Lysozym) wurden diese 30 min bei 200 rpm (37°C) geschüttelt, wonach 150 U Benzonase<sup>®</sup> (Merck) hinzugefügt wurden. Im Anschluß wurde die Suspension weitere 30 min bei 200 rpm (37°C) geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 16000 g (4°C) für 30 min wurde das Zellpellet zweimal mit Waschpuffer I (100 mM TRIS, pH

8,5, 1 M Harnstoff, 5 mM Benzamidin-HCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 - 1,0% (v/v) Triton X-100) und einmal mit Waschpuffer II (100 mM TRIS, pH 8,5, 2 M Harnstoff, 5 mM Benzamidin-HCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gewaschen. Der Aufschluß der *inclusion bodies* erfolgte durch Resuspension (Ultraturrax) in *ib(inclusion bodies)*-Aufschlußpuffer (20 mM TRIS, pH 8,5, 8 M Harnstoff, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und anschließender Inkubation über Nacht bei RT unter Rühren. Nach Zentrifugation für 30 min bei 16000 g (4°C) wurde der so erhaltene Überstand für weitere Arbeitsschritte eingesetzt.

### 3.1.3.2 *Pichia pastoris* als Wirtsorganismus für die heterologe Expression

Die Hefe *P. pastoris* ist methylotroph, das heißt, sie besitzt die Fähigkeit Methanol als einzige Kohlenstoff- bzw. Energiequelle zu verwerten. Die Alkoholoxidase ist das erste Enzym dieses Stoffwechselweges und oxidiert Methanol mit molekularem Sauerstoff zu Formaldehyd. Da Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt dieser Reaktion auftritt, findet die Metabolisierung des Methanols in den Peroxisomen statt, deren Anteil am Zellvolumen auf 80% ansteigen kann (Veenhuis et al., 1983). Aufgrund der schwachen Affinität der Alkoholoxidase zu molekularem Sauerstoff, steigt deren Konzentration zur Kompensation dieses Effektes auf bis zu 30% des löslichen Gesamtproteinanteils der Zelle an. Glucose wirkt als Repressor auf die Expression der Alkoholoxidase, Methanol hebt diese Repression wieder auf. Die Induzierbarkeit des Promotors der Alkoholoxidase durch Methanol macht man sich bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris* zunutze (Ellis et al., 1985; Tschopp et al., 1987; Koutz et al., 1989), wobei Ausbeuten bis zu einem Gramm pro Liter Kultur möglich sind. Geht dem zu exprimierenden Protein eine N-terminale Signalsequenz für die Sekretion voran, wird das Expressionsprodukt in das Kulturmedium sezerniert. Hierzu hat sich die Signalsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- $\alpha$ -Faktors bewährt (Cregg et al., 1993; Scorer et al., 1993), die nach der Erkennungssequenz EKR durch die Proteinase KEX2 im Golgi-Apparat abgespalten wird, insbesondere wenn nach dem Arginin die Dipeptidwiederholung EAEA folgt. Die Abspaltung dieses Tetrapeptides erfolgt durch die Dipeptidylpeptidase STE13, die ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Besitzt das rekombinante Protein potentielle N-Glykosylierungsstellen des Typs NX(S/T), so kann eine N-Glykosylierung überwiegend vom mannosereichen Typ mit durchschnittlich 8 - 14 Zuckerresten pro Seitenkette erfolgen (Grinna und Tschopp, 1989). Eine O-Glykosylierung wird bei *P. pastoris* nur in sehr geringem Umfang beobachtet.

### 3.1.3.3 *Pichia pastoris* KM71 und X33

Die *P. pastoris* Stämme KM71 und X33 wurden entweder durch Elektroporation (bei Verwendung des pPIC9-Vektors) oder mit Hilfe des Pichia EasyComp™ Kits (bei Verwendung des pPICZα-Vektors) (Invitrogen, 2000b; Invitrogen, 1999c) nach Angaben des Herstellers transformiert.

Bei der darauf folgenden Analyse der Hefeklonen, die das gewünschte Protein exprimieren, hat sich eine vereinfachte Kolonie-Blot-Technik bewährt. Dabei wurden die zu untersuchenden Hefeklonen mit einem sterilen Holzstäbchen auf BMMH-Agarplatten (13 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 87 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, 1,34% YNB, 0,4 mg/l Biotin, 40 mg/l L-Histidin, 0,5% (v/v) Methanol, 20 g/l Agar mit 10x *Yeast Nitro Base* [13,4% YNB]: 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 35 mM NaCl, 14 mM CaCl<sub>2</sub>, 750 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 mg/l Vitaminmix) ausgesät, und unmittelbar im Anschluß mit einer PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran bedeckt. Die Kulturen wurden fünf Tage bei 28°C inkubiert, die Membran dann vorsichtig abgezogen und durch Waschen mit dH<sub>2</sub>O von anhaftenden Hefezellen befreit. Die Detektion der erfolgreich transformierten und somit exprimierenden Hefeklonen erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das zu exprimierende Protein.

Eine Ergänzung zur oben beschriebenen Methode, stellte die analytische PCR mit Hilfe von Klonierungs- bzw. AOX-Primern dar. Die AOX-Primer dienten zur Amplifikation der Expressionskassette des Vektor pPICZα A. Zur Analyse wurde eine geringe Menge des zu untersuchenden Hefeklons mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens in den PCR-Ansatz übergeführt und gemäß des unter 3.1.5.2 angegebenen PCR-Programms zur Amplifikation eingesetzt. Der erste Denaturierungsschritt wurde hierzu von 3 auf 5 min verlängert und folgender 10x PCR-Puffer (500 mM TRIS, pH 8,25, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Tween 20) zusammen mit der AmpliTaq Polymerase von PerkinElmer verwendet.

Die erfolgreich transformierten und das rekombinante Protein exprimierenden Hefezellen wurden in Wachstumsmedium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 13 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 87 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6, 1,34% YNB, 0,4 mg/l Biotin, 1% (v/v) Glycerin) bei 28°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 5 bis 20 kultiviert. Danach wurden die Zellen für

15 min bei 1700 g (RT) pelletiert und in Expressionsmedium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 13 mM  $K_2HPO_4$ , 87 mM  $KH_2PO_4$ , pH 6, 1,34% YNB, 0,4 mg/l Biotin, 0,5 - 1% (v/v) Methanol) resuspendiert. Dabei wies das resultierende Kulturmedium des Mut<sup>+</sup>-Stammes X33 eine optische Dichte  $OD_{600}$  zwischen 5 bis 10 und das des Mut<sup>S</sup>-Stammes KM71 eine optische Dichte  $OD_{600}$  zwischen 10 bis 20 auf. Die Kultivierung der Hefezellen zur heterologen Expression erfolgte dann über einen Zeitraum von 4 Tagen bei einer Temperatur von 28°C, wobei alle 24 Stunden 0,5% (v/v) Methanol zur Kultur hinzugefügt wurden. Die Ernte des Kulturüberstandes erfolgte durch Zentrifugation des Hefekultur für 20 min bei 2500 g (4°C). Im Anschluß wurde der vom Zellpellet getrennte Überstand für weitere 30 min bei 16000 g (4°C) zentrifugiert. Das so erhaltene Kulturmedium wurde dann für weitere Experimente eingesetzt.

Alternativ wurden auch Wachstums- und Expressionsmedien ohne Hefeextrakt und Pepton bzw. auch ohne  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ -Puffer (pH 6) eingesetzt. In den ersten beiden Fällen mußte das Medium im Fall des KM71-Stammes 40 mg/l L-Histidin enthalten. Darüber hinaus wurde der pH-Wert des Mediums in einigen Fällen auf pH 7 angehoben um die Expression unter physiologischeren Bedingungen durchzuführen. Gegebenenfalls wurde den Nährmedien bis zu 0,01% (v/v) Antischaummittel zugesetzt. Jegliche Abweichungen von der oben angegebenen Rezeptur sind im Ergebnisteil gesondert gelistet. Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte, je nach benötigter Menge der rekombinaten Proteine in unterschiedlichen Gefäßen. Für Testexpression wurden Erlenmeyerkolben (50 ml und 300 ml) mit Schikanen verwendet. Großexpressionen wurden entweder in Fernbachkolben (750 ml) mit Schikanen oder aber in einem 2 l-Fermenter mit Scheibenrührer und Gaseinleitungsrohr (Eigenbau, Universität Bielefeld) durchgeführt.

#### **3.1.4 Zellkultur**

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bei 37°C kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 - 90% passagiert (ca. alle 3 - 4 Tage). Hierzu wurden die Zellen mit sterilem PBS (Life Technologies) gewaschen und mit einer 0,05%igen (w/v) EDTA/PBS-Lösung abgelöst und 5 min bei 1000 g pelletiert. Das Zellpellet wurde sofort in frischem Nährmedium resuspendiert und die gewünschte Zellmenge in neue Gewebekulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 5% (v/v)  $CO_2$ -Atmosphäre wobei folgende Medien zum Einsatz kamen:

OV-MZ-6-Medium: DMEM mit Glutamax I (Life Technologies), 10 mM HEPES (Life Technologies), 550 mM L-Arginin (Sigma-Aldrich), 272 mM L-Asparagin (Sigma-Aldrich), 1000 U Penicillin/Streptomycin (Seromed Biochrom KG), 10% (v/v) FCS (Life Technologies)

CHO-Medium: MEM alpha (Life Technologies), 10 mM L-Glutamin (Life Technologies), 1000 U Penicillin/Streptomycin (Seromed Biochrom KG), 10% (v/v) FCS (Life Technologies)

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen in Einfriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und für ein bis drei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Danach konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) gegeben werden. Zum Auftauen der Zellen wurden diese vorsichtig im Kryoröhrchen in ein Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) gehalten und danach in FCS resuspendiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und in eine ebenfalls mit frischem Medium gefüllte Gewebekulturflasche pipettiert und für mindestens zwölf Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

#### 3.1.4.1 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 und der Ovarialzelllinie CHO aus Hamster wurde nach Herstellerangaben mit dem kationischen Transfektionsreagenz Lipofectin<sup>®</sup> (Life Technologies) durchgeführt. Im Anschluß an die Transfektion wurden die Zellen im Verlauf von sieben Tagen zur Selektion mit Medium, welches das Antibiotikum G418 (Calbiochem Novabiochem) in einer Konzentration von 1 g/l enthielt, versorgt. Die überlebenden Zellen mußten somit das Resistenzgen für das Gentamycin-verwandte Aminoglykosid G418 enthalten, welches sie im Falle einer erfolgreichen Transfektion mit dem Klonierungsplasmid aufgenommen hatten, so daß ihre Expansion unter Selektionsbedingungen möglich war. Um klonale Zelllinien zu erhalten wurden einzelne Klone in 12-Loch-Platten passagiert, die im Falle einer genügend hohen Zelldichte in *microchamber slides* eingesät wurden. Diese Klone wurden nach Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Laserscannmikroskop charakterisiert. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden in die nächste Selektionsrunde gebracht, kultiviert, expandiert und wiederum durch Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Diese Prozedur wurde bis zur fünften Klonierungsrunde fortgesetzt, und die Zellen in schwach, mittel und stark das jeweilige rekombinante Protein exprimierende Zellklone eingeteilt.

### 3.1.4.2 Immunfluoreszenzfärbung für die konfokale Laserscannmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Vier-Kammer-Glasobjektträger über Nacht bei 4°C mit Vitronectin (Calbiochem) (10 µg/ml) beschichtet, dann mit 2% (w/v) hitze-denaturiertem BSA in PBS für zwei Stunden bei RT blockiert und dreimal mit PBS gewaschen. In jede Kammer wurden 50000 Zellen ausgesät und diese über Nacht bei 37°C kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen für eine Stunde bei 4°C in 1% (w/v) Paraformaldehyd mit 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS fixiert, dann zweimal mit 2% (w/v) Glycin in PBS (Inaktivierung des Paraformaldehydes) und zweimal mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde für eine Stunde bei RT auf den Zellen belassen und nach mehreren Waschschritten wurde der Sekundärantikörper (konjugiert mit den Chromophoren Alexa-488 oder Alexa-568 (Molecular Probes)) für 45 min zur lichtgeschützten Inkubation bei RT eingesetzt. Die Zellen wurden abschließend wieder mit PBS gewaschen und am Laserscannmikroskop (Emission  $\lambda = 580$  nm, Absorption  $\lambda = 495$  nm) untersucht.

### 3.1.4.3 Zelladhäsionstest

In Zellen ist ein lysosomales Enzym, die N-Acetyl- $\beta$ -D-Hexosaminidase vorhanden, welches für den Abbau von glykosylierten Zellbestandteilen zuständig ist. Die Proportionalität der Enzymaktivität mit der Zellzahl wurde in einem Zelladhäsionsversuch (modifiziert nach Landegren, 1984) ausgenutzt. Dazu wurde das chromogene Substrat p-Nitrophenol-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid verwendet, welches von N-Acetyl- $\beta$ -D-Hexosaminidase abgebaut wurde und die Abbauprodukte somit durch die Absorption bei 405 nm in einem Titertek Multiscan MCC/340 ELISA-Reader (Labsystems) gemessen werden konnten.

96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Vitronectin (Calbiochem) (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Waschen der Platten mit sterilem PBS (Life Technologies) wurden freie Bindungsstellen mit 2% (w/v) BSA in PBS für zwei Stunden bei RT blockiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, aus dem Kulturgefäß abgelöst, zentrifugiert (5 min bei 1000 g), in Adhäsionsmedium (DMEM, 20 mM HEPES, 0,5% (w/v) BSA) resuspendiert und gezählt. Die Mikrotiterplatten wurden dreimal mit PBS gewaschen und pro Vertiefung die gleiche Anzahl an Zellen (20000 bis 50000) ausgesät. Als Ne-

gativkontrolle diene 2% (w/v) BSA in PBS ohne Zellen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden nicht adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Als Standardreihe zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Zellverdünnungsreihe mit 6 Verdünnungen (1:2 Verdünnungsschritte) in die Löcher pipettiert. Pro Vertiefung wurden 50 µl Hexosaminidase-Lösung (100 mM Natriumcitrat, pH 5, 0,5% (v/v) Triton X-100, 15 mM p-Nitrophenol-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid) zugefügt und nach einer Stunde Inkubation bei 37°C die Reaktion mit Stoppuffer (200 mM NaOH, 5 mM EDTA) beendet. Die Menge an umgesetzten Substrat konnte durch Messung der Absorption bei 405 nm ermittelt werden. Die pro Vertiefung kolorimetrisch ermittelte Enzymaktivität ist proportional zur Anzahl der Zellen pro Vertiefung.

#### **3.1.4.4 Bestimmung der Zellzahl durch den MTT-Test**

Der MTT-Test dient der Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen, wobei die DNA-Syntheserate der Zellen bei diesem Test nicht miterfaßt wird. Bei diesem Test wird die Reduktion des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazan-Produkt durch die Dehydrogenasen gemessen. Durch den MTT-Test wurde die Gesamtzahl adhärenent wachsender Zellen nach einer modifizierten Methode nach Carmichael et al. (1987) bestimmt.

In den Löchern einer 96-Loch-Mikrotiterplatte, die mit verschiedenen Konzentrationen an Vitronektin (Calbiochem) beschichtet wurden, sind je Loch 5000 Zellen in 50 µl Medium ausgesät und für definierte Zeiten bei 37°C kultiviert worden. Die MTT-Lösung wurde in einer Endkonzentration von 200 µg/ml je Loch hinzugefügt. Nach zwei weiteren Stunden der Inkubation wurde das Medium entfernt und die sich gebildeten violetten Kristalle getrocknet. Die Kristalle wurden dann in 50 µl DMSO gelöst und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570$  nm in einem Titertek Multiscan MCC/340 ELISA-Reader (Labsystems) vermessen.

### 3.1.5 Amplifikation von Nukleinsäuren

#### 3.1.5.1 Reverse Transkription

Die zur reversen Transkription eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus den beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 und der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers (Qiagen, 1997a) isoliert. Die so erhaltene Gesamt-RNA wurde zur reversen Transkription nach folgendem Protokoll eingesetzt:

5 µl Gesamt-RNA (5 µg) werden mit 0,3 µl d(T)12-18 Oligonukleotid (Life Technologies) und 5,7 µl dH<sub>2</sub>O vermischt und 8 min bei 80°C inkubiert. Im Anschluß werden 5 µl RT-Puffer [5x] (Life Technologies), 2 µl DTT [100 mM] (Promega), 1 µl dNTPs [10 mM] (Genecraft), 0,7 µl BSA [10 µg/ml] (NEB) und 0,3 µl RNasin (Promega) addiert und das resultierende Gemisch für 3 min auf 40°C erwärmt. Zum Schluß werden 1 µl SuperScript™ RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Life Technologies) hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 90 min bei 40°C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA konnte direkt für weitere Amplifikationen genutzt werden (Kapitel 3.1.5.2)

#### 3.1.5.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikationen der benötigten DNA-Fragmente wurde nach einem modifizierten PCR-Standardprotokoll durchgeführt wobei sämtliche für die PCR benötigten Reagenzien und Enzyme bei 4°C gehandhabt wurden (Qiagen, 1997b). Der verwendete MiniCycler stammte von der Firma MJ Research, Watertown, USA.

Reagenz bzw. Enzym	Hersteller
1,5 µl DNA-Templat (200 ng)	
0,5 µl 5'-Oligonukleotid	MWG Biotech Life Technologies Metabion
0,5 µl 3'-Oligonukleotid	MWG Biotech Life Technologies Metabion
0,5 µl DeepVent™ Polymerase 0,5 µl Pfu Polymerase 0,5 µl AmpliTaq Polymerase 0,5 µl Expand High Fidelity 0,5 µl MasterTaq Polymerase	New England Biolabs (NEB) Promega PerkinElmer Roche Eppendorf
5 µl DeepVent™ Polymerase-Puffer [10x] 5 µl Pfu Polymerase-Puffer [10x] 5 µl AmpliTaq Polymerase-Puffer [10x] 5 µl Expand High Fidelity-Puffer [10x] 5 µl MasterTaq Polymerase-Puffer [10x]	New England Biolabs (NEB) Promega PerkinElmer Roche Eppendorf
1 µl dNTP [10 mM]	Genecraft
40,5 µl dH <sub>2</sub> O	
0,5 µl DMSO	Sigma-Aldrich

Programmschritt	Dauer	Temperatur	Modifikation
1. Denaturierung	3 min	94°C	
2. Denaturierung	45 s	94°C	
Primerbindung	30 s	50 - 63°C	+ 0,1°C/Zyklus
Polymerisation	30 - 90 s	72°C	+ 1 s/Zyklus
Zyklenanzahl			35
Extension	10 min	72°C	
Endstufe		4°C	

**Tab. 3.1:** Zusammenstellung der zur PCR eingesetzten Reagenzien, Enzyme und Programme.

### 3.1.5.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Synthese der cDNAs nach reverser Transkription. Diese wurden aufgrund der publizierten DNA-Sequenz von Metargidin (Krätzschar et al, 1996) konstruiert.

Oligonukleotide (MWG Biotech)

Pro-RT-F 5'-AAA TAT AGG TGG CAC TGA GGA GCA-3'  
 MP-RT-R 5'-GCT CCA CAA ACA TAT TTC CGC AGA-3'  
 Sig-RT-F 5'-CCA TGC GGC TGG CGC TGC TCT GGG-3'  
 ZP-RT-R 5'-GAG GCA GCG GAA CCT CCG GAG AGG-3'

Oligonukleotide für die Klonierung in die Vektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b:

Oligonukleotide (MWG Biotech)

Pro-Nde-F 5'-CAT ATG ACT GAG GAG CAG CAG GCA GAG-3'  
 MP-BamH-R 5'-GGA TCC TAA GGG GGT AGG CTA GGC AGC-3'  
 MP-Nde-F 5'-CAT ATG GAT GTG GTA ACA GAG ACC AAG-3'

Oligonukleotide für die Klonierung in die Vektoren pPIC9 und pPICZ $\alpha$  A:

Oligonukleotide (Life Technologies)

Pro-Xho-F 5'-CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ACT GAG GAG CAG CAG GCA GAG-3'  
 MP-Xho-F 5'-CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAT GTG GTA ACA GAG ACC AAG-3'  
 MP-Not-R 5'-GCG GCC GCC TAA GGG GGT AGG CTA GGC AGC CG-3'  
 MPMH-Xba-R 5'-TCT AGA GGG GGT AGG CTA GGC AGC CG-3'  
 Dis-Not-R 5'-GCG GCC GCC TAC TCG CCA TCC CCT AGG CTG AC-3'

Oligonukleotid (Metabion)

EGFMH-Xba-R 5'-TCT AGA GCT TTG AGC TGA GTG GTG CAG TCA GG-3'

Oligonukleotide für die Klonierung in den Vektor pcDNA 3.1 Myc-His A:

Oligonukleotide (Life Technologies)

Sig-Hind-F 5'-AAA AAA AGC TTA TGC GGC TGG CGC TGC TC-3'  
 EGFF-Xba-R 5'-AAA AAT CTA GAG CTG GTT GCT TTG AGC TGA-3'  
 ZPF-Xba-R 5'-AAA CAT CTA GAG AGG TAG AGC GAG GAC AC-3'

Oligonukleotide für Mutagenesen:

Oligonukleotide (Life Technologies)

Bgl-Del-F	5'-ATT TCG CGA ATC CAG GAT CTC CAC CTG-3'
Bgl-Del-R	5'-CAG GTG GAG ATC CTG GAT TCG CGA AAT-3'
Mut-EA-F	5'-TCC ATA GCC CAT GCG TTG GGC CAC AGC-3'
Mut-EA-R	5'-GCT GTG GCC CAA CGC ATG GGC TAT GGA-3'
Sma-Sel	5'-GCA AAA AGC TCC TGG GAG GTT GTA TAT CC-3'
RAD-Mut	5'-GTG TCG TCC TAC CAG AGC GGA TTG TGA CTT GCC TG-3'
SGA-Mut	5'-GTG TCG TCC TAC CAG TGG GGC TTG TGA CTT GCC TG-3'

Oligonukleotide für Sequenzierungen und PCR-Analysen:

Oligonukleotide (Life Technologies)

P361-F	5'-ATG ATT TGC CTG GGA ATA GC-3'
P361-R	5'-GCT ATT CCC AGG CAA ATC AT-3'
SEQ-631-F	5'-TCC GCG AAT CCA AGA TCT CC-3'
BGHrev	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
5'AOX1	5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'
3'AOX1	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'

Oligonukleotide (TOPLAB)

15-7/2	5'-GAT TGT GGC TGA TCA CTC GG-3'
15-7/3	5'-CTC CTG GAT GGA ATG GGC-3'
15-rev2	5'-GTC CAC GGC ATT TGC TTC G-3'
15-rev3	5'-CTG GTA GGA CGA CAC TGC C-3'

### 3.1.6 DNA-Sequenzierung

Nukleinsäure-Sequenzierungen erfolgten mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an einem LI-COR Sequencer (MWG Biotech) bzw. mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden an einem ABI-DNA Sequencer (Perkin-Elmer) (Durchführung Frau Dr. W. Engelhardt und Herr F. Hecht, IIT, Universität Bielefeld).

## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Probenvorbereitung für die Dialyse, Ultrafiltration und Chromatographie

Alle zur Dialyse, Ultrafiltration oder chromatographischen Reinigung eingesetzten Proben waren frei von Staub und sonstigen unlöslichen Bestandteilen. Dieses wurde je nach Probenmenge und Beschaffenheit durch 30 min Zentrifugieren bei 48000 g (4°C), Partikelfiltration (0,45 µm bzw. 5 µm) oder Sterilfiltration (0,2 µm) erreicht.

#### 3.2.1.1 Dialyse

Alle zur Dialyse eingesetzten Proben wurden grundsätzlich bei 4°C gegen mindestens das 25fache Volumen des entsprechenden Puffers dialysiert. Zum Einsatz kamen dazu Visking Dialysemembranen der Firma Roth aus Zellulose mit einer Molekulargewichtsausschlußgrenze von 14 kDa.

#### 3.2.1.2 Ultrafiltration

Ultrafiltrationen erfolgten bei 4°C in Kammern der Firma Amicon mit YM-Zellulosemembran (Molekulargewichtsausschlußgrenze: 3 kDa, 10 kDa oder 30 kDa) unter 3 bar Stickstoffatmosphäre. Darüber hinaus wurden Centri- bzw. Mikroconröhrchen (Amicon) (ebenfalls mit YM-Zellulosemembranen) durch Zentrifugieren bei 1500 g (4°C) bzw. 15000 g (4°C) verwendet.

### 3.2.2 Renaturierung der Expressionsprodukte aus *Escherichia coli*

Die in *E. coli* exprimierten Proteine waren aufgrund der Expressions- und Aufarbeitungsbedingungen vollständig denaturiert und mußten für einen Nachweis auf proteolytische Aktivität renaturiert werden. Hierzu wurden mehrere Strategien angewandt, die im folgenden kurz erläutert werden sollen. Die nach Renaturierung erhaltenen Proben konnten dann für *in vitro* Spaltungen potentieller Substrate oder in der Zymographie eingesetzt werden.

### **3.2.2.1 Renaturierung durch sukzessives Entfernen von Harnstoff und $\beta$ -Mercaptoethanol**

Die Proben der rekombinant in *E. coli* hergestellten hADAM 15-Fragmente (MP bzw. ProMP) wurden entweder nach Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) oder direkt als ib-Aufschluß gegen Faltungspuffer (50 mM TRIS, pH 8, 150 mM NaCl) bei 4°C für jeweils 16 h gegen absteigende Harnstoff- (4 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0 M) und  $\beta$ -Mercaptoethanol- (100 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM, 0 mM) Konzentrationen dialysiert. Im Anschluß erfolgte eine Dialyse für 16 h gegen Nativpuffer (25 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) bei 4°C und eine Ultrafiltration (4°C) bei der die Proben auf ca. 25% ihres Volumens eingengt wurden (modifiziert nach Anfinsen, 1973).

### **3.2.2.2 Renaturierung der an Q-Sepharose immobilisierten Expressionsprodukte durch sukzessives Entfernen von Harnstoff und $\beta$ -Mercaptoethanol**

Proben der rekombinant in *E. coli* hergestellten hADAM 15-Fragmente (MP bzw. ProMP) wurden als ib-Aufschluß bei niedriger Ionenstärke (20 mM TRIS, pH 8,5, 8 M Harnstoff, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) an den Anionenaustauscher Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) bei 4°C gebunden. Das Material wurde mit absteigenden Harnstoff- (4 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0 M) und  $\beta$ -Mercaptoethanol- (100 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM, 5 mM, 0 mM) Konzentrationen äquilibriert. Die Elution erfolgte mit Natriumchlorid (25 mM TRIS, pH 8,5, 1 M NaCl) bei 4°C. Im Anschluß wurde das Eluat gegen Nativpuffer dialysiert und durch Ultrafiltration konzentriert. Alternativ erfolgte die fraktionierte Elution der Proben von der Q-Sepharose durch einen linearen Natriumchlorid-Gradienten (0 - 1 M).

### **3.2.2.3 Renaturierung der an Ni-NTA-Agarose immobilisierten Expressionsprodukte durch sukzessives Entfernen von Harnstoff und $\beta$ -Mercaptoethanol**

Eine Probe des ib-Aufschlusses des rekombinant in *E. coli* hergestellten ProMP mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* wurde bei 4°C an Ni-NTA Agarose (Qiagen) gebunden und sukzessive mit folgenden Puffern äquilibriert: Waschpuffer I (10 mM TRIS, pH 8, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M Harnstoff), Waschpuffer II (10 mM TRIS, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,3, 8 M

Harnstoff, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), Naturierungspuffer I (10 mM TRIS, pH 7,5, 8 M Harnstoff, 500 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin), Naturierungspuffer II (10 mM TRIS, pH 7,5, 8 M Harnstoff, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin), Naturierungspuffer III (10 mM TRIS, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin), Naturierungspuffer IV (10 mM TRIS, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 20% (v/v) Glycerin), Naturierungspuffer V (10 mM TRIS, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>), Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 250 mM Imidazol). Im Anschluß wurde das Imidazol durch Dialyse gegen Nativpuffer (25 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) entfernt.

#### **3.2.2.4 Renaturierung durch Verdünnung mit dem Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol**

Der ib-Aufschluß der rekombinanten hADAM 15-Fragmente (MP bzw. ProMP) wurde mindestens mit dem 50fachen Volumen an Redoxpuffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM L-Arginin, 3 mM oxidiertes Glutathion, 1 mM DTT) bei 4°C verdünnt und die Mischung über Nacht bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde die Lösung durch Ultrafiltration auf 10% ihres Volumens konzentriert und gegen Nativpuffer (25 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) dialysiert (modifiziert nach Buchner et al., 1992).

### **3.2.3 Chromatographische Methoden**

Die in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Methoden wurden prinzipiell nach Vorschriften der Hersteller (Amersham Pharmacia Biotech, Baker, Qiagen und Serva) durchgeführt.

#### **3.2.3.1 Ionenaustauschchromatographie**

Ionenaustauschchromatographien mit den Anionenaustauschern Q-Sepharose und CM-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) und dem Kationenaustauscher SP-Sepharose (Amersham

Pharmacia Biotech) wurden bei RT oder 4°C bei Flußraten von 1 - 5 ml/min (in Abhängigkeit vom Durchmesser der verwendeten Säule) mit Äquilierungspuffern durchgeführt, deren pH-Werte 1 - 3 pH-Einheiten über bzw. unter den theoretischen isoelektrischen Punkten der jeweiligen hADAM 15-Fragmenten lagen. Die Elutionen erfolgten fraktioniert mit linearen oder gestuften Natriumchlorid-Gradienten oder mit gestuften pH-Gradienten bei RT oder 4°C.

### 3.2.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde Phenyl-Sepharose und Octyl-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Proben wurden hierzu bei RT mit einem Äquilierungspuffer (pH 5 - 7) der 1 - 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  enthielt an die Matrix gebunden und mit einem linearen Gradienten zu einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von Null eluiert (Flußrate: 1 - 2 ml/min) und fraktioniert gesammelt.

### 3.2.3.3 Affinitätschromatographie mit an Sepharose immobilisierten Farbstoffen

Zur Reinigung der aus *E. coli* erhaltenen Expressionsprodukte wurden verschiedene an Sepharose CL-6B immobilisierte Farbstoffe (z.B. Procion Red HE 3B oder auch Cibacron Blue F3G-A) nach Angaben des Herstellers eingesetzt (Amersham Pharmacia Biotech, 1998). Die Proben wurden hierzu bei geringer Ionenstärke (25 mM TRIS, pH 8,5, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und RT mit der Matrix inkubiert, wonach die Elution fraktioniert durch einen linearen Gradienten zu 1 M Natriumchlorid im gleichen Puffer erfolgte.

### 3.2.3.4 Gelfiltrationschromatographie

Die für die Gelfiltrationschromatographie eingesetzten Materialien waren Sephacryl S-200 HR (Amersham Pharmacia Biotech), Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Biotech) und AcA-44 (Serva). Die Gelfiltrationen wurden sowohl unter denaturierenden Bedingungen (Sephacryl S-200 HR und Sephadex G-75: 50 mM TRIS, pH 8,5, 4 M Harnstoff, 50 - 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 200 - 500 mM NaCl, 0,005 - 0,016% (v/v) Triton X-100 (alternativ 0,1% (w/v) SDS); AcA-44: 20 mM TRIS, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS) bei RT als auch unter nativen Bedingungen (Sephacryl S-200 HR: 50 mM TRIS, pH 7,5, 150 - 500 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ )

bei 4°C durchgeführt. Die Flußraten betragen 0,3 - 0,5 ml/min.

### 3.2.3.5 Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Die Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurde zur Reinigung der mit einem Hexa-Histidin-*tag* fusionierten Expressionsprodukte eingesetzt. Hierbei befand sich im Fall der in *E. coli* exprimierten Proteine der Hexa-Histidin-*tag* am N-Terminus und im Fall der in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15-Fragmente am C-Terminus der Expressionsprodukte. Im allgemeinen wurde die Probe unter denaturierenden (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5 bzw. 8, 300 mM NaCl, 4 M Harnstoff, 10 mM Imidazol bei RT) oder nativen Bedingungen (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol bei 4°C) nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen, 1999) gebunden, dann gewaschen und abschließend mit einem 250 mM Imidazol Stufengradienten eluiert. Im Fall der in *P. pastoris* exprimierten Proteine sind den Waschpuffern alternative Reagenzien wie z.B. 20 - 50 mM Imidazol, 6 M Harnstoff, 2 M NaCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,1 - 1% (v/v) Triton X-100, 50% (v/v) Glycerin oder auch 20% (v/v) Ethanol zugesetzt worden. Die Elution erfolgte auch hier grundsätzlich mit einem 250 mM Imidazol Stufengradienten bei pH 7,5 bzw. 8.

### 3.2.3.6 Affinitätschromatographie an Con A-Sepharose

Concanavalin A ist ein tetrameres Metalloprotein, das bevorzugt  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl- und  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-haltige Glycoproteine bindet. Dadurch läßt es sich in immobilisierter Form zur Anreicherung entsprechend glycosylierter Proteine verwenden. Die Con A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) wurde zur Reinigung der in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15 Fragmente eingesetzt, die aufgrund von drei NX(S/T)-Motiven in der MP-Domäne glykosyliert sind. Die Bindung an das Material gelang bei pH 7,4 in 20 mM TRIS und 500 mM NaCl. Die Elution (Flußrate: 0,75 - 1,5 ml/min) erfolgte fraktioniert mit einem linearen Gradienten bis zu einer  $\alpha$ -D-Methylglucosid-Konzentration von 500 mM.

### 3.2.3.7 Heparin-Sepharose

Die Heparin-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) wurde sowohl als Kationenaustauscher (Heparin enthält einen hohen Anteil an anionischen Sulfatgruppen) (Bindungspuffer: 20

mM Natriumacetat, pH 5; Elutionspuffer: 20 mM Natriumacetat, pH 5, 1 M NaCl) als auch als Affinitätsmatrix (Bindungspuffer: 20 mM TRIS, pH 7,4 (alternativ mit 500  $\mu$ M bzw. 5mM  $\text{CaCl}_2$  und 50  $\mu$ M bzw. 500  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ ); Elutionspuffer: 20 mM TRIS, pH 7,4, 1 M NaCl (alternativ mit 500  $\mu$ M bzw. 5mM  $\text{CaCl}_2$  und 50  $\mu$ M bzw. 500  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ )) zur Reinigung der in *P. pastoris* exprimierten Proteine bei 4°C eingesetzt. Eluiert wurde durch einen linearen Gradienten von 100% Bindungspuffer zu 100% Elutionspuffer bei 4°C. Die Proben wurden fraktioniert gesammelt bei Flußraten bis zu 3,5 ml/min.

### 3.2.3.8 Immobilisierter Hydroxamatinhibitor

Zur Herstellung eines immobilisierten Hydroxamatinhibitors wurden 20 mg des peptidischen Inhibitors Pro-Leu-Gly-NHOH·HCl (Bachem) nach Vorschrift des Hersteller an 1 g aktivierte CH Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, 1998) gekoppelt. Die so erhaltene Affinitätsmatrix wurde bei 4°C mit Nativpuffer (20 mM TRIS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) äquilibriert und im Anschluß mit gegen den Nativpuffer dialysierten Hefeüberstand (hADAM 15-ProMP) beladen. Ungebundene Probenbestandteile wurden durch Waschen mit dem gleichen Nativpuffer entfernt. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten aus 50 mM EDTA und 500 mM NaCl bei pH 7,4.

### 3.2.3.9 Immobilisierter Antikörper

An 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4 B (Amersham Pharmacia Biotech) wurden 9 mg durch Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigten polyklonalen anti-MP-Antikörper nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, 1998) gekoppelt. Der immobilisierte Antikörper wurde zur Reinigung derjenigen in *P. pastoris* rekombinant hergestellten hADAM 15 Fragmente eingesetzt, die die MP-Domäne enthielten. Nach Äquilibrierung mit Bindungspuffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 500 mM NaCl) wurde versucht das rekombinante Protein entweder mit Glycin-Puffer bei pH 2,5 oder mit 3 M  $\text{MgCl}_2$  zu eluieren.

### 3.2.3.10 Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography

Die RP-HPLC (*reversed phase-high performance liquid chromatography*) wurde zur Analytik der für die Immunisierung einzusetzenden Proteinlösungen angewendet. 500 µl des Antigens (300 µg/ml) gelöst in PBS wurden mit einer Bakerbond Standard Wide-Pore Octadecyl (C<sub>18</sub>) 5 µm (4,6 x 250 mm) an einer LaChrom-HPLC-Anlage (Merck-Hitachi) durch einen linearen Gradienten von Puffer A (0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) zu Puffer B (80% (v/v) Acetonitril, 0,08% (v/v) Trifluoressigsäure) über einen Zeitraum von einer Stunde bei RT analysiert.

## 3.2.4 Probenvorbereitung für SDS-PAGE und Western-Blotting

### 3.2.4.1 Lyse von *Escherichia coli*

Dem Expressionsmedium wurden 1 ml Zellsuspension entnommen, diese im Anschluß für 3 min bei 15000 g pelletiert und das Zellpellet in 125 µl Probenpuffer (20 mM TRIS, pH 8, 8 M Harnstoff, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 0,001% (w/v) BPB) resuspendiert und für 10 min bei 100°C erhitzt. Das so erhaltene Lysat wurde für die weitere Analysen verwendet.

### 3.2.4.2 Lyse von *Pichia pastoris*

Zur Lyse von *P. pastoris* wurde folgender Aufschlußpuffer verwendet: 62 mM TRIS, pH 8, 8 M Harnstoff, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 100 mg/ml Pefabloc SC, 1 Tablette/ml Complete Inhibitor Mix (Roche). Das aus 500 µl Suspensionskultur stammende Hefepellet wurde mit 100 mg Glasperlen (0,2 mm) und 200 µl Aufschlußpuffer versetzt und resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min auf 70°C erhitzt und 1 min intensiv vermischt (VortexGenie). Danach wurde 5 min bei 15000 g (4°C) pelletiert und zwei Drittel des Überstandes auf Eis verwahrt. Der verbliebene Rest wurde erneut resuspendiert und 5 min auf 100°C erhitzt und 1 min intensiv vermischt (VortexGenie). Es folgte nochmals eine Zentrifugation für 5 min bei 15000 g (4°C), wonach beide Überstände (s.o.) miteinander vereinigt wurden. Die Probe wurden dann für weitere Analysen eingesetzt.

### 3.2.4.3 Lyse von Säugetierzellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden bei 80 - 90% Konfluenz (T 25 Gewebekulturflasche) dreimal mit PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (50 mM TRIS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Nonidet P-40, 1 Tablette/10 ml Complete Inhibitor Mix (Roche)) für 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 15 min bei 15000 g (4°C) zentrifugiert und dann weiterführend analysiert.

Zur Anreicherung der Glykoproteine wurden dann 900 µl des Überstandes mit 25 µl Con A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Danach wird das Sepharose-Pellet einmal mit Lysepuffer gewaschen und in 100 µl Probenpuffer (125 mM TRIS, pH 6,8, 10 mM EDTA, 15% (w/v) Sucrose, 10 mM DTT) resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 100°C erhitzt und dann weiterführend analysiert.

### 3.2.4.4 Immunpräzipitation

200 µl der zu untersuchenden Probe (Gesamtproteingehalt: 50 - 500 µg/ml) wurden mit 25 µl Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und 2 h bei 4°C geschüttelt. Die Probe wurde pelletiert und der Überstand mit einem geeigneten Antikörper (2 µg) und 25 µl Protein A Sepharose versetzt und 24 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Protein A-Sepharose-Pellet wurde zweimal mit 25 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl gewaschen und in SDS-PAGE-Probenpuffer (62 mM TRIS, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) BPB) resuspendiert und 10 min auf 100°C erhitzt. Die Probe wurde dann für weitere Analysen eingesetzt.

### 3.2.4.5 Chloroform-Methanol-Fällung

Zur Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese oder die Proteinsequenzierung wurde die Chloroform-Methanol-Fällung nach einer abgewandelten Vorschrift von Wessel und Flüge (1984) verwendet. Hierzu versetzte man 150 µl wässrige Proteinlösung mit 600 µl Methanol, 150 µl Chloroform und 450 µl dH<sub>2</sub>O. Im Anschluß wurde der Ansatz intensiv vermischt (VortexGenie) und 5 min bei 7000 g (RT) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde verworfen,

das Proteinpellet in der Interphase zurückbehalten und es wurden nochmals 450 µl Methanol hinzugefügt, wonach der Ansatz erneut intensiv vermischt wurde (VortexGenie). Nach 5 min Zentrifugieren bei 7000 g (RT) wurde die organische Phase komplett entfernt und das Proteinpellet getrocknet. Diese Methode hatte den Vorteil, daß sie auch in Gegenwart von Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen zuverlässig arbeitete und Proteinmengen bis zu 20 ng sicher gefällt wurden. Das transparente Pellet bestand aus dem getrockneten Protein, weitgehend frei von Rückständen des Fällungsmittels oder der Pufferkomponenten.

#### 3.2.4.6 Deglykosylierung mit PNGase F

Die mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Fällung erhaltenen Proben wurden nach Angaben des Herstellers mit PNGase F (New England Biolabs) deglykosyliert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben mit Chloroform und Methanol gefällt und standen nach Lösen in Probenpuffer (62 mM TRIS, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) BPB) für die Analyse in der SDS-PAGE bzw. dem Western-Blotting zur Verfügung. Alternativ wurden Proben, die für weitere Analysen ihrer biologischen Aktivität verwendet werden sollten, unter nativen Bedingungen ohne vorherige Denaturierung deglykosyliert.

#### 3.2.5 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen SDS-PAGE wurden zumeist 15%ige Gele (alternativ auch 7, 10, 12 oder auch 20%ige Gele) in Vertikalkammern verwendet (Eigenbau, Universität Bielefeld). Die Gelelektrophoresen wurden in Gegenwart von SDS (*sodium dodecyl sulfate*) und reduzierend wirkendem  $\beta$ -Mercaptoethanol bei einer Stromstärke von 20 - 30 mA durchgeführt (Laemmli, 1970). Als Alternative zu Gelen nach Laemmli (1970) wurden bei Applikationen, die eine besonders hohe Trennschärfe erforderten, auch Gele nach Schagger und von Jagow (1987) eingesetzt. Der Nachweis der getrennten Proteine erfolgte entweder durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva), durch Silbernitrat (Schoenle et al., 1984) oder durch Zinksulfat (Hardy et al., 1997). Als Molekulargewichtsmarker wurde das LMW Elektrophoresis Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt.

### 3.2.6 Präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur präparativen SDS-PAGE wurden 10%ige Polyacrylamidgele nach Laemmli in Vertikalkammern verwendet (Laemmli, 1970). Die Gele wurden im Anschluß mit Zinksulfat (Hardy et al., 1997) gefärbt, die interessierenden Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Gelstücke zerkleinert. Diese wurden dann bei RT in 500 µl Gelelutionspuffer (50 mM TRIS, pH 9,0, 2% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100) für drei Stunden geschüttelt (VortexGenie), der Überstand lyophilisiert, in 150 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und die Proteine mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) von Salz und Detergenzien befreit. Das Proteinpellet stand dann für weitere Untersuchungen bzw. für die Immunisierung von Kaninchen zur Verfügung.

### 3.2.7 Western-Blotting

Das Blotten der Proteine auf die PVDF-Immobilon-P-Transfermembran (Millipore) erfolgte im Anschluß an eine 15 minütige Inkubation der Gele im Blotpuffer (25 mM TRIS, pH 8,3, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Ethanol) (Towbin et al., 1979). Der immunologische Nachweis erfolgte mit entsprechenden Primärantikörpern, wobei diese mit an alkalische Phosphatase konjugierten Sekundärantikörpern unter Verwendung des NBT(Nitroblautetrazoliumchlorid)/BCIP(5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz)-Farbstoffsystems unter Anwendung von Standardvorschriften (Bio-Rad, 1998) detektiert wurden.

### 3.2.8 Proteinsequenzierung

Der automatisierte Edman-Abbau (Edman und Begg, 1967) wurde mit einem Protein-Sequenzierer 810/910 der Firma Knauer durchgeführt. Die Proben wurden entweder immobilisiert auf einer PVDF-Membran (Blotpuffer: 50 mM Borsäure, pH 9,0, 20% (v/v) Ethanol) oder in lyophilisiertem Zustand zur Sequenzierung gegeben (Durchführung Frau S. Grabolle, Frau K. Köster und Herr M.-O. Luther, Universität Bielefeld).

### 3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

#### 3.2.9.1 BCA-Test

Die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine mit anschließender photometrischer Bestimmung des  $\text{Cu}^+$ /Bicinchoninsäure-Komplexes bei 560 nm im Spektralphotometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech) wurde gemäß dem Protokoll des BCA-Tests (Pierce, 1997) durchgeführt. Als Standard diente eine Lösung mit 2 mg/ml BSA.

#### 3.2.9.2 Photometrische Bestimmung

Die Proteinkonzentrationen in PBS wurde bei 280 nm nach dem Lambert-Beer Gesetz ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) mit  $\epsilon = 13020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  für die MP-Domäne von hADAM 15 (berechnet nach Gill und Hippel (1989)) bestimmt.

### 3.2.10 Nachweis proteolytischer Aktivität

Bei vielen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden die zu charakterisierenden hADAM 15-Fragmente vor Zugabe des betreffenden Substrates mit potentiellen Aktivatoren, wie z.B.  $\text{HgCl}_2$ , APMA (4-Aminophenylmercuriacetat), Trypsin oder auch Furin vorinkubiert. Diese Modifikationen sind im Ergebnisteil gesondert angegeben.

#### 3.2.10.1 *In vitro* Spaltungen potentieller Substrate

Die Probe des entsprechenden rekombinanten hADAM 15-Fragmentes und das zu untersuchende Substrat (Insulin-B-Kette (Sigma),  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Roche) oder das MBP (Sigma)) wurden in Nativpuffer (20 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 - 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,025 - 0,5 mM  $\text{ZnCl}_2$ ) für 5 min bis 16 h - in Abhängigkeit von Probe, Substrat und Substratmenge - bei 37°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte zu definierten Zeitpunkten und die Analyse wurde mittels SDS-PAGE oder Western-Blotting durchgeführt.

### 3.2.10.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry

Der *in vitro* Verdau der oxidierten Insulin-B-Kette (Sigma) wurde durch MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*) analysiert. Hierzu wurden die Spaltungsansätze nach Beendigung der Inkubation mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Fällung von Pufferbestandteilen befreit und konzentriert. Nach Trocknung der Proteinpellets wurden diese in 50 mM TRIS, pH 8,0 resuspendiert und 5 min bei 100°C erhitzt. Ein Mikroliter der so erhaltenen Lösungen wurden mit je einem weiteren Mikroliter Matrixlösung (49,95% (v/v) Methanol, 49,95% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, 10 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-Hydroxyzimtsäure) vermischt und auf den Probenträger zur Kristallisation aufgetropft und getrocknet. Im Anschluß wurden die Proben in einer Voyager-DE™ BioSpectrometry™ Workstation (PerSeptive Biosystems) unter Verwendung eines N<sub>2</sub>-Laser bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 337$  nm und einer Beschleunigungsspannung von 20000 V analysiert.

### 3.2.10.3 Zymographie

Die Zymographie ist eine Methode zur Detektion proteolytischer Aktivität, die auch bei inhomogenen Proben mit hoher Sensitivität angewandt werden kann. Hierzu wurden 10 - 12%ige Polyacrylamidgele nach Laemmli angefertigt (Laemmli, 1970), die pro Milliliter Gelpuffer 1 mg des zu spaltenden Substrates (Kollagen Typ I, II, III, VI oder VII (Sigma), Gelatin (Sigma),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein (Fluka) oder auch Plasma-Fibronektin (Jens Unger, Universität Bielefeld) enthielten. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA in Vertikalgelkammern durchgeführt um eine wärmebedingte Denaturierung der Proben - gelöst in nicht-reduzierend wirkenden Probenpuffer - zu vermeiden. Im Anschluß wurde das Gel zweimal in Triton X-100 haltigem Nativpuffer (25 mM TRIS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 - 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 - 500 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,02% (v/v) Brij 35, 2,5% (v/v) Triton X-100) gewaschen, und dann über Nacht in Nativpuffer (25 mM TRIS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 - 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 - 500 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,02% (v/v) Brij 35) bei 37°C inkubiert. Die Färbung des Zymogramms erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva).

### 3.2.10.4 Spaltung fluorogener Peptide

Zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente wurden diese zur Spaltung fluoreszenzmarkierter Peptide in einem Fluoreszenzspektrometer LS50B (Perkin Elmer) eingesetzt. Hierzu wurde die zu untersuchende Probe in Nativpuffer (20 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 - 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,025 - 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>) vorgelegt, 10 min bei 37°C vorinkubiert und mit 0,25 - 1 µM Peptid versetzt. Der Abbau des Peptides wurde bei 37°C über die Detektion der Emission über einen Zeitraum von einer Stunde dokumentiert. Die zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität eingesetzten Peptide waren:

TACE-Substrat, fluorogen (Bachem)

MCA-Pro-Leu-Ala-Glu-Ala-Val-Dpa-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 328$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda = 393$  nm, effektive Konzentration: 1 µM

MMP2/MMP7-Substrat, fluorogen (Calbiochem)

MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 328$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda = 393$  nm, effektive Konzentration: 0,5 µM

P1m-Peptid, fluorogen (L. Schindler und N. Sewald, Universität Bielefeld)

Abz-Ser-His-His-Gly-Asp-Gln-Met-Ala-Gln-Lys-Ser-Gln-Ser-Thr-Gln-Ile-Tyr(NO<sub>2</sub>)-Gly-NH<sub>2</sub>

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 320$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda = 420$  nm, effektive Konzentration: 0,38 µM

P2m-Peptid, fluorogen (L. Schindler und N. Sewald, Universität Bielefeld)

Abz-Leu-Arg-Ala-Glu-Gln-Gln-Arg-Leu-Lys-Ser-Gln-Asp-Leu-Glu-Tyr(NO<sub>2</sub>)-Gly-NH<sub>2</sub>

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 320$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda = 420$  nm, effektive Konzentration: 0,25 µM

P16m-Peptid, fluorogen (L. Schindler und N. Sewald, Universität Bielefeld)

Abz-Leu-His-His-Gly-Asp-Gln-Met-Ala-Gln-Lys-Ser-Gln-Ser-Thr-Gln-Ile-Tyr(NO<sub>2</sub>)-Gly-NH<sub>2</sub>

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 320$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda = 420$  nm, effektive Konzentration: 0,38  $\mu$ M

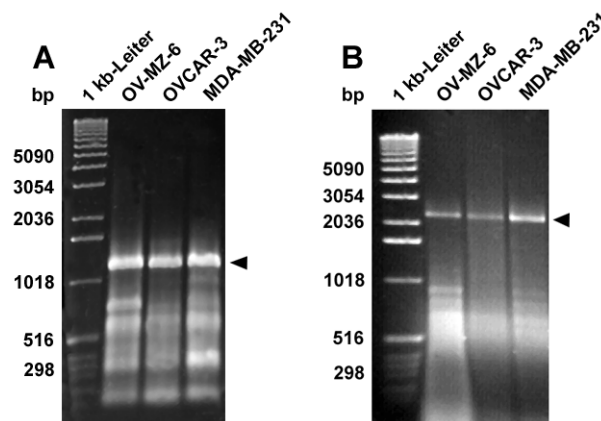
### 3.2.11 Herstellung und Reinigung polyklonaler Antikörper

Nach Reinigung des Antigens (MP-Domäne von hADAM 15, rekombinant hergestellt in *E. coli*) durch präparative SDS-PAGE wurden 300  $\mu$ g in 1 ml PBS gelöst und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die Proben wurden mit der gleichen Menge komplettem Freud'schen Adjuvanz vermischt und diese Emulsion den Kaninchen an 2 Stellen unter die Rückenhaut injiziert. Vier und sechs Wochen später erhielten die Tiere eine intravenöse Injektion von jeweils 300  $\mu$ g Antigen in 1 ml PBS (Durchführung Dr. Alfons Radunz, Universität Bielefeld). Aus den Serenproben der siebten Woche erfolgte die Präparation der polyklonalen Antikörper. Hierzu wurde 1 ml Antiserum mit 9 ml Bindungspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 150 mM NaCl) vermischt und mit 1 ml Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) für zwei Stunden bei 4°C geschüttelt. Im Anschluß wurde das Material mit 150 ml Bindungspuffer gewaschen und die Antikörper mit 10 ml Glycinpuffer (200 mM Glycin, pH 2,7) eluiert, wobei das Eluat direkt in 4,4 ml Neutralisationspuffer (1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 9) getropft wurde. Danach wurde das Eluat mehrmals gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert und lyophilisiert. Alternativ wurde auf die Lyophilisierung verzichtet oder es wurden 3 M MgCl<sub>2</sub> zur Elution eingesetzt, wobei dann der Bindungs- und Neutralisationspuffer nicht Phosphat- sondern TRIS-gepuffert war.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Synthese und Klonierung der humanen ADAM 15-cDNA

Die für hADAM 15 kodierende DNA wurde mittels RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) generiert. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus den beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 und der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 isoliert und zur reversen Transkription eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurden spezifischen Primer (Pro-RT-F und MP-RT-R bzw. Sig-RT-F und ZP-RT-R) verwendet, die anhand der veröffentlichten cDNA-Sequenz von Metargidin konstruiert wurden (Krätzschar et al., 1996).



**Abb. 4.1:** **A) Nachweis der Amplifikation der hADAM 15-ProMP-cDNA: 1220 bp** (siehe Pfeil). (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) Primer: Pro-RT-F und MP-RT-R  
**B) Nachweis der Amplifikation der full length hADAM 15-cDNA: 2476 bp** (siehe Pfeil). (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) Primer: Sig-RT-F und ZP-RT-R

Die hADAM 15-mRNA-Expression wurde in allen drei untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Es wurde hierbei sowohl die komplette cDNA (*full length*) (Abb. 4.1 B) als auch ein verkürztes, nur für die Pro- und Metalloproteinase-Domäne (ProMP) kodierendes Fragment (Abb. 4.1 A) amplifiziert. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> kloniert und in einer ersten DNA-Sequenzierungsrunde über eine Länge von 400 bp sowohl vom 5′- als auch vom 3′-Ende sequenziert. Dabei zeigte sich für alle klonierten Fragmente eine fast vollständige Übereinstimmung mit der bereits publizierten cDNA-Sequenz von Metargidin (Krätzschar et al., 1996). Die Unterschiede betrafen zwei Positionen am 3′-Ende der cDNA,

die für die die zytoplasmatische Domäne von hADAM 15 kodiert (Abb. 4.2). Im Anschluß an die erste cDNA-Sequenzierungsrunde wurde die aus der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 stammende cDNA komplett sequenziert und mit den beiden bereits bekannten cDNA-Sequenzen (Krätzschar et al., 1996; Herren et al., 1997) auf Basis der Aminosäureabfolge verglichen, indem zuvor die Primärstrukturen aus den cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden (Abb. 4.2). Die Abweichungen der Primärstrukturen betreffen die Aminosäurereste 714 und 791 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne. Durch die Synthese und Klonierung der vollständigen cDNA für hADAM 15 aus der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 wurde eine cDNA-Klon etabliert, der für alle weiteren Polymerasekettenreaktionen in dieser Arbeit als Templat diente.

Um nun die Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne von hADAM 15 charakterisieren zu können, wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionssysteme für die rekombinanten hADAM 15-Fragmente etabliert. Die dazu verwendeten Wirtsorganismen waren das Bakterium *Escherichia coli*, die Hefe *Pichia pastoris* und die beiden Säugerzelllinien OV-MZ-6 und CHO.

Für eine bessere Übersichtlichkeit sollen in den folgenden Kapiteln die hier dargestellten Abkürzungen für die diversen hADAM 15-Fragmente verwendet werden:

SigEGF (Ecto)	Ecto-Domäne mit Signalpeptid (M <sup>1</sup> - S <sup>693</sup> )
SigZP ( <i>full length</i> )	Gesamtprotein (M <sup>1</sup> - L <sup>814</sup> )
ProMP	Pro- und Metalloproteinase-Domäne (T <sup>29</sup> - P <sup>419</sup> )
ProMPDis	Pro-, Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne (T <sup>29</sup> - E <sup>510</sup> )
ProEGF	Ecto-Domäne ohne Signalpeptid (T <sup>29</sup> - S <sup>693</sup> )
MP	Metalloproteinase-Domäne (D <sup>207</sup> - P <sup>419</sup> )
MPDis	Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne (D <sup>207</sup> - E <sup>510</sup> )
MPEGF	Ecto-Domäne ohne Signalpeptid und Pro-Domäne (D <sup>207</sup> - S <sup>693</sup> )



	Signalpeptid	Pro-Domäne	
hADAM 15	1 MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIGGTEEQQAES EKAPREP LE PQLQDDLPI SLKKVLQTS LPEPLRIKLEL	75	
Metargidin	1 MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIGGTEEQQAES EKAPREP LE PQLQDDLPI SLKKVLQTS LPEPLRIKLEL	75	
hMDC 15	1 MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIGGTEEQQAES EKAPREP LE PQLQDDLPI SLKKVLQTS LPEPLRIKLEL	75	
hADAM 15	76 DGDSHILELLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVVSEGHTLENCYQGRVRYAGS WVSICTCSGLRGLVLT PERS	150	
Metargidin	76 DGDSHILELLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVVSEGHTLENCYQGRVRYAGS WVSICTCSGLRGLVLT PERS	150	
hMDC 15	76 DGDSHILELLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVVSEGHTLENCYQGRVRYAGS WVSICTCSGLRGLVLT PERS	150	
			<b>Metalloproteinase-Domäne</b>
hADAM 15	151 YTL EQGPGDLQGPPIISRIQDLHLPGHTCALSWRESVHTQTPPEHPLGQRHIRRRRDVVVTETKTVELVIVADHSE	225	
Metargidin	151 YTL EQGPGDLQGPPIISRIQDLHLPGHTCALSWRESVHTQTPPEHPLGQRHIRRRRDVVVTETKTVELVIVADHSE	225	
hMDC 15	151 YTL EQGPGDLQGPPIISRIQDLHLPGHTCALSWRESVHTQTPPEHPLGQRHIRRRRDVVVTETKTVELVIVADHSE	225	
			<b>Cysteine-Switch-Motiv</b> <b>Furin-Spaltstelle</b>
hADAM 15	226 AQKYRDFQHLLNR TLEVALLLD TFFRPLNVRVALVGL EAWTQRDLVEISPNPAVTLENFLHWRR AHL L PRLPHDS	300	
Metargidin	226 AQKYRDFQHLLNR TLEVALLLD TFFRPLNVRVALVGL EAWTQRDLVEISPNPAVTLENFLHWRR AHL L PRLPHDS	300	
hMDC 15	226 AQKYRDFQHLLNR TLEVALLLD TFFRPLNVRVALVGL EAWTQRDLVEISPNPAVTLENFLHWRR AHL L PRLPHDS	300	
hADAM 15	301 AQLVTGT SFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVNMDHST SILGVASSIAHELCHSLGLDHDLPGN S C P C P G P A P A K T	375	
Metargidin	301 AQLVTGT SFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVNMDHST SILGVASSIAHELCHSLGLDHDLPGN S C P C P G P A P A K T	375	
hMDC 15	301 AQLVTGT SFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVNMDHST SILGVASSIAHELCHSLGLDHDLPGN S C P C P G P A P A K T	375	
			<b>Zinkbindungsmotiv</b>
			<b>Disintegrin-Domäne</b>
hADAM 15	376 CIMEASTDFLPGLNFSNCSRRALEKALLDGMGSCLFERLPSLPPMAAFCG NMFVEPEGEQDCGF LDDCVD PCCDS	450	
Metargidin	376 CIMEASTDFLPGLNFSNCSRRALEKALLDGMGSCLFERLPSLPPMAAFCG NMFVEPEGEQDCGF LDDCVD PCCDS	450	
hMDC 15	376 CIMEASTDFLPGLNFSNCSRRALEKALLDGMGSCLFERLPSLPPMAAFCG NMFVEPEGEQDCGF LDDCVD PCCDS	450	
			<b>Met-Turn</b>
			<b>Cystein-reiche Dom.</b>
hADAM 15	451 LTCQLRPGAQCASDG PCCQNCQLRPSGWQCRPTRGD CDLP EFC P G D S S Q C P P D V S L G D G E P C A G G Q A V C M H G R C A	525	
Metargidin	451 LTCQLRPGAQCASDG PCCQNCQLRPSGWQCRPTRGD CDLP EFC P G D S S Q C P P D V S L G D G E P C A G G Q A V C M H G R C A	525	
hMDC 15	451 LTCQLRPGAQCASDG PCCQNCQLRPSGWQCRPTRGD CDLP EFC P G D S S Q C P P D V S L G D G E P C A G G Q A V C M H G R C A	525	
			<b>RGD-Motiv</b>
hADAM 15	526 SYAQQCQSLWGP GAQP AAPLCLQTANTRGNAFG SCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQCQTGR TQP L L G S I R D L L W	600	
Metargidin	526 SYAQQCQSLWGP GAQP AAPLCLQTANTRGNAFG SCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQCQTGR TQP L L G S I R D L L W	600	
hMDC 15	526 SYAQQCQSLWGP GAQP AAPLCLQTANTRGNAFG SCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQCQTGR TQP L L G S I R D L L W	600	
			<b>EGF-ähnliche Domäne</b>
hADAM 15	601 ETIDVNGTEL NCSWVHLDLGS DVAQPLL TLP GTACG PGLVCIDHR CQRVDLLGAQECRSKCHGHGVCDSNRH CYC	675	
Metargidin	601 ETIDVNGTEL NCSWVHLDLGS DVAQPLL TLP GTACG PGLVCIDHR CQRVDLLGAQECRSKCHGHGVCDSNRH CYC	675	
hMDC 15	601 ETIDVNGTEL NCSWVHLDLGS DVAQPLL TLP GTACG PGLVCIDHR CQRVDLLGAQECRSKCHGHGVCDSNRH CYC	675	
			<b>Transmembran-Dom. zytoplasmatische Domäne</b>
hADAM 15	676 EEGWAPPDCTTQLKATSSL T T G L L S L L V L L V L V M L G A S Y W Y R A R L H Q R L C Q L K G P T C Q Y R A A Q S G P S E R P G P P Q	750	
Metargidin	676 EEGWAPPDCTTQLKATSSL T T G L L S L L V L L V L V M L G A S Y W Y R A R L H Q R L C Q L K G P T C Q Y R A A Q S G P S E R P G P P Q	750	
hMDC 15	676 EEGWAPPDCTTQLKATSSL T T G L L S L L V L L V L V M L G A S Y W Y R A R L X Q R L C Q L K G P T C Q Y R A A Q S G P S E R P G P P Q	750	
			<b>714</b>
hADAM 15	751 RALLARGTKSQGPAK P P P P R K P L P A D P Q G R C P S G D L P G P G A G I P P L V V P S R P A P P P P T V S S L Y L	814	
Metargidin	751 RALLARGTKSQGPAK P P P P R K P L P A D P Q G R C P S G D L P G P G A G I P P L V V P S R P A P P P P T V S S L Y L	814	
hMDC 15	751 RALLARGTKSQGPAK P P P P R K P L P A D P Q G R C P S G D L P G P G P G I P P L V V P S R P A P P P P T V S S L Y L	814	
			<b>Prolin-reiche Region 1</b> <b>791</b> <b>Prolin-reiche Region 2</b>

Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz des neu klonierten hADAM 15 mit den beiden bereits publizierten Aminosäuresequenzen von Metargidin (Krätzschmar et al., 1996) und hMDC 15 (Herren et al., 1997). Die hier blau dargestellten Charakteristika sind in Kapitel 2.4 beschrieben worden. Die Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen sind rot dargestellt und betreffen die Aminosäurereste 714 und 791. N-Glykosylierungsstellen sind grün dargestellt.

## 4.2 Heterologe Expression von hADAM 15-Domänen in *Escherichia coli*

Der erste Ansatz zur Charakterisierung der proteolytischen Eigenschaften von hADAM 15 war die Etablierung bakterieller Expressionssysteme, indem die für die MP und die ProMP kodierende DNA in bakterielle Expressionsvektoren des pET-Typs kloniert wurde. Hierzu wurden die relevanten cDNA-Fragmente mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert und durch diese auch mit zu den Expressionsvektoren kompatiblen Restriktionsstellen versehen. Die Amplifikation des MP-cDNA gelang mit dem Primerpaar MP-Nde-F/MP-BamH-R, die der ProMP-cDNA mit dem Primerpaar Pro-Nde-F/MP-BamH-R. Die so erhaltenen cDNA-Fragmente konnten unter Verwendung der *Nde I*- und *BamH I*-Restriktionsstellen in die Vektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b kloniert werden. Im Anschluß wurden alle Klonierungsprodukte sequenziert um PCR-bedingte Mutationen, Deletionen und Insertionen auszuschließen. Durch die Wahl der Restriktionsstelle *Nde I* waren die in den Vektor pET-15b klonierten Fragmente nach heterologer Expression mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* fusioniert, was eine spätere Reinigung der Expressionsprodukte über Ni-NTA-Agarose ermöglichen sollte.

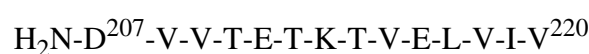
Die generierten Expressionsplasmide wurden dann zur Transformation des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) verwendet. Nach Transformation wurden durch Testexpressionen im 50 ml-Maßstab diejenigen Klone identifiziert, die die gewünschten hADAM 15-Fragmente nach Induktion mit IPTG (Isopropylthiogalaktosid) exprimierten. Die zur heterologen Expression geeigneten Klone wurden zur Expression im 750 ml-Maßstab eingesetzt um größere Mengen an rekombinanten Proteinen zur weiteren Charakterisierung zu erhalten. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die hergestellten Konstrukte, Modifikationen und die verwendeten Expressionsvektoren. Bei der heterologen Expression in *E. coli* wurden die rekombinanten hADAM 15-Fragmente als unlösliche Proteinaggregate (*inclusion bodies*) im Zytosol der Bakterien deponiert. Diese *inclusion bodies* konnten aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte nach Lyse der Zellen durch Zentrifugation von den übrigen Bestandteilen des Zelllysates getrennt werden. Der Nachteil der Methode bestand jedoch darin, daß die *inclusion bodies* unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert und das in ihnen enthaltene Expressionsprodukt wieder renaturiert werden mußte.

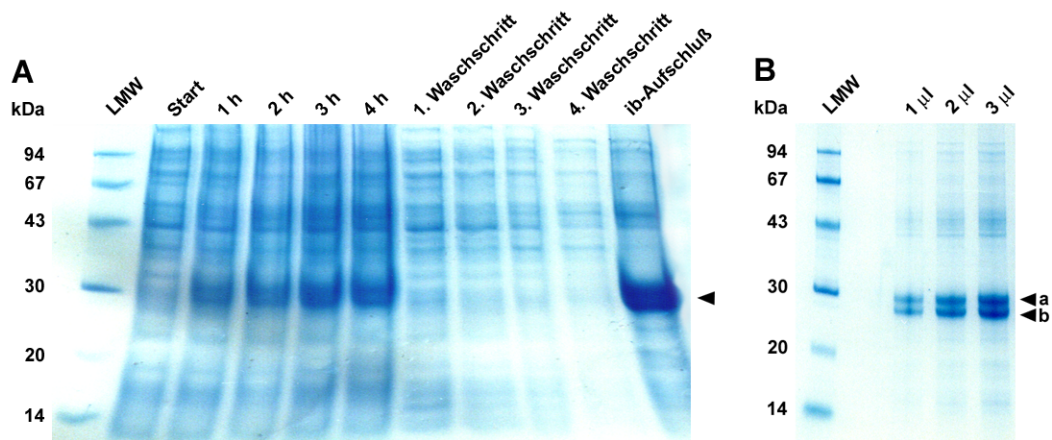
hADAM 15-Domänen	BL21(DE3) pET-11a	BL21(DE3) pET-12b	BL21(DE3) pET-15b
	[WT]	[WT]	[6H~]
	[WT]	[WT]	[6H~]

**Tab. 4.1:** Zusammenstellung der klonierten und im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimierten hADAM 15-Fragmente. Die Expressionsraten werden wie folgt kategorisiert: **starke Expression**, **mittlere Expression**, **schwache bis keine Expression**. Die zur Expression im 750 ml-Maßstab eingesetzten Systeme sind im Fettdruck dargestellt. Abkürzungen: [WT] Wildtyp; [6H~] N-terminaler Hexa-Histidin-tag.

#### 4.2.1 Heterologe Expression der Metalloproteinase-Domäne in BL21(DE3)

Die heterologe Expression der MP im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) gelang in sehr guten Ausbeuten (durchschnittlich 2,0 g Rohprotein pro Liter Bakterienkultur). Abbildung 4.3 gibt einen Überblick über den Expressionsverlauf der hADAM 15-MP nach Induktion mit IPTG. Die Kultivierung der Zellen wurde nach vier Stunden beendet, da die Menge an rekombinantem Protein nicht mehr signifikant zunahm. Durch die Lyse der Bakterien und mehrmaligem Waschen der *inclusion bodies* konnte die MP sehr gut angereichert werden und stand nach Solubilisierung in *ib*-Aufschlußpuffer für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Im SDS-PAGE erschien das Expressionsprodukt als Doppelbande bei 28 und 30 kDa. Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung konnte gezeigt werden, daß beide MP-Fragmente (Abb. 4.3 B, **a** und **b**) den gleichen N-Terminus besaßen:

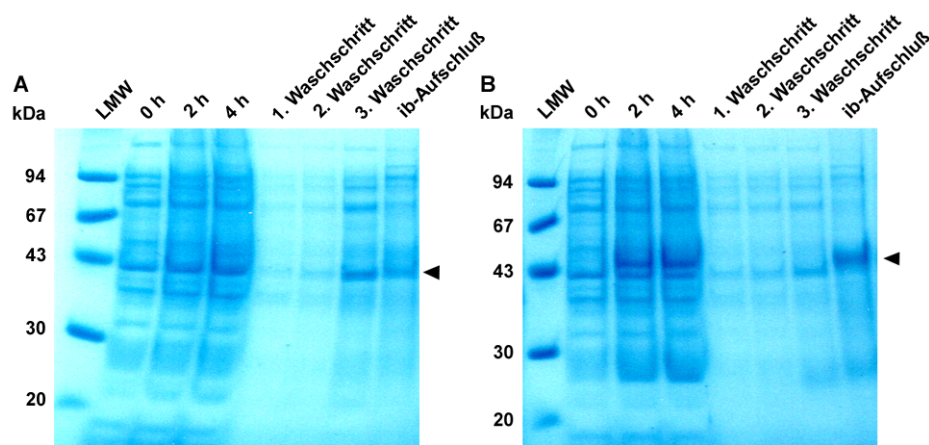




**Abb. 4.3:** **A) Nachweis der Expression der MP** (750 ml-Maßstab; BL21(DE3) pET-11a hADAM 15 MP) **und Dokumentation der anschließenden Aufarbeitung des Zellpellets** (Waschschritte 1 - 4; Kapitel 3.1.3.1). Das Expressionsprodukt erscheint als verbreiterte Bande zwischen 28 und 30 kDa (siehe Pfeil); (kontinuierliche SDS-PAGE (10% PAA), reduzierte Proben, Coomassie-Färbung). **B) Verdünnungsreihe des ib-Aufschlusses** (siehe A) **der MP**. Expressionsprodukt: Doppelbande bei 28 kDa (b) bzw. 30 kDa (a); (Kontinuierliche SDS-PAGE (10% PAA), reduzierte Proben, Coomassie-Färbung).

#### 4.2.2 Heterologe Expression der Pro- und Metalloproteinase-Domäne in BL21(DE3)

Die heterologe Expression der ProMP im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) gelang im Vergleich zur MP nur in geringen bis mittleren Ausbeuten (durchschnittlich 100 mg Rohprotein pro Liter Bakterienkultur), wobei die mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* fusionierte Variante in höheren Ausbeuten (durchschnittlich 400 mg Rohprotein pro Liter Bakterienkultur) erhalten werden konnte. Abbildungen 4.4 A und B geben einen Überblick über den Expressionsverlauf beider Varianten der hADAM 15-ProMP nach Induktion mit IPTG. In Analogie zur Expression der MP zeigte sich auch in diesen beiden Fällen, daß das Zeitoptimum der Expression nach vier Stunden erreicht war. Durch die Lyse der Bakterien und anschließender Aufarbeitung der *inclusion bodies* ließ sich die mit dem N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* fusionierte Variante (ProMP~Myc-6H) bedeutend besser anreichern (Abb. 4.4 B) als die Variante (ProMP) ohne N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* (Abb. 4.4 A). Nach Solubilisierung der beiden ProMP-Varianten in ib-Aufschlußpuffer standen diese für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die Bestimmung des N-Terminus der beiden Expressionsprodukte war nicht möglich, da dieser vermutlich blockiert war. Auch durch die Spaltung mit Bromcyan wurden keine, dem Edman-Abbau zugänglichen, Proteinfragmente erhalten.



**Abb. 4.4:** **A) Nachweis der Expression der ProMP** (750 ml-Maßstab; BL21(DE3) pET-11a hADAM 15 ProMP) **und Dokumentation der anschließenden Aufarbeitung des Zellpellets** (Waschschrte 1 - 3; Kapitel 3.1.3.1). Expressionsprodukt: schwache Bande bei 42 kDa (siehe Pfeil); (kontinuierliche SDS-PAGE (10% PAA), reduzierte Proben, Coomassie-Färbung).

**B) Nachweis der Expression der mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-tag fusionierten ProMP** (750 ml-Maßstab; BL21(DE3) pET-11a hADAM 15 6H~ProMP) **und Dokumentation der anschließenden Aufarbeitung des Zellpellets** (Waschschrte 1 - 3; Kapitel 3.1.3.1). Expressionsprodukt: Bande bei 45 kDa (siehe Pfeil); (kontinuierliche SDS-PAGE (10% PAA), reduzierte Proben, Coomassie-Färbung).

### 4.3 Chromatographische Reinigung der rekombinanten hADAM 15-Domänen (MP, ProMP und ProMP~Myc-6H)

Es wurde versucht, die in *E. coli* rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente (MP, ProMP, 6H~ProMP) durch unterschiedliche chromatographische Verfahren anzureichern und zu reinigen. Hierbei zeigte sich, daß keine der angewandten Methoden, wie z.B. Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie oder Gelfiltrationschromatographie zu befriedigenden Resultaten führte. Versuche, die mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-tag fusionierte ProMP über Ni-NTA-Agarose anzureichern und dabei von unerwünschten Probenbestandteilen zu befreien und als homogenes Protein zu eluieren, scheiterten ebenfalls.

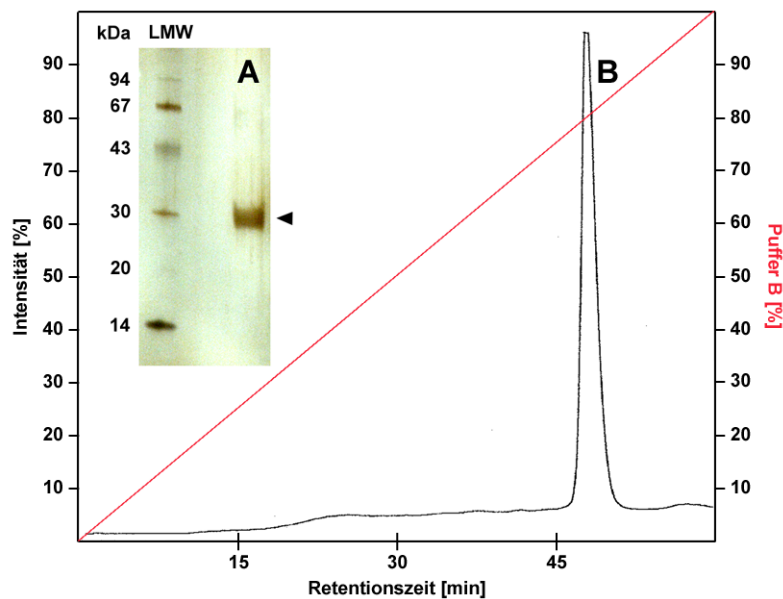
### 4.4 Charakterisierung der Expressionsprodukte aus *Escherichia coli*

Um die proteolytische Aktivität der in *E. coli* exprimierten hADAM 15-Fragmente (MP und ProMP) charakterisieren zu können wurden verschiedenen Renaturierungsstrategien für die de-

naturierten Expressionsprodukte angewandt (Kapitel 3.2.2). Zum jetzigen Zeitpunkt sind keinerlei *in vivo*- oder auch *in vitro*-Substrate für hADAM 15 beschrieben. Eine Kontrolle der Renaturierungsstrategie auf Erfolg war somit nicht möglich. Beispielsweise ließ sich bei Einsatz der „renaturierten“ hADAM 15-Fragmente keinerlei proteolytische Aktivität durch Zymographie (Gelatin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein) detektieren. Aufgrund der bestehenden Schwierigkeiten wurden die Untersuchungen mit den rekombinant in *E. coli* hergestellten hADAM 15-Domänen eingestellt und das *P. pastoris*-Expressionssystem als Alternative ausgewählt, da es korrekt gefaltete Expressionsprodukte zugänglich machen sollte (Kapitel 4.6).

#### **4.5 Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Antikörpers gegen die Metalloproteinase-Domäne von hADAM 15**

Zur Charakterisierung und Detektion der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente, die grundsätzlich die MP beinhalteten, war ein gegen die MP gerichteter polyklonaler Antikörper notwendig. Zu diesem Zweck wurden Kaninchen mit der rekombinant in *E. coli* hergestellten MP immunisiert. Die MP konnte zwar in sehr guten Ausbeuten im *E. coli* exprimiert werden, doch ihre Reinigung mit konventionellen chromatographischen Methoden erwies sich als sehr schwierig und unzureichend für diesen Zweck. Deshalb wurde das zur Immunisierung einzusetzende Antigen (MP) durch präparative SDS-Gelelektrophorese zur Homogenität gereinigt. Hierzu wurden bis zu 100  $\mu$ l ib-Aufschluß zur Elektrophorese eingesetzt, das Gel mit Zink gefärbt, das 28 kDa-MP-Fragment (Abb. 4.3 B, **b**) ausgeschnitten, eluiert, lyophilisiert, anschließend in dH<sub>2</sub>O gelöst und durch Chloroform-Methanol-Fällung von Detergenzien und anderen Pufferkomponenten befreit. Die so erhaltene Probe konnte in PBS gelöst und zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzt werden. Abbildung 4.5 A dokumentiert die Effizienz der Reinigung durch die präparative SDS-Gelelektrophorese und veranschaulicht, daß das 28 kDa-MP-Fragment zur Homogenität gereinigt werden konnte. Zusätzlich zur SDS-PAGE-Analyse wurde die Antigenprobe durch RP-HPLC analysiert. Auch hierbei wurden keinerlei Kontaminationen detektiert (Abb. 4.5 B). Durch Anwendung dieser Reinigungsstrategie konnten bis zu 3,5  $\mu$ g reines Protein pro Mikroliter ib-Aufschluß gewonnen werden. Nach der Immunisierung (Kapitel 3.2.11) der Kaninchen wurde das Antiserum der siebenten Immunisierungswoche zur Präparation der IgG-Fraktion durch Reinigung über Protein A-Sepharose eingesetzt. Im Durchschnitt konnten 8 - 9 mg IgG pro Milliliter Antiserum gewonnen werden.

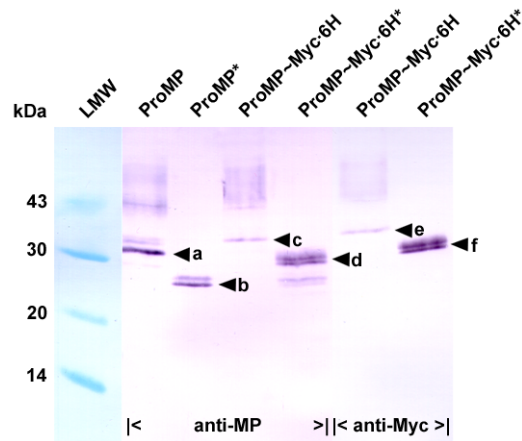


**Abb. 4.5:** **A)** Nachweis des durch präparative Gelelektrophorese gereinigten 28 kDa-MP-Fragmentes (siehe Pfeil) (kontinuierliche SDS-PAGE (10% PAA), reduzierte Probe, Silber-Färbung). **B)** Kontrolle des Reinheitsgrades des 28 kDa-MP-Fragmentes durch RP-HPLC.  
 Puffer A: 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure  
 Puffer B: 80% (v/v) Acetonitril, 0,08% (v/v) Trifluoressigsäure  
 Säule: Wide-Pore Octadecyl (C<sub>18</sub>) 5 mm (4,6 x 250 mm)

Zur Charakterisierung des anti-MP-Antikörpers wurden zwei unterschiedliche, rekombinant in *P. pastoris* hergestellte ProMPs verwendet. Die eine Form entsprach der Wildtyp-ProMP, die andere Form war mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag fusioniert (ProMP~Myc-6H) und konnte dadurch zusätzlich durch einen anti-Myc-Antikörper detektiert werden. Durch Vergleich der Spezifität der beiden Antikörper im Western-Blot konnte die Qualität des neu hergestellten anti-MP-Antikörpers verifiziert werden (Abb. 4.6).

Der anti-MP-Antikörper detektierte bezüglich der Expression der ProMP in *P. pastoris* ein Fragment von **32 kDa** (Abb. 4.6, a). Das aus der Primärstruktur der ProMP ermittelte Molekulargewicht entsprach 43 kDa. Unter der Annahme, daß die im Golgi-Apparat von *P. pastoris* existierende furinartige KEX2-Proteinase die Furin-Spaltstelle innerhalb der ProMP erkennt und prozessiert, würde man ein **23 kDa**-Fragment für die MP erwarten. Berücksichtigt man zusätzlich die drei in der MP existierenden N-Glykosylierungsstellen (Abb. 4.2) und geht von einer Glykosylierungseffizienz von 8 - 14 Mannose-Resten pro N-Glykosylierungsstelle in *P. pastoris* aus (Invitrogen, 2000b), würde sich das theoretisch errechnete Molekulargewicht der

MP um ungefähr 7 kDa, von 23 kDa auf **30 kDa** erhöhen. Dieser Wert stimmte relativ gut mit dem gefundenen Wert von **32 kDa** (s.o.) überein.



**Abb. 4.6: Charakterisierung des anti-MP-Antikörpers durch Vergleich mit dem anti-Myc-Antikörper** (Western-Blot-Analyse, diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben).  
 Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml) bzw. anti-Myc (0,2 µg/ml)  
 Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml) bzw. anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml)  
 Die mit PNGase F behandelten Proben (Kapitel 3.2.4.6) sind mit einem \* gekennzeichnet.  
**a** (32 kDa) MP und **c, e** (35 kDa) MP~Myc•6H nach intrazellulärer Prozessierung  
**b** (27 kDa) MP und **d, f** (29 kDa) MP~Myc•6H nach intrazellulärer Prozessierung und PNGase F-  
 handlung

Wurde diese ProMP-Probe zuvor mit PNGase F (Peptid-N-(N-acetyl-β-glucosaminyl)-asparaginamidase) inkubiert (Entfernung aller N-glykosidisch gebundenen Mannose-Reste), konnte tatsächlich eine Verringerung des Molekulargewichtes um 5 - 6 kDa beobachtet werden (Abb. 4.6, **b**). Wurde der anti-MP-Antikörper zur Detektion der ProMP~Myc-6H eingesetzt konnten analoge Beobachtungen gemacht werden. Auch hier betrug der Größenunterschied zwischen glykosylierter und deglykosylierter Form ungefähr 5 - 6 kDa (Abb. 4.6, **c** und **d**), wobei die Fragmente aufgrund des C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag um ungefähr 3 kDa größer erscheinen. Wenn die Detektion der letztgenannten Proben (Abb. 4.6, **c** und **d**) nicht mit dem anti-MP-Antikörper sondern mit dem anti-Myc-Antikörper (detektiert das c-Myc-Epitop des tag) erfolgte (Abb. 4.6, **e** und **f**), zeigte sich in allen vier Fällen (Abb. 4.6, **c** bis **f**) das gleiche Bandenmuster, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß der neu hergestellte anti-MP-Antikörper die MP im Western-Blot detektiert.

#### 4.6 *Pichia pastoris* als heterologes Expressionssystem für rekombinante hADAM 15-Fragmente: Konzept und Analyse

Die Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der MP von hADAM 15 erforderte die rekombinante Darstellung dieser Domäne in einem Expressionssystem, welches die Expressionsprodukte im nativen Zustand, also mit korrekter Konformation und Disulfidbrückenmuster zugänglich machen würde. Aus diesem Grund wurde der eukaryontische Wirtsorganismus *P. pastoris* ausgewählt. Da Informationen über die Beeinflussung der proteolytischen Aktivität der MP durch die anderen Domänen, wie z.B. die Disintegrin- oder Cystein-reiche Domäne des hADAM 15 fehlten, wurden Expressionssysteme etabliert, die verschieden große Fragmente der Ecto-Domäne zugänglich machten. Die Amplifikation der cDNAs dieser Fragmente gelang mit spezifischen Primern, die auch die Klonierung in Expressionsvektoren über die Einführung kompatibler Restriktionsstellen ermöglichten (Tab. 4.2).

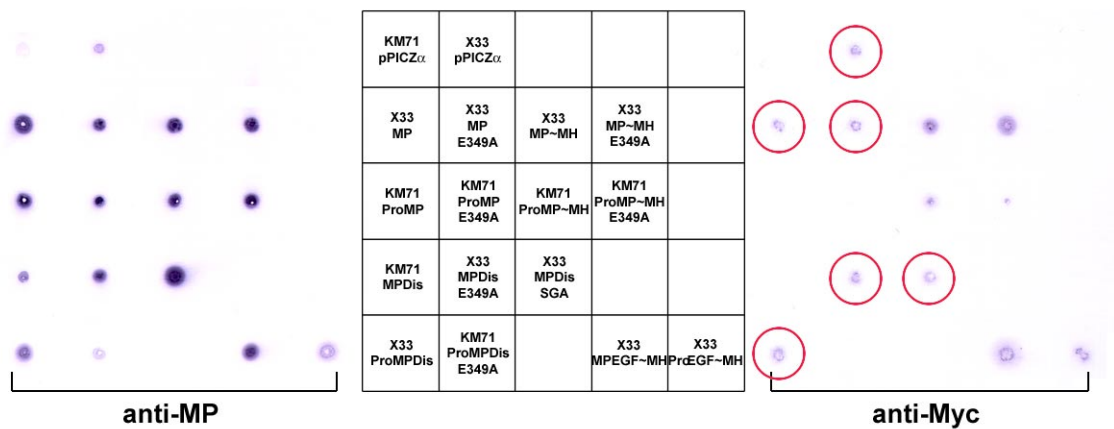
hADAM 15 cDNA-Fragmente (Größe des Amplifikates)	Primerpaar	Modifikationen
MP (674 bp)	MP-Xho-F/MP-Not-R MP-Xho-F/MPMH-Xba-R	Wildtyp C-terminaler c-Myc-Epi- top-Hexa-Histidin-tag
ProMP (1208 bp)	Pro-Xho-F/MP-Not-R Pro-Xho-F/MPMH-Xba-R	Wildtyp C-terminaler c-Myc-Epi- top-Hexa-Histidin-tag
MPDis (947 bp)	MP-Xho-F/Dis-Not-R	Wildtyp
ProMPDis (1481 bp)	Pro-Xho-F/Dis-Not-R	Wildtyp
MPEGF (1481 bp)	MP-Xho-F/EGFMH-Xba-R	C-terminaler c-Myc-Epi- top-Hexa-Histidin-tag
ProEGF (2015 bp)	Pro-Xho-F/EGFMH-Xba-R	C-terminaler c-Myc-Epi- top-Hexa-Histidin-tag

**Tab. 4.2:** Zusammenstellung der für die Klonierung in *P. pastoris*-Expressionsvektoren verwendeten Primerpaare. Die Klonierung über die *Xho I*-Restriktionsstelle bewirkte sowohl bei der Ligation in den pPIC9- als auch in den pPICZ $\alpha$  A-Vektor, daß das Expressionsprodukt N-terminal mit dem  $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignal fusioniert wurde. Wurde die *Xba I*-Restriktionsstelle für die Ligation in den pPICZ $\alpha$  A-Vektor verwendet, so wurde das Expressionsprodukt zusätzlich mit einem C-terminalen c-Myc-Epi-top-Hexa-Histidin-tag fusioniert.

Sämtliche Klonierungsprodukte wurden sequenziert um PCR-bedingte Mutationen, Deletionen und Insertionen auszuschließen. Zur heterologen Expression der hADAM 15-Fragmente in *P. pastoris* wurden entweder elektrokompetente oder chemisch kompetente *P. pastoris*-Zellen der Stämme KM71 und X33 mit den hergestellten Plasmiden transformiert.

Die Analyse der transformierten Hefezellen erfolgte grundsätzlich mit drei unterschiedlichen Methoden (A - C), deren Prinzipien hier kurz erläutert werden sollen.

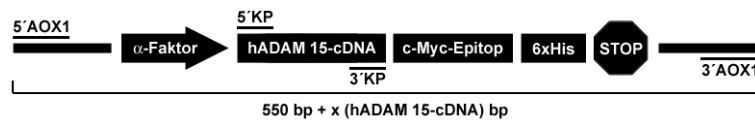
A) Die transformierten Hefezellen wurden durch Anfertigung von Kolonie-Blots (Kapitel 3.1.3.3) analysiert, die eine Vorauswahl der Hefeklone zuließen, die die gewünschte hADAM 15-Domäne exprimierten. Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte durch Verwendung des anti-MP-Antikörpers. Alternativ wurde im Fall von mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-*tag* fusionierten Expressionsprodukten der anti-Myc-Antikörper zur Detektion eingesetzt. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden stets Leervektor-transformierte Hefezellen (Leervektorkontrolle) in die Analyse mit einbezogen, um die durch die konstitutiv exprimierten Hefeproteine hervorgerufene Farbreaktion zu berücksichtigen. Grundsätzlich war bei dieser Analysemethode zu beachten, daß eine Farbreaktion nicht zwingend bedeutete, daß das Expressionsprodukt in das umgebende Medium sekretiert worden war. Eine Farbreaktion konnte auch dadurch zustande kommen, daß der Zellinhalt abgestorbener Hefezellen, und mit diesem auch die nicht sekretierten rekombinanten hADAM 15-Fragmente mit der PVDF-Membran in Kontakt gerieten. Trotz dieser Einschränkung erwies sich die Kolonie-Blot-Analyse als eine sehr effektive Methode zur Identifizierung der Hefeklone, die die rekombinanten hADAM 15-Fragmente exprimierten. Abbildung 4.7 zeigt eine Zusammenstellung dieser *P. pastoris*-Klone. Die Analyse unter Verwendung des anti-MP-Antikörpers erbrachte für alle *P. pastoris*-Klone, die hADAM 15-Fragmente heterolog exprimieren sollten, positive Signale, deren Intensität intensiver als die der Leervektorkontrollen war. Der anti-Myc-Antikörper hingegen zeigte eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit den konstitutiven Expressionsprodukten des Hefestammes X33 (rot umrandete Klone), so daß auch diejenigen Hefeklone als positiv erschienen, deren Expressionsprodukte nicht mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-*tag* fusioniert waren.



**Abb. 4.7: Kolonie-Blot-Analyse zum Nachweis der in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15-Fragmente.**  
 Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml) bzw. anti-Myc (0,2 µg/ml)  
 Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml) bzw. anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml)  
 Abkürzungen: [SGA] R484S Aminosäureaustausch und D486A Aminosäureaustausch; [~MH] C-terminaler c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag. Die rot umrandeten Klone sind falschpositive Signale (siehe Text).

**B)** Parallel erfolgte die Charakterisierung der Hefeklone durch Analyse ihrer genomischen DNA mittels PCR. Mit dieser Methode sollte sicher gestellt werden, daß die zur Transformation eingesetzte hADAM 15-cDNA vollständig in das Hefegenom integriert worden war. Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination von Teilbereichen der Vektor-DNA mit entsprechenden DNA-Sequenzen im Hefegenom. Diese zum Hefegenom homologen DNA-Sequenzen (5'AOX1-Promoterregion und AOX1-Transkriptionsterminationsregion) waren Bestandteile der Vektor-DNA (Abb. 3.3) und flankierten die Expressionskassette am 5'- und 3'-Ende, in deren Mitte sich die in den Vektor ligierte hADAM 15-cDNA befand. Dadurch konnten die betreffenden hADAM 15-cDNAs durch homologe Rekombination der Vektor-DNA zusätzlich in das Hefegenom integriert werden.

Die PCR-Analysen wurden durch Verwendung der Klonierungsprimer (5'KP und 3'KP: spezifische Amplifikation der hADAM 15-cDNA) und der AOX-Primer (5'AOX1 und 3'AOX1: spezifische Amplifikation der gesamten Expressionskassette) durchgeführt (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** Schematische Darstellung der PCR-Analyse zum Nachweis der in das Hefegenom integrierten Expressionskassette. Die spezifische Amplifikation der gesamten Expressionskassette gelingt durch Verwendung der AOX-Primer (5´AOX1 und 3´AOX1) und die der hADAM 15-cDNA durch Verwendung der Klonierungsprimer (5´KP und 3´KP).

Ein Zusammenstellung der Amplifikatgrößen bei Verwendung der Klonierungsprimer (siehe auch Tab. 4.2) und der AOX-Primer ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

hADAM 15-Fragmente	Größe des Amplifikates bei Verwendung der Klonierungsprimer (Tab. 4.2)	Größe des Amplifikates bei Verwendung der AOX-Primer
MP	674 bp	1224 bp
ProMP	1208 bp	1758 bp
MPDis	947 bp	1497 bp
ProMPDis	1481 bp	2031 bp
MPEGF	1481 bp	2031 bp
ProEGF	2015 bp	2565 bp





**Tab. 4.3:** Zusammenstellung der Größen der Amplifikationsprodukte bei Verwendung der Klonierungs- und AOX-Primer zur Analyse der transformierten Hefezellen.



Bei Verwendung der AOX-Primer entstanden um 550 bp größere Amplifikate als bei Verwendung der Klonierungsprimer, da sie den Bereich des gesamten Expressionskassette (550 bp) mit einschlossen. Durch Verwendung der AOX-Primer konnte somit die Integration der gesamten Expressionskassette in das Hefegenom zusätzlich nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Bei Analyse der genomischen DNA der Hefeklone des Stammes X33 (Phänotyp Mut<sup>+</sup>) durch die AOX-Primer wurde ein weiteres Amplifikat der Größe 2200 bp erhalten. Dieses entsprach dem nativen AOX1-Gen im Hefegenom.

C) Die mit den hADAM 15-cDNAs transformierten Hefezellen wurden zusätzlich durch Expressionen in Suspensionskultur (20 ml-Maßstab) analysiert. Die anschließende Analyse der Kulturüberstände oder Zelllysate erfolgte durch Western-Blotting unter Verwendung spezifi-

scher Antikörpern (anti-MP bzw. anti-Myc). Hierdurch sollte getestet werden ob die transformierten Hefezellen die betreffenden hADAM 15-Fragmente nach Induktion mit Methanol in das Medium sezernierten. Die Kulturüberstände wurden direkt oder nach Deglykosylierung mit PNGase F analysiert. Falls keine Expressionsprodukte im Kulturüberstand nachzuweisen waren, wurden die betreffenden Hefezellen lysiert und das Zellysate analysiert.

Die bezüglich der heterologen Expression als positiv kategorisierten *P. pastoris*-Klone wurden zur Expression im 750 ml-Maßstab (Fernbachkolben) oder 1500 ml-Maßstab (Fermenter) eingesetzt, um größere Mengen an rekombinanten Proteinen zur weiteren Charakterisierung zu erhalten. Der pPIC9-Vektor erwies sich als ungeeignet Hefezellen mit hADAM 15-cDNAs zu transformieren, da in keinem Fall eine Expression der rekombinanten Proteine beobachtet werden konnte. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über sämtliche Konstrukte, Modifikationen und die jeweiligen Hefestämme.

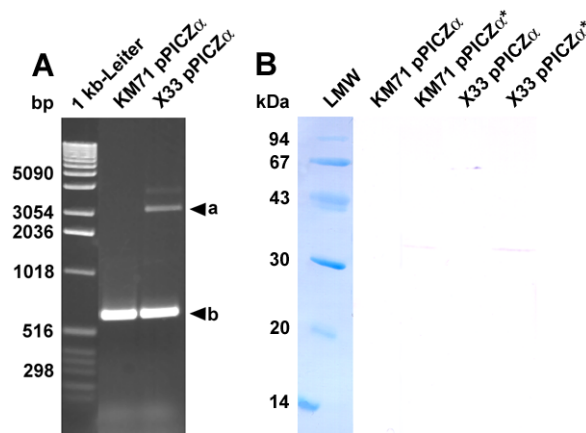
hADAM 15-Domänen	KM71 pPICZ $\alpha$ A	X33 pPICZ $\alpha$ A
	[WT] [M1] [~Myc-6H] [M1~Myc-6H]	[WT] [M1] [~Myc-6H] [M1~Myc-6H]
	[WT] [M1] [~Myc-6H] [M1~Myc-6H]	[WT] [M1] [~Myc-6H] [M1~Myc-6H]
	[WT] [M1] [M2]	[WT] [M1] [M2]
	[WT] [M1]	[WT] [M1]

hADAM 15-Domänen	KM71 pPICZ $\alpha$ A	X33 pPICZ $\alpha$ A
	[~Myc-6H]	[~Myc-6H]
	[~Myc-6H]	[~Myc-6H]

**Tab. 4.4:** Zusammenstellung der klonierten und in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15-Fragmente. Die relativen Expressionsraten in Suspensionskultur werden wie folgt kategorisiert: **starke Expression**, **mittlere Expression**, **schwache bis keine Expression**. Die im Kolonie-Blot (Abb. 4.7) analysierten Klone sind im Fettdruck dargestellt. Abkürzungen: [WT] Wildtyp; [M1] E349A Aminosäureaustausch; [M2] R484S Aminosäureaustausch und D486A Aminosäureaustausch, im folgenden auch als SGA bezeichnet; [~Myc-6H] C-terminaler c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag.

#### 4.6.1 Kontrolltransformationen von *Pichia pastoris*

Die rekombinanten Expressionsprodukte der mit den hADAM 15-cDNA-Konstrukten transformierten Hefezellen sollten durch Kolonie- und Western-Blotting analysiert werden. Hierzu war eine geringe Kreuzreaktivität des anti-MP-Antikörpers mit konstitutiv sekretierten Hefeproteinen erforderlich. Zur Kontrolle der Antikörperspezifität sind *P. pastoris*-Klone etabliert worden, die mit „leerem“ pPICZ $\alpha$  A-Vektor (Leervektorkontrolle) transformiert wurden. Die Integration der folglich „leeren“ Expressionskassette in das Hefegenom wurde durch PCR-Analyse verifiziert (Abb. 4.9 A). Ergänzend wurden Kulturüberstände dieser Klone nach viertägiger Kultivierung unter Expressionsbedingungen analysiert. Es zeigte sich hierbei keinerlei Reaktivität des anti-MP-Antikörpers mit den im Kulturüberstand befindlichen Proteinen, so daß der anti-MP-Antikörper für die Analyse der aus *P. pastoris* gewonnen rekombinanten Expressionsprodukte geeignet war (Abb. 4.9 B).



**Abb. 4.9:** A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels AOX-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration des „leerem“ pPICZ $\alpha$  A-Vektor (Leervektorkontrolle).

a (2200 bp) natives AOX1-Gen (Mut<sup>+</sup>-Phänotyp)

b (550 bp) „leere“ Expressionskassette

B) Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) der Kulturüberstände von *P. pastoris* (Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C). Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml)

Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml)

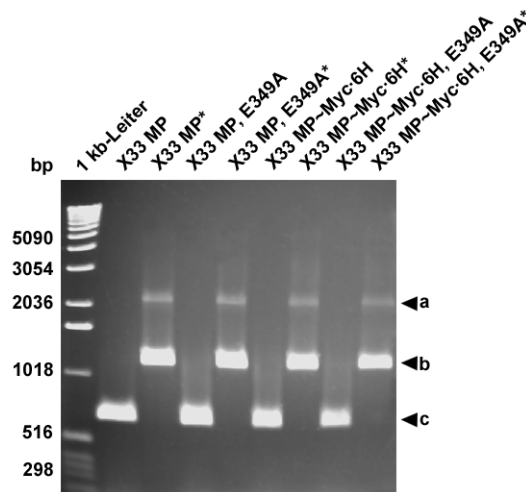
Die mit PNGase F behandelten Proben (Kapitel 3.2.4.6) sind mit einem \* gekennzeichnet.

#### 4.7 Die heterologe Expression diverser rekombinanter hADAM 15-Fragmente in *Pichia pastoris*

Insgesamt wurden sechs verschiedene cDNA-Fragmente, die jeweils für unterschiedliche Bereiche der Ecto-Domäne von hADAM 15 kodieren, zur Transformation der beiden *P. pastoris*-Stämme KM71 und X33 eingesetzt (Tab. 4.4). Durch die heterologe Expression dieser cDNAs in *P. pastoris* sollten neben den Wildtypformen der meisten Fragmente auch Aminosäure-Mutanten und/oder durch einen C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag erweiterte Fusionsproteine zugänglich werden. Eine der Mutanten [M1] bestand in einem Austausch des Glutamat(349)-Restes durch einen Alanin-Rest im Zinkbindungsmotiv der MP. Sie sollte als Kontrollmutante zur Verifikation der potentiellen proteolytischen Aktivität des Proteins verwendet werden. Die zweite Mutante [M2] bestand in einem Austausch des RGD-Motivs innerhalb der Disintegrin-Domäne. Hier wurde der Arginin(484)-Rest gegen ein Serin-Rest und der Aspartat(486)-Rest gegen einen Alanin-Rest ausgetauscht. Diese Mutante sollte zur Verifikation der integrin antagonistischen Funktion des RGD-Motives dienen.

#### 4.7.1 Expression der Metalloproteinase-Domäne in *Pichia pastoris*

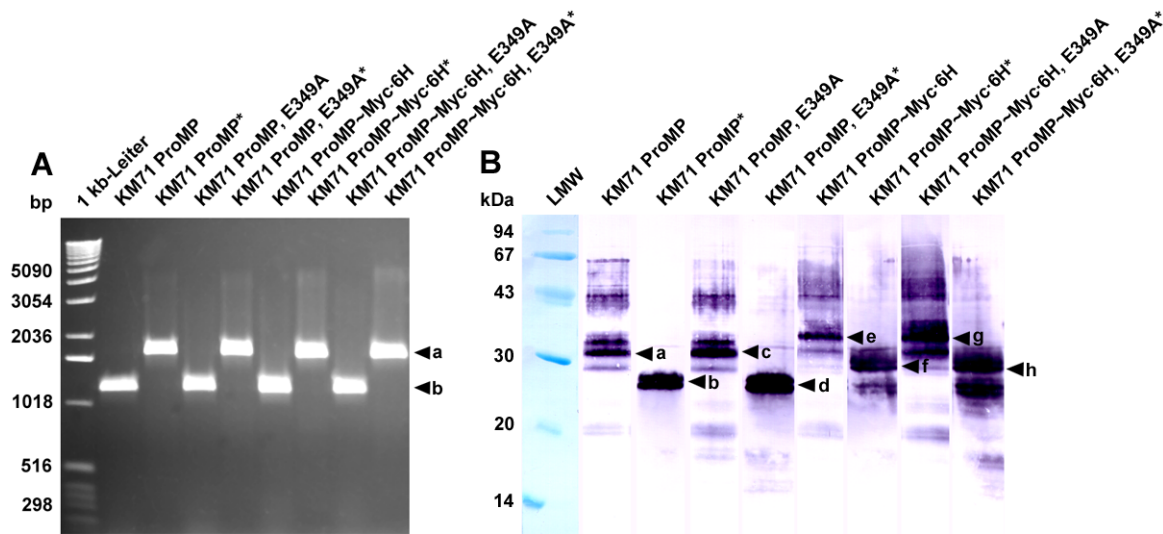
Beide Hefestämme, KM71 und X33 wurden mit den MP-cDNA-Konstrukten (Tab. 4.4) transformiert. Durch Kolonie-Blot-Analyse konnte die heterologe Expression aller vier Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 4.7) und darüber hinaus belegt Abbildung 4.10 die Integration der vier cDNA-Fragmente in das Genom des Hefestammes X33. Ein Nachweis der Expressionsprodukte gelang jedoch weder im Kulturüberstand einer Suspensionskultur noch im Lysat der Hefezellen.



**Abb. 4.10: PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern** (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) **zum Nachweis der Integration von MP-cDNA-Konstrukten** (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 MP; MP, E349A; MP~Myc-6H; MP~Myc-6H, E349A).  
**a** (2200 bp) natives AOX-Gen (Mut<sup>+</sup>-Phänotyp)  
**b** (1224 bp) Expressionskassette + hADAM 15-MP-cDNAs  
**c** (674 bp) hADAM 15-MP-cDNAs

#### 4.7.2 Expression der Pro- und Metalloproteinase-Domäne in *Pichia pastoris*

Die Transformation der beiden Hefestämme KM71 und X33 gelang mit allen klonierten ProMP-cDNA-Konstrukten (Tab. 4.4). Die in das Hefegenom integrierten cDNAs konnte durch analytische PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.11 A). Sowohl in der Kolonie-Blot- (Abb. 4.7) als auch in der Western-Blot-Analyse (Abb. 4.11 B) erwiesen sich die transformierten Hefezellen des Stammes KM71 als besonders gut geeignet zur heterologen Expression der diversen ProMP-Formen.



**Abb. 4.11:** A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration von ProMP-cDNA-Konstrukten (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 ProMP; ProMP, E349A; ProMP~Myc-6H; ProMP~Myc-6H, E349A).

a (1758 bp) Expressionskassette + hADAM 15-ProMP-cDNAs

b (1208 bp) hADAM 15-ProMP-cDNAs

**B) Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten durch Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) der Kulturüberstände.**

Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C

Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml)

Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml)

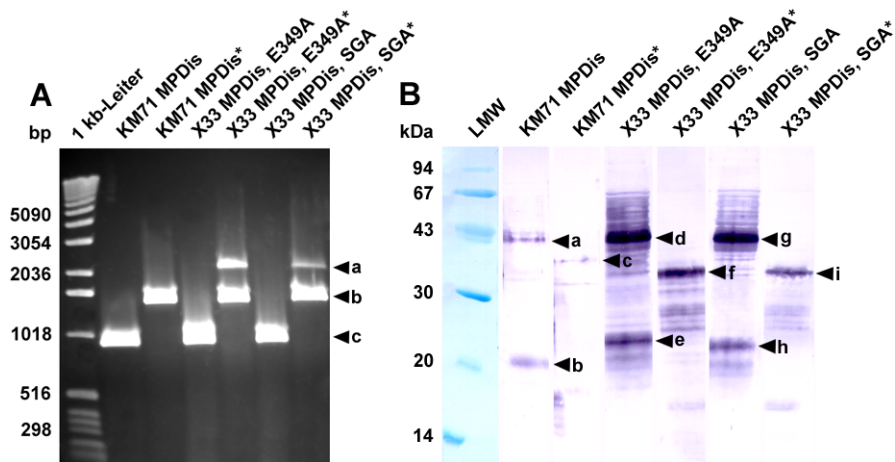
Die mit PNGase F behandelten Proben (Kapitel 3.2.4.6) sind mit einem \* gekennzeichnet.

a, c (32 kDa) MP und e, g (35 kDa) MP~Myc-6H nach intrazellulärer Prozessierung

b, d (27 kDa) MP und f, h (29 kDa) MP~Myc-6H nach intrazellulärer Prozessierung und PNGase F-Behandlung

### 4.7.3 Expression der Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne in *Pichia pastoris*

Für die Expression der MPDis in *P. pastoris* wurden ebenfalls verschiedene cDNA-Konstrukte (Tab. 4.4) kloniert und zur Transformation der Hefestämme KM71 und X33 eingesetzt. Abbildung 4.12 A belegt die Integration der kodierenden DNA-Fragmente in das Genom der betreffenden Hefestämme. Die heterologe Expression der rekombinanten MPDis konnte sowohl in der Kolonie-Blot- (Abb. 4.7) als auch in der Western-Blot-Analyse (Abb. 4.12 B) der Kulturüberstände belegt werden.



**Abb. 4.12:** A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration von MPDis-cDNA-Konstrukten (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 MPDis; MPDis, E349A; MPDis, SGA).

a (2200 bp) natives AOX-Gen (Mut<sup>+</sup>-Phänotyp)

b (1497 bp) Expressionskassette + hADAM 15-MPDis-cDNAs

c (947 bp) hADAM 15-MPDis-cDNAs

**B) Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten durch Western-Blot-Analyse** (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) der Kulturüberstände.

Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C

Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml)

Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml)

Die mit PNGase F behandelten Proben (Kapitel 3.2.4.6) sind mit einem \* gekennzeichnet.

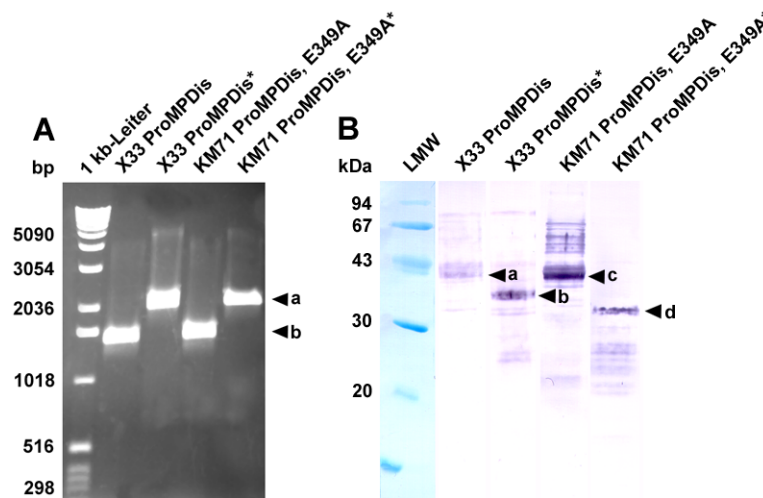
a, d, g (43 kDa) MPDis nach intrazellulärer Prozessierung

c (38 kDa) und f, i (36 kDa) MPDis nach intrazellulärer Prozessierung und PNGase F-Behandlung

b (22 kDa) und e, h (24 kDa) MP-Fragment

#### 4.7.4 Expression der Pro-, Metalloproteinase- und Disintegrin-Domäne in *Pichia pastoris*

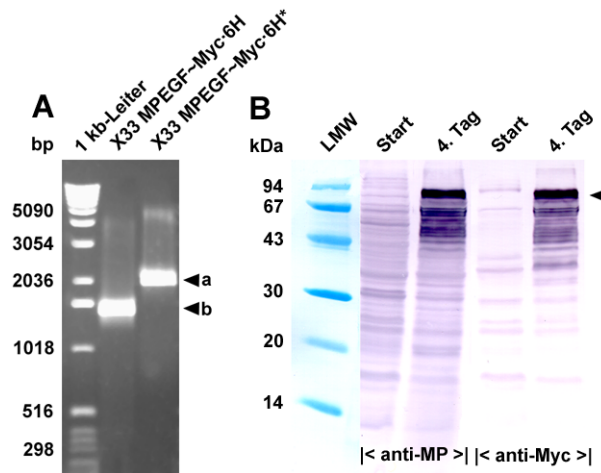
Die heterologe Expression der ProMPDis wurde in den Hefestämmen KM71 und X33 durchgeführt, wobei die Transformation und Expression durch analytische PCR (Abb. 4.13 A), Kolonie-Blot- (Abb. 4.7) und Western-Blot-Analyse (Abb. 4.13 B) nachgewiesen wurde.



**Abb. 4.13:** **A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration von ProMPDis-cDNA-Konstrukten (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 ProMPDis; ProMPDis, E349A).**  
**a** (2031 bp) **Expressionskassette + hADAM 15-ProMPDis-cDNAs**  
**b** (1481 bp) **hADAM 15-ProMPDis-cDNAs**  
**B) Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten durch Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) der Kulturüberstände.**  
 Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C  
 Primärantikörper: anti-MP (1  $\mu$ g/ml)  
 Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2  $\mu$ g/ml)  
 Die mit PNGase F behandelten Proben (Kapitel 3.2.4.6) sind mit einem \* gekennzeichnet.  
**a, c** (43 kDa) **MPDis** nach intrazellulärer Prozessierung  
**b** (38 kDa) und **c** (36 kDa) **MPDis** nach intrazellulärer Prozessierung und PNGase F-Behandlung

#### 4.7.5 Expression der um die Pro-Domäne verkürzten Ecto-Domäne in *Pichia pastoris*

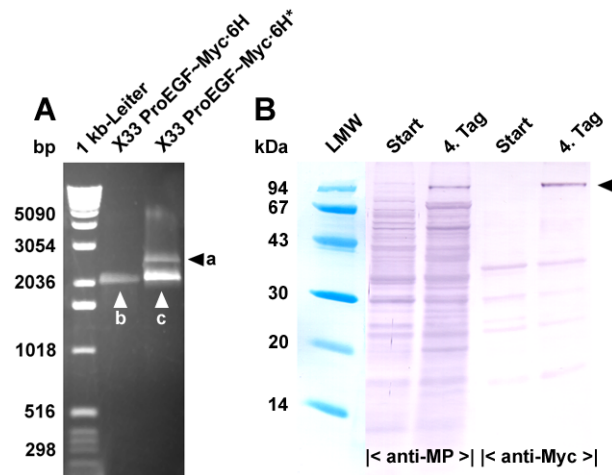
Die heterologe Expression der um die Pro-Domäne verkürzten Ecto-Domäne (MPEGF) wurde mit einem C-terminalen fusionierten c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-*tag* durchgeführt, wobei keine Sekretion des rekombinanten Proteins in das Kulturmedium erfolgte. Im Zellysate des betreffenden Hefeklones konnte sowohl unter Verwendung des anti-MP- als auch des anti-Myc-Antikörpers ein Fragment detektiert werden, daß aufgrund seiner Größe von **fast 90 kDa** einer unprozessierten Form des Expressionsproduktes - inklusive  $\alpha$ -Faktor - entsprach. Theoretisch würde das Molekulargewicht eines derartigen Expressionsproduktes **85 kDa** betragen: 52 kDa (MPEGF) + 12,5 kDa (fünf N-Glykosylierungsstellen innerhalb der MPEGF) + 3 kDa (C-terminaler c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-*tag*) + 10 kDa ( $\alpha$ -Faktor) + 7,5 kDa (drei N-Glykosylierungsstellen innerhalb des  $\alpha$ -Faktors).



**Abb. 4.14:** A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration des MPEGF-cDNA-Konstruktes (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 MPEGF~Myc-6H).  
**a** (2031 bp) Expressionskassette + hADAM 15-MPEGF-cDNAs  
**b** (1481 bp) hADAM 15-MPEGF-cDNAs  
**B**) Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten durch Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) des Zelllysates.  
 Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C  
 Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml) bzw. anti-Myc (0,2 µg/ml)  
 Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml) bzw. anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml)  
**Unprozessierte MPEGF~Myc•6H** (inklusive  $\alpha$ -Faktor: 90 kDa, siehe Pfeil)

#### 4.7.6 Expression der Ecto-Domäne in *Pichia pastoris*

Die Versuche die Ecto-Domäne (ProEGF) in *P. pastoris* zu exprimieren schienen an ähnlichen Problemen zu scheitern, wie sie auch schon bei der Expression der um die Pro-Domäne verkürzten Ecto-Domäne auftraten. Die Transformation der Hefezellen war zwar erfolgreich (Abb. 4.15 A) aber das Expressionsprodukt konnte nur intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 4.15 B). Das im Western-Blot detektierte Fragment wies ein Molekulargewicht von annähernd **100 kDa** auf. Dieser Wert deutet ebenfalls auf die unprozessierte Form des Expressionsproduktes inklusive  $\alpha$ -Faktor hin (theoretisch: 85 kDa (s.o.) + 20 kDa (Pro-Domäne) = **105 kDa**).

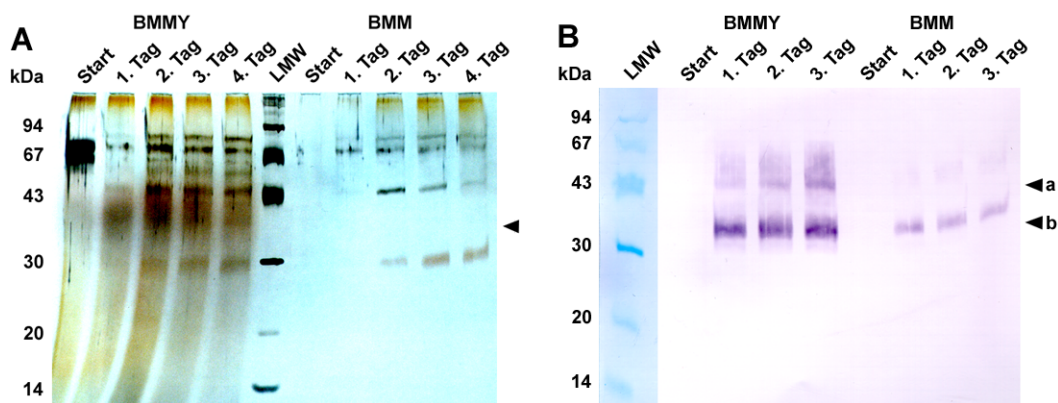


**Abb. 4.15:** A) PCR-Analyse der genomischen *P. pastoris*-DNA mittels Klonierung- und AOX\*-Primern (Agarose-Gel (1%), Ethidiumbromid-Färbung) zum Nachweis der Integration des ProEGF-cDNA-Konstruktes (pPICZ $\alpha$  hADAM 15 ProEGF~Myc-6H).  
**a** (2565 b) Expressionskassette + hADAM 15-ProEGF-cDNAs  
**b** (2015 bp) hADAM 15-ProEGF-cDNAs  
**c** (2200 bp) natives AOX1-Gen (Mut<sup>+</sup>-Phänotyp)  
 B) Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten durch Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) des Zelllysates.  
 Kultivierung: 20 ml-Maßstab, 4 Tage, Schüttelkolben, 28°C  
 Primärantikörper: anti-MP (1 µg/ml) bzw. anti-Myc (0,2 µg/ml)  
 Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml) bzw. anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml)  
 Unprozessierte ProEGF~Myc•6H (inklusive  $\alpha$ -Faktor: 100 kDa, siehe Pfeil)

#### 4.8 Optimierung der heterologen Expression in *Pichia pastoris*

Nachdem die heterologe Expression einer ganzen Reihe von hADAM 15-Fragmenten zuzüglich diverser Aminosäure-Mutanten (Tab. 4.4) in der Hefe *P. pastoris* etabliert worden war, bestand die nächste Aufgabe in der Optimierung der Expressionsbedingungen für die Großexpression bzw. Fermentation. Hierzu wurden unterschiedliche **Nährmedien** (Komplettmedium BMMY, Minimalmedium BMM, ungepuffertes Minimalmedium MM), **Methanolkonzentrationen** (Induktion der Expression) und **unterschiedliche Zelldichten** vor Induktion der heterologen Expression getestet. Bei diesen Untersuchungen erwies sich das **Komplettmedium BMMY** (enthält Hefeextrakt und Pepton) und eine **Methanolkonzentration zwischen 0,5 - 1% (v/v)** als optimal. Zelldichten von **5·10<sup>8</sup> Zellen/ml (OD<sub>600</sub> = 10)** für den Hefestamm **KM71** und **2,5·10<sup>8</sup> Zellen/ml (OD<sub>600</sub> = 5)** für den Hefestamm **X33** vor Induktion erwiesen sich als besonders geeignet. Trotz dieser Optimierungen waren die Rohausbeuten an rekombinanten hADAM 15-Fragmenten gering. Beispielsweise waren die Expressionsprodukte bei der Expres-

sion der ProMP~Myc-6H in einem durch Silbernitrat gefärbten Polyacrylamidgel nicht oder nur sehr schwach als Proteinbande zu erkennen (Abb. 4.16 A). Setzt man bei der Anfärbung von Proteinen durch Silbernitrat eine untere Nachweisgrenze von 5 Nanogramm pro Proteinbande voraus und ermittelt aufgrund der zur Gelelektrophorese eingesetzten Probenmenge die Menge an rekombinanten Protein pro Liter Kulturüberstand, wurden Rohausbeuten von **unter 50 µg Rohprotein pro Liter Kulturüberstand** erhalten. Aufgrund dieser geringen Rohausbeute wirkten sich einerseits die konstitutiv in das Medium sekretierten *P. pastoris*-Proteine und andererseits die Medienbestandteile Hefeextrakt und Pepton im Kompletmedium als störend bei den nachfolgenden chromatographischen Reinigungen aus. Abbildung 4.16 A zeigt bei der heterologen Expression der ProMP~Myc-6H einerseits die Zunahme der konstitutiv sekretierten *P. pastoris*-Proteine (sowohl im Kompletmedium BMMY als auch im Minimalmedium BMM) und andererseits die Kontamination des Kulturüberstandes durch Medienbestandteile im Kompletmedium BMMY. Abbildung 4.16 B dokumentiert die heterologe Expression der ProMP~Myc-6H durch Nachweis der intrazellulär prozessierten und anschließend sekretierten MP~Myc-6H (35 kDa) unter Verwendung des anti-Myc-Antikörpers im Western-Blot.



**Abb. 4.16: Nachweis der heterologen Expression der mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag fusionierten ProMP (X33 pPICZα hADAM 15 ProMP~Myc-6H) in *P. pastoris* über einen Zeitraum von 3 bzw. 4 Tagen in zwei verschiedenen Nährmedien (Kompletmedium BMMY und Minimalmedium BMM) bei 28°C.**

**A)** Kontinuierliche SDS-PAGE (12% PAA), reduzierte Proben, Silber-Färbung.

Das Expressionsprodukt (MP~Myc-6H, 35 kDa) ist durch Silber-Färbung nicht zu detektieren (siehe Pfeil).

**B)** Western-Blot-Analyse, kontinuierliche SDS-PAGE (12% PAA), reduzierte Proben

Primärantikörper: anti-Myc (0,2 µg/ml)

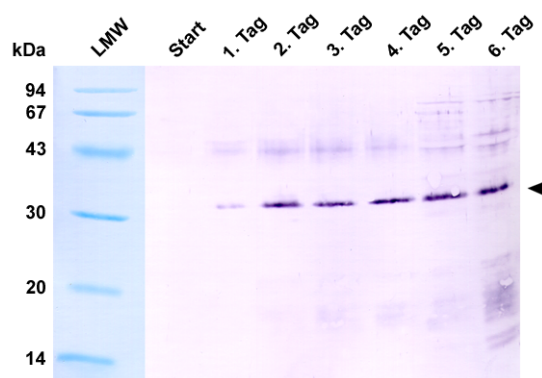
Sekundärantikörper: anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml).

**a** (43 kDa) ProMP~Myc-6H nach unvollständiger intrazellulärer Prozessierung

**b** (35 kDa) MP~Myc-6H nach intrazellulärer Prozessierung

Es wird deutlich, daß die Expression des gewünschten Fragmentes im Kompletmedium wesentlich effektiver ist mit dem Nachteil der stärkeren Kontamination des zu erntenden Kulturüberstandes durch peptid- bzw. proteinartige Medienbestandteile.

Neben der heterologen Expression im Fernbachkolben (750 ml-Maßstab) wurde auch die heterologe Expression im Fermenter (1500 ml-Maßstab) etabliert. Diese sollte aufgrund der besseren Versorgung der Hefezellen mit Sauerstoff höhere Expressionsraten ermöglichen. Abbildung 4.17 zeigt die Expression der ProMP über einen Zeitraum von sechs Tagen im Fermenter. Es ist zu erkennen das die Konzentration des rekombinanten Expressionsproduktes nicht signifikant zunahm und der Expressionsverlauf aufgrund der geringen Ausbeute im Western-Blot analysiert werden mußte. Ergo konnte durch die heterologe Expression im Fermenter keine Steigerung der Expressionsraten erzielt werden.



**Abb. 4.17: Nachweis der heterologen Expression der ProMP (KM71 pPICZ $\alpha$  hADAM 15 ProMP) in *P. pastoris* über einen Zeitraum von 6 Tagen bei 28°C im Fermenter durch Western-Blot-Analyse (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) des Kulturüberstandes.**

Primärantikörper: anti-MP (1  $\mu$ g/ml)

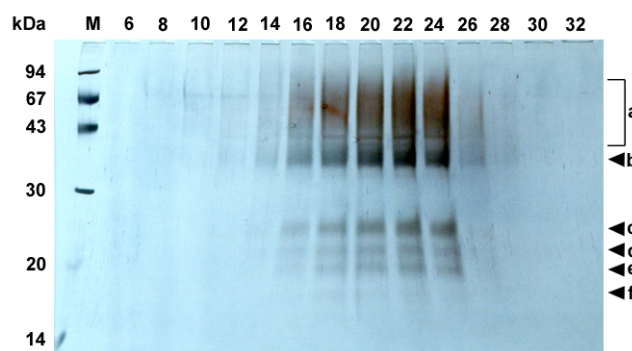
Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2  $\mu$ g/ml)

MP (32 kDa) nach intrazellulärer Prozessierung (siehe Pfeil)

Neben den oben genannten Beispielen (ProMP und ProMP~Myc-6H) wurde ebenfalls versucht die Expressionsraten anderer hADAM 15-Fragmente, wie z.B. der entsprechenden E349A-Mutanten der ProMP und ProMP~Myc-6H, der MPDis oder auch der ProMPDis zu steigern. Bei keinem der Fragmente gelang die Steigerung der Rohausbeuten, weder im Fernbachkolben noch im Fermenter.

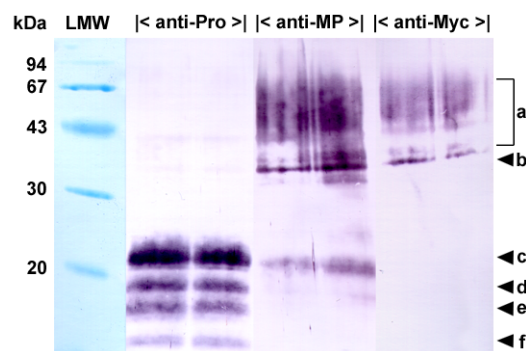
#### 4.9 Chromatographische Reinigung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente aus *Pichia pastoris*

Bei der chromatographischen Reinigung der in *P. pastoris* rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente erwies sich das ungünstige Mengenverhältnis zwischen gewünschten Expressionsprodukten und unerwünschten Hefeproteinen und Nährmedienbestandteilen als Problem. Darüber hinaus erfolgte die intrazelluläre Prozessierung der Proformen an der Furin-Spaltstelle durch die Proprotein-Konvertase KEX2 im Golgi-Apparat der Hefe *P. pastoris* nicht quantitativ, so daß stets auch die unprozessierte Proformen der hADAM 15-Fragmente im Kulturüberstand vorhanden waren. Hierbei war ferner zu beachten, daß die Pro-Domäne trotz proteolytischer Spaltung der Furin-Spaltstelle an der MP gebunden blieb. Die beiden letztgenannten Aspekte sollen durch das folgende Beispiel veranschaulicht werden. In Abbildung 4.18 ist die Elution einer Ni-NTA-Agarose durch einen 250 mM-Imidazol-Stufengradienten dargestellt. Die Matrix wurde zuvor mit dem gegen Startpuffer dialysierten Hefekulturüberstand beladen, der durch die heterologe Expression der ProMP~Myc-6H gewonnen worden war. Bei der Elution der Ni-NTA-Agarose fanden sich neben dem erwarteten Fragment MP~Myc-6H (Abb. 4.18, **b**, 35 kDa) auch höhermolekulare Fragmente, die auf unprozessierte Proformen (ProMP~Myc-6H) hinwiesen (Abb. 4.18, **a**), bei denen noch Teile der Pro-Domäne mit der MP kovalent über die Furin-Spaltstelle verbunden waren.



**Abb. 4.18: Nachweis von hADAM 15-ProMP~Myc-6H-Fragmenten durch Analyse einzelner Fraktionen der chromatographischen Reinigung des Kulturüberstandes durch Ni-NTA-Agarose (kontinuierliche SDS-PAGE (12% PAA), reduzierte Proben, Silber-Färbung).  
**a** (diffuser Bereich) ProMP~Myc-6H-Fragmente nach unvollständiger intrazellulärer Prozessierung  
**b** (35 kDa) MP~Myc-6H nach intrazellulärer Prozessierung  
**c, d, e, f** (18 bis 25 kDa) Pro-Domänen-Fragmente**

Des Weiteren fanden sich gleichzeitig Fragmente der Pro-Domäne (Abb. 4.18, **c** bis **f**) neben dem prozessierten Fragment MP~Myc-6H (Abb. 4.18, **b**, 35 kDa). Dies wies auf die Wechselwirkung zwischen Pro- und MP-Domäne trotz proteolytischer Spaltung der Furin-Spaltstelle hin. Die Wechselwirkungen zwischen Pro- und MP-Domäne waren nicht kovalent. Wurde das Eluat der Ni-NTA-Agarose zur Analyse im SDS-PAGE weder reduziert noch hitze-denaturiert konnte das gleiche Bandenmuster wie in Abbildung 4.18 beobachtet werden. Disulfidbrücken schieden somit als Ursache für die Wechselwirkung zwischen Pro- und MP-Domäne aus. Dieser „Komplex“ zwischen Pro- und MP-Domäne erwies sich als widerstandsfähig gegenüber einer Vielzahl denaturierender Reagenzien, wie z.B. 6 M Harnstoff, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS, 2 M NaCl, 50% (v/v) Glycerin oder 20% (v/v) Ethanol. Höhere Konzentrationen dieser Reagenzien konnten nicht eingesetzt werden, da diese nicht kompatibel zur Ni-NTA-Agarose gewesen wären. Die durch Elution der Ni-NTA-Agarose erhaltene **Fraktion 24** (Abb. 4.18) wurde durch Western-Blot-Analyse näher charakterisiert um die oben geschilderten Befunde zu verifizieren. Durch Verwendung des anti-MP- und des anti-Myc-Antikörpers gelang es den den diffusen Bereich **a** (Abb. 4.18 und 4.19) als unprozessierte Proformen (ProMP~Myc-6H) und das Fragment **b** (Abb. 4.18 und 4.19) als MP~Myc-6H nach intrazellulärer Prozessierung zu bestätigen. Die Fragmente **c** bis **f** (Abb. 4.18 und 4.19) konnten durch Verwendung des anti-Pro-Antikörpers als Fragmente der Pro-Domäne bestätigt werden.



**Abb. 4.19: Western-Blot-Analyse** (diskontinuierliche SDS-PAGE (4%/15% PAA), reduzierte Proben) **der Fraktion 24** (Abb. 4.18) **der chromatographischen Reinigung der hADAM 15-ProMP~Myc-6H durch Ni-NTA-Agarose.**

Primärantikörper: anti-Pro (1 µg/ml), anti-MP (1 µg/ml) bzw. anti-Myc (0,2 µg/ml)

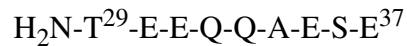
Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-AP (0,2 µg/ml) bzw. anti-Maus IgG-AP (0,2 µg/ml)

**a** (diffuser Bereich) **ProMP~Myc-6H**-Fragmente nach **unvollständiger** intrazellulärer Prozessierung

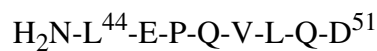
**b** (35 kDa) **MP~Myc-6H** nach intrazellulärer Prozessierung

**c, d, e, f** (16 bis 23 kDa) **Pro-Domänen-Fragmente**

Darüber hinaus konnten die beiden größeren Pro-Domänen-Fragmente (23 kDa und 18 kDa) durch N-terminale Aminosäuresequenzierung charakterisiert werden. Die N-terminale Aminosäuresequenzierung ergab für das 23 kDa-Fragment (Abb. 4.18 und 4.19, **c**) folgende Sequenz:



Die Sequenz für das 18 kDa-Fragment (Abb. 4.18 und 4.19, **d**) war:



Dadurch waren die beiden größeren Fragmente eindeutig als Teile der Pro-Domäne identifiziert.

Insgesamt erwies sich bei der chromatographischen Reinigung der heterolog in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15-Fragmente die geringe Menge des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials als problematisch, da die Rohausbeuten 50 µg pro Liter Kulturüberstand (Kapitel 4.8) nicht übertrafen. Eine Steigerung der Rohausbeuten durch Optimierung der Expressionsbedingungen konnte nur bedingt erzielt werden. Faktisch ergab sich zwar eine stärkere Expression der rekombinanten hADAM 15-Fragmente in Kompletmedium (verglichen mit Minimalmedium), doch die Menge an erhaltenen Expressionsprodukten stagnierte ein bis zwei Tage nach Induktionsbeginn (Abb. 4.16 B und 4.17) und nahm selbst bei längerer Kultivierung nicht signifikant zu (Abb. 4.17). Dadurch führten die in dieser Arbeit angewendeten chromatographischen Methoden (Kapitel 3.2.3) zu keiner signifikanten Anreicherung der rekombinanten Expressionsprodukte in Relation zu den unerwünschten *P. pastoris*-Proteinen und Nährmedienbestandteilen. Tabelle 4.5 ist eine Zusammenstellung der angewendeten chromatographischen Methoden.

Matrix	Bemerkungen	Resultate
<i>Anionenaustauscher</i> Q-Sepharose CM-Sepharose (3.2.3.1)	Elution durch lineare NaCl-Gradienten, NaCl-Stufengradienten, pH-Stufengradienten 4°C bzw. RT	Keine signifikante Anreicherung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente
<i>Kationenaustauscher</i> SP-Sepharose (3.2.3.1)	Elution durch lineare NaCl-Gradienten, NaCl-Stufengradienten, pH-Stufengradienten 4°C bzw. RT	Keine signifikante Anreicherung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente
<i>Hydrophobe Interaktionschromatographie</i> Phenyl-Sepharose Octyl-Sepharose (3.2.3.2)	Bindung durch (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> RT	Keine signifikante Anreicherung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente
<i>Gelfiltration</i> Sephacryl S-200 HR Sephadex G-75 AcA-44 (3.2.3.4)	native und denaturierende Puffer 4°C bzw. RT	Eine Trennung des Komplexes zwischen Pro- und MP-Domäne war nicht möglich
Ni-NTA-Agarose (3.2.3.5)	verschiedene Zusätze zu den Waschpuffern: 20 - 50 mM Imidazol; 6 M Harnstoff; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (w/v) SDS; 2 M NaCl; 50% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) Ethanol 4°C bzw. RT	Eine Trennung des Komplexes zwischen Pro- und MP-Domäne war nicht möglich
Con A-Sepharose (3.2.3.6)	Elution durch linearen α-D-Methylglucosid-Gradienten 4°C bzw. RT	Keine signifikante Anreicherung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente
Heparin-Sepharose (3.2.3.7)	Elution durch lineare NaCl-Gradienten bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5,0 und pH 7,4) 4°C	Keine signifikante Anreicherung der rekombinanten hADAM 15-Fragmente
Immobilisierter Hydroxamatinhibitor Pro-Leu-Gly-NHOH (3.2.3.8)	Bindung unter nativen Bedingungen Elution durch EDTA 4°C	Keine Bindung der MP an den immobilisierten Hydroxamatinhibitor
Immobilisierter anti-MP-Antikörper (3.2.3.9)	Bindung unter nativen Bedingungen Elution durch 200 mM Glycin pH 2,5 oder 3 M MgCl <sub>2</sub> 4°C	Die Elution der rekombinanten hADAM 15-Fragmente war nicht möglich

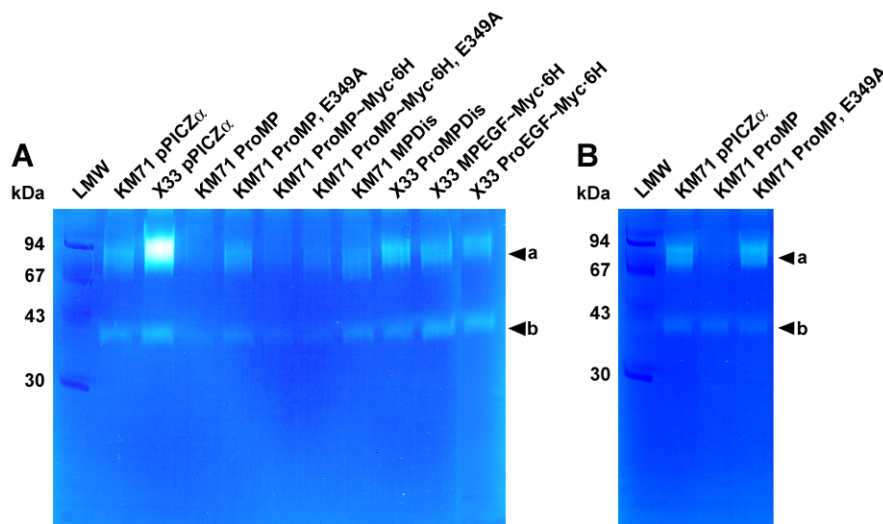
**Tab. 4.5: Zusammenstellung chromatographischer Methoden**, die zur Reinigung der in *P. pastoris* exprimierten hADAM 15-Fragmente angewendet wurden. Es sind jeweils nur die wesentlichen chromatographischen Bedingungen bemerkt.

#### 4.10 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der rekombinant in *Pichia pastoris* dargestellten hADAM 15-Fragmente

Da zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von hADAM 15 keine zur Homogenität gereinigten rekombinanten Expressionsprodukte zur Verfügung standen, wurde mit ungereinigten Hefekulturüberständen oder mit Hefekulturüberständen die gegen Nativpuffer dialysiert worden waren gearbeitet. Zur Verifikation der Ergebnisse dienten Kulturüberstände der entsprechenden E349A-Mutanten bzw. Kulturüberstände, die von mit „leerem“ pPICZ $\alpha$  A-Vektor (Leervektorkontrolle) transformierten Hefezellen gewonnen wurden.

##### 4.10.1 Zymographie

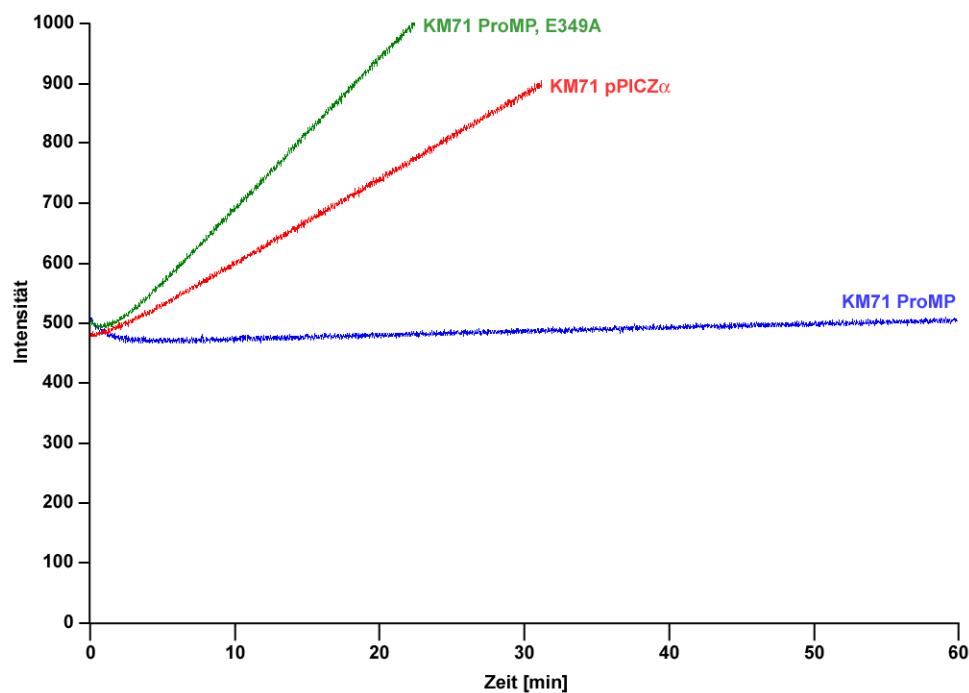
Die in *P. pastoris* rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente wurde zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der MP in der Zymographie eingesetzt. Abbildung 4.20 A gibt eine Übersicht über die proteolytische Aktivität, die in den Kulturüberständen aus der heterologen Expression einiger rekombinanter hADAM 15-Fragmente gegenüber Gelatin detektiert werden konnten. Zwei nicht zu identifizierende Proteinase in der Größe von 80 kDa (Abb. 4.20 A, **a**) und 40 kDa (Abb. 4.20 A, **b**) führten in fast allen Proben (inklusive der E349A-Mutanten und der Leervektorkontrollen) zu einer Degradation des Gelatins. Es mußte sich hierbei um konstitutiv exprimierte Proteinase aus *P. pastoris* handeln. Auffällig war, daß die durch die 80 kDa-Proteinase hervorgerufene Degradationsbande im Fall des ProMP-Kulturüberstandes weniger intensiv war als die entsprechenden Degradationsbande des Leervektorüberstandes und der E349A-Mutante (Abb. 4.20 B, **a**). Die durch die 40 kDa-Proteinase hervorgerufene Degradationsbande (Abb. 4.20 B, **b**) zeigte diesen Effekt nicht. Neben Gelatin wurde noch eine Reihe anderer potentieller Substrate in der Zymographie getestet: Kollagen Typ I, II, III, VI, VII,  $\alpha$ -Casein,  $\beta$ -Casein und Plasma-Fibronektin. Bei keinem der genannten Substrate war eine Degradation zu beobachten, die auf proteolytischen Eigenschaften der rekombinanten hADAM 15-Fragmente schließen ließ.



**Abb. 4.20:** **A) Gelatin-Zymogramm** (kontinuierliche SDS-PAGE (12% PAA) mit 1 mg/ml Gelatin) zur **Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der rekombinanten hADAM 15-Fragmente**. Die Proben sind ungereinigte Kulturüberstände der entsprechenden Expressionen in *P. pastoris*. **Konstitutiv exprimierte *P. pastoris*-Proteinasen** mit Molekulargewichten von **80 kDa (a)** und **40 kDa (b)** führten zur Spaltung von Gelatin. **B) Gelatin-Zymogramm** (kontinuierliche SDS-PAGE (12% PAA) mit 1 mg/ml Gelatin) zur **Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der ProMP gegenüber einer konstitutiv exprimierten *P. pastoris*-Proteinase**. Die Proben sind ungereinigte, gegen Nativpuffer dialysierte Kulturüberstände der entsprechenden Expressionen im *P. pastoris*-Stamm KM71. **a (80 kDa)** Diese konstitutiv exprimierte *P. pastoris*-Proteinase führte zur Spaltung von Gelatin im Fall der Leervektorkontrolle und der Expression der ProMP, E349A (Kontrollmutante), doch ihre proteolytische Aktivität war bei Expression der ProMP nicht mehr zu beobachten. **b (40 kDa)** Die Aktivität dieser konstitutiv exprimierte *P. pastoris*-Proteinase wurde nicht durch die Expression der ProMP beeinflusst.

#### 4.10.2 Spaltung fluorogener Peptide

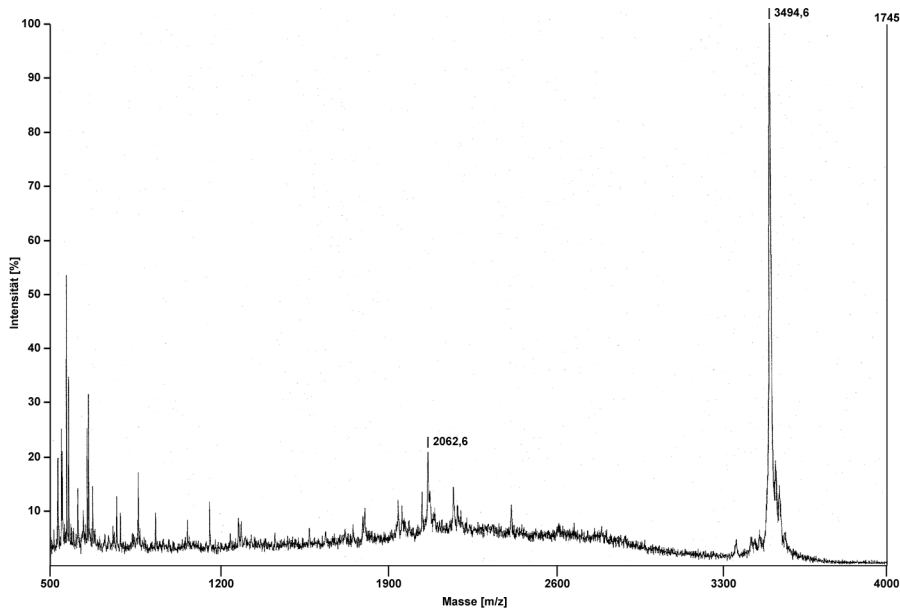
Bei der Spaltung des fluorogenen MMP2/MMP9-Substrates durch gegen Nativpuffer dialysierte Kulturüberstände (ProMP; ProMP, E349A; Leervektorkontrolle) zeigte sich ein unerwarteter Effekt (Abb. 4.21). Wurde der ProMP-Kulturüberstand zur Spaltung eingesetzt, war eine Spaltung des Substrates über einen Zeitraum von 60 min kaum zu detektieren. Die Kulturüberstände der Kontrollmutante (ProMP, E349A) und der Leervektorkontrolle zeigten hingegen eine deutliche Spaltung des Substrates. Bei Verwendung des TACE-Substrates konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Wurden die entsprechenden Kulturüberstände zur Spaltung der fluorogenen Substrate P1m, P2m und P16m eingesetzt, konnte in keinem Fall ein Abbau detektiert werden. Versuche die Proformen der hADAM 15-Fragmente durch HgCl<sub>2</sub>, APMA, Trypsin oder Furin zu aktivieren zeigten ebenfalls keinerlei Wirkung.



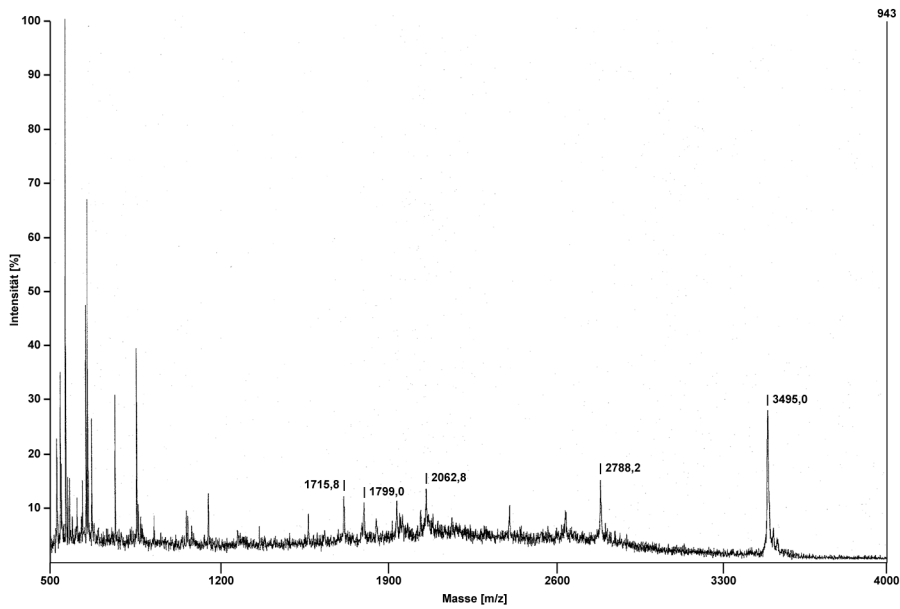
**Abb. 4.21:** Charakterisierung der proteolytischen Aktivität in *P. pastoris*-KM71-Kulturüberständen (ProMP; ProMP, E349A; Leervektorkontrolle) durch *in vitro*-Spaltung des fluorogenen MMP2/MMP7-Substrates. Die Kulturüberstände aus der heterologen Expression der **ProMP, E349A** und die **Leervektorkontrolle** des *P. pastoris*-Stammes KM71 zeigen **proteolytische Aktivität** gegenüber dem MMP2/MMP7-Substrat. Der Kulturüberstand aus der heterologen Expression der **ProMP** im gleichen Hefestamm zeigt hingegen eine deutlich **verringerte proteolytische Aktivität**.

#### 4.10.3 Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette

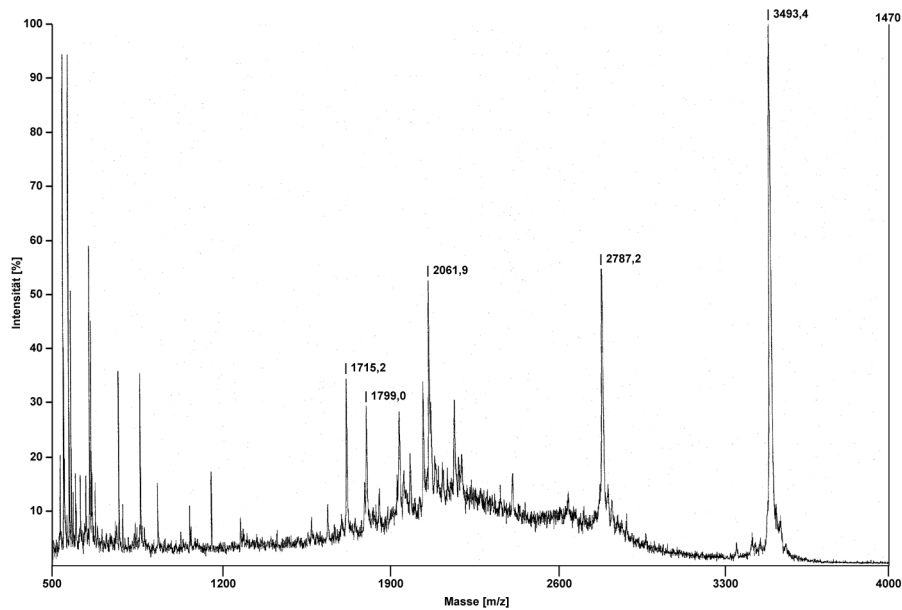
Bei der Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette durch die oben genannten Kulturüberstände (ProMP; ProMP, E349A, Leervektorkontrolle) zeigte sich ein ähnlicher Effekt, wie bei der Spaltung des fluorogenen MMP2/MMP7-Substrates. Keine Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette bei Verwendung des ProMP-Kulturüberstandes (Abb. 4.22) und Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette bei Verwendung der Kulturüberstände der Kontrollmutante (ProMP, E349A) (Abb. 4.23) und der Leervektorkontrolle (4.24). Auch hier zeigten Versuche die Proformen der hADAM 15-Fragmente durch HgCl<sub>2</sub>, APMA, Trypsin oder Furin zu aktivieren keinerlei Wirkung.



**Abb. 4.22: Analyse der Insulin-B-Ketten-Spaltung (oxidierte Form) durch MALDI-TOF-MS.** Der gegen Nativpuffer dialysierte Kulturüberstand stammte aus der heterologen Expression der **ProMP** im *P. pastoris*-Stamm KM71. Es liegen keine Hinweise auf eine Spaltung der Insulin-B-Kette vor.

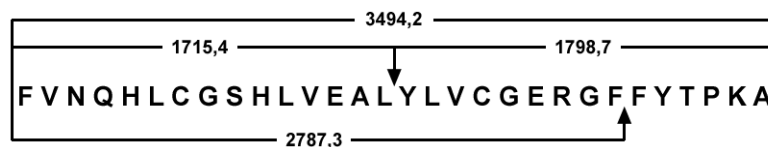


**Abb. 4.23: Analyse der Insulin-B-Ketten-Spaltung (oxidierte Form) durch MALDI-TOF-MS.** Der gegen Nativpuffer dialysierte Kulturüberstand stammte aus der heterologen Expression der **ProMP, E349A** im *P. pastoris*-Stamm KM71. Bei diesem Experiment sind drei Fragmente der Insulin-B-Kette zu detektieren: 1715,8, 1799,0 und 2788,2.



**Abb. 4.23: Analyse der Insulin-B-Ketten-Spaltung (oxidierte Form) durch MALDI-TOF-MS.** Der gegen Nativpuffer dialysierte Kulturüberstand stammte aus dem mit „leerem“ pPICZ $\alpha$  A-Vektor (**Leervektor-kontrolle**) transformierten *P. pastoris*-Stamm KM71. Bei diesem Experiment sind drei Fragmente der Insulin-B-Kette zu detektieren: 1715,2, 1799,0 und 2787,2.

Die bei der Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette durch MALDI-TOF-MS detektierten Fragmente von 1715,4 und 1798,7 und 2787,3 (Abb. 4.23 und 4.24) lassen sich eindeutig als Fragmente der oxidierten Insulin-B-Kette identifizieren (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25: Zuordnung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten Fragmente zur oxidierten Insulin-B-Kette.** Das Fragment der Masse 3494,2 entspricht der ungespaltenen Insulin-B-Kette. Die Fragmente der Massen 1715,4 und 1798,7 resultieren aus der Spaltung zwischen Leucin(15) und Tyrosin(16). Das Fragment der Masse 2787,3 resultiert aus der Spaltung zwischen Phenylalanin(24) und Phenylalanin(25).

Die Untersuchungen der Kulturüberstände (ProMP; ProMP, E349A; Leervektorkontrolle) durch Gelatin-Zymographie (Abb. 4.20 B), durch Spaltung des fluorogenen MMP2/MMP7-Substrates (Abb. 4.21) und durch Spaltung der oxidierten Insulin-B-Kette ließen den Schluß zu, daß alle Spaltungen durch eine konstitutiv exprimierte *P. pastoris*-Proteinase hervorgerufen wurden. Diese *P. pastoris*-Proteinase hat ein Molekulargewicht von 80 kDa (Abb. 4.20 B) und

zeigte keinerlei proteolytische Aktivität in den ProMP-Kulturüberständen. In den Kulturüberständen der Kontrollmutante (ProMP, E349A) und der Leervektorkontrolle ist die proteolytische Aktivität der *P. pastoris*-Proteinase deutlich zu detektieren. Möglicherweise degradiert die durch intrazelluläre Prozessierung aus der ProMP entstehende MP diese *P. pastoris*-Proteinase proteolytisch. Auf diese Weise würde wiederum das proteolytische Potential der *P. pastoris*-Proteinase zerstört werden. Damit wäre erstmals ein Hinweis auf die proteolytische Aktivität von hADAM 15 gefunden worden. Eine Isolierung der *P. pastoris*-Proteinase durch RP-HPLC oder ihre Charakterisierung durch N-terminale Aminosäuresequenzierung gelang nicht.

#### 4.10.4 Spaltung von MBP und $\alpha_2$ -Makroglobulin *in vitro*

Zur Spaltung des MBP und des  $\alpha_2$ -Makroglobulins *in vitro* wurde eine ganze Vielzahl rekombinanter hADAM 15-Fragmente (ProMP, ProMP~Myc-6H, MPDis, ProMPDis, MPEGF~Myc-6H) eingesetzt, wobei keinerlei proteolytische Aktivität, auch nicht nach Einsatz potentieller Proenzymaktivatoren wie z.B. HgCl<sub>2</sub>, APMA, Trypsin und Furin beobachtet wurde. Tabelle 4.5 faßt alle Ergebnisse der Spaltungsversuche nochmals zusammen.



Substrat	Bemerkung
Gelatin	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente; die rekombinante ProMP unterdrückt die Aktivität einer Gelatin-spaltenden <i>P. pastoris</i> -Proteinase
$\alpha$ -Casein	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
$\beta$ -Casein	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Kollagen Typ I	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Kollagen Typ II	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Kollagen Typ III	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Kollagen Typ VI	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Kollagen Typ VII	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Plasma-Fibronektin	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
Insulin-B-Kette	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente; die ProMP unterdrückt die Aktivität einer die Insulin-B-Kette-spaltenden <i>P. pastoris</i> -Proteinase
$\alpha_2$ -Makroglobulin	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente

Substrat	Bemerkung
MBP	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
MMP2/MMP7-Substrat	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente; die rekombinante ProMP unterdrückt die Aktivität einer das MMP2/MMP7-Substrat-spaltenden <i>P. pastoris</i> -Proteinase
TACE-Substrat	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente; die rekombinante ProMP unterdrückt die Aktivität einer das TACE-Substrat-spaltenden <i>P. pastoris</i> -Proteinase
P1m-Peptid	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
P2m-Peptid	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente
P16m-Peptid	Keine direkte Spaltung durch rekombinante hADAM 15-Fragmente

**Tab. 4.6:** Überblick über alle zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von hADAM 15 eingesetzten *in vitro*-Substrate.

#### 4.11 Expression der Ecto-Domäne und des kompletten (*full length*) hADAM 15-Moleküls in Säugerzellen

Zur Charakterisierung der Ecto-Domäne wurde die für diese Domäne kodierende DNA mit Hilfe des Primerpaars Sig-Hind-F/EGFF-Xba-R amplifiziert und über die Restriktionsstellen *Hind III* und *Xba I* in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 Myc-His A ligiert. Die für das gesamte (*full length*) hADAM 15-Molekül kodierende DNA konnte durch das Primerpaar Sig-Hind-F/ZPF-Xba-R amplifiziert und anschließend ebenfalls über die Restriktionsstellen *Hind III* und *Xba I* in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 Myc-His A ligiert werden. Die nach heterologer Expression resultierenden rekombinanten Proteine waren C-terminal mit einem c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-*tag* fusioniert. Dieser *tag* sollte die Detektion und Charakterisierung der rekombinanten Proteine durch den anti-Myc-Antikörper ermöglichen. Neben der Wildtypform der Ecto-Domäne und des gesamten (*full length*) Proteins wurden zusätzlich zwei Mutanten etabliert, bei denen das RGD-Motiv innerhalb der Disintegrin-Domäne durch ein SGA-Motiv ersetzt wurde (Tab. 4.7).

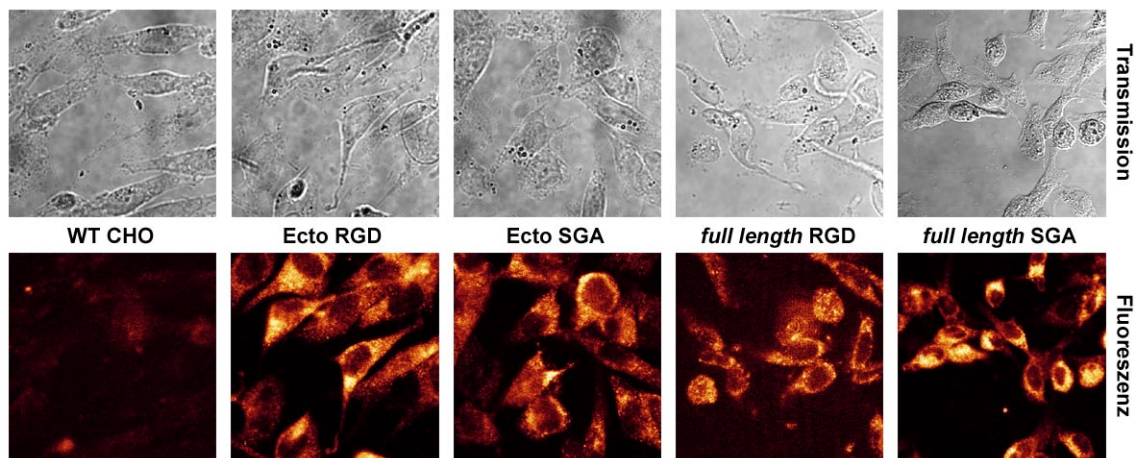
hADAM 15-Domänen	CHO pcDNA 3.1 A	OV-MZ-6 pcDNA 3.1 A
	[~Myc·6H] [M2~Myc·6H]	[~Myc·6H] [M2~Myc·6H]
	[~Myc·6H] [M2~Myc·6H]	[~Myc·6H] [M2~Myc·6H]

**Tab. 4.7: Zusammenstellung der klonierten und in den Säugerzellen CHO und OV-MZ-6 exprimierten hADAM 15-Fragmente.** Abkürzungen: [M2] R484S Aminosäureaustausch und D486A Aminosäureaustausch, im folgenden auch als SGA bezeichnet; [~Myc·6H] C-terminaler c-Myc-Epitop-Hexa-Histidin-tag.

Die oben gezeigten cDNA-Konstrukte (Tab. 4.6) und der „leere“ Vektor pcDNA 3.1 Myc-His A (Leervektorkontrolle) wurden zur **stabilen** Transfektion der humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und der Ovarialzelllinie CHO aus Hamster eingesetzt.

#### 4.11.1 Heterologe Expression von rekombinantem hADAM 15 in CHO-Zellen

Zur stabilen Transfektion von CHO-Zellen wurden die vier cDNA-Konstrukte (Ecto RGD, Ecto SGA, *full length* RGD und *full length* SGA) eingesetzt (Tab. 4.7). Die Charakterisierung der transfizierten Zellen erfolgte durch konfokale Laserscanmikroskopie unter Verwendung des anti-Myc-Antikörpers. Bei Zellen der fünften Klonierungsrunde zeigte sich, daß die Expressionsprodukte überwiegend im Zytoplasma aber auch in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert waren. Im Bereich des Zellkerns konnten keine Expressionsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 4.26). Die stabile Transfektion der CHO-Zellen sollte bei entsprechend hohen Expressionsraten einen Zugang zu rekombinanten hADAM 15-Fragmenten darstellen. Da aber aufgrund der Schwierigkeiten die Expressionsprodukte im Western-Blot zu detektieren kein spezifischer Nachweise etabliert werden konnte, sind Untersuchungen in dieser Richtung eingestellt worden.



**Abb. 4.26: Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten in stabil transfizierten CHO-Zellen durch konfokale Laserscanmikroskopie.**

Immunfluoreszenzuntersuchung fixierter CHO-Zellen.

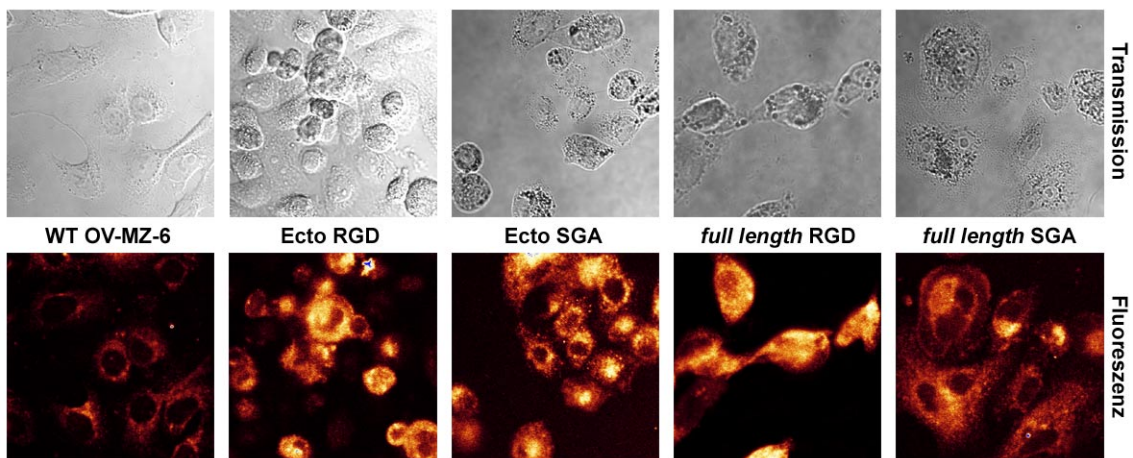
Primärantikörper: anti-Myc (1 µg/ml)

Sekundärantikörper: anti-Maus IgG-Alexa-488 (1 µg/ml)

Abkürzungen: [WT] Wildtyp

#### 4.11.2 Heterologe Expression von rekombinantem hADAM 15 in der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6

Die stabile Transfektion der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde ebenfalls mit den vier cDNA-Konstrukten (Ecto RGD, Ecto SGA, *full length* RGD und *full length* SGA) durchgeführt. Durch die Immunfluoreszenzuntersuchung der transfizierten OV-MZ-6-Zellen der fünften Klonierungsrunde mit dem anti-Myc-Antikörper konnte die heterologe Expression von hADAM 15 im Vergleich zum OV-MZ-6-Wildtyp nachgewiesen werden. Wie bei den CHO-Zellen erfolgte der Nachweis der Expressionsprodukte nur in der Plasmamembran und im Zytoplasma der OV-MZ-6-Zellen, nicht aber im Bereich des Zellkerns (Abb. 4.27). Durch die Transfektion der Zellen mit diesen cDNA-Konstrukten sollte der Einfluß von hADAM 15 auf die Adhäsion und Proliferation dieser Zelllinie untersucht werden.



**Abb. 4.27: Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen durch konfokale Laserscanmikroskopie.**

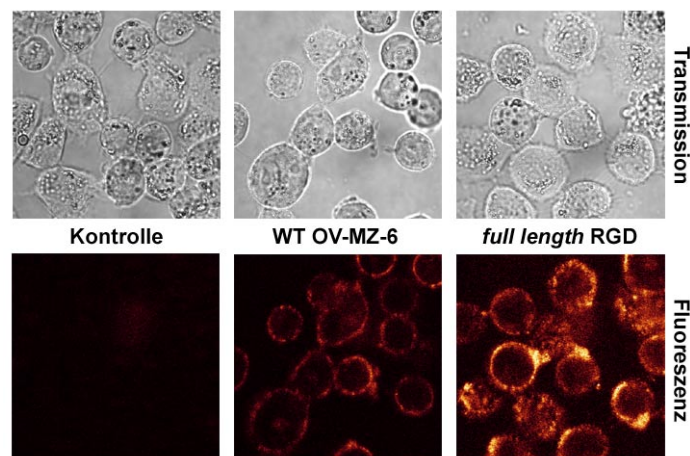
Immunfluoreszenzuntersuchung fixierter OV-MZ-6-Zellen.

Primärantikörper: anti-Myc (1 µg/ml)

Sekundärantikörper: anti-Maus IgG-Alexa-488 (1 µg/ml)

Abkürzungen: [WT] Wildtyp

Um einen weiteren spezifischen Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15 in OV-MZ-6-Zellen zu führen, wurde der anti-Ecto-Antikörper zur Detektion des in der Plasmamembran verankerten Gesamtproteins (*full length* RGD) verwendet.



**Abb. 4.28: Nachweis der heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen durch konfokale Laserscanmikroskopie.**

Immunfluoreszenzuntersuchung lebender OV-MZ-6-Zellen.

Primärantikörper: anti-Ecto (Antiserum 1:500)

Bei der Kontrolle wurde dieser Antikörper nicht verwendet.

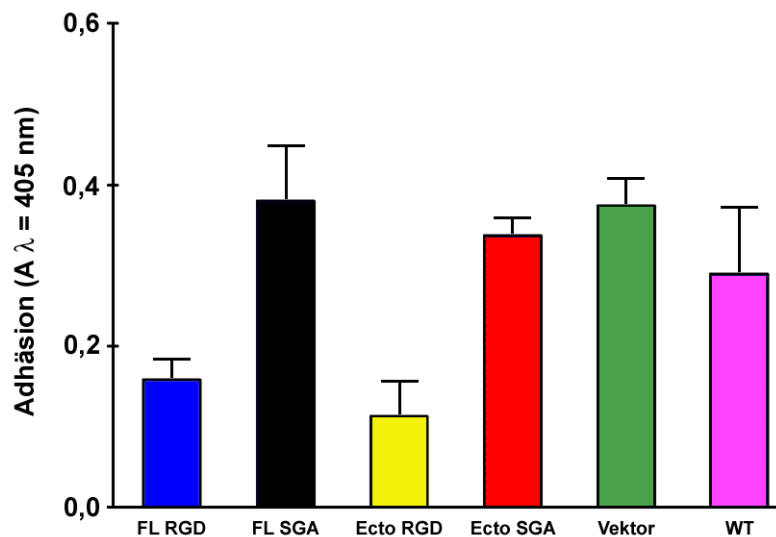
Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG-Alexa-568 (1 µg/ml)

Abkürzungen: [WT] Wildtyp

Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte sowohl das konstitutiv exprimierte hADAM 15 auf nicht transfizierten OV-MZ-6-Zellen (Abb. 4.28, Mitte) als auch das aufgrund der Transfektion mit hADAM 15-cDNA (*full length* RGD) verstärkt exprimierte Protein (Abb. 4.28, Rechts) nachgewiesen werden.

#### 4.11.3 Die Beeinflussung der Adhäsion und Proliferation der OV-MZ-6-Zellen durch hADAM 15

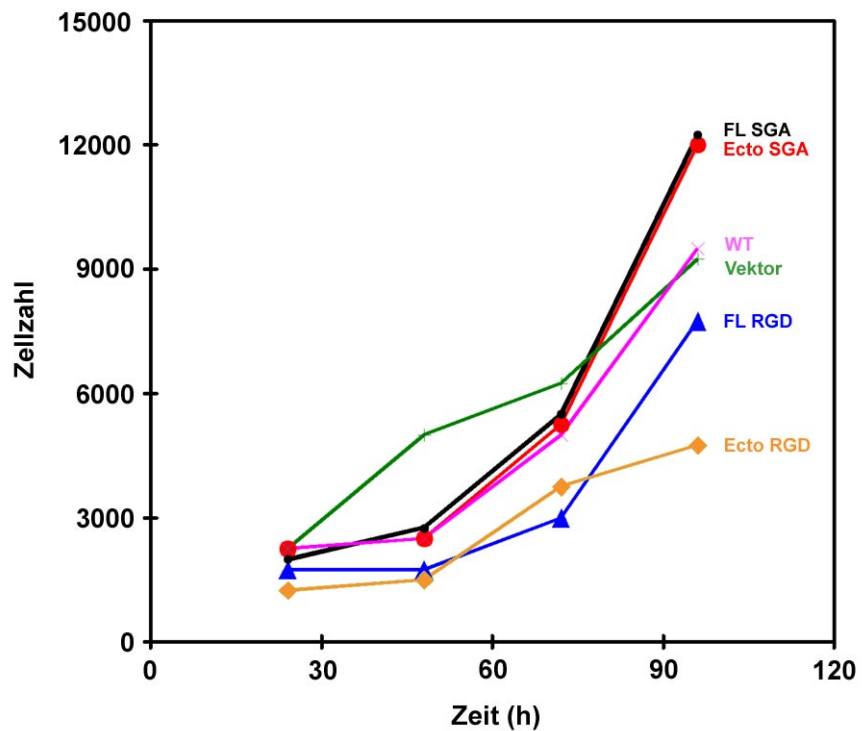
Die mit den vier unterschiedlichen cDNA-Konstrukten (Ecto RGD, Ecto SGA, *full length* RGD und *full length* SGA) stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen wurden hinsichtlich ihres adhäsiven und proliferativen Phänotyps auf Vitronektin untersucht. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Zellen bei Expression der Wildtypformen von hADAM 15 (*full length* RGD und Ecto RGD) eine signifikant erniedrigte Adhäsion im Vergleich zu den entsprechenden SGA-Mutanten (*full length* SGA und Ecto SGA) aufwiesen.



**Abb. 4.29:** Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion von mit hADAM 15-cDNAs transfizierten OV-MZ-6-Zellen auf Vitronektin (3 Messungen pro Klon). Bei den beiden Wildtypformen von hADAM 15 (*full length* RGD und Ecto RGD) war die Adhäsion signifikant reduziert. Die entsprechenden SGA-Mutanten (*full length* SGA und Ecto SGA) zeigten ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie der Wildtyp und die Leervektorkontrolle. Abkürzungen: [FL] full length; [WT] Wildtyp; [Vektor] Leervektorkontrolle.

Bei der Untersuchung der transfizierten OV-MZ-6-Zellen, des OV-MZ-6-Wildtyps und der Leervektorkontrolle bezüglich ihrer Proliferation auf Vitronektin konnte gezeigt werden, daß

die mit der Wildtypform von hADAM 15 transfizierten Zellen (*full length* RGD und Ecto RGD) ein geringere Proliferationsrate aufwiesen. Besonders die heterologe Expression der Wildtyp-Ecto-Domäne (Ecto RGD) führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate.



**Abb. 4.29:** Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Proliferation von mit hADAM 15-cDNAs transfizierten OV-MZ-6-Zellen auf Vitronektin (MTT-Test, eine Messung pro Zeitpunkt und Klon). Eine signifikante Reduktion der Proliferation zeigten vor allem die OV-MZ-6-Zellen, die die Ecto-Domäne der Wildtypform von hADAM 15 (Ecto RGD) exprimierten. Abkürzungen: [FL] full length; [WT] Wildtyp; [Vektor] Leervektorkontrolle.

## 5 Diskussion

Das Interesse der aktuellen Forschung an den Mitgliedern der Familie der ADAMs ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen, da ihre Beteiligung an einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität spielen die ADAMs eine wichtige Rolle bei der Prozessierung membrangebundener Proteine (*ecto domain shedding*), doch erst für 35% der potentiell proteolytisch aktiven ADAMs konnten *in vivo*- oder *in vitro*-Substrate identifiziert werden. Durch Identifizierung ihrer biologischen Substrate und Untersuchung ihrer Hemmung durch physiologische oder synthetischen Inhibitoren wären neue Ansätze bei der Diagnose und Therapie pathologischer Veränderungen, wie beispielsweise der Alzheimer-Erkrankung oder der Arteriosklerose, denkbar. Das hADAM 15 trägt innerhalb seiner MP-Domäne das Zinkbindungsmotiv der Metzinkine; ein Indiz für eine proteolytische Aktivität von hADAM 15. Bisher ist es jedoch nicht gelungen Substrate von hADAM 15 zu identifizieren. Die Tatsache, daß hADAM 15 in arteriosklerotischen und osteoarthritischen Läsionen, jedoch nicht in gesunden Gefäßen und Knorpeln exprimiert wird, motivierte zur Untersuchung der proteolytischen Eigenschaften von hADAM 15 in der vorliegenden Arbeit.

### 5.1 Expression der hADAM 15-mRNA in Karzinomzellen

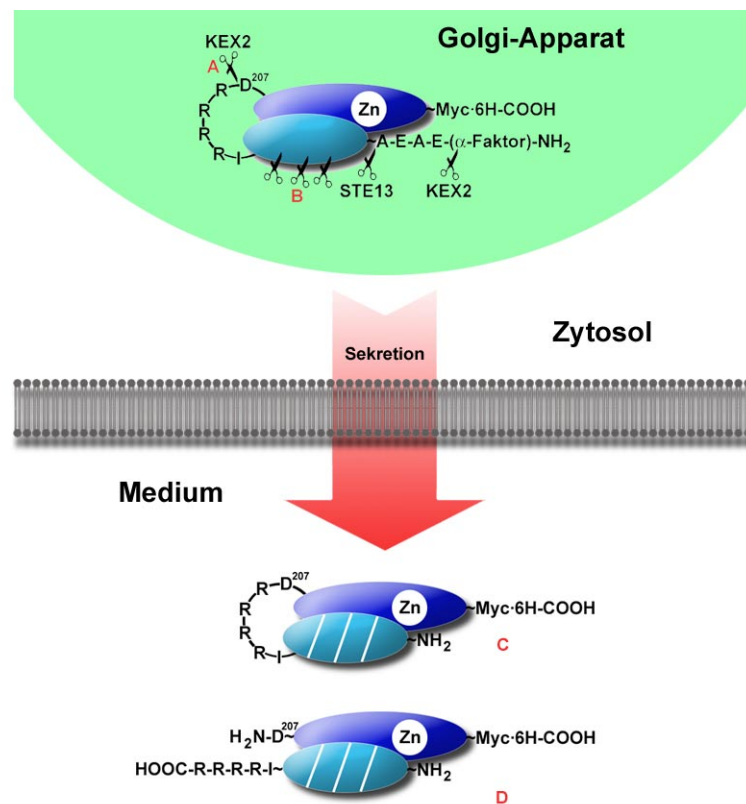
Durch RT-PCR-Experimente konnte die Expression der hADAM 15-mRNA in den humanen Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 und der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 nachgewiesen werden. Da die Zellen vor der Isolierung der Gesamt-RNA keinem transkriptionsinduzierenden Stimulus ausgesetzt waren, ist anzunehmen, daß hADAM 15 in diesen drei Zelllinien konstitutiv exprimiert wird. Dieser Befund ist konform mit der Beobachtung, daß hADAM 15 ubiquitär in vielen Geweben exprimiert wird und darüber hinaus bei malignen Blut- und Prostataerkrankungen gefunden wurde (Krätzschar et al., 1996; Wu et al., 1997; McCulloch et al., 2000). Das Gen für hADAM 15 ist in einer Region (Chromosomenbande 1q21.3) lokalisiert, die in vielen Krebsarten verstärkt amplifiziert wird (Kärkkäinen et al., 2000), also ein weiteres Indiz dafür, daß hADAM 15 eine Beteiligung am Krebsgeschehen zukommen könnte. Beim Vergleich der Primärstruktur des hier neu klonierten hADAM 15 mit

den beiden bereits publizierten Primärstrukturen von Metargidin (Krätzschar et al., 1996) und hMDC 15 (Herren et al., 1997) wurden Abweichungen der Primärstruktur an den Aminosäurepositionen 714 und 791 identifiziert. Da die zur Synthese der cDNA verwendete RNA in allen drei Untersuchungen aus unterschiedlichen Zelllinien isoliert worden war, könnten die Abweichungen auf zellspezifische Isoformen von hADAM 15 hindeuten.

## 5.2 Die Metalloproteinase-Domäne

Ziel in der vorliegenden Arbeit war es, die MP-Domäne von hADAM 15 bezüglich ihrer proteolytischen Eigenschaften zu charakterisieren. Der erste Ansatz bestand in der heterologen Expression des MP- und ProMP-Fragmentes von hADAM 15 in dem prokaryontischen Wirt *E. coli*. Da die rekombinanten Proteine nach ihrer Isolierung aus *E. coli* in reduzierter und denaturierter Form vorlagen, war eine Renaturierung zur Wiederherstellung ihrer nativen Konformation nötig. Hierzu wurden unterschiedliche Methoden (Kapitel 3.2.2) angewandt, die die schrittweise Entfernung der denaturierenden und reduzierenden Reagenzien ermöglichten. Dieser Vorgang war insofern kompliziert, da die Pro-Domäne von hADAM 15 fünf und die MP-Domäne sogar sechs Cystein-Reste enthält. Die unter reduzierenden Bedingungen ungepaart vorliegenden Cystein-Reste tendieren bei Entfernung der Reduktionsmittel zur zufälligen Ausbildung von Disulfidbrücken, wobei dieser Vorgang die Bildung der nativen Konformation des Moleküls verhindern kann. Außerdem kann es bei der Renaturierung zur erneuten Aggregation der Expressionsprodukte kommen (Lilie et al., 1998). Um diesen Problemen zu begegnen wurden die Renaturierungen unter hohen Verdünnungen der Expressionsprodukte durchgeführt, doch ein Nachweis proteolytischer Aktivität der „renaturierten“ hADAM 15-Fragmente durch Zymographie (Gelatin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein) gelang nicht. Dies war möglicherweise auf die Ausbildung eines nicht der nativen Konformation entsprechenden Disulfidbrückenmusters bei der Renaturierung zurückzuführen. Eine experimentelle Überprüfung des Renaturierungserfolges durch andere Analysemethoden war nicht möglich, da potentielle *in vivo*- oder *in vitro*-Substrate unbekannt waren. Die in *E. coli* exprimierte und anschließend durch präparative Gelelektrophorese gereinigte MP-Domäne ermöglichte jedoch die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers. Erst durch die Verwendung dieses anti-MP-Antikörpers bei Western-Blot- und Kolonie-Blot-Analysen war es möglich, die in *P. pastoris* rekombinant hergestellten hADAM 15-Fragmente zu detektieren und ihre Expression und Reinigung zu dokumentieren.

Alternativ zur heterologen Expression von hADAM 15-Fragmenten in bakteriellen Expressionssystemen wurde die heterologe Expression verschiedener hADAM 15-Fragmente in dem eukaryontischen Wirtsorganismus *P. pastoris* etabliert. Dieses Expressionssystem sollte die Gewinnung der rekombinanten Proteine unter nativen Bedingungen mit korrekter Konformation und Disulfidbrückenmuster ermöglichen (Cereghino und Cregg, 2000). Die rekombinanten Proteine wurden in das Medium sezerniert und konnten somit direkt zur Charakterisierung oder Aufarbeitung eingesetzt werden. Hierbei zeigte sich, daß die Expressionsraten gering waren und bei allen hADAM 15-Fragmenten unterhalb von 50 µg pro Liter Kulturüberstand lagen. Möglicherweise könnte einer der Gründe für die relativ niedrigen Expressionsraten darin liegen, daß sich der Aspartat(207)-Rest am N-Terminus der prozessierten MP-Domäne befindet. Dieser Aspartat-Rest wird wahrscheinlich durch die Prozessierung der Proformen der hADAM 15-Fragmente im Golgi-Apparat durch die furinartige KEX2-Proteinase exponiert, die nach dem Arginin(206)-Rest der Furin-Spaltstelle RRRR spaltet (Abb. 5.1). Es ist bekannt, daß die KEX2-Proteinase nach der Erkennungssequenz EKR spaltet und dadurch normalerweise den  $\alpha$ -Faktor, ein Sekretionssignal, daß Proteine (hier die rekombinanten hADAM 15-Fragmente) in den Golgi-Apparat dirigiert, entfernt. Die Sequenz EKR stimmt gut mit der typischen Furin-Spaltstelle RX(K/R)R überein (Nakayama, 1997). Beispielsweise wurde in zwei Arbeiten, die die heterologe Expression der ProMP von hADAM 9 in *P. pastoris* (Schwettmann und Tschesche, 2001) und der ProMP von hADAM 17 in *S. cerevisiae* (Clarke et al., 1998) beschreiben, eine Prozessierung der betreffenden Proformen nach der Furin-Spaltstelle beobachtet, die die Autoren ebenfalls auf die furinartige KEX2-Proteinase zurückführen. Darüber hinaus ist im Golgi-Apparat von *P. pastoris* die Dipeptidylpeptidase STE13 lokalisiert, die den EA-repeat, der bei allen rekombinanten hADAM 15-Fragmenten die Verbindung zwischen dem C-Terminus des  $\alpha$ -Faktors und dem N-Terminus des zu exprimierenden Proteins darstellte, entfernt (Abb. 5.1). Bei den ohne Pro-Domäne exprimierten hADAM 15-Fragmenten, wie z.B. der MP-Dis oder der MPEGF~Myc-6H erfolgte die Exposition des Aspartat(207)-Restes vermutlich durch die Dipeptidylpeptidase STE13. Die Hypothese, daß der Aspartat(207)-Rest die Expressionsraten und somit die Ausbeuten an rekombinanten hADAM 15-Fragmenten beeinflusste, wird durch Untersuchungen von Bachmair und Kollegen unterstützt.



**Abb. 5.1:** Schema einer möglichen intrazellulären Prozessierung der rekombinanten hADAM 15-Proformen in der Hefe *P. pastoris* am Beispiel des hADAM 15-Fragmentes ProMP~Myc•6H. Der  $\alpha$ -Faktor, der als Sekretionssignal die Expressionsprodukte in den Golgi-Apparat dirigierte, wird dort durch die furinartige KEX2-Proteinase abgespalten. Der Glu-Ala-repeat wird durch die Proteinase STE13 entfernt. Ferner kommt es zu einer Spaltung der Furin-Spaltstelle RRRR<sup>206</sup> durch die KEX2-Proteinase (A), die jedoch nicht quantitativ zu verlaufen scheint, da im Kulturmedium auch unprozessierte Proformen nachgewiesen werden konnten (C) (Abb. 4.18 und 4.19). Die Pro-Domäne wird aus bisher unbekannter Ursache teilweise proteolytisch fragmentiert (B), wobei die Pro-Domänen-Fragmente ebenso wie die ungespaltene Pro-Domäne zur Ausbildung nicht kovalenter Komplexe mit der MP-Domäne neigen (C und D).

Die Autoren fanden, daß die Aminosäure am N-Terminus die Stabilität eines Proteins *in vivo* beeinflusst. Hierzu untersuchten sie die Halbwertszeit verschiedener  $\beta$ -Galactosidase-Mutanten in der Hefe *S. cerevisiae*, die sich nur in der Aminosäure am N-Terminus unterschieden (Bachmair et al., 1986; Bachmair und Varshavsky, 1989). Um den Verbleib bzw. die Menge der exprimierten  $\beta$ -Galactosidase zu bestimmen, wandten die Autoren die *pulse-chase*-Technik oder ein Verfahren zur Analyse der enzymatischen Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase an. In Abhängigkeit von der am N-Terminus befindlichen Aminosäure wurden Halbwertszeiten zwischen zwei Minuten und zwanzig Stunden ermittelt. Befand sich eine Aspartat-Rest am N-Terminus der  $\beta$ -Galactosidase betrug die Halbwertszeit *in vivo* drei Minuten. Es wäre denkbar, daß die für die

Hefe *S. cerevisiae* geltenden Beobachtungen auf die artverwandte Hefe *P. pastoris* übertragbar sind. Dadurch wäre eine Erklärung für die auffallend geringen Expressionsraten der hADAM 15-Fragmente in der *P. pastoris* gefunden.

Bei der heterologen Expression der Proformen von hADAM 15 in *P. pastoris* wurde beobachtet, daß die Pro-Domäne proteolytisch fragmentiert wird und einen nicht kovalenten Komplex mit der MP-Domäne bildet. Diese beiden Vorgänge schienen unabhängig von einer Spaltung, der zwischen der Pro- und MP-Domäne befindlichen Furin-Spaltstelle zu sein (Abb. 5.2). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der heterologen Expression des gesamten mADAM 15 in COS-7-Zellen beschrieben (Lum et al., 1998), doch auch die Pro-Domänen von hADAM 12 und hADAM 17 zeigen eine Komplexbildung mit der dazugehörigen MP-Domäne (Milla et al., 1999; Loechel et al., 2000). Milla und Kollegen untersuchten den Einfluß der Disintegrin- und Cystein-reichen Domäne auf die Abspaltung der Pro-Domäne von hADAM 17. Die Autoren exprimierten verschiedene Deletionsmutanten von hADAM 17 in Insektenzellen und führten Western-Blot-Analysen der Kulturüberstände und der Zellysate durch, wobei sie einen spezifischen Antikörper, der gegen die MP-Domäne von hADAM 17 gerichtet war, verwendeten. Hierbei konnten sie zeigen, daß die Pro-Domäne nur bei Anwesenheit der Disintegrin- und Cystein-reichen Domäne von der MP-Domäne dissoziierte. Bei dem Versuch die Pro-Domäne allein zu exprimieren konnten keine Hinweise auf eine Expression gefunden werden und bei dem Versuch nur der MP-Domäne zu exprimieren gelang nur der Nachweis zellassoziierter Fragmente, die auf eine intrazelluläre Degradation hindeuteten (Milla et al., 1999). Aus diesen und den eigenen Untersuchungen läßt sich schließen, daß die Pro-Domäne essentiell an der intrazellulären Prozessierung von hADAM 17 und hADAM 15 beteiligt ist, denn die alleinige Expression der MP-Domäne von hADAM 15 gelang - in Analogie zur Expression der MP-Domäne von hADAM 17 in Insektenzellen - in *P. pastoris* ebenfalls nicht. Doch im Gegensatz zu Insektenzellen, die die heterologe Expression der Ecto-Domäne von hADAM 17 ermöglichten (Milla et al. 1999), gelang die heterologe Expression der Ecto-Domäne von hADAM 15 in *P. pastoris* nicht. Es ließen sich keine Sekretionsprodukte im Kulturüberstand sondern nur eine unprozessierte Form der Ecto-Domäne intrazellulär nachweisen. Keines der hier etablierten *P. pastoris*-Expressionssysteme ermöglichte einen Zugang zu vollständig prozessierten hADAM 15-Fragmenten, bei denen die Pro-Domäne nicht mit der MP-Domäne komplexiert war. Es wurde deshalb versucht die Pro-Domäne bei chromatographischen Reinigungsverfahren mit dena-

turierenden Reagenzien zu entfernen. Allerdings konnte keines der getesteten Reagenzien (z.B. Harnstoff, Triton X-100, SDS, Ethanol) zu einer Dissoziation, des anscheinend sehr stabilen Komplexes zwischen Pro- und MP-Domäne, beitragen. Dieser stabile Komplex, die proteolytische Fragmentierung der Pro-Domäne und auch die Beteiligung der daraus resultierenden Pro-Domänen-Fragmente bei der Bildung des Komplexes verhinderten neben der nicht quantitativen Spaltung der Furin-Spaltstelle in den exprimierten Proformen und den allgemein geringen Expressionsraten der hADAM 15-Fragmente die Etablierung effektiver chromatographischer Reinigungsverfahren.

Deshalb wurden zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von hADAM 15 ungereinigte Hefekulturüberstände verwendet. Hierbei kamen neben der potentiell proteolytisch aktiven Form der betreffenden hADAM 15-Fragmente und den dazu korrespondierenden E349A-Kontrollmutanten auch Leervektorkontrollen, der zur heterologen Expression verwendeten *P. pastoris*-Stämme, zum Einsatz. Keines der zur Analyse eingesetzten Substrate (Tab. 4.6) wurde durch die rekombinanten hADAM 15-Fragmente gespalten, auch nicht nach - insofern es sich um die Proformen handelte - Aktivierung mit  $\text{HgCl}_2$ , APMA, Trypsin oder Furin. Auffällig war jedoch, daß die Aktivität einer konstitutiv im Hefestamm KM71 exprimierten und in den Kulturüberstand sezernierten Proteinase unterdrückt wurde, wenn gleichzeitig die hADAM 15-ProMP exprimiert wurde. Diese *P. pastoris*-Proteinase hat ein Molekulargewicht von 80 kDa und zeigt proteolytische Aktivität gegenüber Gelatin, dem fluorogenen MMP2/MMP7-Substrat und gegenüber der Insulin-B-Kette. Bei Expression der Kontrollmutante (ProMP, E349A) konnte die Aktivität dieser *P. pastoris*-Proteinase analog zur Leervektorkontrolle beobachtet werden.

Es wäre möglich, daß diese *P. pastoris*-Proteinase durch die potentiell proteolytisch aktive MP (intrazellulär aus der ProMP entstanden) gespalten und dadurch inaktiviert wurde. Dies wäre der erste Hinweis auf eine proteolytische Aktivität von hADAM 15. Eine Identifizierung der *P. pastoris*-Proteinase war bisher nicht möglich. Interessant wäre die Analyse der möglicherweise durch die hADAM 15-MP generierten Spaltprodukte durch N-terminale Aminosäuresequenzierung, da somit Informationen zur Spaltstellenspezifität der hADAM 15-MP erhalten werden könnten. Da durch Zymographie keinerlei Spaltung von MMP-typischen Substrate (Gelatin,  $\alpha$ -Casein,  $\beta$ -Casein, Plasma-Fibronektin und die Kollagene Typ I, II, III, VI, VII) durch hADAM

15 beobachtet werden konnte, ist zu vermuten, daß die Funktion von hADAM 15 eher das *shedding* membrangebundener Proteine als die Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix ist.

### 5.3 Die Disintegrin-Domäne

Das hADAM 15 weist im Vergleich zu allen anderen Vertretern der ADAMs die Besonderheit auf, daß es innerhalb der Disintegrin-Domäne die Aminosäuresequenz RGD enthält. Dieses RGD-Sequenz findet sich sowohl bei Schlangengift-Disintegrinen als auch bei Bestandteilen der extrazellulären Matrix (z.B. in Fibronectin oder Vitronectin) und vermittelt die Wechselwirkung dieser Proteine mit Integrinen. Die Existenz des RGD-Motives innerhalb der Disintegrin-Domäne von hADAM 15 läßt somit eine Interaktion von hADAM 15 mit Integrinen vermuten. In der Tat konnte eine RGD-abhängige Interaktion von hADAM 15 mit den Integrinen  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  gezeigt werden (Zhang et al., 1998; Nath et al., 1999). Eine RGD-unabhängige Interaktion mit dem Integrin  $\alpha 9\beta 1$  konnte zusätzlich gezeigt werden (Eto et al., 2000). Diese Ergebnisse wiesen auf eine adhäsionsvermittelnde Funktion von hADAM 15 bei Zell-Zell-Kontakten hin. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob hADAM 15 als endogener Integrinantagonist die Adhäsion von humanen Ovarialkarzinomzellen an eine Vitronectin-Matrix unterbindet.

Zur Charakterisierung der integrinantagonistischen Eigenschaften von hADAM 15 wurde die heterologe Expression der Ecto-Domäne (Ecto RGD) und die des gesamten Enzyms (*full length* RGD) in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 etabliert. Um die Funktion des RGD-Motives bei der Unterbrechung der Zell-Matrix-Interaktion zu evaluieren sind zwei zusätzliche Mutanten (Ecto SGA und *full length* SGA), in denen das RGD-Motiv gegen ein SGA-Motiv ausgetauscht war, etabliert worden. Die zu den Untersuchungen verwendeten OV-MZ-6-Zellen wurden auf Vitronectin kultiviert, welches der bestimmende Ligand für das in dieser Zelllinie exprimierte Integrin  $\alpha v\beta 3$  ist. Eine Überexpression der RGD-Formen (Ecto RGD und *full length* RGD) führte im Vergleich zu den SGA-Mutanten (Ecto SGA und *full length* SGA) zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion und Proliferation der OV-MZ-6-Zellen auf Vitronectin. Es wäre denkbar, daß die Verminderung der Adhäsion durch die Interaktion von hADAM 15 mit dem Integrin  $\alpha v\beta 3$  hervorgerufen wird. Die Folgen einer derartigen Interaktion

von hADAM 15 mit dem Integrin  $\alpha v \beta 3$  könnten bei Endothelzellen die Inhibierung der Angiogenese oder der Induktion apoptotischer Vorgänge sein. Beispielsweise konnte für Accutin, ein RGD-Disintegrin aus dem Gift von *A. acutus* gezeigt werden, daß es spezifisch an das Integrin  $\alpha v \beta 3$  auf HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) bindet und dadurch die für die Angiogenese wichtige Kapillarbildung inhibiert. Des weiteren induziert Accutin die apoptotische DNA-Fragmentierung in HUVECs (Yeh et al., 1998). Möglicherweise könnten solche Vorgänge auch durch hADAM 15, welches konstitutiv in HUVECs exprimiert wird (Herren et al., 1997) unter bestimmten Bedingungen ausgelöst werden. Die Beobachtung, daß hADAM 15 die Adhäsion von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix inhibiert erlaubt die Annahme, daß hADAM 15 an einer verstärkten Disseminierung von Ovarialkarzinomzellen in das Peritoneum und Organe des kleinen Beckens beteiligt sein könnte, wodurch dort von neuem Metastasen entstehen könnten. Ob es sich bei der Verminderung der Proliferationsrate um einen rein adhäsiven Effekt handelte konnte bisher nicht geklärt werden. Es wäre beispielsweise denkbar, daß hADAM 15 aufgrund seiner Fähigkeit mit SH3-Domänen-tragenden Proteinen zu interagieren (Howard et al., 1999) Signaltransduktionswege beeinflußt, die an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt sind.

## 6 Literatur

Abbaszade, I., Liu, R. Q., Yang, F., Rosenfeld, S. A., Ross, O. H., Link, J. R., Ellis, D. M., Tortorella, M. D., Pratta, M. A., Hollis, J. M., Wynn, R., Duke, J. L., George, H. J., Hillman, M. C. Jr., Murphy, K., Wiswall, B. H., Copeland, R. A., Decicco, C. P., Bruckner, R., Nagase, H., Itoh, Y., Newton, R. C., Magolda, R. L., Trzaskos, J. M., Burn, T. C. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J. Biol. Chem.* **274**(33), 23443-23450 (1999)

Adham, I. M., Kim, Y., Shamsadin, R., Heinlein, U. A. O., Von Beust, G., Mattei, M. G., Engel, W. Molecular cloning, chromosomal localization, and expression analysis of CYRN1 and CYRN2, two human genes coding for cyritestin, a sperm protein involved in gamete interaction. *DNA Cell Biol.* **17**(2), 161-168 (1998)

Albeda, S. M., Mette, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C. A. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta 3$  subunit with tumor progression. *Cancer Res.* **50**, 6757-6764 (1991)

Alfandari, D., Wolfsberg, T. G., White, J. M., DeSimone, D. W. ADAM 13: a novel ADAM expressed in somitic mesoderm and neural crest cells during *Xenopus laevis* development. *Dev. Biol.* **182**(2), 314-330 (1997)

Almeida, E. A., Huovila, A. P., Sutherland, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D. G. Mouse egg integrin  $\alpha 6\beta 1$  functions as a sperm receptor. *Cell* **81**(7), 1095-1104 (1995)

Amersham Pharmacia Biotech. Affinity Chromatography - Principles and Methods. **Edition AB** (1998)

Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., Docherty, A. J. P., Murphy, G. TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* **435**(1), 39-44 (1998)

Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knäuper, V., Docherty, A. J., Murphy, G. The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* **473**(3), 275-279 (2000)

Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96), 223-230 (1973)

Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. *In Vivo* Half-Life of a Protein Is a Fusion of Its Amino-Terminal Residue. *Science* **234**, 179-186 (1986)

Bachmair, A. und Varshavsky, A. The Degradation Signal in a Short-Lived Protein. *Cell* **56**, 1019-1032 (1989)

Bazzoni, F. und Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* **334**(26), 1717-1725 (1996)

Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M. S., Almeida, E. A., Osbourne, L., White, J. M. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin  $\beta$ ) and murine eggs. Role of the  $\alpha 6$  integrin subunit. *J. Biol. Chem.* **275**(16), 11576-11584 (2000)

Bio-Rad. Protein Blotting - A Guide to Transfer and Detection. **Second Edition** (1998)

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. *Crit. Rev. in Oral. Biol. Med.* **4**(2), 197-250 (1993)

Bjarnason, J. B. und Fox, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins. *Methods Enzymol.* **248**, 345-368 (1995)

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N.,

- Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **385(6618)**, 729-733 (1997)
- Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P., White, J. M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252 (1992)
- Blobel, C. P. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev. Reprod.* **5(2)**, 75-83 (2000)
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., Stöckler, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins. *FEBS Lett.* **331(1,2)**, 134-140 (1993)
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 639-652 (1999)
- Böhm, B. B., Aigner, T., Gehrsitz, A., Blobel, C. P., Kalden, J. R., Burkhardt, H. Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **42(9)**, 1946-1950 (1999)
- Bosse, F., Petzold, G., Greiner-Petter, R., Pippirs, U., Gillen, C., Muller, H. W. Cellular localization of the disintegrin CRII-7/rMDC15 mRNA in rat PNS and CNS and regulated expression in postnatal development and after nerve injury. *Glia* **32(3)**, 313-327 (2000)
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., Israel, A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell.* **5(2)**, 207-216 (2000)
- 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. *Anal. Biochem.* **205(2)**, 263-270 (1992)
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A. Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273(43)**, 27765-27767 (1998)
- Byzova, T. V., Rabbani, R., D'Souza, S. E., Plow, E. F. Role of integrin  $\alpha v \beta 3$  in vascular biology. *Thromb. Haemost.* **80(5)**, 726-734 (1998)
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., Reeves, W. J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 661-674 (1974)
- Cal, S., Freije, J. M., Lopez, J. M., Takada, Y., Lopez-Otin, C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the  $\alpha v \beta 3$  integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* **11(4)**, 1457-1469 (2000)
- Cal, S., Argüelles, J. M., Fernández, P. L., López-Otin, C. Identification, characterization and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J. Biol. Chem.* (2001) im Druck
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942 (1987)
- Cereghino, J. L. und Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45-66 (2000)

- Cerretti, D. P., Poindexter, K., Castner, B. J., Means, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Black, R. A., Nelson, N. Characterization of the cDNA and gene for mouse tumour necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme (TACE/ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25. *Cytokine* **11(8)**, 541-551 (1999a)
- Cerretti, D. P., DuBose, R. F., Black, R. A., Nelson, N. Isolation of two novel Metalloproteinase-Disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 810-815 (1999b)
- Chen, H., Sampson, N. S. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg  $\alpha 6\beta 1$  integrin is the receptor for sperm fertilin  $\beta$ . *Chem. Biol.* **6(1)**, 1-10 (1999a)
- Chen, M. S., Almeida, E. A., Huovila, A. P., Takahashi, Y., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., White, J. M. Evidence that distinct states of the integrin  $\alpha 6\beta 1$  interact with laminin and an ADAM. *J. Cell Biol.* **144(3)**, 549-561 (1999b)
- Chen, M. S., Tung, K. S., Coonrod, S. A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P. W., Herr, J. C., White, J. M. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin  $\alpha 6\beta 1$ : implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96(21)**, 11830-11835 (1999c)
- Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J.-E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P., Myles, D. G. Fertilization defects in sperm form mice lacking fertilin  $\beta$ . *Science* **281**, 1857-1859 (1998)
- Choi, S. J., Han, J. H., Roodman, G. D. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J. Bone Miner. Res.* **16(5)**, 814-822 (2001)
- Chubinskaya, S., Cs-Szabo, G., Kuettner, K. E. ADAM-10 message is expressed in human articular cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* **46(6)**, 723-729 (1998)
- Clark, M. E., Kelner, G. S., Turbeville, L. A., Boyer, A., Arden, K. C., Maki, R. A. ADAMTS9, a novel member of the ADAM-TS/metallospodin gene family. *Genomics* **67(3)**, 343-350 (2000)
- Clarke, H. R., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Castner, B. J., Huang, C. P., Gerhart, M. J., Johnson, R. S., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., Price, V. L., Black, R. A. Expression and purification of correctly processed, active human TACE catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* **13(1)**, 104-110 (1998)
- Clontech. Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit. **2nd Version** (1994)
- Colige, A., Li, S. W., Sieron, A. L., Nusgens, B. V., Prockop, D. J., Lapiere, C. M. cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(6)**, 2374-2379 (1997)
- Condon, T. P., Flournoy, S., Sawyer, G. J., Baker, B. F., Kishimoto, T. K., Bennett, C. F. ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **11(2)**, 107-116 (2001)
- Cornwall, G. A., Hsia, N. ADAM7, a member of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) gene family is specifically expressed in the mouse anterior pituitary and epididymis. *Endocrinology* **138(10)**, 4262-4272 (1997)
- Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T., Alfandari, D. PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. *Dev. Biol.* **227(1)**, 197-210 (2000)
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., Raschke, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)* **11(8)**, 905-910 (1993)

- Dallas, D. J., Genever, P. G., Patton, A. J., Millichip, M. I., McKie, N., Skerry, T. M. Localization of ADAM10 and notch receptors in bone. *Bone* **25(1)**, 9-15 (1999)
- Doedens, J. R. und Black, R. A. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **275(19)**, 14598-14607 (2000)
- Edman, P., Begg, G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1(1)**, 80-91 (1967)
- Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., Gingeras, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.* **5(5)**, 1111-1121 (1985)
- Emi, M., Katagiri, T., Harada, Y., Saito, H., Inazawa, J., Ito, I., Kasumi, F., Nakamura, Y. A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. *Nature Gen.* **5**, 151-157 (1993)
- Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X. P., Takada, Y. RGD-independent binding of integrin  $\alpha 9\beta 1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* **275(45)**, 34922-34930 (2000)
- Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M., Goodman, C. S. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(23)**, 13233-13238 (1996)
- Frayne, J. und Hall, L. The gene for the human tMDC I sperm surface protein is non-functional: implications for its proposed role in mammalian sperm-egg recognition. *Biochem. J.* **334(1)**, 171-176 (1998a)
- Frayne, J., Jury, J. A., Barker, H. L., Perry, A. C., Jones, R., Hall, L. Macaque MDC family of proteins: sequence analysis, tissue distribution and processing in the male reproductive tract. *Mol. Hum. Reprod.* **4(5)**, 429-437 (1998b)
- Frayne, J., Dimsey, E. A. C., Jury, J. A., Hall, L. Transcripts encoding the sperm surface protein tMDC II are non-functional in the human. *Biochem. J.* **341(3)**, 771-775 (1999)
- Fritsche, J., Moser, M., Faust, S., Peuker, A., Buttner, R., Andreesen, R., Kreutz, M. Molecular cloning and characterization of a human metalloprotease disintegrin - a novel marker for dendritic cell differentiation. *Blood* **96(2)**, 732-739 (2000)
- Galliano, M. F., Huet, C., Frygeliuss, J., Polgren, A., Wewer, U. M., Engvall, E. Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein,  $\alpha$ -actinin-2, is required for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* **275(18)**, 13933-13939 (2000)
- Gill, S. C. und Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182(2)**, 319-326 (1989)
- Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M.-G., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. A novel, secreted form of human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) provokes myogenesis *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273(1)**, 157-166 (1998)
- Grams, F., Huber, R., Kress, L. F., Moroder, L., Bode, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* **335(1)**, 76-80 (1993)
- Grinna, L. S. und Tschopp, J. F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5(2)**, 107-115 (1989)
- Hamilton, T. C., Young, R. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., Green, J. A., Chu, E. W., Whang-Peng, J., Rogan, A. M., Green, W. R., Ozols, R. F. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* **43(11)**, 5379-5389 (1983)

- Hardy, E., Pupo, E., Castellanos-Serra, L., Reyes, J., Fernández-Patrón, C. Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc an imidazol salts. *Anal. Biochem.* **244**, 28-32 (1997)
- Herren, B., Raines, E. W., Ross, R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells *in vivo*. *FASEB* **111(2)**, 173-180 (1997)
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77(1)**, 51-59 (1989)
- Hougaard, S., Loechel, F., Xu, X., Tajima, R., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275(2)**, 261-267 (2000)
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., Glynn, P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloproteinase expressed in various cell types. *Biochem. J.* **317**, 45-50 (1996)
- Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A., Blobel, C. P. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* **274(44)**, 31693-31699 (1999)
- Howard, L., Maciewicz, R. A., Blobel, C. P. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J.* **348(1)**, 21-27 (2000)
- Howard, L., Zheng, Y., Horrocks, M., Maciewicz, R. A., Blobel, C. P. Catalytic activity of ADAM28. *FEBS Lett.* (2001) im Druck
- Hurskainen, T. L., Hirohata, S., Seldin, M. F., Apte, S. S. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases - General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J. Biol. Chem.* **274(36)**, 25555-25563 (1999)
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F., Wewer, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) supports tumor cell adhesion. *Am. J. Pathol.* **154(5)**, 1489-1501 (1999)
- Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kraetzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y. M., Baron, R., Blobel, C. P. Cloning and initial characterization of mouse meltrin  $\beta$  and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* **273(7)**, 4180-4187 (1998)
- Invitrogen. *Pichia EasyComp™ Kit* - For the preparation and transformation of competent *Pichia* cells. **Version B** (1999)
- Invitrogen. *Pichia Expression Kit* - A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Version L** (2000b)
- Invitrogen. TOPO TA Cloning® - Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products. **Version K** (2000a)
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-g/ADAM9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17(24)**, 7260-7272 (1998)
- Jia, L.-G., Shimokawa, K.-I., Bjarnason, J. B., Fox, J. W. Snake venom metalloproteinases: Structure, Function, and Relationship to the ADAMs Family of Proteins. *Toxicon* **34(11/12)**, 1269-1276 (1996)
- Jiang, W. und Bond, J. S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* **312(2,3)**, 110-114 (1992)

- Jury, J. A., Frayne, J., Hall, L. The human fertilin  $\alpha$  gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem. J.* **321**, 577-581 (1997)
- Jury, J. K., Frayne, J., Hall, L. Sequence analysis of a variety of primate fertilin  $\alpha$  genes: Evidence for non-functional genes in the gorilla and man. *Mol. Reprod. Dev.* **51(1)**, 92-97 (1998)
- Kärkkäinen, I., Karhu, R., Huovila, A.-P. J. Assignment of the ADAM 15 gene to human chromosome band 1q21.3 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**, 206-207 (2000)
- Kang, Q., Cao, Y., Zolkiewska, A. Metalloproteinase-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem. J.* **352**, 883-892 (2000)
- Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., Brew, K. TIMP-3 Is a Potent Inhibitor of ADAM-TS4 (Aggrecanase 1) and ADAM-TS5 (Aggrecanase 2). *J. Biol. Chem.* (2001) im Druck
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an  $\alpha$ -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **343**, 371-375 (1999)
- Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., Thill, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5(3)**, 167-177 (1989)
- Krätzschmar, J., Lum, L., Blobel, C. P. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J. Biol. Chem.* **271(9)**, 4593-4596 (1996)
- Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., Matsushima, K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs and an inflammation associated gene. *J. Biol. Chem.* **272(1)**, 556-562 (1997)
- Kuno, K. und Matsushima, K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.* **273(22)**, 13912-13917 (1998)
- Kuno, K., Terashima, Y., Matsushima, K. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **274(26)**, 18821-18826 (1999)
- Kuno, K., Okada, Y., Kawashima, H., Nakamura, H., Miyasaka, M., Ohno, H., Matsushima, K. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* **478(3)**, 241-245 (2000)
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**, 680-685 (1970)
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3922-3927 (1999)
- Landegren, U. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* **67**, 379-388 (1984)
- Lee, M. H., Knäuper, V., Becherer, J. D., Murphy, G. Full-length and N-TIMP-3 display equal inhibitory activities toward TNF- $\alpha$  convertase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280(3)**, 945-950 (2001)
- Li, S. W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G. C., Langsjö, T. K., Hyttinen, M. M., Helminen, H. J., Prockop, D. J. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *Biochem. J.* **355(Pt 2)**, 271-278 (2001)

- Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501 (1998)
- Linder, B. und Heinlein, U. A. Decreased in vitro fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. *Dev. Growth Differ.* **39**(2), 243-247 (1997)
- Liu, L. und Smith, J. W. Identification of ADAM 31: a protein expressed in Leydig cells and specialized epithelia. *Endocrinology* **141**(6), 2033-2042 (2000)
- Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. Human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **273**(27), 16993-16997 (1998)
- Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain - Evidence for a functional, cysteine switch. *J. Biol. Chem.* **274**(19), 13427-13433 (1999)
- Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R., Wewer, U. M. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 511-515 (2000)
- Lum, L., Reid, M. S., Blobel, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**(40), 26236-26247 (1998)
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., Blobel, C. P. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**(19), 13613-13618 (1999)
- Lunn, C. A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P. J., Narula, S. K., Lundell, D. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF $\alpha$  convertase. *FEBS Lett.* **400**, 333-335 (1997)
- Macherey-Nagel. Nucleobond AX - Properties and Applications. **January** (2000b)
- Macherey-Nagel. NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1 - For direct purification of PCR products or DNA fragments from agarose gels. **January** (2000c)
- Macherey-Nagel. NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid - For isolation of high-quality plasmid DNA. **January** (2000a)
- Markland, F. S., Jr. Snake venoms. *Drugs* **54**(Suppl. 3), 1-10 (1997)
- Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Ellestad, G. A., Reddy, P., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Castner, B. J., Davis, R., Clarke, H. R., Petersen, M., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., March, C. J., Paxton, R. J., Black, R. A., Bode, W. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(7), 3408-3412 (1998)
- Matthews, R. T., Gary, S. C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E. C., Hockfield, S. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J. Biol. Chem.* **275**(30), 22695-22703 (2000)
- McCulloch, D. R., Harvey, M., Herington, A. C. The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. *Mol. Cell Endocrinol.* **167**(1-2), 11-21 (2000)
- McKie, N., Edwards, T., Dallas, D. J., Houghton, A., Stringer, B., Graham, R., Russel, G., Croucher, P. I. Expression of members of a novel membrane linked metalloproteinase family (ADAM) in human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 335-339 (1997)

- Milla, M. E., Leesnitzer, M. A., Moss, M. L., Clay, W. C., Carter, H. L., Miller, A. B., Su, J. L., Lambert, M. H., Willard, D. H., Sheeley, D. M., Kost, T. A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R. K., Pahel, G. L., Mitchell, J. L., Hoffman, C. R., Becherer, J. D. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* **274**(43), 30563-30570 (1999)
- Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E. X., Dale, S., McKie, N. The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**(2), 594-598 (1998)
- Möbus, V., Gerharz, C. D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P. G., Kreienberg, R. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **52**(1), 76-84 (1992)
- Montgomery, A. M. P., Reisfeld, R. A., Cheresch, D. A. Integrin  $\alpha v \beta 3$  rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8856-8860 (1994)
- Moss, M. L., Jin, S. L. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W.-J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffmann, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.-L., Warner, J., Willard, D., Becherer, J. D. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* **385**, 733-736 (1997)
- Muga, A., Neugebauer, W., Hirama, T., Surewicz, W. K. Membrane Interactions and Conformational Properties of the Putative Fusion Peptide of PH-30, a Protein Active in Sperm-Egg Fusion. *Biochemistry* **33**, 4444-4448 (1994)
- Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro*. *DNA. Res.* **4**(2), 141-150 (1997)
- Nakamura, H., Fujii, Y., Inoki, I., Sugimoto, K., Tanzawa, K., Matsuki, H., Miura, R., Yamaguchi, Y., Okada, Y. Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J. Biol. Chem.* **275**(49), 38885-38890 (2000)
- Nakayama, K. Furin: a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635 (1997)
- Nath, D., Slocombe, P. M., Webster, A., Stephens, P. E., Docherty, A. J., Murphy, G. Meltrin  $\gamma$  (ADAM-9) mediates cellular adhesion through  $\alpha 6 \beta 1$  integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *J. Cell Sci.* **113**, 2319-2328 (2000)
- Nelson, K. K., Schlöndorff, J., Blobel, C. P. Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor  $\alpha$  convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with novel MAD2-related protein, MAD2 $\beta$ . *Biochem. J.* **343**, 673-680 (1999)
- Pan, D., Rubin, G. M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**(2), 271-280 (1997)
- Perry, A. C. F., Gichuhi, P. M., Jones, R., Hall, L. Cloning and analysis of monkey fertilin reveals novel a subunit isoforms. *Biochem. J.* **307**, 843-850 (1995)
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**(5392), 1281-1284 (1998)

Pierce. BCA Protein Assay Kit. **October** (1997)

Plantefaber, L. C. und Hynes, R. O. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* **56**, 281-290 (1989)

Podbilewicz, B. ADM-1, a protein with metalloprotease- and disintegrin-like domains, is expressed in syncytial organs, sperm, and sheath cells of sensory organs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **7(12)**, 1877-1893 (1996)

Poindexter, K., Nelson, N., DuBose, R. F., Black, R. A., Cerretti, D. P. The identification of seven metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes from genomic libraries. *Gene* **237(1)**, 61-70 (1999)

Promega. Technical Manual - pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems. **June** (1999)

Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 945-956 (1958)

Qiagen. RNeasy Mini Handbook. **March** (1997a)

Qiagen. Taq PCR Handbook. **May** (1997b)

Qiagen. The QIAexpressionist. **March** (1999)

Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., Black, R. A. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **275(19)**, 14608-14614 (2000)

Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., Corfas, G. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* **275(14)**, 10379-10387 (2000)

Roberts, C. M., Tani, P. H., Bridges, L. C., Laszik, Z., Bowditch, R. D. MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **274(41)**, 29251-29259 (1999)

Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P., Blobel, C. P. Metalloprotease-disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274(6)**, 3531-3540 (1999)

Rosendahl, M. S., Ko, S. C., Long, D. L., Brewer, M. T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S. M., Moreland, J., Meyers, M. A., Kohno, T., Lyons, D., Lichenstein, H. S. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- $\alpha$ -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **272(39)**, 24588-24593 (1997)

Sagane, K., Ohya, Y., Hasegawa, Y., Tanaka, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem. J.* **334(1)**, 93-98 (1998)

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

Satoh, K., Suzuki, N., Yokota, H. ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is transcriptionally induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* **289(3)**, 177-180 (2000)

Schägger, H., von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166(2)**, 368-379 (1987)

- Schlöndorff, J. und Blobel, C. P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* **112(21)**, 3603-3617 (1999)
- Schlöndorff, J., Becherer, J. D., Blobel, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor  $\alpha$  convertase (TACE). *Biochem. J.* **347(1)**, 131-138 (2000)
- Schoenle, E. J., Adams, L. D., Sammons, D. W. Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **259(19)**, 12112-12116 (1984)
- Schwettmann, L. und Tschesche, H. Cloning and Expression in *Pichia pastoris* of Metalloprotease Domain of ADAM 9 Catalytically Active against Fibronectin. *Protein Expr. Purif.* **21(1)**, 65-70 (2001)
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136(1-2)**, 111-119 (1993)
- Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U. M., Murphy, L. J. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* **275(24)**, 18574-18580 (2000)
- Shilling, F. M., Kratzschmar, J., Cai, H., Weskamp, G., Gayko, U., Leibow, J., Myles, D. G., Nuccitelli, R., Blobel, C. P. Identification of metalloprotease/disintegrins in *Xenopus laevis* testis with a potential role in fertilization. *Dev. Biol.* **186(2)**, 155-164 (1997)
- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashi, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y., Matsushima, K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105(10)**, 1345-1352 (2000)
- Sotillos, S., Roch, F., Campuzano, S. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in *Notch* activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* **124(23)**, 4769-4779 (1997)
- Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y., White, J. M. Sequence-Specific Interaction between the Disintegrin Domain of Mouse ADAM 3 and Murine Eggs: Role of  $\beta$ 1 Integrin-associated Proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol. Biol. Cell* **12(4)**, 809-820 (2001)
- Tang, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33(1)**, 33-44 (2001)
- Tortorella, M. D., Burn, T. C., Pratta, M. A., Abbaszade, I., Hollis, J. M., Liu, R., Rosenfeld, S. A., Copeland, R. A., Decicco, C. P., Wynn, R., Rockwell, A., Yang, F., Duke, J. L., Solomon, K., George, H., Bruckner, R., Nagase, H., Itoh, Y., Ellis, D.M., Ross, H., Wiswall, B. H., Murphy, K., Hillman, M. C. Jr., Hollis, G. F., Arner, E. C. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* **284(5420)**, 1664-1666 (1999)
- Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R. Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T., Arner, E. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J. Biol. Chem.* **275(33)**, 25791-25797 (2000)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76(9)**, 4350-4354 (1979)
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., Gingeras, T. R. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15(9)**, 3859-3876 (1987)
- van Huijsduijnen, R. H. ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin  $\alpha$ . *Gene* **206**, 273-282 (1998)

van Wart, H. E. und Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5578-5582 (1990)

Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M., Iruela-Arispe, M. L. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* **274(33)**, 23349-23357 (1999)

Veenhuis, M., Van Dijken, J. P., Harder, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **24**, 1-82 (1983)

Waters, S. I., White, J. M. Biochemical and molecular characterization of bovine fertilin  $\alpha$  and  $\beta$  (ADAM 1 and ADAM 2): A candidate sperm-egg binding/fusion complex. *Biol. Reprod.* **56(5)**, 1245-1254 (1997)

Wei, P., Zhao, Y. G., Zhuang, L., Ruben, S., Sang, Q. X. Expression and enzymatic activity of human disintegrin and metalloproteinase ADAM19/meltrin beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280(3)**, 744-755 (2001)

Weskamp, G., Krätzschmar, J., Reid, M. S., Blobel, C. P. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* **132(4)**, 717-726 (1996)

Wessel, D. und Flügge, U. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143 (1984)

Wolfsberg, T. G., Bazan, J. F., Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., White, J. M. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloproteinase and a disintegrin domain: Structural, functional and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10783-10787 (1993)

Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P. J., Primakoff, P., Myles, D. G., White, J. M. ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with A Disintegrin And Metalloprotease Domain. *Dev. Biol.* **169**, 378-383 (1995)

Wolfsberg, T. G. und White, J. M. ADAM metalloproteinases. *Handbook of Proteolytic Enzymes* **447**, 1310-1313 (1998)

Wu, E., Croucher, P. I., McKie, N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235(2)**, 437-442 (1997)

Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y.-I., Fujisawa-Sehara, A. A metalloproteinase-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* **377**, 652-656 (1995)

Yeh, C. H., Peng, H. C., Yih, J. B., Huang, T. F. A new short chain RGD-containing disintegrin, accutin, inhibits the common pathway of human platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 493-504 (1998)

Yoshiyama, K., Higuchi, Y., Kataoka, M., Matsuura, K., Yamamoto, S. CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics* **41(1)**, 56-62 (1997)

Yuan, R. Y., Primakoff, P., Myles, D. G. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J. Cell Biol.* **137(1)**, 105-112 (1997)

Zhang, X. P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin  $\alpha v \beta 3$ . *J. Biol. Chem.* **273(13)**, 7345-7350 (1998)

Zhang, Z., Kolls, J. K., Oliver, P., Good, D., Schwarzenberger, P. O., Joshi, M. S., Ponthier, J. L., Lancaster, J. R. Jr. Activation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **275(21)**, 15839-15844 (2000)

Zhao, J., Chen, H., Peschon, J. J., Shi, W., Zhang, Y., Frank, S. J., Warburton, D. Pulmonary Hypoplasia in Mice Lacking Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme Indicates an Indispensable Role for Cell Surface Protein Shedding during Embryonic Lung Branching Morphogenesis. *Dev. Biol.* **232(1)**, 204-218 (2001)

Zhou, M., Graham, R., Russell, G., Croucher, P. I. MDC-9 (ADAM-9/Meltrin  $\gamma$ ) Functions as an Adhesion Molecule by Binding the  $\alpha v \beta 5$  Integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280(2)**, 574-580 (2001)

Zhu, G. Z., Lin, Y., Myles, D. G., Primakoff, P. Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene* **234(2)**, 227-237 (1999)

Zhu, X., Bansal, N. P., Evans, J. P. Identification of key functional amino acids of the mouse fertilin  $\beta$  (ADAM2) disintegrin loop for cell-cell adhesion during fertilization. *J. Biol. Chem.* **275(11)**, 7677-7683 (2000)

## Lebenslauf

### Personendaten

Name: **Harald-Gerhard Geppert**  
Geburtsort: Bielefeld  
Geburtsdatum: 11. August 1971  
Familienstand: ledig

### Werdegang

08/1978 - 06/1982 Grundschule ("Klosterschule") in Bielefeld  
08/1982 - 05/1991 Gymnasium ("Marienschule der Ursulinen") in Bielefeld  
05/1991 Abitur  
07/1991 - 06/1992 Wehrdienst  
10/1992 - 03/1998 Universität Bielefeld, Diplomstudiengang Chemie  
07/1997 Mündliche Diplomprüfungen  
07/1997 - 03/1998 Diplomarbeit "Klonierung, Expression und Charakterisierung der Metalloproteinase-Domäne und Disintegrin-Domäne von Fertilin  $\beta$ "  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Tschesche, Bielefeld  
05/1998 - 07/2001 Dissertation "Klonierung, Expression und Charakterisierung der Metalloproteinase-Domäne und Disintegrin-Domäne von humanem ADAM 15"  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Tschesche, Bielefeld  
10/1998 - 07/1999 Universität Bielefeld, Programm "Studierende und Wirtschaft"  
12/2000 - 02/2001 Universität Bielefeld, Programm "Patentrecht"

### Studentische Hilfskrafttätigkeiten

04/1995 - 07/1995 Lehrstuhl für Organische Chemie  
10/1997 - 03/1998 Lehrstühle für Anorganische und Physikalische Chemie

### Nebenbeschäftigung

12/1991 - 07/1998 Textilverkäufer ("Peek & Cloppenburg") in Bielefeld

### Besondere Fähigkeiten

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (fließend)

EDV: MacOS, Windows, UNIX, Photoshop, FrameMaker, CorelDraw, HTML