

**Rekombinantes ADAM 9: Proteolytische
Aktivität und Vorkommen in benignen und
malignen Geweben**

Dissertation

vorgelegt von

Lutz Schwettmann

Prof. Dr. H. Tschesche
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld, Juni 2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Tschesche danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine Bemühungen um den Fortgang dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. Kleesiek für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen sowie für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. med. Hentschel danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonderen Dank für die ständige Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen und Diskussionen:

Martin

Vielen Dank für die ausgezeichnete und einzigartige Arbeitsatmosphäre in F4-270:

Andreas & Andreas, Jörg, Jörn, Madame Hübèl, Martina und Peterchen

Danke für die Hilfestellung in bürokratischen und technischen Fragen:

Herbert, Margot und Rainer

Allerherzlichsten Dank an meine Eltern und „Flo“ für die Unterstützung während des Studiums, das stete Interesse an meiner Arbeit und die aufgebrachte Geduld.

Non lasciare andare i bei tempi !

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1. Die Proteinfamilie der ADAMs	4
2.2. Proteinstruktur und Funktion	6
2.3. ADAMs als Zell-Adhäsionsmoleküle	11
2.4. ADAMs als Sekretasen	13
2.5. ADAM 9	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Molekularbiologische Methoden	19
3.1.1. Reverse Transkription	19
3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion	19
3.1.3. TA-Klonierung	21
3.1.4. Ligation von DNA	21
3.1.5. Spaltung von DNA	21
3.1.6. DNA-Gelelektrophorese	21
3.1.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	22
3.1.8. Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.1.9. Isolierung von RNA aus humanen Zellen	22
3.1.10. Reinigung von DNA	22
3.1.11. DNA-Sequenzierung	23
3.1.12. Transformation von <i>E. coli</i>	23
3.1.13. Transformation von <i>P. pastoris</i>	24
3.1.14. Kultivierung von Zellen	24

3.2. Proteinbiochemische Methoden	
3.2.1. Proteinexpression	26
3.2.2. Isolierung der <i>E. coli</i> -Expressionsprodukte	27
3.2.3. <i>In vitro</i> -Faltung denaturierter rekombinanter Proteine	27
3.2.4. Protein-Konzentrationsbestimmung	29
3.2.5. Ultrafiltration	29
3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	29
3.2.7. Färbung von Gelen	29
3.2.8. Dialyse	30
3.2.9. Western-Blotting	30
3.2.10. Immunologische Detektion von Proteinen	30
3.2.11. Proteinsequenzierung	30
3.2.12. Herstellung polyklonaler Antikörper	31
3.2.13. Antikörper-Reinigung durch Affinitäts-Chromatographie	31
3.2.14. Antikörper-Reinigung durch Immunoaffinitätschromatographie	31
3.2.15. Ionenaustausch-Chromatographie	32
3.2.16. Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	33
3.2.17. Metallchelat-Affinitätschromatographie	33
3.2.18. Zymographie	33
3.2.19. Proteolytische Spaltung von Proteinen	33
3.2.20. Proteolytische Spaltung von Mca-Peptiden	34
3.3. Zellen und Vektoren	35
3.3.1. <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.2. <i>Pichia pastoris</i>	39
3.4. Immunhistochemie	42
3.4.1. Vorbereitung der Schnitte	44
3.4.2. Färbung	45

4. Ergebnisse	46
4.1. Klonierungen	46
4.1.1. Reverse Transkription	46
4.1.2. Klonierung in Expressionsvektoren	47
4.1.3. Mutagenese-PCR	49
4.1.4. Transformation von <i>P. pastoris</i>	50
4.2. Expression	51
4.2.1. Expression der katalytischen Domäne von ADAM 9 in <i>E. coli</i>	51
4.2.2. Präparation des Expressionsproduktes aus <i>E. coli</i>	52
4.2.3. Expression in <i>P. pastoris</i>	53
4.2.4. Reinigung der rekombinanten Proteine	56
4.3. Charakterisierung	59
4.3.1. Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität	59
4.3.2. Untersuchungen zur Aktivität der Metalloprotease-Domäne aus <i>E. coli</i>	59
4.3.3. Untersuchungen zur Aktivität der Metalloprotease-Domäne aus <i>P. pastoris</i>	60
4.3.4. Spaltung von Fibronectin und Plasminogen	62
4.3.5. Quantifizierung der proteolytischen Aktivität	65
4.3.6. Darstellung polyklonaler Antikörper	67
4.4. Immunhistochemische Detektion von ADAM 9 in benignem und malignem Gewebe	70
4.4.1. Mammakarzinom	71
4.4.2. Dickdarm	72
4.4.3. Niere und Nierenzellkarzinom	75
4.4.4. Hoden	77

5. Diskussion	80
5.1. Expression in <i>E. coli</i>	81
5.2. Klonierung und Expression in <i>P. pastoris</i>	82
5.3. Charakterisierung	83
5.4. Immunhistochemie	85
5.5. ADAMs in der Tumor-Metastasierung ?	88
6. Literatur	91

1. Zusammenfassung

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) bilden eine 31 Proteine umfassende Familie von membranständigen Zink-abhängigen Metalloproteasen. Nur 15 der ADAMs besitzen das für die katalytische Aktivität essentielle Zink-Bindungsmotiv und könnten daher potentiell proteolytisch aktiv sein.

Um Einblicke in die Funktion der ADAMs als membranständige Proteasen zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch ein potentiell katalytisch aktives ADAM näher untersucht. Hierzu wurde die katalytische Domäne des humanen ADAM 9 (Meltrin γ) als Modellenzym, stellvertretend für das Gesamtzym, rekombinant dargestellt, charakterisiert und das Vorkommen in Geweben *in vivo* untersucht.

Zu Beginn wurde die cDNA der ADAM 9 Metalloprotease-Domäne mit Propeptid durch reverse Transkription aus einer Prostatakarzinom-Zelllinie dargestellt. Weitere Klonierungsschritte lieferten Plasmide, die zur heterologen sekretorischen Proteinexpression im eukaryontischen Expressionssystem der methyloptrophen Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt wurden. Um bei den angestrebten Aktivitätsstudien zur Charakterisierung des Proteins eine verlässliche Kontrolle zur Verfügung zu haben, wurde zusätzlich durch zielgerichtete Mutagenese-PCR eine inaktive Variante der Metalloprotease-Domäne kloniert. Hierbei führte eine Basensubstitution zu einem Aminosäureaustausch im katalytischen Zentrum, bei dem Glutamat³⁴⁸ durch Alanin ersetzt wurde. Nach Transformation der *P. pastoris*-Stämme X33, KM71 und GS115 konnten beide Varianten der ADAM 9 Metalloprotease-Domäne in *P. pastoris* exprimiert werden. Durch das Pro-Segment des alpha Faktors von *Saccharomyces cerevisiae* als fusioniertem Sekretionssignal wurden die rekombinanten Proteine in sezernierter Form erhalten. Eine Überexpression der 32 kDa großen Proteine wurde dabei ausschließlich bei Zellen des Stamms KM71 beobachtet, wobei die Ausbeute bis zu 6 mg/l betrug.

Die Bestimmung der N-Termini der Expressionsprodukte mittels Edman-Abbau bestätigte eine intrazelluläre Prozessierung der Prodomäne durch eine Furin-ähnliche Protease unmittelbar nach der Pro-Protein-Konvertase Spaltstelle (RRRR²⁰⁵-A²⁰⁶VLPQTRYVE). Die sezernierte 32 kDa große Metalloprotease-Domäne besitzt zwei

potentielle N-Glykosylierungsstellen, die von *P. pastoris* erkannt und mit Zuckerketten versehen wurden. Die zum Vergleich in *E. coli* exprimierte Metalloprotease-Domäne wurde als ca. 8 kDa kleineres Protein (24 kDa) in „inclusion bodies“ intrazellulär abgelagert.

Während die beiden Varianten aus *P. pastoris* anschließend durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose und hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose bis zur Homogenität gereinigt werden konnten, wurde das *E. coli*-Expressionsprodukt durch chromatographische Reinigungsmethoden nicht völlig homogen erhalten.

Für Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität der rekombinant dargestellten Proteine mittels Zymographie wurden humanes Plasmafibronektin, Gelatin und β -Casein als Substrate eingesetzt. Dabei konnte im Fall der Wild-Typ Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris* erstmals katalytische Aktivität gegen alle drei Substrate nachgewiesen werden, wohingegen die mutierte Variante aus *P. pastoris* wie erwartet inaktiv war. Das *E. coli* Expressionsprodukt zeigte im Zymogramm keine Aktivität.

Zusätzlich konnte Plasminogen als Substrat des rekombinanten ADAM 9 identifiziert werden.

Durch fluoreszenzkinetische Untersuchungen mit dem synthetischen fluorogenen TACE-Substrat nach van Dyk konnte die proteolytische Aktivität quantifiziert werden. Dabei berechnete sich die Spezifitätskonstante als k_{cat}/K_M zu $0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Desweiteren diente die Spaltung des fluorogenen Mca-Peptids für qualitative Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die katalytische Aktivität von ADAM 9. Dabei wurde die katalytische Domäne durch den synthetischen Thiadiazin-Inhibitor JST-182 inhibiert, wogegen die natürlichen Metalloprotease-Inhibitoren TIMP-1 und -2 keine und TIMP-4 nur geringe Wirkung zeigten.

Für immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von ADAM 9 in verschiedenen Geweben wurden polyklonale Kaninchen-anti-ADAM 9 Antikörper gegen ein 13 Aminosäuren umfassendes synthetisches Peptid der Metalloprotease-Domäne erzeugt. Diese konnten aus dem Serum durch Affinitätschromatographie an Protein-A Sepharose gereinigt werden. Die Isolierung spezifischer anti-ADAM 9 Antikörper gelang anschließend durch Immunoaffinitätschromatographie an einer Antigensäule, bei der das Peptid als Antigen an eine Säulenmatrix gekoppelt war. Nachdem die Qualität der

immunoaffinitätsgereinigten Antikörper mittels Western-Blot überprüft worden war, wurden diese zur immunhistochemischen Detektion in Gewebeschnitten von Formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben eingesetzt. Zur Kontrolle dienten gereinigte Antikörper aus dem Präimmunserum der Tiere.

Die immunhistochemische Detektion von ADAM 9 in verschiedenen Geweben zeigte in Epithelzellen hauptsächlich ein intrazelluläres Expressionsmuster. In Tumorzellen des Mammakarzinoms sowie in Epithelien der Dickdarmschleimhaut und Endothelien der Gefäßwände des Dickdarms war eine cytoplasmatische Expression von ADAM 9 nachweisbar. Außerdem konnte in Zellen des Blutes ebenfalls eine Immunreaktion im Cytoplasma von Granulozyten, nicht jedoch von Erythrozyten detektiert werden. Immunhistochemische Untersuchungen an Hodengewebe detektierten das Vorkommen von ADAM 9 in Leydig-Zellen. Desweiteren konnte eine vom Stadium der Spermatogenese abhängige Expression in samenbildenden Zellen der Hodenkanälchen festgestellt werden. Hierbei scheinen Spermatogonien ADAM 9 nicht zu exprimieren. Erst in weiter entwickelten Spermatozyten war eine intrazelluläre Expression von ADAM 9 detektierbar.

Ein räumlich begrenztes Expressionsmuster zeigte sich im Nierengewebe. Hier konnte in gesundem Gewebe eine intrazelluläre Lokalisierung in den Epithelien der Tubuli-Übergangsstücke sowie in den Epithelzellen der proximalen Tubuli nachgewiesen werden, die auf diese Zellen beschränkt war. Im Glomerulus (Nierenkörperchen) konnte hingegen kein ADAM 9 detektiert werden. Weder in den Endothelzellen innerhalb des Glomerulus, noch in den Endothelzellen der Glomeruluskapsel war ADAM 9 nachweisbar. Im malignen Nierenzellkarzinom erschien ADAM 9 dagegen ausschließlich auf der Zelloberfläche der entarteten Epithelien und nicht intrazellulär wie bei vergleichbaren benignen Epithelzellen.

2. Einleitung

2.1. Die Proteinfamilie der ADAMs

Für viele biologische Vorgänge ist ein gesteuerter Auf- und Abbau von Makromolekülen der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise sind Wachstum und Entwicklung eines Organismus mit Zellbewegungen sowie mit der Umstrukturierung und Neubildung der extrazellulären Matrix verbunden. Wenn Zellen eine Basalmembran durchdringen, wie zum Beispiel Leukozyten bei der Wanderung in das Gewebe als Antwort auf eine Infektion, ist ein lokal begrenzter Abbau der ECM wahrscheinlich erforderlich. Hierbei bauen proteolytische Enzyme, die von Zellen sezerniert werden, die Bestandteile der ECM ab. Zu den an der Degradierung der extrazellulären Matrix beteiligten Proteasen gehören u.a. die Metalloproteasen, insbesondere die Matrix-Metalloproteasen. Sie spielen aufgrund ihrer breiten Substratspezifität eine wichtige Rolle beim Matrixabbau.

Zusammen mit den Serralysinen, Astazinen und Reprolysinen gehören die Matrix-Metalloproteasen (Matrixine) zur Proteinfamilie der Metzinkine, einer Familie zinkabhängiger Metalloproteasen (Abb. 1; Bode et al., 1993; Stöcker et al. 1995). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie zeichnen sich durch charakteristische strukturelle Gemeinsamkeiten innerhalb des katalytischen Zentrums aus. Allen gemeinsam ist eine zinkbindende Konsensussequenz sowie ein „Met-turn“, ein konservierter Methionin-Rest in der Nähe des katalytischen Metallions. Aufgrund von Strukturhomologien werden die Adamalysine in zwei Proteinfamilien unterteilt, zum einen in die ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), zum anderen in die SVMPs (Snake Venom Metalloproteases), die sich aus löslichen Schlangengift-Proteasen zusammensetzen.

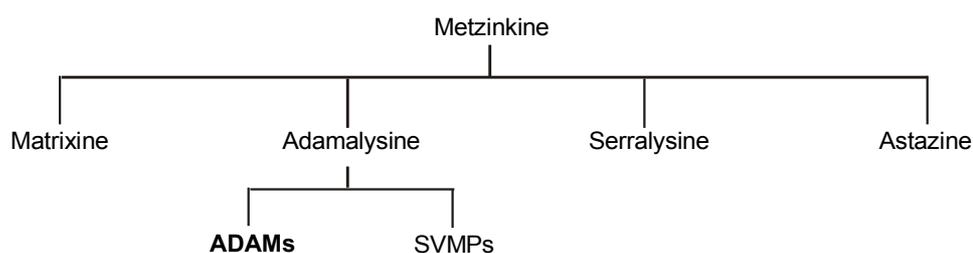


Abb. 1:
Proteinfamilie der
Metzinkine

Die ADAMs bilden eine Gruppe von membranständigen Glykoproteinen. Die charakteristische Domänenstruktur, die zuvor bei einigen Schlangengiften (SVMPs) entdeckt wurde, umfasst eine N-terminale Signalsequenz, welcher eine Prodomäne, eine Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, eine EGF (Epidermal growth factor)-ähnliche Domäne, eine Transmembran-Domäne und letztlich eine Cytoplasmatische Domäne folgen. So vielfältig wie die Domänenstruktur ist, sind auch die damit verbundenen potentiellen Funktionen der ADAMs, zu denen Katalyse, Adhäsion, Signalübertragung und Zellfusion gehören. Vieles, was anfangs über die ADAMs bekannt war, leitete sich aus den bis dahin wesentlich besser charakterisierten SVMPs ab, zu denen sie teilweise hohe strukturelle Homologie aufweisen. Jedoch sind die SVMPs im Gegensatz zu den ADAMs lösliche Proteine, da sie keine Transmembran-Domäne und keinen cytoplasmatischen Teil besitzen (Bjarnason und Fox, 1995).

Die Bezeichnung ADAM (**A** Disintegrin **A**nd **M**etalloprotease) spiegelt die Schlüsseldomänen der Proteinfamilie wieder, mit denen ihre Hauptfunktionen verbunden sind. Die Metalloprotease-Domäne erfüllt proteolytische Aufgaben, wogegen die Disintegrin-Domäne Adhäsionseigenschaften vermittelt. Die Bezeichnung „Disintegrin“ rührt von den verwandten SVMPs her. Die löslichen Schlangengifte binden über ihre „Disintegrin“-Domäne an das Blutplättchen-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und fungieren somit als kompetitiver Inhibitor der Blutplättchenaggregation, was zur Verhinderung der Bindung der Plättchen an Fibrin führt (Gould et al., 1990). Eben auf der Fähigkeit dieser Domäne, die Integrin-Bindung auf den Blutplättchen zu unterdrücken, beruht die Bezeichnung „Disintegrin“.

Die ADAMs wurden erstmals 1992 in Spermien des Meerschweinchens entdeckt. Sie besitzen dort reproduktive Funktionen, insbesondere bei der Spermatogenese und der Fusion von Spermium und Eizelle (Blobel et al., 1992). Bis heute wurden 31 Mitglieder dieser Proteinfamilie in vielen Säugetieren nachgewiesen, daneben aber auch in Nicht-Säugetieren wie *Xenopus*, *Drosophila* und *C.elegans*. In Bakterien und Pflanzen konnten bisher keine ADAMs identifiziert werden (Stone et al., 1999). Die ADAMs sind im Organismus ubiquitär verteilt. Zu finden sind sie u.a. in Spermien, Epididymis, Epithel, Plazenta, Ovar, Brust, Skelettmuskel, Herz, Leber, Niere, Dickdarm, Dünndarm, Gehirn,

Thymus, Lunge, Knochen, Monozyten, Makrophagen und Leukozyten (Wolfsberg et al., 1995; Wolfsberg and White, 1996). Sie sind in verschiedene physiologische Prozesse, wie der Bindung von Spermium und Eizelle sowie deren Fusion, Myoblastenfusion, Prozessierung von Protein-Ektodomänen sowie dem „Shedding“ von extrazellulären Protein-Domänen involviert (Primakoff et al., 1987).

Eingehende Studien an ausgewählten Mitgliedern der Proteinfamilie, insbesondere dem Spermiumoberflächen-Protein Fertilin (ADAM 1 und 2), Cyritestin (ADAM 3), TACE (TNF α -Converting Enzyme, ADAM 17), Kuzbanian (KUZ, ADAM 10) und Meltrin α (ADAM 12) haben gezeigt, daß ADAMs ferner bei der Entwicklung von Nerven und Flügeln in *Drosophila*, bei der Epithelreifung und der Entwicklung von Haut und Haar der Maus, bei der Vulvaentwicklung des Fadenwurms *C. elegans* und bei der Direktion von Axons mitwirken können (Blobel et al., 1992; Heillein et al., 1994; Linder und Heinlein, 1997; Black et al., 1997; Moss et al., 1997; Pan und Rubin, 1997; Sotillos et al., 1997; Wen et al., 1997; Yagami-Hiromasa et al., 1995).

2.2 Proteinstruktur und Funktion

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sowie die Proteolyse der extrazellulären Matrix sind von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus. Während der Embryogenese und Morphogenese müssen Zellen wandern, sich adhären, miteinander interagieren und fusionieren. Hierbei spielen verschiedene Zelloberflächen-Adhäsionsproteine sowie Proteasen entscheidende Rollen. Die Proteine der ADAM-Familie besitzen aufgrund ihrer Domänenstruktur potentielle Funktionen wie Proteolyse und Adhäsion, weshalb sie vielfältig innerhalb des Entwicklungsprozesses eines Organismus sowie dessen Erhaltung eingreifen können (Wolfsberg et al., 1995). Aufgrund großer struktureller Homologie (bis zu 30 %) besitzen sie enge Verwandtschaft zu den SVMPs. Die strukturellen Beziehungen zwischen SVMPs und ADAMs sind in Abbildung 2 dargestellt.

Beide Gruppen besitzen eine Prä Domäne, die als Sekretionssignal dient und eine Prodomäne, welche die katalytische Domäne in einem latenten Zustand hält und bei der Aktivierung prozessiert wird. C-terminal an die Disintegrin Domäne fügt sich die Cystein-reiche Domäne an. Im Gegensatz zu den SVMPs besitzen die membrangebundenen ADAMs zusätzliche C-terminale Domänen, wie die EGF-ähnliche Domäne, die Transmembran-Domäne und die Cytoplasmatische Domäne, über welche die Aktivität der ADAMs möglicherweise reguliert wird (Nelson et al., 1999).

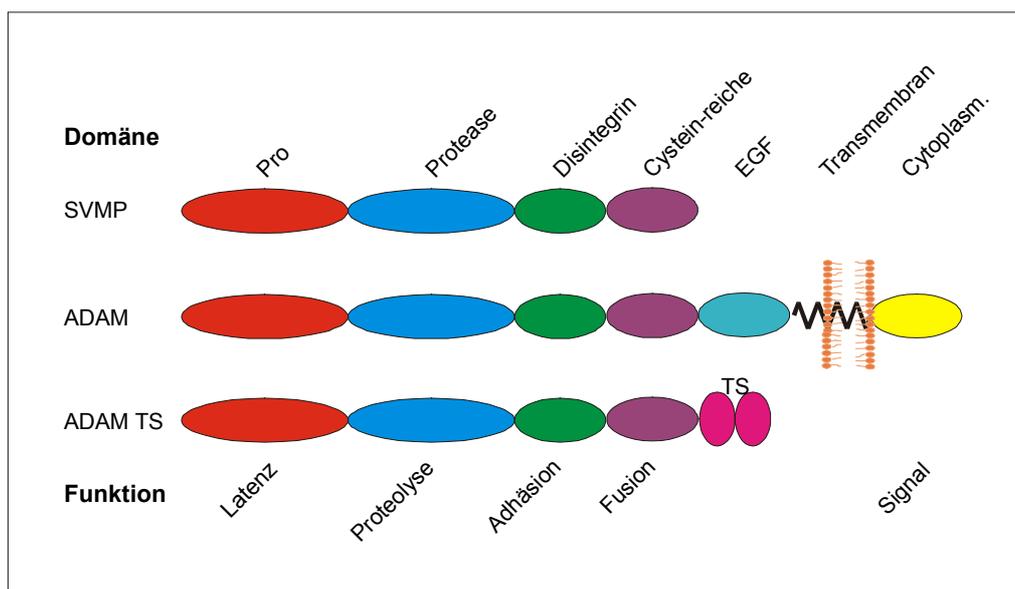


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAMs zum Vergleich mit P III SVMPs und ADAM TS

Neben dem weitaus größten Teil der membranständigen ADAMs sind auch wenige lösliche ADAM-Proteine (ADAM-TS; A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs) bekannt. Diese tragen anstelle der C-terminalen Domänen Thrombospondin Typ I-Motive, weshalb sie nicht auf der Zellmembran verankert werden können und sezerniert werden. Vielmehr binden sie aufgrund des Thrombospondin-Motivs an Moleküle der extrazellulären Matrix und nehmen hier ihre Aufgaben wahr (Kuno et al., 1998).

Wie die Matrix-Metalloproteasen und auch einige SVMPs, besitzen die potentiell katalytisch aktiven ADAMs eine Metalloprotease-Domäne und werden als Zymogene produziert. Ausschlaggebend für den latenten Zustand der Metalloprotease-Domäne ist die Prodomäne, die einen intramolekularen Komplex zwischen der Sulfhydryl-Gruppe eines Cystein-Restes im Propeptid und dem dreifach koordinierten Zink-Ion in der katalytischen Domäne ermöglicht. Die Prodomäne hält die katalytische Domäne auf diese Weise in einem inaktiven Zustand. Mit einem als „cysteine switch“ bekannten Aktivierungsmechanismus kann das Enzym durch Entfernung des Cysteins vom Komplex und der damit verbundenen Konformationsänderung aktiviert werden (van Waart und Birkedal-Hansen, 1990). Außerdem kann eine Aktivierung durch enzymatische Abspaltung des Propeptids erfolgen (Abb. 3).

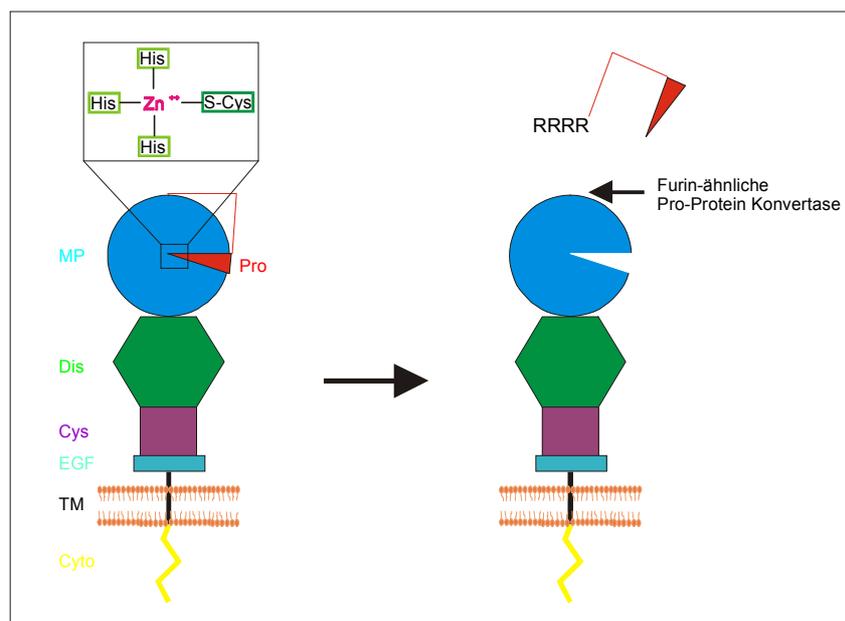


Abb. 3: Modell des Cystein-switch-Mechanismus zur Aktivierung der ADAMs.
 (Pro: Prodomäne, MP: Metalloprotease-Domäne, Dis: Disintegrin-Domäne, Cys: Cystein-reiche Domäne, EGF: Epidermal growth factor-like, TM: Transmembran-Domäne, Cyto: Cytoplasm. Domäne)

Bei einigen ADAMs wurden am C-Terminus der Prodomäne die Aminosäuresequenzen RRRR und RXKR identifiziert, die als Erkennungssequenzen für die Prozessierung der Prodomäne durch eine Furin-ähnliche Pro-Protein-Konvertase gelten (Matthews et al.,

1994). Dieser Mechanismus konnte bereits für die Aktivierung des humanen Meltrin α (ADAM 12) bestätigt werden (Loechel et al., 1998). Desweiteren ist auch eine Pro-Protein-Konvertase an der Entfernung der Prodomäne von ADAM 9 und 15 im trans-Golgi-Apparat der Zelle beteiligt (Roghani et al., 1999; Lum et al., 1998).

Nur 15 der bisher bekannten ADAMs enthalten die Metalloprotease-Domäne mit dem für die Metzinkin-Proteinfamilie charakteristischen Zink-Bindungsmotiv **HEXGHXXGXXHD** und besitzen deshalb potentiell proteolytische Aktivität (Stöcker et al., 1995; Wolfsberg et al., 1995). Hierbei koordinieren die drei Histidin-Reste das Zinkion, während das Glutamat (E) den katalytisch aktiven Rest darstellt. Ein Methionin-Rest in der Nähe des C-Terminus dieser Sequenz ermöglicht eine Rückfaltung der Polypeptidkette („Met-turn“), was zur Stabilisierung des Zink-Liganden beiträgt (Bode et al., 1993; Stöcker et al., 1995). Dieses konnte für die ADAMs anhand der Kristallstruktur der katalytischen Domäne von TACE (ADAM 17) bereits gezeigt werden (Maskos et al., 1998).

Neben verschiedenen ADAMs, bei denen bereits proteolytische Aktivität nachgewiesen wurde, sind auch Mitglieder der löslichen ADAM-TS-Familie proteolytisch aktiv. ADAM-TS2 spaltet N-terminal Peptide während der Prozessierung von Typ I und Typ II Prokollagen zu Kollagen ab (Colige et al. 1997). Ferner spalten die als Aggrekanase-1 und -2 bekannten ADAMs TS-4 und TS-11 das Proteoglykan Aggrekan an spezifischen Stellen. Da Aggrekan dem Gelenkknorpel mechanische Stabilität verleiht, kann ein Abbau zu Entzündungserkrankungen wie der Osteoarthritis und der Rheumatoiden Arthritis führen (Abbaszade et al., 1999; Tortorella et al., 2000).

Für die 16 vermutlich katalytisch inaktiven ADAMs, die aufgrund des Fehlens eines Konsensusmotivs keine Koordination des Zinkions zulassen, kommt nur eine Funktion bei der Zellfusion, bei der intrazellulären Signalübertragung oder als Adhäsionsmolekül in Betracht.

Die Funktion der ADAMs als Adhäsionsmoleküle beruht auf der Aktivität der Disintegrin-Domäne, die Integrinen und anderen Rezeptoren als Ligand dient. Normalerweise interagieren Disintegrine mit ihren Substraten durch eine Schleife, an deren Spitze sich die Integrin-Bindungssequenz Arg-Gly-Asp (RGD) befindet (Krätschmar et al., 1996). Bis auf ADAM 15 besitzt jedoch keines der ADAMs diese Sequenz innerhalb der Disintegrin-Domäne. Stattdessen sind andere Bindungssequenzen vorhanden, die

anstelle des Aspartats (D) Glutamat (E) besitzen. Möglich ist, daß der negativ geladene Rest für eine Funktion als Integrin-Ligand verantwortlich ist (Wolfsberg et al., 1995). Ferner könnte auch die dreidimensionale Struktur der Schleife entscheidend für die Adhäsion an Integrine oder Zelloberflächen-Rezeptoren sein und nicht nur die Primärstruktur (Wolfsberg und White, 1996).

Zelldifferenzierung, Zellausrichtung, Adhäsion und manchmal auch Zellwanderung leiten eine Serie von Entwicklungsstadien eines Organismus ein, die oftmals zur Zell-Zell Fusion führen. Die Vermutung, daß ADAMs auch an diesem Prozess teilhaben können, beruht auf Beobachtungen, daß einige ADAMs potentielle Fusionspeptid-Sequenzen innerhalb ihrer Cystein-reichen Domäne besitzen, wie sie auch bei viralen Fusionsproteinen vorkommen (Blobel et al., 1992). Das Charakteristische der Cystein-reichen Domäne ist der hohe Anteil an Cystein-Resten, die in sehr unterschiedlichen Sequenzmustern vorkommen. Die eigentliche Funktion dieser Domäne ist jedoch noch nicht genau bekannt. In Betracht gezogen wird eine Beteiligung der Cystein-reichen Domäne bei der Präsentation der Disintegrin-Domäne oder bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (Jia et al., 1996).

Während die Transmembran-Domäne für die Verankerung der Proteine in der Zellmembran verantwortlich ist, läßt die intrazelluläre Cytoplasmatische Domäne eine Involvierung der ADAMs als Signalmediatoren zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum über Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen vermuten. Die Aminosäurezusammensetzung der Cytoplasmatischen Domäne ist sehr unterschiedlich. Manche enthalten viel Serin-Reste, Glutamin-Reste oder Lysin-Reste. Jedoch besitzen einige ADAMs Prolin-reiche Sequenzen innerhalb der Cytoplasmatischen Domäne, die potentielle Bindungsstellen für Proteine darstellen, die SH3-Domänen (Src Homology 3) enthalten (Weskamp et al., 1996; Inoue et al., 1998).

Für ADAM 9 und ADAM 15 konnte bereits eine Wechselwirkung der Cytoplasmatischen Domäne mit Endophilin I und dem Protein SH3PX1 nachgewiesen werden, die beide SH3-Domänen enthalten (Howard et al., 1999). Basierend auf diesen Beobachtungen wird derzeit eine mögliche Regulierung der katalytischen Aktivität der ADAMs durch die Cytoplasmatische Domäne diskutiert.

2.3. ADAMs als Zell-Adhäsionsmoleküle

Eine Zelle bedient sich mehrerer molekularer Mechanismen, um sich an andere Zellen oder an die extrazelluläre Matrix anzuheften. Die meisten Zellen mehrzelliger Organismen sind in Geweben organisiert. Hier stehen sie je nach Gewebetyp mit anderen Zellen oder mit der extrazellulären Matrix in Kontakt. In diese Vorgänge sind eine ganze Reihe von Zelloberflächen-Adhäsionsproteinen involviert. Zu den membrangebundenen Adhäsionsmolekülen zählen die Cadherine, Selektine, Integrine, Immunglobuline und auch die ADAMs (Blobel, 1997). Daß auch sie an Zell-Zell Adhäsionsvorgängen beteiligt sind, wurde erstmals 1992 bei Untersuchungen zur Fertilisation gezeigt (Blobel et al., 1992). Der Prozess der Vereinigung von Spermium und Eizelle umfaßt viele einzelne Schritte (Wassarman, 1999). Er beginnt mit der Bindung eines frei schwimmenden Spermiums an die Zona Pellucida, eine extrazelluläre Hülle der reifen Eizelle und endet kurze Zeit später mit der Fusion der Plasmamembranen, was zur Bildung der Zygote führt. Dazwischen werden eine Reihe von Schritten durchlaufen, wie z.B. die Akrosom-Reaktion. Bei der Bindung des Spermiums an die Plasmamembran der Eizelle sind zwei Familien von Zell-Adhäsionsproteinen beteiligt: ADAMs und Integrine (Blobel et al., 1992). Fertilin (ADAM 1, 2) wurde als erstes ADAM in Spermien des Meerschweinchens entdeckt (Primakoff et al., 1987). Das heterodimere Spermienoberflächenprotein besteht aus zwei Untereinheiten: Fertilin α (ADAM 1) und Fertilin β (ADAM 2). Beide Untereinheiten besitzen zu Beginn ihrer Biosynthese eine Metalloprotease- und Disintegrin-Domäne, wobei nur Fertilin α das katalytische Zink-Bindungsmotiv innerhalb der Metalloprotease-Domäne aufweist. Während der Reifung des Spermiums im Hoden werden beide Untereinheiten einer Reihe von proteolytischen Prozessen unterworfen, welche zur Entfernung der Pro- und Metalloprotease-Domäne führen (Abb. 4).

Auf dem befruchtungsfähigen Spermium erscheint deshalb ein prozessiertes Fertilin-Heterodimer, an dessen N-Terminus sich die Disintegrin-Domäne befindet (Lum und Blobel, 1997). Jedoch nur die Disintegrin-Domäne des Fertilin β bindet als Integrin-Ligand das Integrin $\alpha_6\beta_1$ der Eizellenoberfläche, wodurch der Kontakt zwischen Spermium und Eizelle während der Befruchtung hergestellt wird (Chen und Sampson, 1999; Bigler et al., 2000).

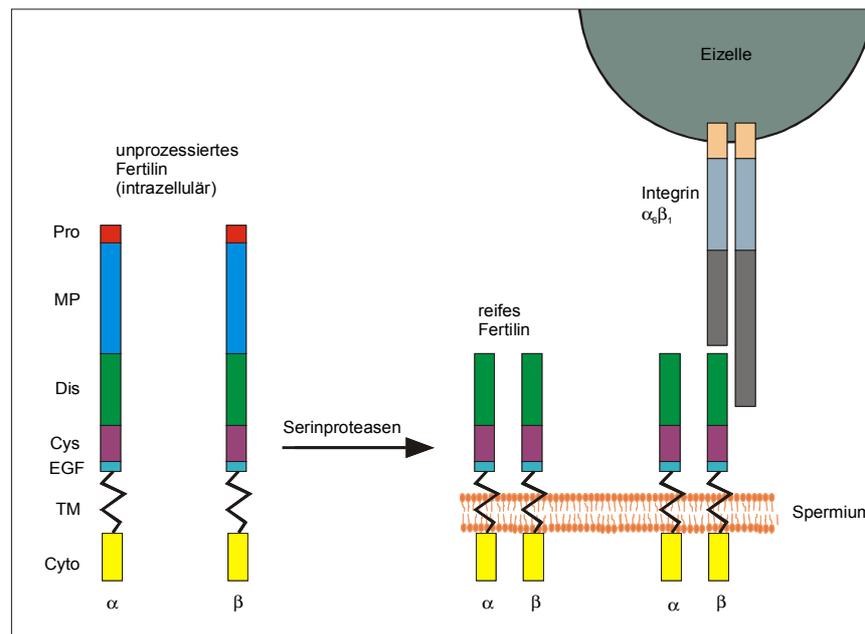


Abb. 4: Modell für die Bindung von Spermium und Eizelle via Fertilin und Integrin $\alpha_6\beta_1$ (modifiziert nach Lum und Blobel, 1997).

Welche Rolle hierbei die α -Untereinheit des Fertilins spielt, ist noch ungeklärt. Gezielte Deletionen des Fertilin β -Gens bestätigen dessen Rolle bei der Anheftung des Spermiums an die Eizelle während des Befruchtungsvorgangs und weisen zusätzlich auf eine Beteiligung bei der Spermienwanderung hin (Cho et al., 1998).

Desweiteren können ADAMs auch an somatischen Zell-Zell Wechselwirkungen beteiligt sein. ADAM 15, das einzige bisher bekannte ADAM mit der von den SVMPs bekannten Integrin-Bindungssequenz RGD innerhalb der Disintegrin-Domäne, bindet spezifisch die auf somatischen Zellen weit verbreiteten Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ (Zhang et al., 1998; Nath et al., 1999). Welche biologische Rolle Metargidin (ADAM 15) in verschiedenen Zellen spielt, ist bisher noch nicht bekannt.

2.4. ADAMs als Sekretasen

Proteolyse ist ein entscheidender Vorgang, durch welchen der Organismus Proteinfunktionen regulieren und modifizieren kann. Durch sie können Proteine aktiviert oder inaktiviert werden, oder ihre funktionellen Eigenschaften ändern. Deshalb ist geregelte Proteolyse auf der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix von essentieller Bedeutung für normale Zellfunktionen während der Entwicklung eines Organismus sowie dessen anschließende Aufrechterhaltung. Unzureichende oder unregelmäßige Proteolyse kann hingegen verantwortlich sein für schwere pathologische Prozesse, wie z.B. Krebs, Rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis und Alzheimersche Krankheit.

Neben ihrer Fähigkeit, Zell-Zell-Wechselwirkungen zu vermitteln, ist die Proteinfamilie der ADAMs aufgrund ihrer Metalloprotease-Domäne auch in proteolytischen Prozessierungen von Membranproteinen involviert, die nach ihrer Ablösung von der Zelloberfläche wichtige Rollen in physiologischen und pathologischen Vorgängen übernehmen können. Diese als Membranprotein-Sekretasen bezeichneten Enzyme spalten im allgemeinen Membranproteine auf der Zelloberfläche und entlassen sie damit in den extrazellulären Raum. Zu der Gruppe von Proteinen, die zu Beginn ihrer Biosynthese als membrangebundene Vorläuferproteine hergestellt werden, um dann in einem als Shedding bezeichneten Schritt durch membranständige Proteasen von der Plasmamembran gelöst zu werden, gehören u.a. folgende Membranrezeptoren: CD23, IL-6 R (Interleukin-6 receptor) und TNFR (Tumour necrosis factor receptor). Weiterhin gehören zu dieser Gruppe Cytokine und Wachstumsfaktoren wie Fas-L (Fas-ligand), TGF α (Transforming growth factor α) und TNF α (Tumour necrosis factor α) sowie Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere L-Selektin und ACE (Angiotensin-converting enzyme) (Hooper et al., 1997).

Neben den membrangebundenen MMPs (MT-MMPs) und membranständigen Serinproteasen übernehmen in diesem Zusammenhang auch die ADAMs mit Protease-Aktivität wichtige Funktionen.

Das erste ADAM, dem eine physiologische Bedeutung beim Prozessieren von Membranproteinen nachgewiesen wurde, ist TACE (TNF α -converting enzyme; ADAM

17; Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Das Cytokin $\text{TNF}\alpha$ wird als Antwort auf Infektionen oder Gewebsverletzungen freigesetzt. TACE spaltet dabei eine Peptidbindung in der extrazellulären Domäne der membranständigen Vorläuferform von $\text{TNF}\alpha$, was zur Freisetzung der löslichen Form des Cytokins führt (Abb. 5).

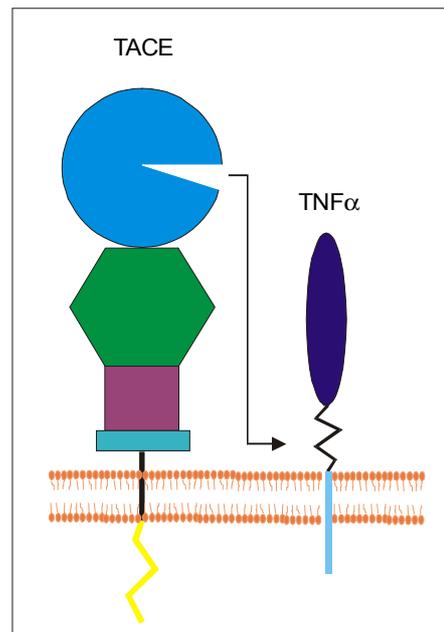


Abb. 5: Shedding von $\text{TNF}\alpha$ durch TACE (ADAM 17).

Obwohl auch andere Proteasen, wie z.B. ADAM 10 $\text{TNF}\alpha$ spalten, erfüllt die katalytische Domäne von TACE den weitaus größten Anteil der Prozessierung von $\text{TNF}\alpha$ im Organismus (Black et al., 1997). Wie Untersuchungen an TACE-defizienten Mäusen zeigen, ist es auch am Shedding von anderen Substraten wie L-Selektin, p75 TNFR und $\text{TGF}\alpha$ beteiligt (Peschon et al., 1998).

Die Röntgen-Kristallstruktur der katalytischen Domäne von TACE ist bisher die einzige bekannte Kristallstruktur eines ADAMs und zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten zu Adamalysin II, einem Mitglied der Familie der SVMPs (Maskos et al., 1998).

Viele Erkenntnisse über die proteolytische Aktivität der ADAMs rühren neben den Untersuchungen zu TACE (ADAM 17) auch von Untersuchungen des Zelloberflächen-Rezeptors Notch her. Notch ist ein Protein, das für Differenzierung und Entwicklung notwendig ist (Greenwald, 1998). Ein Beispiel dafür, wie Zelloberflächenproteolyse durch ADAMs die Genexpression regulieren kann, zeigt das ADAM *kuzbanian* (KUZ),

das in *Drosophila* als Vermittler der Signalübertragung durch Notch identifiziert wurde (Rooke et al., 1996). Es spaltet Notch innerhalb der extrazellulären Domäne (Bray, 1998; Logeat et al., 1998; Chan et al., 1998). Dieses führt zu einer erneuten Spaltung innerhalb der Transmembran-Domäne von Notch durch Presenilin, wodurch der cytoplasmatische Teil freigesetzt wird. Dieser tritt in den Zellkern ein und aktiviert zusammen mit einem Transkriptionsfaktor die Expression von verschiedenen Notch-abhängigen Genen (Schroeter et al., 1998; Struhl et al., 1998; Lewis et al., 1998).

Das zu KUZ orthologe Säugetier-ADAM, ADAM 10, wird in vielen Geweben exprimiert und spaltet *in vitro* neben Typ IV Kollagen (Howard et al., 1996) auch das basische Myelin-Protein (Millichip et al., 1998) und $\text{TNF}\alpha$ (Rosendahl et al., 1997). Bisher gibt es aber keine Anzeichen dafür, daß eines dieser Substrate auch ein physiologisches Substrat darstellt.

Die sequenzielle proteolytische Prozessierung von Notch ähnelt der eines anderen Transmembran-Proteins: des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP; Amyloid precursor protein; Selkoe, 1998). APP, das an verschiedenen Stellen durch drei verschiedene als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnete Proteasen prozessiert wird, hat besondere Bedeutung bei der Alzheimerschen Krankheit (Buxbaum et al., 1992; Caporaso et al., 1992). Die α - und β -Sekretasen spalten APP in der extrazellulären Domäne während die γ -Sekretase APP innerhalb der Transmembran-Domäne prozessiert (Abb. 6).

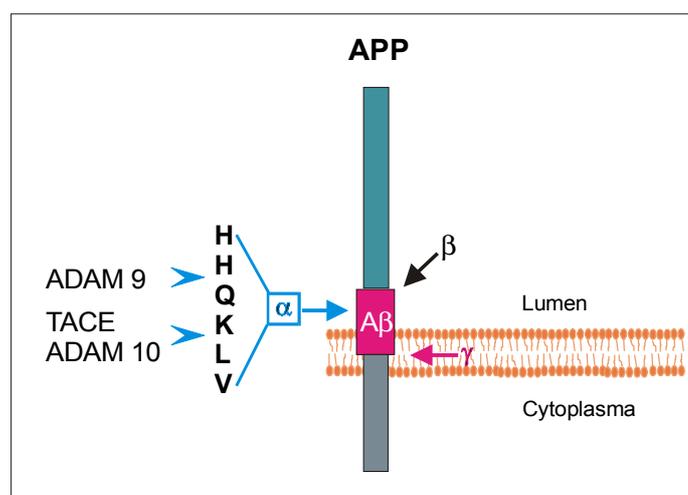


Abb. 6: ADAMs als mögliche α -Sekretasen bei der Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP).

Dadurch entstehen unterschiedliche Peptide. Die Spaltung von APP durch β - und γ -Sekretasen liefert ein 40-42 Aminosäuren langes Peptid (A β). Dieses Peptid stellt die Hauptkomponente der Plaques dar, die bei der Alzheimerschen Krankheit die zentrale Rolle spielen. Die Spaltung des APP durch eine α -Sekretase hingegen liefert ein lösliches extrazelluläres Fragment, dessen genaue Funktion noch ungeklärt ist (Selkoe, 1998). Möglich ist eine Schutzfunktion der α -Sekretase gegen die Alzheimersche Krankheit, da eine Prozessierung von APP durch eine α -Sekretase die Spaltung durch eine β -Sekretase und damit die Bildung von A β verhindert (Caporaso et al., 1992).

Auch TACE und ADAM 10 als katalytisch aktive ADAMs besitzen α -Sekretase-Aktivität (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999). Ob TACE, ADAM 10 oder beide physiologische α -Sekretasen sind, ist noch zu klären. Ist dies der Fall, könnten ADAMs dadurch auch am Krankheitsgeschehen der Alzheimerschen Demenz beteiligt sein. *In vitro* spalten rekombinante lösliche Formen von TACE und ADAM 10 APP an derselben Position, an der auch die α -Sekretasen der meisten nicht-neuronalen Zellen spalten (Buxbaum et al., 1998). Im Gegensatz dazu spaltet rekombinantes ADAM 9 *in vitro* APP an einer anderen Stelle als der, die von TACE und ADAM 10 erkannt wird (Roghani et al., 1999). Interessanterweise existiert im Hippocampus eine α -Sekretase, die APP an genau dieser von ADAM 9 bevorzugten Stelle spaltet (Simons et al., 1996). Unterschiede in der Substratspezifität sind jedoch zumindest bei TACE, ADAM 10 und ADAM 9 vorhanden. Welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen könnten, zeigen frühere Studien über Proteine, die am Shedding von Membranproteinen beteiligt sind. Hiernach ist eine etwa 10 Aminosäuren lange Sequenz um die Spaltstelle herum für die Spaltspezifität ausschlaggebend. Ferner ist die Entfernung der Spaltstelle zur Transmembran-Domäne entscheidend (Arribas et al., 1997; Hooper et al., 1997). Bei den ADAMs besteht aufgrund ihrer unterschiedlichen Domänen weiterhin die Möglichkeit, daß andere Domänen wie z.B. die Disintegrin-Domäne oder die Cysteinreiche Domäne für die Substratbindung verantwortlich sind (Blobel, 1997).

2.5. ADAM 9 (Meltrin γ)

ADAM 9 ist ein typisches Mitglied der membranständigen ADAM Familie. Es besitzt wie alle ADAMs auf der extrazellulären Seite eine Prodomäne, Metalloprotease-, Disintegrin- und Cystein-reiche Domäne.

Es wurde 1995 erstmals aus einer cDNA-Bibliothek der Mammaepithel-Krebszelllinie MDA-MB 468 kloniert (Weskamp et al., 1996). Durch Northern-Blot wurde die mRNA von ADAM 9 in vielen Geweben nachgewiesen, u.a. in Herz, Pankreas, Niere, Hoden, Ovar und Dickdarm (Weskamp et al., 1996). Desweiteren konnte die mRNA mittels RT-PCR in malignen Adenokarzinom-, Chondrosarkom-, Osteosarkom- und Prostatakarzinom-Zelllinien detektiert werden (Schwettmann und Tschesche; 2001). ADAM 9 wird in der Biosynthese als 100 kDa großes Protein hergestellt und während des Transports zur Zellmembran nach der Passage durch den Golgi-Apparat intrazellulär zu seiner reifen 84 kDa großen Form prozessiert, indem die Prodomäne durch eine Furin-ähnliche Pro-Protein-Konvertase entfernt wird (Roghani et al., 1999). Dadurch erscheint auf der Zelloberfläche die schon prozessierte, katalytisch aktive Form.

Die Disintegrin-Domäne von ADAM 9 besitzt Zelladhäsionseigenschaften. Sie bindet u.a. das Integrin $\alpha_6\beta_1$ auf Fibroblasten, wodurch die Beweglichkeit dieser Zellen erhöht werden kann (Nath et al., 2000). Damit ist es neben Fertilin β das zweite ADAM, das als Ligand des Integrins $\alpha_6\beta_1$ fungieren kann. Zusätzlich konnte *in vitro* auch eine Fähigkeit zur Bindung des Integrins $\alpha_v\beta_5$ auf Myelomzellen nachgewiesen werden (Zhou et al., 2001). Die Disintegrin-Domäne von ADAM 9 scheint somit mehr als nur ein Integrin binden zu können. *In vitro*-Untersuchungen haben ferner gezeigt, daß die Cystein-reiche Domäne mit Endophilin I, einem cytoplasmatischen Protein mit SH3-Domäne wechselwirken kann. Durch diese Wechselwirkung läßt sich eine eventuelle Regulierung des Transports oder der subzellulären Lokalisierung von ADAM 9 über die Cytoplasmatische Domäne ableiten (Howard et al., 1999).

Daß die Metalloprotease-Domäne mit dem konservierten Zink-Bindungsmotiv proteolytisch aktiv ist, konnte bisher mit der rekombinanten löslichen Form, ohne Transmembran und Cytoplasmatische Domäne gezeigt werden. Durch Spaltung der

Insulin B-Kette konnten die Spaltstellen Tyr¹⁶-Leu¹⁷ und Tyr²⁶-Thr²⁷ identifiziert werden (Roghani et al., 1999).

TACE und die Matrix-Metalloprotease 1 spalten im Vergleich hierzu nur an der Tyr¹⁶-Leu¹⁷-Bindung. Desweiteren werden Peptide proteolytisch durch ADAM 9 gespalten, die den Spaltstellen von speziellen Membranproteinen entsprechen, die durch Metalloproteasen prozessiert werden. Hierzu gehören TNF α , p75TNFR und KL1 (c-kit-Ligand). Jedoch stimmen die Spaltstellen nicht mit denen überein, die durch Sheddase *in vivo* prozessiert werden (Roghani et al., 1999). Die Ursache hierfür ist noch ungeklärt. Ferner besitzt ADAM 9 α -Sekretase-Aktivität. Die Spaltstelle, die hierbei von ADAM 9 erkannt wird, ist nicht identisch mit der, die von TACE und ADAM 10 bevorzugt wird (Abb. 6). Eine α -Sekretase-Aktivität von ADAM 9 könnte insofern von Bedeutung sein, als daß eine Spaltung von APP durch eine α -Sekretase die Spaltung durch eine β -Sekretase und damit die Bildung des A β -Fragments verhindert (Koike et al., 1999).

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (Veres et al., 1987) wurden ca. 5 µg RNA und sequenzunspezifische Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer sowie die MMLV-Reverse Transkriptase (GibcoBRL) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA wurde nach einem modifizierten PCR Standardprotokoll mit dem Mini-Cycler PTC-150-16 (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt (Saiki et al., 1988).

Für die zielgerichtete Mutagenese-PCR wurde das QUIKchange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) mit zugehörigem Protokoll eingesetzt.

PCR-Reaktionsansatz:

- 1,0 µl Template-DNA (1-10 ng)
- 0,5 µl forward-Primer (100 µM) (MWG Biotech, Ebersberg)
- 0,5 µl reverse-Primer (100 µM) (MWG-Biotech)
- 1,0 µl dNTPs (10 mM) (Roche)
- 5,0 µl 10 x AmpliTaq-Puffer (Perkin-Elmer, Weiterstadt) oder
10 x Pfu-Puffer (Stratagene)
- 0,2 µl AmpliTaq-Polymerase (5U/µl) (Perkin-Elmer) oder
0,8 µl Pfu-Polymerase (5U/µl) (Stratagene)
- 41,8 µl H₂O bidest

- Standard-PCR-Programm

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	60 s	93°C
2. Denaturierung	30 s	95°C
3. Annealing	45 s	60°C + 0,2°C/Zyklus
4. Polymerisation	60 s	72°C
5. Wiederholung	39 x zu Schritt 2	
6. Extension	5 min	72°C
7. Ende		4°C

- Mutagenese-PCR-Programm:

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	30 s	95°C
2. Denaturierung	30 s	95°C
3. Annealing	60 s	55°C
4. Polymerisation	12 min	68°C
5. Wiederholung	13 x zu Schritt 2	
6. Ende		4°C

- Verwendete Oligonukleotide (MWG-Biotech):

h-procd-F:	5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCGCGGCCAGGCTTTCAACAG-3'
h-procd-R/Not:	5'-AATTCGCCCGCGGCCGCTTAATAGGCTTCATCA-3'
h-procd- R/Not-mycHis	5'-AACTAGTGCGGCCGCATAGGCTTCATCAGGCTTTG-3'
h-procd-E>A-F	5'-ATTGTTGCTCATGCATTGGGTCATAAT-3'
h-procd-E>A-R	5'-ATTATGACCCAATGCATGAGCAACAAT-3'
β-Aktin-F	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATG-3'
β-Aktin-R	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'
h-procd-F100	5'-GCGCGGCCAGGCTTTCAACAGACC-3'
h-procd-R100	5'-ATAGGCTTCATCAGGCTTTGGAAT-3'

3.1.3. TA-Klonierung

Mittels TA-Klonierung wurde das PCR-Amplifikat direkt in einen Vektor inseriert. Die überhängenden Thymidin- und Adenosin-Basen im Vektor und im Amplifikat erleichterten dabei die Ligation. Abschließend erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid.

Die TA-Klonierung wurde mit dem *TA Cloning Kit* (Invitrogen, Leek, Niederlande) durchgeführt. Die Ligations- und Transformationsansätze richteten sich nach der Vorschrift des Herstellers.

3.1.4. Ligation von DNA

Für die Ligation von 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden über eine Phosphodiesterbindung wurde die T4 DNA-Ligase (Weiss et al., 1968) gemäß Herstellerangaben (Genecraft, Münster) eingesetzt. Um ein Religieren der Vektor-DNA zu verhindern, wurden zuvor die 5'-Phosphatenden durch Alkalische Phosphatase (Roche) laut beiliegendem Protokoll dephosphoryliert.

3.1.5. Spaltung von DNA

Die erforderlichen enzymatischen Spaltungen von cDNA und Plasmid-DNA erfolgten über Nacht bei 37 °C (Cohen et al., 1973) mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Schwalbach) gemäß Herstellerprotokoll.

3.1.6. DNA-Gelelektrophorese

Die Proben und der DNA-Längenstandard (GibcoBRL) wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer nach Standardvorschrift (Sambrook et al., 1989) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (Sharp et al., 1973).

3.1.7. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA wurde nach Ausschneiden aus dem Agarosegel mit Hilfe des QIAgen™-Gel Extraction Kits (QIAgen, Hilden) anhand des beiliegenden Protokolls isoliert.

3.1.8. Isolierung von DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Bakterienzellen durch alkalische Lyse in Anwesenheit von RNase aufgeschlossen und auf Hochsalz-Bedingungen eingestellt, unter denen sich die DNA nach Ausfällung von Zelltrümmern und chromosomaler DNA in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an eine Glasfaseroberfläche binden ließ. Da unter diesen Bedingungen nur DNA spezifisch gebunden wurde, ließ sich die Plasmid-DNA nach verschiedenen Waschvorgängen frei von Verunreinigungen eluieren. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit dem „Plasmid Isolation Kit“ (Roche) gemäß Herstellerangaben.

3.1.9. Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Die Präparation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde mit dem „Rneasy Total RNA Kit“ (Quiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.10. Reinigung von DNA

Die nach einer PCR oder nach Spaltung durch Restriktionsendonukleasen erforderliche Reinigung von DNA wurde mit dem „PCR Purification Kit“ (Roche) gemäß beiliegendem Protokoll durchgeführt.

3.1.11. DNA-Sequenzierung

Die Nukleinsäure-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) und wurde vom IIT, Universität Bielefeld mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden am „LI-COR Sequencer“ (MWG Biotech) bzw. mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden am „ABI-DNA-Sequencer“ (Perkin Elmer) durchgeführt.

3.1.12. Transformation von *E. coli*

Die Darstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983).

Hierzu wurde die Bakterienkultur bei 37°C über Nacht in SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,5_{578 nm} kultiviert. Anschließend wurde die Kultur 15 Minuten auf Eis gekühlt und 12 Minuten bei 4°C und 2500 rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 34 ml FSB-Transformationspuffer (10 mM Kaliumacetat, 100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM Hexaminkobalt(III)-chlorid, 10% Glycerin) resuspendiert und nach 15 minütigem Kühlen auf Eis erneut 12 min bei 4°C und 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 8 ml FSB-Transformationspuffer resuspendiert, 140 µl frisches DMSO zugefügt und geschüttelt. Nach erneuter Inkubation auf Eis (5 min) wurden nochmals 140 µl DMSO zugefügt, geschüttelt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lagerung bei –70°C wurden die Zellen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA richtete sich nach dem Herstellerprotokoll (Stratagene und Invitrogen).

3.1.13. Transformation von *P. pastoris*

Die *P. pastoris*-Stämme GS115, KM71 und X33 wurden über Nacht in 50 ml YPD-Medium (20 g/l Pepton, 20 g/l Glucose, 10 g/l Hefeextrakt) bis zu einer optischen Dichte von 1,3-1,5_{578 nm} bei 28°C unter Schütteln kultiviert und anschließend fünf Minuten bei 4°C und 1500 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml sterilem Wasser (0°C) resuspendiert und nach wiederholten Wasch- und Zentrifugationsvorgängen mit 25 ml sterilem Wasser (0°C) bzw. 2 ml Sorbitol (1 M) letztlich in 1 ml Sorbitol (1 M, 0°C) aufgenommen und resuspendiert (Invitrogen, 1999).

Je 200 µl Zellsuspension wurden in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (BioRad, München) mit 5-10 µg linearisierter DNA gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation (Neumann et al., 1982) anhand folgender Parameter:

Elektroporator II (Dialog, München)

Feldstärke: 470 V/cm; 3 x 10 ms Rechteckimpulse in Abständen von 1 s;
Elektrodenfläche 2 cm²; Elektrodenabstand 2 mm; Zellkonstante: 10

Anschließend wurden die Zellen sofort mit 1 ml 1 M Sorbitol (0°C) versetzt, fünf Minuten auf Eis und zwei Stunden bei 28°C inkubiert. Nachdem die Transformationsansätze auf YPDS^{Zeo}-Nährböden (YPD-Medium, dem 100 µg/ml ZeocinTM als Antibiotikum und 15 g/l Agar zugesetzt wurde) ausgestrichen worden waren, erfolgte eine Inkubation bei 28°C über drei Tage.

3.1.14. Kultivierung von Zellen

Pichia pastoris

Die mit linearisierter DNA transformierten *P. pastoris*-Stämme GS115, KM71 und X33 (Sreekrishna et al., 1987; Cregg und Madden, 1988) wurden 30 Stunden bei 28°C in YPD-Medium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Peptone, 20 g/l Glucose) unter Schütteln kultiviert. Feste Nährböden wurden durch den Zusatz von 2% Agar, Sorbitol (1 M) und

Zeocin™ (100 µg/ml) als Antibiotikum erhalten. Die Langzeitlagerung bei –80°C erfolgte in YPD-Medium mit 20% Glycerin bei einer optischen Dichte von 50-100. Hierzu wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Escherichia coli

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme JM109 (Promega, Madison, USA), TOP10 (Invitrogen), XL1-Blue MRF' (Stratagene), BL21(DE3) und HMS174(DE3) (Novagen Inc., Madison, USA) erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 37°C in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Peptone, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5). Zur Selektion der antibiotikaresistenten Transformanten wurde dem Medium Ampicillin zugesetzt (50 µg/ml). Feste Nährböden wurden durch den Zusatz von 2% Agar zum LB-Medium hergestellt. Für den Test auf α -Komplementation (Ullmann et al., 1967) der *E. coli*-Stämme JM109 und TOP10 mit dem Vektor pCR2.1-TOPO wurden zusätzlich 20 µl X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid, 50 mg/ml) auf die Nährböden aufgetragen (Sambrook et al., 1989). Zur Langzeitlagerung bei –80°C wurde der Kultur 30% Glycerin zugesetzt.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Proteinexpression

Escherichia coli

E. coli-Zellen der Stämme HMS174(DE3) und BL21(DE3) wurden in ampicillinhaltigem (0,2 mg/ml) LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte von 0,6_{578 nm} kultiviert. Die Induktion der heterologen Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Isopropylthiogalaktosid; Eurogentec) und wurde über einen Zeitraum von vier Stunden durch stündliche Probenentnahme im SDS-Polyacrylamidgel kontrolliert.

Pichia pastoris

Die *P. pastoris* Stämme X33, GS115 und KM71 wurden über Nacht bei 28°C im Schüttelinkubator in BMGY-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵% Biotin, 1% Glycerin) kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 2-6_{578nm} erfolgte die Induktion der heterologen Expression durch den Austausch des BMGY-Mediums gegen methanolhaltiges BMMY-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% Biotin, 0,5% Methanol) nach Herstellerprotokoll. Zur fortlaufenden Expression über vier Tage wurde dem Medium alle 24 Stunden 0,5% Methanol zugesetzt. Die Expressionskontrolle erfolgte durch tägliche Probenentnahme und anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

3.2.2. Isolierung der *E. coli*-Expressionsprodukte

Rekombinante Proteine werden von *E. coli* in der Regel als unlösliche Proteinaggregate, sog. „inclusion bodies“ (ib) innerhalb der Zelle abgelagert. Deshalb ist eine Isolierung der rekombinanten Proteine notwendig, wobei die Bakterienzellen lysiert und die Proteine solubilisiert werden. Die enzymatische Degradation der Bakterienzellwand erfolgt durch Lysozym, wonach die noch bestehende Zellmembran osmotisch und durch Detergenzien zerstört wird. Das heterologe Expressionsprodukt wird nach Zentrifugations- und Waschschritten durch Denaturierungsmittel unter reduzierenden Bedingungen solubilisiert.

Die Expressionskulturen wurden 30 Minuten bei 3500 rpm pelettiert, das Pellet in 90 ml Zelllysepuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, 2 mg/100ml Lysozym, pH 8,5) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gerührt und nochmals 30 Minuten bei 37°C gerührt. Nach Zugabe von NaCl (500 mM) und Triton X-100 (1%) wurde 10 Minuten auf Eis gerührt und das Homogenisat 20 Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit dem Ultraturax (Jahnke & Kunkel, Staufen) in 100 ml Waschpuffer I (50 mM Tris/HCl, 1 M Harnstoff, 1,5% Triton X-100, pH 8,5) resuspendiert und 15 Minuten bei 4°C und 11000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte eine Wiederholung dieses Waschschriffs mit anschließender Zentrifugation unter Verwendung von Waschpuffer II (50 mM Tris/HCl, 1 M Harnstoff, pH 8,5). Die Solubilisierung des restlichen Pellets erfolgte durch Ultraturax-Behandlung in 50 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, 0,2 M NaCl, 150 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,5), wonach über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 Minuten) bei 11000 rpm entfernt. Die Lagerung der erhaltenen Lösung erfolgte bei 4°C.

3.2.3. *In vitro*-Faltung denaturierter rekombinanter Proteine

Da die rekombinanten Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet wurden, sind sie in den meisten Fällen biologisch inaktiv. Damit sie ihre korrekte

dreidimensionale Struktur annehmen können, müssen Detergenzien entfernt sowie eventuell vorhandene Disulfidbrücken korrekt geknüpft werden.

Hierfür stehen verschiedene Faltungsmethoden zur Verfügung, die alle auf der Dialyse von gering konzentrierten Proteinlösungen gegen verschiedene Faltungspuffer bei niedrigen Temperaturen beruhen (Ausubel et al., 1989).

- Faltung durch stufenweise Entfernung der Detergenzien

Sämtliche Dialysen erfolgten bei 4°C über Nacht.

Zur Überführung der in *E. coli* exprimierten und unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossenen rekombinanten Proteine in ihre biologisch aktive Konformation wurden die denaturierenden und reduzierenden Komponenten der Puffer schrittweise durch Dialyse gegen Faltungspuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,001% Triton X-100), der absteigende Konzentrationen von Harnstoff (6 M, 4 M, 2 M, 1 M) und β -Mercaptoethanol (50 mM, 25 mM, 10 mM, 4 mM) enthält, entfernt. Abschließend erfolgte eine Dialyse gegen Nativpuffer (50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,1 mM ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, pH 7,5).

- Faltung durch das Redoxsystem Glutathion/Dithiothreitol

(modifiziert nach Buchner et al., 1992)

Da die katalytische Domäne des humanen ADAM 9 mehrere Disulfidbrücken besitzt, bot sich für die korrekte Verknüpfung der Cysteine das „oxido-shuffling“-System an. Hierbei handelt es sich um ein Redox-System bestehend aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol.

5 ml der vorgereinigten Probe wurden über Nacht bei 4°C gegen Nativpuffer dialysiert. Anschließend wurde die Probe in dem 50-fachen Volumen an Redoxpuffer (50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,1 mM ZnCl₂, 0,1 M L-Arginin, 10 mM Glutathion_{oxidiert}, 3 mM DTT, pH 7,5) schnell verdünnt. Nach 2-tägiger Inkubation bei 4°C wurde das Dialysat durch Ultrafiltration auf das Ausgangsvolumen eingeeengt und gegen Nativpuffer dialysiert.

3.2.4. Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Proteine erfolgte photometrisch. Der für die Konzentrationsberechnung nach dem Lambert-Beer Gesetz benötigte Extinktionskoeffizient wurde nach folgender Formel ermittelt (Pace et al., 1995) :

$$\epsilon \text{ [l/mol x cm]} = W \times 5500 + Y \times 1490 + C \times 125$$

W=Anzahl Tryptophanreste, Y= Anzahl Tyrosinreste und C=Anzahl Cysteinreste.

Der Extinktionskoeffizient für die katalytische Domäne des humanem ADAM 9 berechnete sich hiernach zu $\epsilon = 19200 \text{ l/mol x cm}$.

3.2.5. Ultrafiltration

Sämtliche Ultrafiltrationen wurden mit YM10-Membranen (Amicon, Witten) durchgeführt.

3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach dem Standardsystem (Laemmli, 1970) in vertikalen Elektrophoresekammern (Eigenbau, Universität Bielefeld) durchgeführt. Alternativ hierzu wurde das Tricin-SDS-Gelelektrophoresesystem für Proteine und Peptide zwischen 1 und 50 kDa eingesetzt (Schägger et al., 1987). Als Molekulargewichtsstandard diente der Low Molecular Weight-Marker (Pharmacia, Freiburg) sowie Mark12 Wide Range Protein Standard (Novex).

3.2.7. Färbung von PAA-Gelen

Zur Visualisierung der Proteinbanden im PAA-Gel wurde für Proteinmengen oberhalb 1 $\mu\text{g/Bande}$ die Coomassie Blue-Färbung angewandt. Für Proteinmengen unterhalb 1 $\mu\text{g/Bande}$ wurde die empfindliche Silberfärbung eingesetzt.

Die Färbung der PAA-Gele erfolgte mit Coomassie Blue (Serva, Heidelberg) oder mit Silbernitrat nach Standardvorschrift (Heukeshoven et al., 1988).

3.2.8. Dialyse

Dialysiert wurde grundsätzlich bei 4°C über Nacht und langsamem Rühren unter Verwendung von permeablen Celluloseschläuchen (Roth, Karlsruhe) mit einer Ausschlußgrenze von 12 kDa .

3.2.9. Westernblotting

Westernblotting (Towbin et al., 1979) wurde unter Verwendung der PVDF-Membran Immobilon-P (Millipore, Eschborn) mit der Blottingapparatur Fastblot (Biometra, Göttingen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.10. Immunologische Detektion von Proteinen

Nachdem Proteine durch Westernblotting auf eine Membran transferiert wurden, wurde zum immunchemischen Proteinnachweis ein polyklonaler Kaninchen-anti-ADAM 9-Antikörper (Pineda, Berlin) eingesetzt, der nach einer sekundären Antikörper-Antigen-Reaktion mit einem mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion sichtbar gemacht wurde. Als chromogene Substrate dienten 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).

3.2.11. Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau (Edman et al., 1967) mit dem Protein Sequencer 810/910 (Knauer, Berlin) und wurde nach Transfer auf Immobilon-Membranen durchgeführt.

3.2.12. Herstellung polyklonaler Antikörper

Unter Berücksichtigung der Spezifität und Antigenizität von Peptidsequenzen (Parker et al., 1986) wurde das 13 Aminosäuren umfassende Peptid (REKFLITRRRHDS) aus der katalytischen Domäne des humanen ADAM 9 synthetisiert (Pineda, Berlin). Nach Kopplung des Peptids an den Träger KLH (keyhole limpet hemocyanin) erfolgte die Immunisierung von Kaninchen durch vier intradermale Injektionen am 1., 62., 100. und 115. Tag, wobei jeweils 500 µg Peptid als Antigen eingesetzt wurden (Pineda, Berlin). Die Serumgewinnung erfolgte nach dem 115. Tag.

3.2.13. Antikörper-Reinigung durch Affinitäts-Chromatographie

Zur Isolierung der IgG-Antikörper aus Serum ließ sich die Bindung zwischen Protein A und Antikörpern ausnutzen, die bei basischem pH-Wert verstärkt wurde (Kronvall et al., 1970 and Goudswaard et al., 1978).

Die Reinigung der Antikörper mittels Protein A-Sepharose (Pharmacia) erfolgte nach Herstellerangaben und wurde folgendermaßen modifiziert:

1 ml Serum wurde zur Abtrennung von Schwebeteilchen fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend mit 9 ml Bindungspuffer (0,14 M Na₂HPO₄, pH 8,0) verdünnt. Die Bindung an Protein A-Sepharose erfolgte in einer Säule mit 1,5 ml äquibrierter Protein A-Sepharose innerhalb von zwei Stunden bei 4°C unter langsamem Drehen der Säule. Gewaschen wurde viermal mit je einem Säulenvolumen Bindungspuffer. Zur Elution diente ein Säulenvolumen 0,2 M Glycin/HCl mit einem pH-Wert von 2,7. Das Eluat wurde in Neutralisierungspuffer (1 M K₂HPO₄, pH 8,0) aufgefangen, bei 4°C gegen H₂O_{bidest} dialysiert und durch Gefriertrocknung eingeengt. Die Antikörper wurden bei -20°C gelagert.

3.2.14. Antikörper-Reinigung durch Immunoaffinitäts-Chromatographie

Mit Hilfe einer Antigensäule, bei der das Peptid über einen Spacer an aktiviertes Säulenmaterial gekoppelt ist, ließen sich antigenspezifische (affinitätsgereinigte)

Antikörper isolieren. Die Verwendung affinitätsgereinigter Antikörper ist unerlässlich bei immunhistochemischen Untersuchungen, um unspezifische Bindungen und damit falsche Interpretationen zu vermeiden.

Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte durch Absenkung des pH-Werts.

Die Kopplung von 30 mg Peptid an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Für die Isolierung affinitätsgereinigter anti-Peptid-MDC9-Antikörper wurden 3-4 mg Protein A gereinigte Antikörper in 1 ml PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gelöst und zusammen mit 5 ml PBS-Puffer zu 1,5 ml äquilibriertem Säulenmaterial gegeben. Die Bindung der Antikörper an das Säulenmaterial erfolgte innerhalb von zwei Stunden bei 4°C unter langsamem Drehen der Säule. Nach dem Waschen der ungebundenen Antikörper mit ca. 15 ml PBS-Puffer wurden die antigenspezifischen Antikörper mit 5 ml 0,2 M Glycin/HCl pH 2,7 eluiert, wobei das Eluat in 3 ml Neutralisierungspuffer (1M K₂HPO₄, pH 8,0) aufgefangen wurde. Abschließend erfolgte eine Dialyse des Eluats gegen H₂O_{bidest}, wonach die Lösung durch Gefriertrocknung (WKF L2, WKF, Darmstadt) eingengt und die Antikörper in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) gelöst bei 4°C gelagert wurden.

3.2.15. Ionenaustausch-Chromatographie

Zu Beginn der Reinigung der rekombinanten sezernierten Proteine wurde die Probe über Nacht gegen Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl pH 8,5) dialysiert. Die Ionenaustausch-Chromatographie wurde bei Raumtemperatur im „batch“-Verfahren mit Q-Sepharose (Pharmacia) als stationäre Phase bei pH 8,5 durchgeführt. Die anschließende Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0,2 bis 0,7 M NaCl im Bindungspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min.

3.2.16. Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (Porath et al., 1973)

Die Bindung der rekombinanten Proteine erfolgte im „batch“-Verfahren an Phenylsepharose (Pharmacia) bei pH 8,0 und einer Salzkonzentration von 2 M Ammoniumsulfat. Eluiert wurde mit einem abnehmenden linearen Salzgradienten von 2 M bis 0 M Ammoniumsulfat gemäß Herstellerangaben (Pharmacia, Product Manual).

3.2.17. Metallchelate-Affinitätschromatographie

Nachdem die zu reinigende Probe über Nacht bei 4°C gegen Äquilibriumspuffer dialysiert worden war, erfolgte die Aufreinigung über Ni-NTA-Sepharose (Pharmacia) gemäß dem Produktprotokoll.

3.2.18. Zymographie (Heussen et al., 1980, Kleiner et al., 1994).

Zur Anfertigung der Zymogramme wurden 12 mg Substrat in 7,5 ml Gelpuffer unter Aufkochen gelöst und nach Abkühlen mit 1,25 ml H₂O, 3,75 ml Acrylamidlösung (30%) und APS als Polymerisationsstarter versetzt. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer (40 mM Tris/HCl, 5% w/v SDS, 20% v/v Glycerin, 0,03% w/v Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen und elektrophoretisch bei 20 mA getrennt. Anschließend wurde das Gel zweimal 30 Minuten mit 2,5% (w/v) Triton X-100 und dreimal eine Minute in H₂O_{bidest} gewaschen. Die Renaturierung erfolgte durch Inkubation in nativem Puffer über Nacht bei 37°C. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt.

3.2.19. Proteolytische Spaltung von Proteinen

Zur Untersuchung der Substratspezifität der katalytischen Domäne des ADAM 9 wurden die Substrate (3 nM) bei 37°C mit dem rekombinanten Enzym (32 pM) in Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,5 mM ZnCl₂, pH 7,5)

inkubiert. Eine Umsetzung des Substrates zeigte sich nach anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese anhand der sichtbaren Abbaubanden.

3.2.20. Proteolytische Spaltung von Mca-Peptiden

Synthetisch hergestellte fluorogene Peptide (Mca-Peptide) lassen sich durch verschiedene Proteasen spalten, wobei die Spaltung zur Aufhebung der Fluoreszenzlöschung führt und die Zunahme der Fluoreszenz des freigesetzten Cumarin-Derivats mit einem Spektralfluorimeter verfolgt werden kann (Knight et al., 1992).

Als Substrate wurden sowohl das als Substrat für verschiedene MMPs bekannte Peptid (7-Methoxycumarin-4-yl-)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH₂ (Calbiochem, Bad Soden) als auch das als TACE-Substrat bekannte Peptid (7-Methoxycumarin-4-yl-)acetyl-Pro-Leu-Ala-Gln-Val-Dap(Dnp))-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂ (Bachem, Heidelberg) eingesetzt (van Dyk et al., 1997). Die Substrate wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in nativem Puffer mit rekombinantem ADAM 9 über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer LS 50 B) bei einer Anregungswellenlänge von 328 nm und einer Emissionswellenlänge von 398 nm verfolgt wurde.

Um die inhibitorische Wirkung potentieller Inhibitoren zu untersuchen, wurde das Enzym zuvor 30 Minuten mit dem Inhibitor bei 25°C inkubiert. Die Inhibierung von ADAM 9 für verschiedene Thiadiazin-Inhibitor-Konzentrationen wurde durch Auftragen der gemessenen Restaktivitäten gegen die Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Durch nicht-lineare Regression wurde unter Berücksichtigung von 3 Parametern der IC₅₀-Wert ermittelt.

3.3. Zellen und Vektoren

3.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli-Stämme

Alle verwendeten Stämme sind rekombinationsdefiziente *E. coli*-Stämme, die im Phänotyp ampicillinsensitiv sind. Sie wurden von den Firmen Novagen, Invitrogen und Stratagene bezogen.

- *E. coli* TOP10

Genotyp: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 deoR$
 $araD 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$

Der *E. coli*-Stamm TOP10 wurde im Rahmen der TA-Klonierung zur Transformation von Ligationsansätzen eingesetzt, da er eine Insertionskontrolle durch α -Komplementation ermöglicht.

- *E. coli* XL1blue-MRF'

Genotyp: $\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1$
 $gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^q Z\Delta M15 Tn 10 (Tet^r)]$

Bei dem *E. coli*-Stamm XL1blue-MRF' handelt es sich um einen reinen Klonierungsstamm, der zur Klonierung der Ziel-DNA in verschiedene Vektoren und zur Vervielfältigung und Erhaltung der Plasmide eingesetzt wurde, da er rekombinationsdefizient ($recA^-$) ist und hohe Transformationsraten erzielt. Verwendung findet dieser Stamm insbesondere auch bei der Klonierung eukaryontischer cDNA, da diese oftmals an Cytosinen und/oder Adeninen methyliert ist und vom Bakterium als

fremde DNA erkannt wird, was zum Abbau der DNA führen kann. Mutationen in verschiedenen Genen des Stammes verhindern dies.

- *E. coli* BL21[DE3]

Genotyp: B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal* λ(DE3)

Dieser *E. coli*-Expressionsstamm wurde für die heterologe Proteinexpression eingesetzt. BL21[DE3] ist ein Lysogen des λ-Bakteriophagen DE3, der ein DNA-Fragment trägt, das das *lacI*-Gen, den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7 RNA-Polymerase umfaßt (Studier und Moffatt, 1986). Die Kopie des T7 RNA-Polymerasegens im Chromosom von Expressionsstämmen steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors und ist durch IPTG induzierbar, was eine kontrollierte Expression von Genen stromabwärts der T7 RNA-Polymerase-Bindungsstelle ermöglicht.

- *E. coli* HMS174[DE3]

Genotyp: F⁻ *recA hsdR* (rK12⁻mK12⁺) Rif^R (DE3)

Der *E. coli*-Stamm HMS174[DE3] wurde neben BL21[DE3] zur Expression von Proteinen eingesetzt. Auch er ist ein Lysogen des λ-Bakteriophagen und ermöglicht die Aktivierung des T7 RNA-Polymerasegens durch IPTG, was zur Induktion der Expression führt.

Escherichia coli-VektorenpCR[®]-2.1-TOPO

Für TA-Klonierungen wurde der Vektor pCR[®]-2.1-TOPO (Invitrogen) eingesetzt, der auf Plasmiden der pUC-Serie basiert.

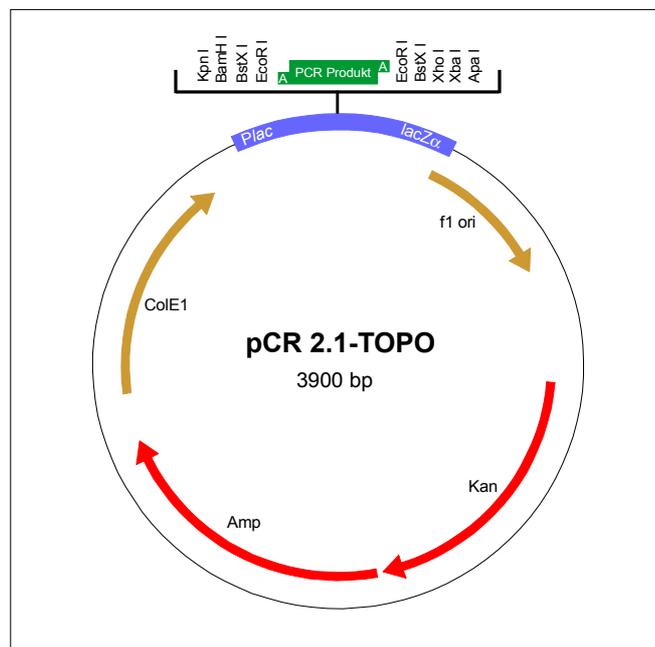


Abb. 7: Vektorkarte pCR[®]-2.1-TOPO.

Plac lac Promotor
lacZ α LacZ α Fragment
f1 ori f1 Replikationsursprung
Kan Kanamycinresistenzgen
Amp Ampicillinresistenzgen
ColE1 Replikationsursprung
 PCR Produkt TA-Klonierungsstelle

pET-11a

Heterologe Expressionen wurden mit dem pET-Vektor 11a (Novagen) durchgeführt, der ebenfalls eine Ampicillinresistenz vermittelt und als Expressionsvektor eine Transkriptionskontrolle durch das RNA-Polymerase/Promotor-System des Phagen T7 ermöglicht.

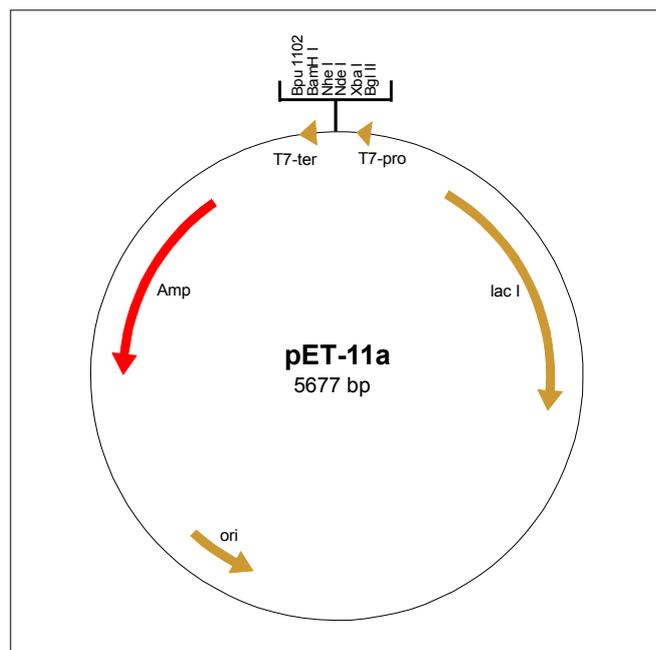


Abb. 8: Vektorkarte pET-11a.

T7-pro	T7 Promotor
T7-ter	T7 Terminator
Amp	Ampicillinresistenzgen
ori	Replikationsursprung
lac I	Lac-Repressor

3.3.2. *Pichia pastoris*

P. pastoris als Expressionssystem

Mit Hefe als Expressionssystem lassen sich viele authentische eukaryontische Proteine rekombinant darstellen, die alle posttranslationalen Modifikationen des ursprünglichen Wirts aufweisen können.

Als methylotrophe Hefe nutzt *P. pastoris* Methanol als einzige Kohlenstoffquelle, welches im ersten Schritt in Gegenwart von Sauerstoff durch das Enzym Alkohol-Oxidase (AOX) zu Formaldehyd oxidiert wird. Da es sich bei der Alkohol-Oxidase um ein peroxisomales Protein handelt und bei dieser Reaktion Wasserstoffperoxid entsteht, findet der Methanol-Metabolismus innerhalb spezieller, als Peroxisomen bezeichneter Zellorganellen statt. Dadurch werden toxische Nebenprodukte vom Rest der Zelle separiert. Der reprimierbare und starke Promotor des Alkohol-Oxidase-Gens reguliert die Produktion der Alkohol-Oxidase und wird auch zur Kontrolle der heterologen Proteinexpression verwendet, wodurch Expressionsniveaus von bis zu 30% des Gesamtzellproteins erreicht werden (Ellis et al., 1985).

Rekombinante Proteine können mit *P. pastoris* sowohl cytosolisch als auch in sezernierter Form hergestellt werden. Die cytosolische Expression findet eigentlich nur Anwendung, wenn das rekombinante Protein im ursprünglichen Wirt im Cytosol vorkommt. Mehr Anwendung findet dagegen die sekretorische Expression nativer Glykoproteine, da die endständige Mannosylierung und das damit verbundene Risiko der Hyperglykosylierung weitaus weniger ausgeprägt ist als bei anderen Hefen (Tschopp et al., 1987).

Die Expressionselemente werden bei *P. pastoris* ins Chromosom integriert. Sekretionssignale als Fusionsproteine mit dem rekombinanten Expressionsprodukt werden nach der Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) von verschiedenen Proteasen abgespalten. Im Lumen des ER findet sowohl die Faltung zur nativem Konformation als auch die Glykosylierung zu Glykoproteinen statt.

Primärsequenzen, die von *P. pastoris* als zu glykosylierende Stellen erkannt werden, sind Asn-X-Ser/Thr. Hier findet im ER die N-Glykosylierung des Mannose-Typs statt, bei

der 8-14 Mannose-Reste pro Oligosaccharidkette posttranslational an das Protein angefügt werden (Grinna und Tschopp, 1989).

P. pastoris-Stämme

P. pastoris besitzt zwei Gene, die für Alkohol-Oxidase codieren: *AOX1* und *AOX2*.

Für den weitaus größten Teil der Alkohol-Oxidase-Aktivität in der Zelle ist das *AOX1*-Gen verantwortlich. Die Expression ist genau reguliert und kann durch Induktion mit Methanol auf ein Vielfaches ansteigen.

P. pastoris-Stämme wie X33 und GS115 nutzen das *AOX1*-Gen, um Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Sie gehören zum Phänotyp Mut⁺ (Methanol ut ilization plus).

Das *AOX2*-Gen ist 97% homolog zum *AOX1*-Gen. Der Verlust des *AOX1*-Gens führt zum Verlust des größten Teils der Alkohol-Oxidase-Aktivität der Zellen und resultiert im verlangsamten Methanol-Metabolismus unter Nutzung des *AOX2*-Gens und damit in vermindertem Wachstum (Cregg et al., 1989). Zu diesem Phänotyp Mut^s (Methanol utilization slow) gehört der *P. pastoris*-Stamm KM-71.

Die Phäno- und Genotypen der verwendeten *P. pastoris*-Stämme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Stamm	Genotyp	Phänotyp
X33	Wildtyp	Mut ⁺
GS115	his4	Mut ⁺
KM71	arg4 his4 aox1:ARG4	Mut ^s

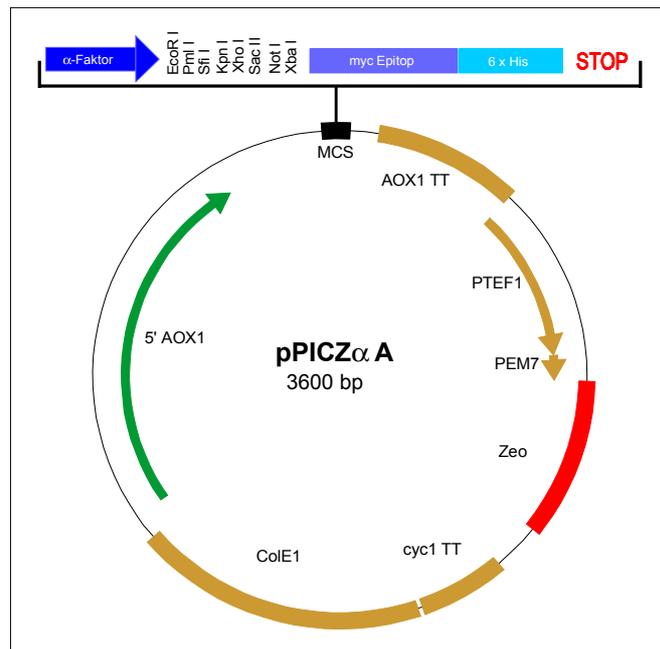
Tab. 1: Phäno- und Genotypen der verwendeten *P. pastoris* Stämme

Pichia pastoris-Vektoren

Für die heterologe Expression in *P. pastoris* wurde der Vektor pPICZ α A (Invitrogen) verwendet, der nach Linearisierung durch Restriktion innerhalb des AOX1-Gens in das *Pichia*-Genom integriert wurde. Dieser Vektor trägt eine aminoterminal Signalsequenz, die als Fusionsprotein die Sekretion des heterologen Proteins in das endoplasmatische Retikulum ermöglicht. Als Sekretionssignal dient das Pro-Segment des alpha-Matingfaktors (alpha-Faktor) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg et al., 1993). Nach Transfer in den Golgi-Apparat erfolgt die Prozessierung des heterologen Fusionsproteins, wobei der α -Faktor durch die Aktivität zweier Proteasen, die Genprodukte von KEX2 und STE13, abgespalten wird. Ferner codiert der Vektor für sechs Histidin-Reste, die C-terminal am heterologen Fusionsprotein die Aufreinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie erleichtern.

Abb. 9: Vektorkarte pPICZ α A

5' AOX1	Promotor der Alkoholoxidase
α -Faktor	α -Faktor Sekretionssignal
MCS	Multiple Cloning Site
<i>myc</i>	C-terminales myc-Epitop
6 x His	C-terminaler Polyhistidin-Tag
AOX1 TT	Transkriptionsterminationssignal des AOX1 Gens
<i>PTEF1</i>	Promotor des Transkriptionselongationsfaktors 1
<i>PEM 7</i>	Synthetischer prokaryontischer Promotor für Zeocinresistenzgen
<i>Zeo</i>	Zeocinresistenzgen
<i>Cyc1</i> TT	Transkriptionsterminationsregion des <i>cyc1</i> Gens
<i>ColE1</i>	Replikationsursprung für <i>E. coli</i>



3.4. Immunhistochemie

Immunhistochemie bezeichnet die Darstellung immunologisch reaktiver Strukturen in Geweben nach Anwendung immunchemischer Verfahren. Die Einführung der Immunchemie in die histologische und zytologische Routinediagnostik eröffnete u.a. die Möglichkeit zur Identifizierung und Charakterisierung maligner Tumoren. Sie ermöglicht z.B. den spezifischen Nachweis von Zelloberflächenstrukturen, die nur auf Tumorzellen, nicht aber auf gesunden Körperzellen vorkommen. So wird die Immunhistochemie u.a. zum Nachweis von Krebszellen in Patientenbiopsien verwendet.

Voraussetzung für den immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in Geweben und Zellen ist die Erhaltung der Antigene sowie der strukturellen Details. Für histologische und zytologische Untersuchungen müssen deshalb die Zellen und das Gewebe konserviert werden. Hierzu werden die entnommenen Gewebestücke mit Fixierungslösungen, oftmals Formalin, behandelt. Fixativa denaturieren Proteine durch Koagulation und Quervernetzung, verhindern somit die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme und unterdrücken das Wachstum von ebenfalls am Abbauprozess beteiligten Bakterien und Pilzen. Da eine Probe nur eine begrenzte Menge Antigen enthält und jeder Schritt der Bearbeitung dieser Probe etwas von dem Antigen zerstört, kommt dem Schritt der Fixation besondere Bedeutung zu.

Kryostatschnitte, bei denen der Gewebeblock sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird bieten den Vorteil, daß antigene Determinanten im Gewebe besser erhalten bleiben, da oftmals Antigene den Einsatz quervernetzender Fixativa wie Formalin nicht überstehen.

Das fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebestückchen wird anschließend mit einem Mikrotom in 2-5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gebracht.

Der anschließende immunchemische Nachweis erfolgt mit einem Antikörper gegen das darzustellende Antigen. Neben der Immunfluoreszenz stehen zur Lokalisierung von Antigenen eine Vielzahl immunenzymatischer Färbetechniken für die Lichtmikroskopie zur Verfügung.

Aufgrund der überlegenen Sensitivität gegenüber anderen Färbemethoden hat sich hierbei die Avidin-Biotin-Technik durchgesetzt (Hsu et al., 1981), die die starke Affinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein zu Biotin (Vitamin H) ausnutzt. Avidin kann auch durch Streptavidin, einem Protein aus dem Pilz *Streptomyces avidinii*, ersetzt werden.

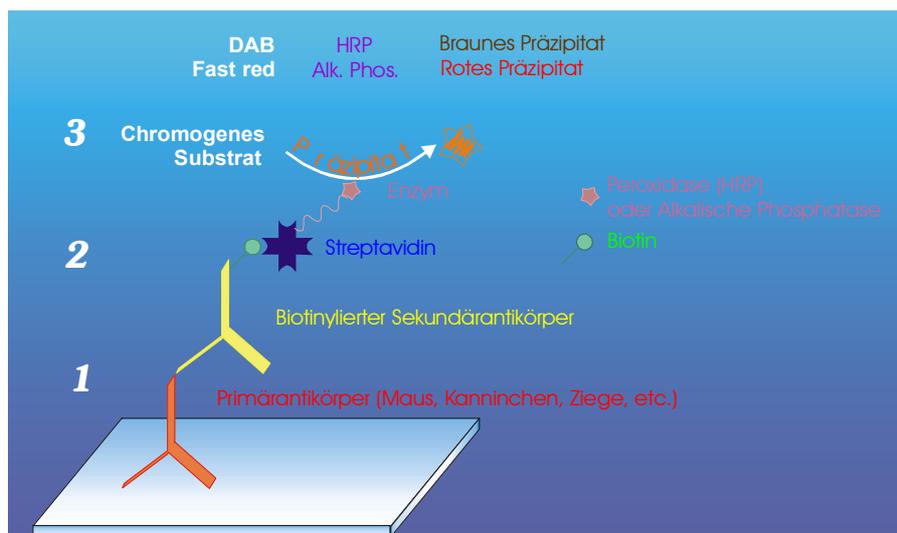


Abb. 10: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Methode.

Bei diesem Verfahren wird zuerst ein Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym für die Farbreaktion gebildet. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, die aufgrund der molekularen Konfiguration nicht alle besetzt werden. Freie Bindungsstellen am Avidin des Komplexes binden dann an das Biotin des biotinylierten Sekundär- oder Brückenantikörpers. Dieser Sekundärantikörper ist in einer anderen Spezies als der Primärantikörper hergestellt worden und erkennt den F_C -Teil des Primärantikörpers, der direkt an das Antigen koppelt. Die Reihenfolge der Reagenzien-Applikation bei der Avidin-Biotin-Technik ist dementsprechend Primärantikörper, biotinylierter Sekundärantikörper, vorgeformter Avidin-Biotin-Enzymkomplex und Substratlösung (Abb. 10).

Die Antikörper-Antigen-Reaktion wird letztendlich durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Hierbei wird aus einem farblosen chromogenen Substrat ein farbiges Präzipitat gebildet, das im Lichtmikroskop sichtbar ist und das Antigen spezifisch in oder

auf der Zelle nachweist. Als Enzyme werden in der Immunhistochemie meistens Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Alkalische Phosphatase (AP) mit den entsprechenden Substraten verwendet. Welches Enzym zur Farbreaktion eingesetzt wird, hängt vom Gewebe ab. Das Enzym Peroxidase ist endogen in Blutzellen, Dünndarm- und Nervenzellen vorhanden. Hingegen kommt Alkalische Phosphatase endogen u.a. in Knochengewebe, Leber und Niere vor. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, müssen deshalb die endogenen Enzyme bei Verwendung dieser Gewebe spezifisch inhibiert oder eine andere Nachweismethode angewendet werden.

Um einen Kontrast gegenüber der primären Farbreaktion zu erhalten, wird eine als Gegenfärbung bezeichnete sekundäre Farbreaktion durchgeführt, die allgemein zelluläre Strukturen sichtbar macht. Die Hämatoxilin-Färbung ist die verbreitetste Gegenfärbemethode in der Histologie und Routinepathologie. Hämatoxilin ist ein basischer Farbstoff und färbt saure Strukturen lila-blau. Aufgrund des hohen Gehalts an DNA haben Zellkerne eine starke Affinität zu diesem Farbstoff und erscheinen unter dem Lichtmikroskop lila-blau.

3.4.1. Vorbereitung der Schnitte – Entparaffinierung und Rehydrierung

Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden mit dem Mikrotom (DMRE, Leica, Wetzlar) in Scheiben (4 µm dick) geschnitten und jeweils zwei Cluster auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen. Zur vollständigen Entfernung des Einbettungsmediums wurden die Objektträger zweimal 15 Minuten in Xylol eingetaucht, das anschließend durch eine alkoholische Reihe von 100%, 70%, 40% Ethanol und abschließend PBS (0,01 M Na₂HPO₄, pH 7.2) entfernt wurde. Nach dem Umranden der einzelnen Cluster mit dem PAP-Stift (Dako, Kopenhagen, DK) waren die Schnitte für die Färbung einsetzbar.

3.4.2. Färbung

Die Objektträger wurden mit Angaben über die Antikörper beschriftet und zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen 30 min in Protein-Blockierlösung inkubiert (TBS-Puffer (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6) mit 2% BSA und 3% FCS). Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer (Biorad, München) bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper (Kaninchen-anti-Peptid-human ADAM 9, Pineda, Berlin) wurde 1:70 mit TBS-Puffer mit 2% BSA und 3% FCS verdünnt. Nach „Abklopfen“ der Lösung vom Objektträger wurden ca. 150 µl Verdünnung des primären Antikörpers aufgetragen und 90 min inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde nach „Abklopfen“ der Antikörperlösung durch zweimal fünfminütiges Waschen in TBS-Puffer entfernt. Ca. 150 µl des 1:500 in TBS-Puffer verdünnten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen IgG; Dako, Kopenhagen, DK) wurden über die Schnitte verteilt und 60 Minuten inkubiert. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde wiederum nach „Abklopfen“ der Antikörperlösung durch zweimal fünfminütiges Waschen in TBS-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit 150 µl Streptavidin-Biotin-Komplex Lösung (Dako) 30 Minuten inkubiert. Die Darstellung des Streptavidin-Biotin-Komplexes erfolgte nach beiliegendem Herstellerprotokoll. Zur Entfernung von nicht gebundenem Streptavidin-Biotin-Komplex wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Die Sichtbarmachung der Immunreaktion erfolgte durch sechsminütige Inkubation mit „Fuchsin Plus Substrat-System“ (Dako) nach Angaben des Herstellers, welches zur Inaktivierung eventuell vorhandener endogener Alkalischer Phosphatase Aktivität mit einem Tropfen Levamisol (Dako) pro ml Substratlösung versetzt wurde (Ponder et al., 1981). Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit H₂O_{bidest} gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte 30 Sekunden mit Hämatoxilin (Dako), welches anschließend unter Leitungswasser abgewaschen wurde. Zur Vermeidung von Ablagerungen einzelner Chromogenpartikel und Pigmente, die zu Färbefaktoren führen können, wurde das Hämatoxilin zuvor frisch filtriert. Das abschließende Eindecken der getrockneten Schnitte erfolgte mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex (Merck, Darmstadt).

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop RM 2155 unter Verwendung der Software DC-Viewer (Leica, Wetzlar).

4. Ergebnisse

4.1. Klonierungen

4.1.1. Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial stand die humane Prostatakarzinom-Zelllinie BM 1604 zur Verfügung, aus der nach Kultivierung der Zellen die Gesamt-RNA isoliert wurde. Durch reverse Transkription konnten cDNAs erhalten werden, die durch PCR mit den Oligonukleotiden β -Aktin-F und β -Aktin-R überprüft wurden. Das amplifizierte 838 bp große cDNA-Fragment codiert für einen Teil des β -Aktin-Gens und bestätigte die erfolgreiche reverse Transkription (Abb. 11).

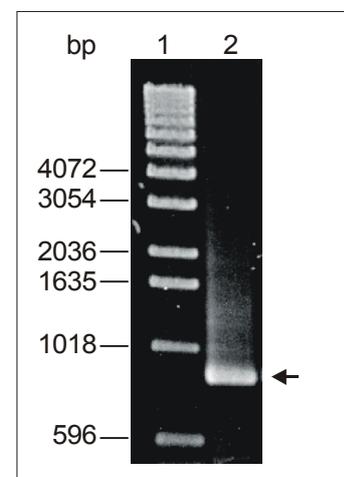


Abb. 11: Kontrolle der reversen Transkription
Bahn 1: 1 kb-Leiter
Bahn 2: Amplifiziertes 838 bp großes cDNA Fragment des β -Aktin-Gens (←)

Ausgehend von der cDNA wurden zur anschließenden Amplifizierung der Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 mit Propeptid (ProMP) die vollständig homologen Oligonukleotide 5'-procd-F100 und 3'-procd-R100 eingesetzt. Das 1149 bp große Amplifikat (Abb. 12) wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel isoliert und durch TA-Ligation in den Vektor pCR 2.1-TOPO eingebracht. Nach Transformation der *E. coli*-Zellen TOP10 wurden die isolierten Plasmide zur DNA-

Sequenzierung eingesetzt, welche die korrekte Basensequenz der cDNA für die ProMP bestätigte.

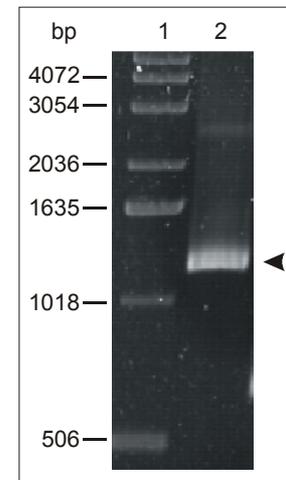


Abb.12: RT-PCR zur Amplifikation der ProMP cDNA
Bahn 1: 1 kb-Leiter
Bahn 2: cDNA Amplifikat der ProMP (< 1149 bp)

4.1.2. Klonierung in Expressionsvektoren

Durch erneute PCR wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-h-procd-F und 3'-h-procd-R/Not die cDNA der ProMP mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und NotI versehen, die zur weiteren Klonierung dienen. Die angestrebte Expression des rekombinanten Proteins in *Pichia pastoris* sollte durch den Expressionsvektor pPICZ α A vermittelt werden, der eine sekretorische Expression ermöglicht. Da dieser Vektor auf der 3'-Seite der Klonierungsstelle die DNA-Sequenz für ein C-terminales *myc*-Epitop und einen C-terminalen sechsfachen Polyhistidin-Tag trägt, wurde mit den Oligonukleotiden h-procd-F und h-procd-R/Not-*mycHis* zusätzlich die cDNA für die ProMP mit C-terminalem *myc*-Epitop und Polyhistidin-Tag (ProMP+*mycHis*) amplifiziert.

Das 5'-Oligonukleotid h-procd-F enthielt einen Teil der cDNA, die für das Pro-Segment des α -Matingfaktors (α -Faktor) aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert, wodurch nach Ligation die cDNA des Sekretionssignals vervollständigt wurde.

Das 3'-Oligonukleotid h-procd-R/Not enthielt ein Stop-Codon während das 3'-Oligonukleotid h-procd-R/Not-mycHis kein Stop-Codon besaß. Dadurch wurden zwei cDNA-Konstrukte von 1149 bp bzw. 1146 bp erhalten, die für die ProMP ohne bzw. mit *myc*-Epitop und Polyhistidin-Tag codierten (Abb. 13).

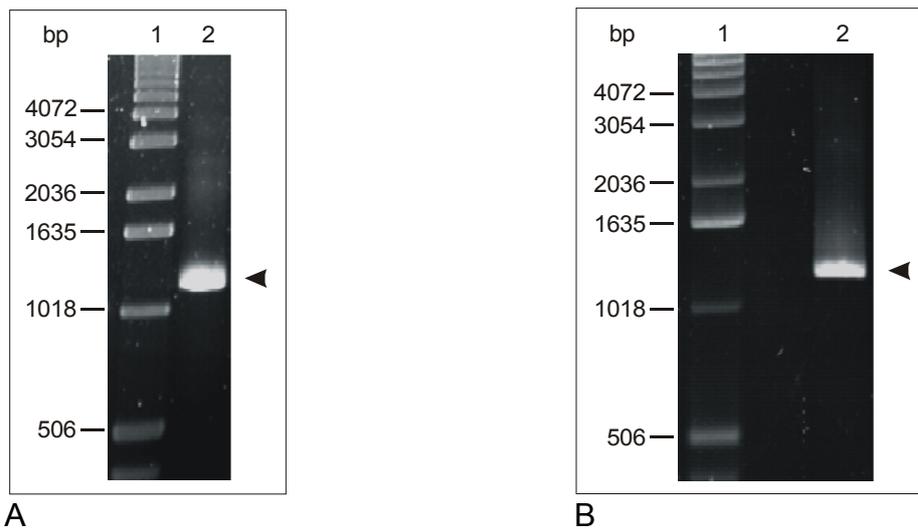


Abb. 13: Nachweis der PCR-Produkte der ProMP (A) und ProMP+mycHis (B)

- A Bahn 1: 1 kb-Leiter
 Bahn 2: cDNA-Amplifikat für die ProMP (< 1149 bp)
- B Bahn 1: 1 kb-Leiter
 Bahn 2: cDNA-Amplifikat für die ProMP+mycHis (< 1146 bp)

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Isolierung aus dem Gel wurden die PCR-Produkte mit dem pCR 2.1-TOPO-Vektor ligiert. Die Plasmide wurden aus transformierten *E. coli*-Zellen des Stamms TOP10 isoliert und die cDNA der ProMP und ProMP+mycHis durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und NotI erhalten, wonach sie zur Ligation mit dem entsprechend vorbereiteten Expressionsvektor pPICZ α A eingesetzt wurden. *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen wurden mit den Plasmiden transformiert und in Zeocin-haltigem Medium (25 μ g/ml) kultiviert. Nach Isolierung der Plasmide wurden diese durch Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und NotI überprüft (Abb. 14).

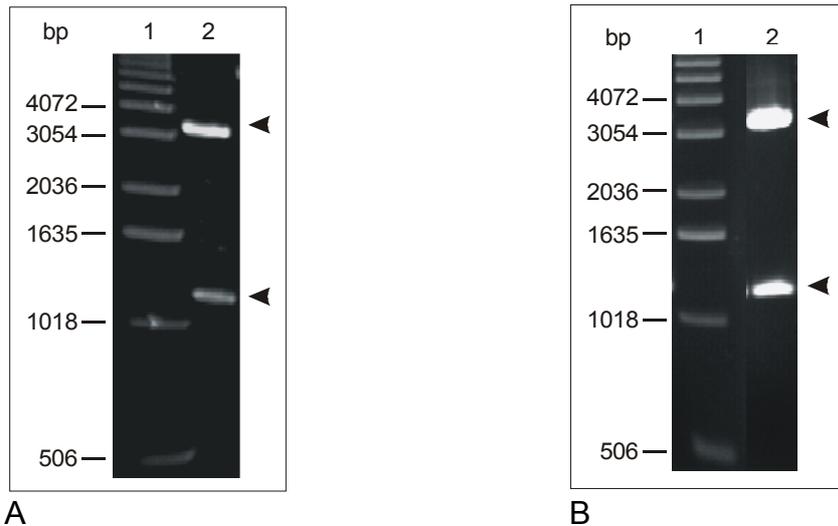


Abb. 14: Restriktionsanalyse der Plasmide ProMP/pPICZ α A (A) und ProMP+mycHis/pPICZ α A (B)

- A Bahn 1: 1 kb-Leiter
 Bahn 2: Plasmid ProMP/pPICZ α A nach Restriktion mit XhoI und NotI
- B Bahn 1: 1 kb-Leiter
 Bahn 2: Plasmid ProMP+mycHis/pPICZ α A nach Restriktion mit XhoI und NotI

Die im Agarosegel sichtbaren Banden mit einer Größe von 1149 bp bzw. 1146 bp und 3600 bp entsprachen der ProMP- cDNA (< 1149 bp) bzw. ProMP+mycHis-cDNA (< 1146 bp) sowie der DNA des Vektors pPICZ α A (< 3600 bp) und bestätigten somit die erfolgreiche Klonierung.

Zusätzlich konnte für beide Konstrukte die fehlerfreie Basensequenz sowie die korrekte Rekonstruktion des α -Faktors durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

4.1.3. Mutagenese-PCR

Das Plasmid ProMP/pPICZ α A wurde als Template für eine zielgerichtete Mutagenese-PCR eingesetzt, durch die die cDNA für eine katalytisch inaktive Variante erhalten werden sollte. Unter Verwendung der mutagenen Oligonukleotidprimer 5'-h-procd-E>A-F und 3'-h-procd-E>A-R sollte durch PCR gezielt eine Mutation in das Codon eingeführt werden, das für die Aminosäure Glutamat³⁴⁸ codiert, die sich im Zinkbindungsmotiv befindet und für die katalytische Aktivität essentiell ist. Dabei wurde die Sequenz der

mutagenen Oligonukleotidprimer so gewählt, daß die Basensubstitution während der Translation zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat³⁴⁸ zu Alanin führt.

Durch PCR konnte ein modifiziertes 4749 bp großes Amplifikat (ProMP-E348A/pPICZ α A) erhalten werden (Abb. 15), welches zum Abbau der parentalen DNA mit der Endonuklease DpnI verdaut wurde. Kompetente *E. coli* JM109-Zellen wurden anschließend mit dem PCR-Produkt transformiert, die Plasmide isoliert und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt. Diese bestätigte den Erhalt eines fehlerfreien Amplifikats, das an der korrekten Position die gewünschte Basensubstitution aufwies (ProMP-E348A).

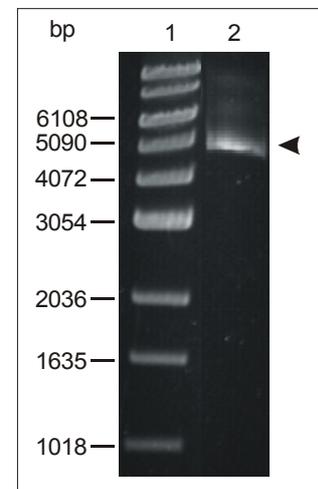


Abb. 15: *site-directed* Mutagenese-PCR zur Generierung der cDNA für die inaktive Variante ProMP-E348A
Bahn 1: 1 kb-Leiter
Bahn 2: cDNA-Amplifikat der ProMP-E348A (< 4749 bp)

4.1.4. Transformation von *P. pastoris*

Die Plasmide ProMP/pPICZ α A, ProMP+mycHis/pPICZ α A und ProMP-E348A/pPICZ α A wurden mit der Restriktionsendonuklease SacI linearisiert, welche im *AOX1*-Gen des Vektors spaltet. Jeweils 5-10 μ g DNA wurden zur Transformation der vorbereiteten kompetenten Zellen der *P. pastoris*-Stämme GS115, X33 und KM71 eingesetzt, welche durch Elektroporation erfolgte. Von den auf Zeocin-haltigem Medium selektierten Klonen wurden jeweils fünf Klone pro Stamm zur Isolierung der DNA ausgewählt. Bei allen Klonen konnte die Integration der eingesetzten DNA in das Hefegenom durch PCR mit den spezifischen Klonierungsprimern bestätigt werden.

4.2. Expression

4.2.1. Expression der katalytischen Domäne von ADAM 9 in *E. coli*

Zur heterologen Expression der Metalloprotease-Domäne von humanem ADAM 9 ohne Propeptid in *E. coli* stand zu Beginn der Arbeit bereits ein Expressionsplasmid zur Verfügung (L. Schwettmann, Diplomarbeit 1998). Hierbei handelte es sich um die für die katalytische Domäne codierende cDNA, kloniert in den Expressionsvektor pET-11a. Nach Bestätigung der korrekten cDNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung wurden hiermit die *E. coli*-Stämme BL21[DE3] und HMS174[DE3] transformiert. Die dadurch erhaltenen Expressionssysteme MP/pET-11a/BL21[DE3] und MP/pET-11a/HMS174[DE3] wurden zur Expression in 3 l Kulturmedium eingesetzt. Eine Aktivierung des T7 RNA-Polymerasegens durch IPTG und damit die Induktion der heterologen Expression erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,6. Die Expression erstreckte sich über vier Stunden, wobei zur Kontrolle stündlich Proben der Kultur entnommen wurden, die nach Zentrifugation und Resuspension des Pellets in Laemmli-Puffer durch SDS-Gelelektrophorese untersucht wurden. Die starke Überexpression des rekombinanten Proteins war in beiden Expressionssystemen im PAA-Gel anhand der an Intensität stetig zunehmenden 24 kDa großen Proteinbande erkennbar (Abb. 16).

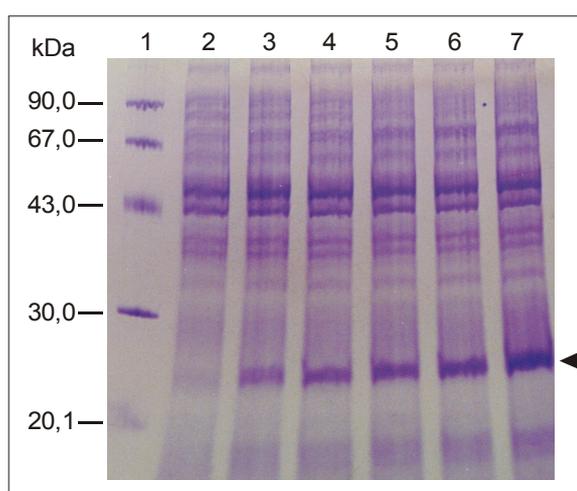
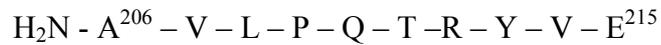


Abb. 16: Zeitlicher Expressionsverlauf der Metalloprotease-Domäne (◄) in *E. coli*

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Kulturproben 0h, 1/2h, 1h, 2h, 3h und 4h nach Induktion

Die Aminosäuresequenzierung mittels Edman-Abbau bestätigte den korrekten N-Terminus der 23 kDa großen ADAM 9 Metalloprotease-Domäne:



4.2.2. Präparation des Expressionsproduktes aus *E. coli*

Durch die Verwendung des *E. coli*-Stamms BL21[DE3] und HMS174[DE3] in Kombination mit dem Vektorsystem pET-11a wurde das rekombinante Enzym während der Expression intrazellulär in Form von „inclusion bodies“ abgelagert. Diese konnten nach Zellyse durch eine Kombination aus osmotischem Schock und enzymatischer Degradation der Zellwand durch Lysozym aus dem Bakterienlysat isoliert werden. Die Zentrifugation lieferte Pellets von 2g/l Expressionskultur. Die Solubilisierung gelang mit Aufschlußpuffer, der 8 M Harnstoff und 150 mM β -Mercaptoethanol enthielt.

Nach Reduzierung der denaturierenden und reduzierenden Reagenzien auf 4 M Harnstoff bzw. 50 mM β -Mercaptoethanol durch Dialyse erfolgte die Vorreinigung des rekombinanten Proteins mittels Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Durch Elution bei einem pH-Wert von 8,5 mit einem Salzgradienten von 0 M bis 0,8 M NaCl in Tris-Puffer konnte ein großer Teil Fremdprotein abgetrennt und so die rekombinante katalytische Domäne in vorgereinigter Form gewonnen werden. Die ADAM 9 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert (Abb. 17).

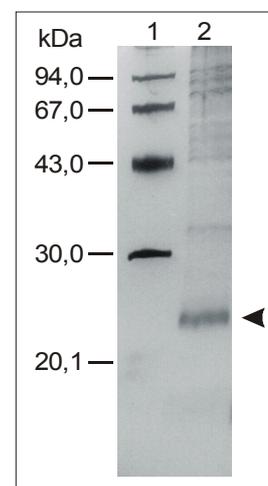


Abb. 17: Reinigungskontrolle des *E. coli* Expressionsproduktes

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: ADAM 9 Metalloprotease-Domäne nach Q-Sepharose (< 24 kDa)

Da eine anschließende Reinigung bis zur vollständigen Homogenität durch andere chromatographische Methoden nicht gelang, wurde die Metalloprotease-Domäne in ihrer vorgereinigten Form für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Da für katalytische Aktivität die biologisch aktive Konformation notwendig ist, mußten Detergenzien entfernt und Cystein-Brücken richtig geknüpft werden. Die ADAM 9 Metalloprotease-Domäne besitzt 6 Cystein-Reste. Zur Faltung in die aktive Konformation wurde über mehrere Tage ein aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol bestehendes Redox-System („oxido-shuffling“-System) eingesetzt (Buchner et al., 1992). Anschließend wurden die durch Ultrafiltration konzentrierten Faltungsansätze nach Dialyse gegen nativen Puffer für Aktivitätstests verwendet.

4.2.3. Expression in *P. pastoris*

Zur rekombinanten Darstellung der ADAM 9 Metalloprotease-Domäne mit Propeptid (ProMP) wurden jeweils die transformierten positiven Klone der Stämme GS115, X33 und KM71 eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte über mehrere Tage in 500ml methanolhaltigem Medium. Zur Kontrolle der Expression wurden täglich Proben entnommen, deren Überstände mittels SDS-PAGE untersucht wurden. Dabei zeigte sich, daß ein Expressionsmaximum nach vier Tagen erreicht war.

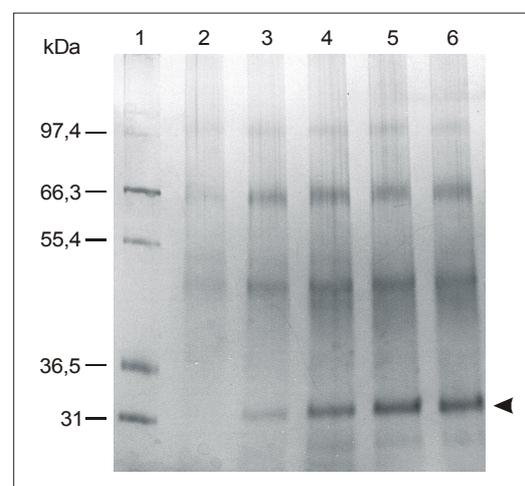


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Expression (◀) in *P. pastoris*

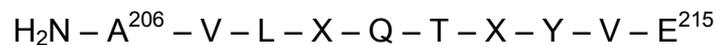
Bahn 1: M12-Marker

Bahn 2: Kulturüberstände 0d, 1d, 2d, 3d und 4d nach Induktion

Eine Überexpression des rekombinanten Proteins erfolgte ausschließlich im *P. pastoris*-Stamm KM71. Eine Überexpression in den Stämmen X33 und GS 115 des Phänotyps Mut⁺ war dagegen nicht erkennbar. Das Expressionsprodukt der ProMP wurde stark in das Kulturmedium sezerniert und war im PAA-Gel anhand einer überexprimierten 32 kDa großen Bande sichtbar (Abb. 18). Die Ausbeute an rekombinantem Protein betrug ca. 6 mg/l.

Die experimentell beobachtete Proteingröße von 32 kDa entsprach jedoch nicht der erwarteten theoretischen Größe von ca. 55 kDa für die ProMP.

Nach erfolgter PAA-Gelelektrophorese und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran konnten die 10 N-terminalen Aminosäuren mittels Edman-Abbau identifiziert werden:



Dabei zeigte sich, daß der N-Terminus des Expressionsproduktes identisch mit dem N-Terminus der Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 war.

Zusätzlich wurden die transformierten *P. pastoris* Stämme GS115, X33 und KM71 der mutierten Variante ProMP-E348A zur Expression in methanolhaltigem Medium kultiviert. Auch hier konnte anhand der entnommenen und im PAA-Gel aufgetrennten Proben ein sezerniertes Expressionsprodukt von 32 kDa nachgewiesen werden (Abb. 19).

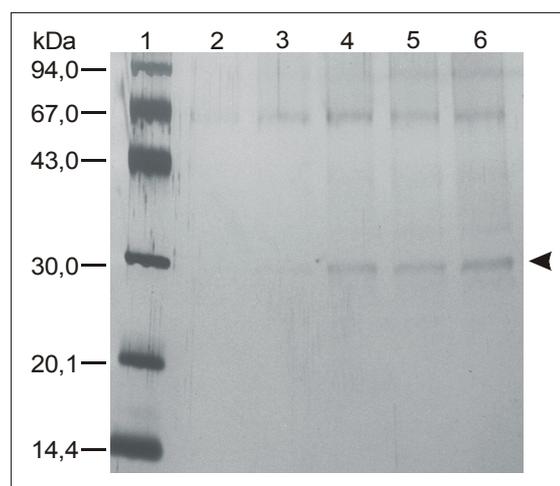
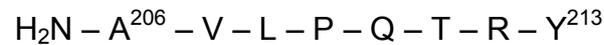


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Expression der mutierten Variante (◄) in *P. pastoris*

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2-6: Kulturüberstände 0, 1d, 2d, 3d und 4d nach Induktion

Eine detektierbare Expression erfolgte ebenfalls nur durch die Zellen des *P. pastoris*-Stamms KM71. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran konnte der N-Terminus des Expressionsproduktes durch Edman-Abbau identifiziert werden:

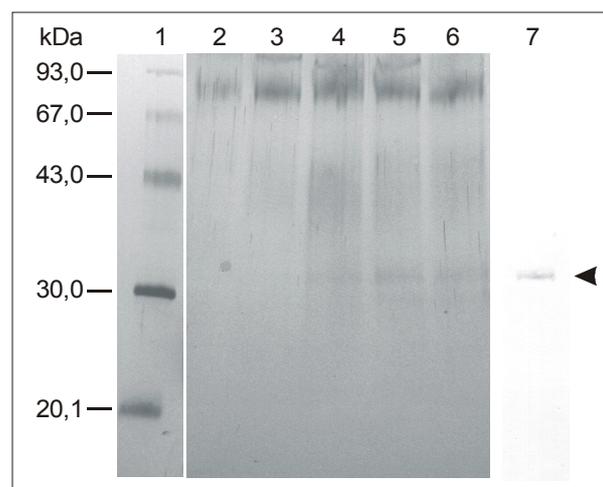


Auch in diesem Fall war der N-Terminus identisch mit dem der Metalloprotease-Domäne von humanem ADAM 9.

Desweiteren wurden zur Expression der ProMP mit C-terminalem Polyhistidin-Tag und *myc*-Epitop in den *P. pastoris*-Stämmen KM71, GS115 und X33 die Zellen vier Tage kultiviert. Der Nachweis einer heterologen Expression gelang nach Probenentnahme durch Auftrennung der sezernierten Proteine im PAA-Gel. Das überexprimierte Produkt war als 35 kDa große Protein-Bande im silbergefärbten PAA-Gel sichtbar (Abb. 20), wobei die schwache Expression nur mit dem *P. pastoris*-Stamm KM71 gelang. Aufgrund der schwachen Expression war eine Bestimmung des N-Terminus durch Edman-Abbau nicht möglich.

Abb. 20: Zeitlicher Expressionsverlauf von ProMP+mycHis (◀) in *P. pastoris*

Bahn 1: LMW-Marker
Bahn 2-6: Kulturüberstände 0, 1d, 2d, 3d und 4d nach Induktion
Bahn 7: Western-Blot



Die Identifizierung des Expressionsproduktes gelang jedoch nach Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot unter Verwendung eines gegen das *myc*-Epitop gerichteten anti-*myc* Antikörpers. Dadurch konnte das 35 kDa große Expressionsprodukt als bereits prozessierte ADAM 9 Metalloprotease-Domäne identifiziert werden. Der Größenunterschied von 3 kDa zum Wild-Typ Protein war auf den zusätzlichen C-terminalen Polyhistidin-Tag sowie das *myc*-Epitop zurückzuführen.

4.2.4. Reinigung der rekombinanten Proteine

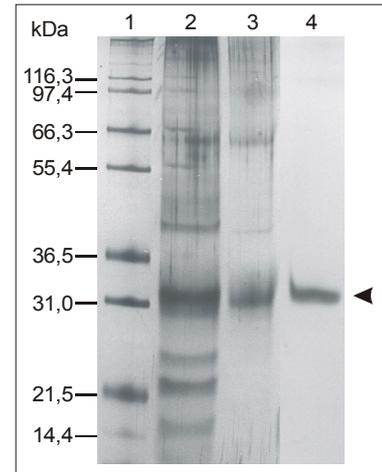
Wild-Typ der Metalloprotease-Domäne

Da *P. pastoris* das rekombinante Protein in das Medium sezernierte, wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation von den Zellen vollständig getrennt und zur Reinigung durch Säulenchromatographie eingesetzt. Nach Dialyse des Kulturüberstandes gegen Tris-Puffer konnte bei einem pH-Wert von 8,5 eine Bindung der Proteine an den starken Anionenaustauscher Q-Sepharose erzielt werden. Zur Elution wurde ein Salzgradient von 0,2 bis 0,7 M Natriumchlorid in Tris-Puffer eingesetzt und das Eluat fraktioniert gesammelt (Abb. 21, Bahn 3). Das rekombinante Protein wurde durch hydrophobe Interaktionschromatographie bis zur Homogenität gereinigt. Dazu wurden die vereinigten Fraktionen des Q-Sepharose-Eluats durch Dialyse gegen Tris-Puffer, der 2M Ammoniumsulfat enthielt, auf die erforderlichen Hochsalzbedingungen eingestellt. Die Bindung an Phenyl-Sepharose gelang bei pH 8,0 unter Schütteln des Säulenmaterials mit der Proteinlösung. Die anschließende Elution erfolgte durch einen linear abnehmenden Salzgradienten von 2M bis 0M Ammoniumsulfat. Die das Zielprotein enthaltenden vereinigten Fraktionen wurden durch Ultrafiltration konzentriert und die Homogenität nach Gelelektrophorese im PAA-Gel überprüft (Abb. 21).

Die Ausbeute betrug 0,1 mg/l Kultur.

Abb. 21: Reinigung der Metalloprotease-Domäne (32 kDa) durch Säulenchromatographie

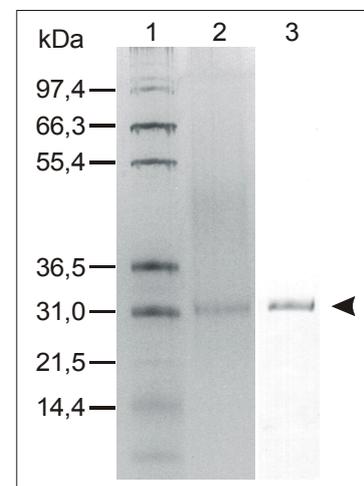
- Bahn 1: M12-Marker
- Bahn 2: Kulturüberstand
- Bahn 3: Metalloprotease-Domäne nach Ionenaustauschchromatographie
- Bahn 4: Metalloprotease-Domäne nach hydrophober Interaktionschromatographie (◀)



Zur Reinigung der Variante MP-E348A wurde die gleiche Reinigungsstrategie verfolgt. Hierbei konnte das Zielprotein jedoch schon nach der Ionenaustauschchromatographie in homogener Form erhalten werden. Die Identität wurde mittels Western-Blot mit einem anti-ADAM 9 Antikörper bestätigt (Abb. 22).

Abb. 22: Reinigung der mutierten Metalloprotease-Domäne (◀; 32 kDa) durch Ionenaustauschchromatographie

- Bahn 1: M12-Marker
- Bahn 2: Eluat nach Ionenaustauschchromatographie
- Bahn 3: Western-Blot

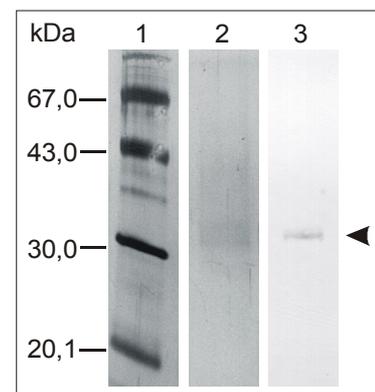


Durch die verwendete Reinigungsstrategie konnten beide Varianten der Metalloprotease-Domäne homogen erhalten werden. Die eindeutige Identifizierung der Proteine gelang durch Bestimmung der N-Termini sowie durch immunologischen Nachweis.

Für die Reinigung der Variante MP+mycHis bot sich aufgrund der sechs Histidin-Reste am C-Terminus die Metallchelate-Affinitätschromatographie an. Hierzu wurde der Kulturüberstand gegen Äquilibrierungspuffer (pH 8,0), der 20 mM Imidazol enthielt, dialysiert. Unter Schütteln konnten die Proteine an eine Nickel-NTA-Säulenmatrix gebunden werden. Eluiert wurde unter Verwendung eines linear steigenden Imidazol-Gradienten von 0 M bis 200 mM. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert. Nach erfolgter Gelelektrophorese war das Zielprotein anhand einer sehr schwachen Proteinbande im PAA-Gel sichtbar (Abb. 23). Zusätzlich erfolgte die Detektion des Zielproteins durch Western-Blot mit einem anti-*myc* Antikörper. Da die Konzentration des erhaltenen, nicht bis zur Homogenität gereinigten Proteins sehr gering war, waren keine zusätzlichen Reinigungsschritte mehr möglich.

Abb. 23: Reinigung der Variante ProMP+mycHis (◀) durch Metallchelate-Affinitätschromatographie

Bahn 1: LMW-Marker
Bahn 2: Eluat nach Ni-NTA-Sepharose
Bahn 3: Western-Blot



4.3. Charakterisierung

4.3.1. Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität

Als Substrat des ADAM 9 war neben der Insulin B-Kette auch das Membranprotein HB-EGF (Heparin binding-epidermal growth factor) bekannt, das durch ADAM 9 von der Membranoberfläche abgespalten wird (Izumi et al., 1998). Zusätzlich war die Fähigkeit zur Spaltung von Peptiden bekannt, die Teilsequenzen von Membranoberflächenproteinen entsprachen. Diese dienen Sekretasen als Erkennungssequenz für die proteolytische Prozessierung. Hierzu gehören Peptidsequenzen des β -APP, $\text{TNF}\alpha$, p75-TNFR und KL-1 (Roghani et al., 1999). Bestandteile der extrazellulären Matrix sind in dieser Hinsicht noch nicht untersucht worden.

Deshalb wurde die rekombinant dargestellte Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität mittels Zymographie eingesetzt. Zusätzlich zum Nachweis der Aktivität erlaubt die Zymographie die Abschätzung des Molekulargewichts einer aktiven Protease. Als Substrate dienten humanes Fibronectin, Gelatin und β -Casein.

4.3.2. Untersuchungen zur Aktivität der Metalloprotease-Domäne aus *E. coli*

Die sich in nicht denaturierendem Puffer befindenden Faltungsansätze des *E. coli*-Expressionsproduktes wurden zur Untersuchung proteolytischer Aktivität mittels Zymographie eingesetzt. Als Substrate wurden humanes Plasmafibronektin, Gelatin und β -Casein in das PAA-Gel einpolymerisiert.

Mit diesen Substraten konnte jedoch keine proteolytische Aktivität der rekombinant in *E. coli* dargestellten Metalloprotease-Domäne detektiert werden. Auch verschiedene Modifikationen der Faltungsmethoden zur Überführung des Expressionsproduktes in die katalytisch aktive Konformation sowie die direkte Dialyse des vorgereinigten Produktes gegen nicht denaturierenden Puffer führten nicht zur katalytischen Aktivität.

4.3.3. Untersuchungen zur Aktivität der Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*

Die im Gegensatz zu dem *E. coli* Expressionsprodukt glykosylierten Produkte aus *P. pastoris* wurden ebenfalls zum Nachweis proteolytischer Aktivität für die Zymographie eingesetzt. Als Proben diente die bis zur Homogenität gereinigte Wild-Typ Metalloprotease-Domäne sowie deren mutierte Variante E348A. Zusätzlich wurde die durch Metallchelate-Affinitätschromatographie vorgereinigte Metalloprotease-Domäne mit C-terminalem *myc*-Epitop und Polyhistidin-Tag eingesetzt. Die Proben wurden zuvor gegen nicht denaturierenden Puffer dialysiert. Als Substrate dienten in das PAA-Gel einpolymerisiertes humanes Plasmafibronektin, Gelatin und β -Casein.

Wie aus den Abbildungen 24A bis 24C ersichtlich ist, konnte auf diese Weise proteolytische Aktivität für die Wild-Typ Metalloprotease-Domäne gegen Fibronektin, Gelatin und β -Casein nachgewiesen werden. Die Abbaubanden waren als helle Flecken auf dem durch Coomassie blau gefärbten Substratgel zu erkennen. Zusätzlich konnte die korrekte Größe der Abbaubande von 32 kDa anhand eines Protein-Größenstandards bestätigt werden.

Die Variante der Metalloprotease-Domäne, bei der die Aminosäure Glutamat³⁴⁸ durch Alanin ausgetauscht wurde, zeigte in keinem der Zymogramme proteolytische Aktivität.

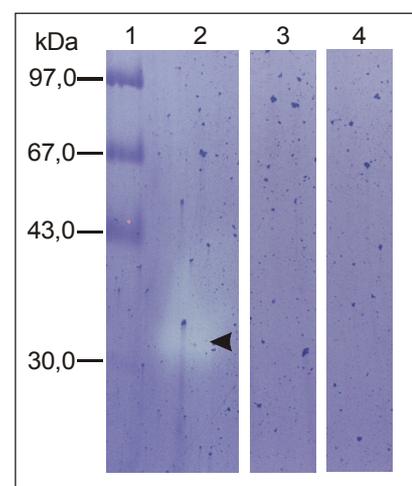


Abb. 24: Aktivitätsnachweis durch Zymographie

A: Fibronektin-Zymogramm

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Wild-Typ Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*

Bahn 3: Variante E348A der Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*

Bahn 4: Metalloprotease-Domäne mit C-term. *myc*-Epitop und His-Tag aus *P. pastoris*

Abb. 24: Aktivitätsnachweis durch Zymographie

B: β -Casein-Zymogramm

Bahn 1: LMW-Marker

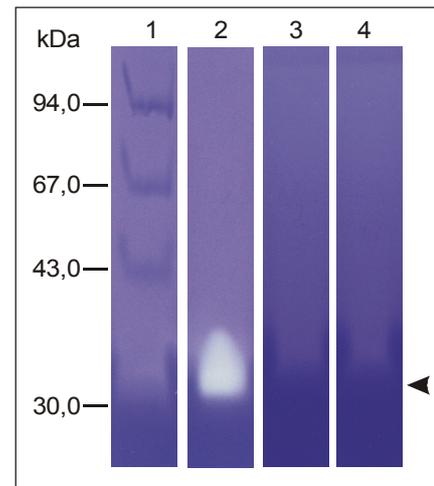
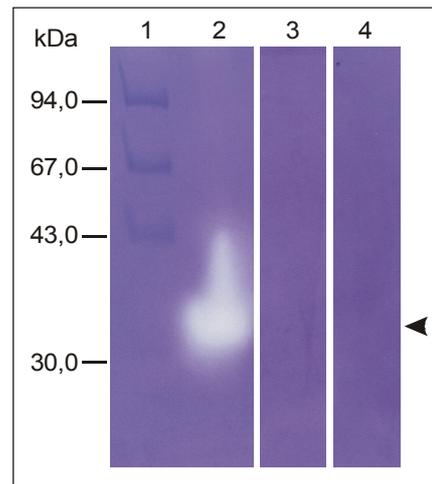
Bahn 2: Wild-Typ Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*Bahn 3: Variante E348A der Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*Bahn 4: Metalloprotease-Domäne mit C-term. myc-Epitop und His-Tag aus *P. pastoris*

Abb. 24: Aktivitätsnachweis durch Zymographie

C: Gelatin-Zymogramm

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Wild-Typ Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*Bahn 3: Variante E348A der Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris*Bahn 4: Metalloprotease-Domäne mit C-term. myc-Epitop und His-Tag aus *P. pastoris*

Auf diese Weise konnte erstmals proteolytische Aktivität einer rekombinant in *P. pastoris* dargestellten Metalloprotease-Domäne eines ADAMs gegen Fibronectin, β -Casein und Gelatin nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente die zur Verfügung stehende rekombinante inaktive Variante E348A aus *P. pastoris*.

Für die Variante MP+mycHis war im Zymogramm keine Aktivität nachweisbar. Der Unterschied zur Wild-Typ Metalloprotease-Domäne bestand lediglich in dem C-terminal angefügten myc-Epitop und Polyhistidin-Tag.

4.3.4. Spaltung von Fibronektin und Plaminogen

Die Degradation von humanem Fibronektin durch rekombinantes ADAM 9 wurde *in vitro* überprüft, indem Fibronektin mit der rekombinanten Metalloprotease-Domäne 10 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Reaktionsansatzes durch Gelelektrophorese im PAA-Gel. Dabei zeigte sich, daß Fibronektin durch ADAM 9 zu mehreren hochmolekularen Fragmenten (>94 kDa) sowie zu kleineren Fragmenten von ca. 50 kDa und 24 kDa degradiert wurde (Abb. 25).

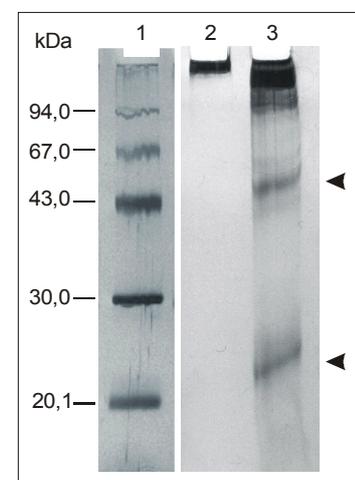


Abb. 25: *In vitro* Spaltung von Fibronektin durch ADAM 9

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Fibronektin nach Inkubation für 10h bei 37°C ohne ADAM 9

Bahn 3: Abbauprodukte (◄) des Fibronektins nach Inkubation mit ADAM 9 für 10h bei 37°C

Die Reaktionszeit von 10 Stunden war erforderlich, weil bei kürzeren Reaktionszeiten kein deutlicher Abbau des Substrates erkennbar war. In Gegenwart von EDTA als chelatisierender Inhibitor für Metalloproteasen fand keine Degradation des Fibronektins statt. Ferner zeigte die zur Kontrolle eingesetzte inaktive Variante der Metalloprotease-Domäne wie erwartet keine proteolytische Aktivität.

Desweiteren wurde Plasminogen als potentielles Substrat für ADAM 9 untersucht. Plasminogen wurde für eine Stunde mit der rekombinanten Metalloprotease-Domäne bei 37°C inkubiert. Durch Auftrennung der Proteolyseprodukte im PAA-Gel konnte eine deutliche Degradation des Substrates festgestellt werden. Dabei entstanden aus dem ursprünglich ca. 90 kDa großen Protein drei kleinere Fragmente von ca. 50 kDa, ca. 38 kDa und ca. 35 kDa (Abb. 26). In diesem Fall reichte eine Inkubationszeit von einer Stunde zur fast vollständigen Degradation des Substrates aus. Der Zusatz von EDTA

als Inhibitor führte zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Außerdem konnte bei Verwendung der inaktiven Variante kein Abbau des Plasminogens beobachtet werden.

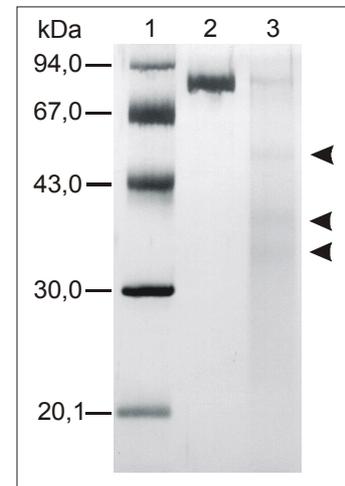


Abb. 26: *In vitro* Spaltung von Plasminogen durch ADAM 9

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Plasminogen nach Inkubation für 1h bei 37°C ohne ADAM 9

Bahn 3: Abbauprodukte (<) des Plasminogens nach Inkubation mit ADAM 9 für 1h bei 37°C

Neben Fibronektin, Gelatin und β -Casein konnte somit Plasminogen als weiteres Substrat für ADAM 9 identifiziert werden.

Hingegen konnten durch zusätzliche Untersuchungen α 2-Makroglobulin, Plasmakallikrein sowie die Integrine $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_b$ als Substrate des ADAM 9 ausgeschlossen werden. Desweiteren war keine Aktivierung der Progelatinasen A und B, wie sie durch MT-MMPs vermittelt werden kann (Sato et al., 1994), durch ADAM 9 möglich.

Tabelle 2 faßt zur Übersicht die Substrate zusammen, die zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität von ADAM 9 eingesetzt wurden:

Substrat	Degradation durch ADAM 9
Humanes Fibronectin	+
β -Casein	+
Gelatin	+
Plasminogen	+
α 2-Makroglobulin	--
Plasmakallikrein	--
Integrin $\alpha_5\beta_1$	--
Integrin $\alpha_v\beta_6$	--
Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$	--
Integrin $\alpha_{11}\beta_b$	--
Progelatinase A	--
Progelatinase B	--

Tab. 2: Übersicht der eingesetzten Substrate

4.3.5. Quantifizierung der proteolytischen Aktivität

Um die katalytische Aktivität der rekombinanten Metalloprotease-Domäne zu quantifizieren, wurde das Enzym in fluoreszenzkinetischen Untersuchungen zur Spaltung des synthetischen fluorogenen Mca-Peptids Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂ eingesetzt (van Dyk et al., 1997). Anhand der Zunahme der Fluoreszenz innerhalb von 60 Minuten konnte ein Umsatz des fluorogenen Substrates bei 37°C nachgewiesen werden (Abb. 27 A).

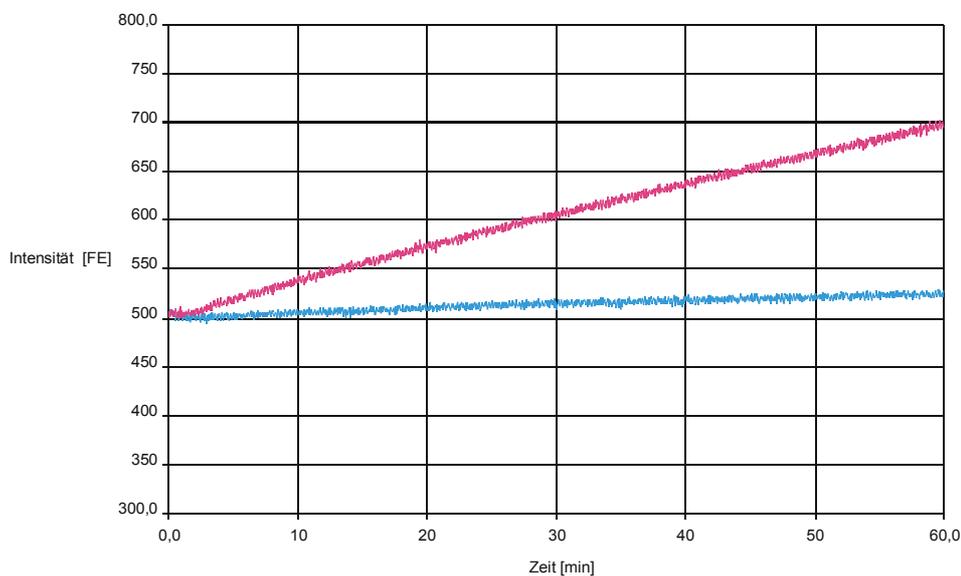


Abb. 27 A: Zeitlicher Fluoreszenzverlauf der Mca-Peptid-Spaltung

rot: Fluoreszenz des Mca-Peptids während der Inkubation mit ADAM 9 für 1h bei 37°C
blau: Fluoreszenz des Mca-Peptids während der Inkubation ohne ADAM 9 für 1h bei 37°

Hingegen wurde keine Zunahme der Fluoreszenz und somit keine Aktivität des Enzyms gegenüber dem herkömmlichen fluorogenen Mca-Peptid Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ beobachtet (Knight et al., 1992).

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten K_M wurde der lineare Umsatz des fluorogenen Substrats in Dreifachbestimmungen mit acht verschiedenen Konzentrationen von 0,1 μ M bis 1,5 μ M Substrat gemessen.

Die Michaelis-Konstante wurde für dieses Substrat aus den Werten der Fluoreszenzmessungen entsprechend dem Verfahren nach Lineweaver-Burk berechnet.

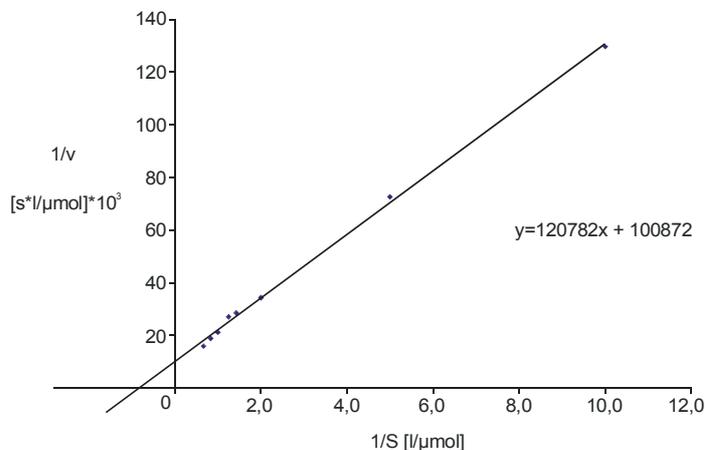


Abb. 27 B: Lineweaver-Burk Diagramm zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität

Anhand der bestimmten Werte für K_M und v_{max} berechnete sich somit die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M zu $0,2 (\pm 0,006) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Desweiteren wurde anhand der Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die katalytische Aktivität von ADAM 9 untersucht. Dafür wurden die Mitglieder der natürlichen MMP-Inhibitor-Familie TIMP-1 (Farr, 1998), bTIMP-2 (Bovine TIMP-2) und idTIMP-4 (Inhibitory domain of TIMP-4; Stratmann, 2000) eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß die natürlichen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 keine Wirkung auf ADAM 9 hatten. Die rekombinante inhibitorische Domäne von TIMP-4 zeigte nur geringe Wirkung.

Mit dem synthetischen Thiadiazin-Inhibitor JST-182 (2-Amino-N-allyl-5-(4-chlorphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromid) wurde hingegen eine starke Reduktion der Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit beobachtet. Unterschiedliche Konzentrationen des Thiadiazin-Inhibitors wurden für 30 min bei 25°C mit der Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 inkubiert und anschließend die Restaktivität des Enzyms bestimmt. In Abbildung 28 ist die aufgenommene Hemmkurve für die Inhibition der katalytischen Domäne von ADAM 9 dargestellt, aus der sich ein IC_{50} -Wert von 11 μM ergab.

Hiermit konnte erstmals gezeigt werden, daß TIMP-1, -2 und -4 keine, bzw. nur sehr geringe Wirkung gegen ADAM 9 besitzen. Ferner konnte eine inhibitorische Wirkung eines synthetischen Thiadiazins gegen ADAM 9 nachgewiesen werden.

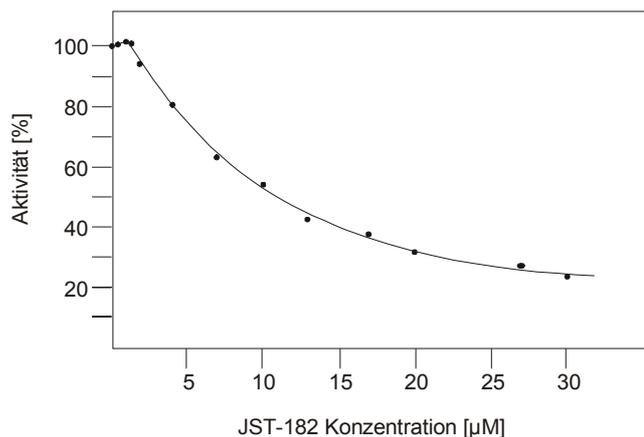


Abb. 28: Inhibierung der ADAM 9 Metalloprotease-Domäne durch den synthetischen Thiadiazin-Inhibitor JST-182

4.3.6. Darstellung polyklonaler Antikörper

Um die Verteilung von ADAM 9 in verschiedenen Geweben mittels immunhistochemischer Methoden untersuchen zu können, wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen die Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 hergestellt. Zur Immunisierung der Tiere diente ein synthetisches Peptid, dessen Sequenz laut Datenbankrecherche ausschließlich in der Metalloprotease-Domäne von ADAM 9 vorkam. Um die Zugänglichkeit des Epitops auf dem nativen Protein im Gewebe zu gewährleisten, wurde die Peptidsequenz so gewählt, daß sich keine Glykosylierungsstellen in unmittelbarer Nähe des Epitops befanden. Desweiteren wurde eine hydrophile Peptidsequenz gewählt, die 13 Aminosäuren umfaßte:



Nachdem das Tier durch vier subkutane Injektionen mit dem an KLH (keyhole limpet hemocyanin) als Träger gekoppelten Antigen immunisiert wurde, erfolgte die Serumgewinnung nach 115 Tagen (Pineda, Berlin).

Die Reinigung der Antikörper gelang durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose. Nach Bindung der Antikörper bei einem pH-Wert von 8,0 an das Säulenmaterial konnten diese nach mehrmaligem Waschen durch Erniedrigung des pH-Werts auf 2,7 eluiert werden. Die Fraktionen 4 bis 12 enthielten die von den restlichen Serumbestandteilen getrennten Antikörper (Abb. 29).

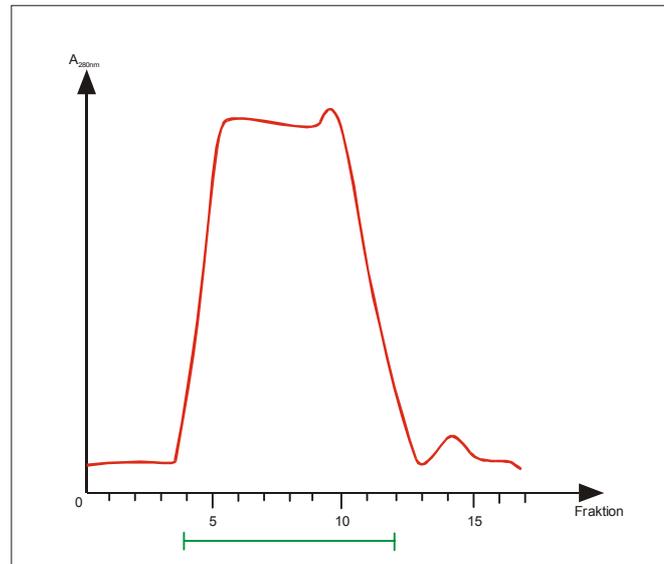


Abb. 29: Chromatogramm zur Reinigung von anti-ADAM 9 Antikörpern an Protein A-Sepharose

Um antigenspezifische Antikörper zu erhalten, wurde das Peptid kovalent an aktivierte Sepharose gekoppelt, und als Antigensäule in einem zweiten Reinigungsschritt eingesetzt. Auf diese Weise gelang die Isolierung immunoaffinitätsgereinigter anti-ADAM 9 Antikörper. Nach Auftrennung durch Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen waren die leichten (25 kDa) und schweren (55 kDa) Ketten der IgGs im PAA-Gel erkennbar (Abb. 30).

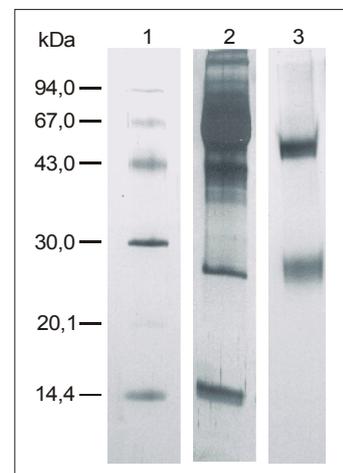


Abb. 30: Reinigung polyklonaler anti-ADAM 9 Antikörper durch Immunoaffinitätschromatographie

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Serum

Bahn 3: Immunoaffinitätsgereinigter anti-ADAM 9 Antikörper

Die Qualität der immunoaffinitätsgereinigten Antikörper wurde durch Western-Blot mit rekombinanter Metalloprotease-Domäne aus *P. pastoris* als Antigen bestätigt. Die aus Präimmuns serum aufgereinigten IgGs zeigten keine Immunreaktion gegenüber ADAM 9 und dienen deshalb als Kontrolle für immunhistochemische Untersuchungen (Abb. 31).

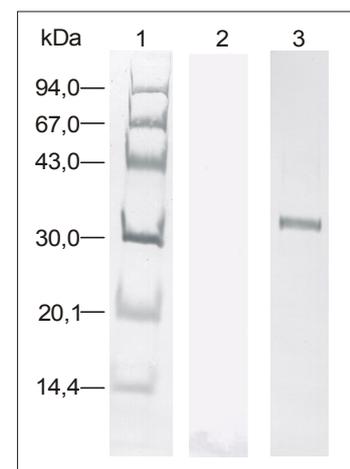


Abb. 31: Western-Blot zur Überprüfung der anti-ADAM 9 Antikörper

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Präimmun IgG

Bahn 3: anti-ADAM 9 IgG

4.4. Immunhistochemische Detektion von ADAM 9 in benignem und malignem Gewebe

Da die bisherigen Erkenntnisse des Vorkommens von ADAM 9 im Gewebe nur auf Untersuchungen durch Northern-Blot und RT-PCR beruhten, wurden immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen Gewebeschnitten unter Verwendung immunoaffinitätsgereinigter anti-ADAM 9 Antikörper durchgeführt.

Die fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden in 4-5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf dem Objektträger entparaffiniert und rehydriert. Zur anschließenden immunchemischen Reaktion wurden immunoaffinitätsgereinigte anti-ADAM 9 Antikörper in Verdünnungen von 1:75 eingesetzt. Die Detektion der Immunreaktion erfolgte mittels Avidin-Biotin-Technik, wobei ein biotinylierter Sekundärantikörper zur Kopplung des enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Komplexes diente. Eine erfolgte Immunreaktion war letztlich durch die enzymatische Umsetzung des chromogenen Substrats Fast Red TR[®] zu einem roten Farbstoff erkennbar. Negativkontrollen erfolgten durch den Einsatz von Präimmun-Antikörpern anstelle der anti-ADAM 9 IgG als Primärantikörper.

Eine Gegenfärbung zur Verdeutlichung der Gewebestruktur erfolgte mit Hämatoxilin, wodurch Zellkerne als violett-blaue Flecken unter dem Lichtmikroskop erkennbar waren. Zur mikroskopischen Auswertung wurden 100-, 250- und 400-fache Vergrößerungen gewählt.

4.4.1. Mammakarzinom

Abb. 32 zeigt einen 4 µm dicken Paraffinschnitt aus dem Brustgewebe einer Patientin, die an Brustkrebs erkrankte. In diesem Gewebe konnte eine deutliche Expression von ADAM 9 im Cytoplasma der Drüsen-Epithelzellen (EpC; Epithelial cell, G; Gland) detektiert werden (A). Ferner zeigten bereits in das umliegende Bindegewebe (CT; Connective tissue) ausgewanderte Tumorzellen (TC; Tumor cell) eine cytoplasmatische Anfärbung. Mit der Negativkontrolle, bei der Präimmun-Antikörper als Primär-Antikörper eingesetzt wurden, fand wie erwartet keine Immunreaktion statt (B).

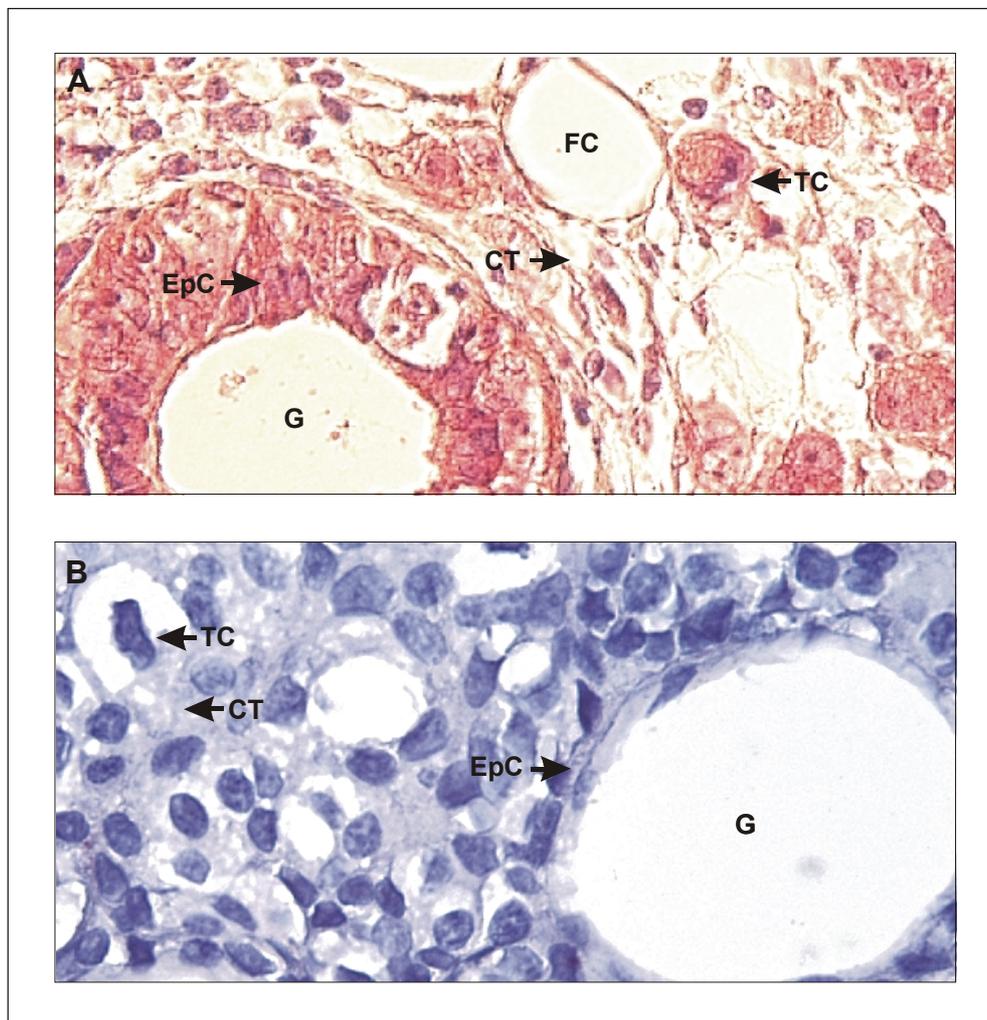


Abb. 32: Expression von ADAM 9 im Mammakarzinom; Vergrößerung 400-fach

A: Immunreaktion in Epithelzellen (EpC; Epithelial cell) der Drüse (G; Gland) und in Tumorzellen (TC; Tumor cell); FC: Fat cell

B: Kontrolle mit Präimmun IgG

4.4.2. Dickdarm

Das Dickdarmepithel umfaßt neben resorbierenden Zellen auch schleimproduzierende Zellen, sog. Becher-Zellen, deren sezerniertes Produkt den Stuhl gleitfähiger macht.

In Abb. 33 sind schleimproduzierende Epithelzellen (EpC; Epithelial cell) sichtbar, die zur Vergrößerung der funktionellen Oberfläche in dicht aneinander gelagerten schlauchförmigen Drüsen angeordnet sind.

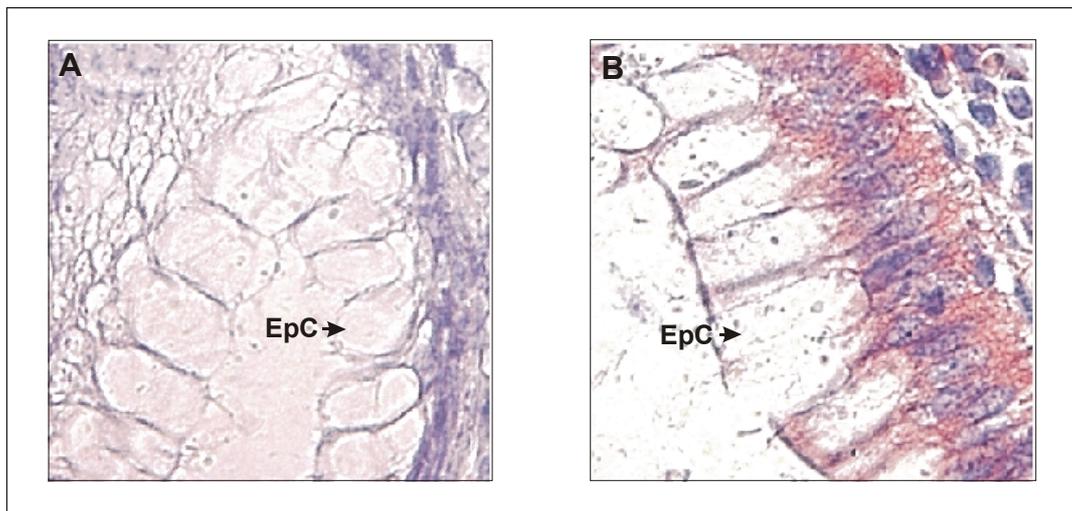


Abb. 33: Expression von ADAM 9 im Epithel der Dickdarmschleimhaut;
Vergrößerung 400-fach

A: Kontrolle mit Präimmun IgG

B: Immunreaktion in Schleimhautepithelien (EpC; Epithelial cell) mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 IgG

Eine Expression von ADAM 9 war im Cytoplasma der Epithelzellen detektierbar (Abb. 33 B). Die Anfärbung fand hier nicht in der gesamten Zelle statt, sondern nur in Kernnähe (violett-blaue Flecken). Dieses war darauf zurückzuführen, daß die in diesen Zellen in großer Zahl vorkommenden Granula, die Mucin als Gleitmittel enthalten, das Cytoplasma weiten und so die anderen Zellbestandteile zusammendrücken.

Da die Dickdarmwand zum Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen zahlreiche Zellen des Immunsystems enthält, wurde diese ebenfalls auf die Expression von ADAM 9 untersucht. Dabei konnte eine cytoplasmatische Anfärbung ausschließlich in Granulozyten (Gc; Granulocytes) detektiert werden (Abb. 34 B). Die verwendete Gewebeprobe stammte aus einem Colonkarzinom, und die Granulozyten sind vermutlich aufgrund der Immunantwort in das Gewebe ausgewandert.

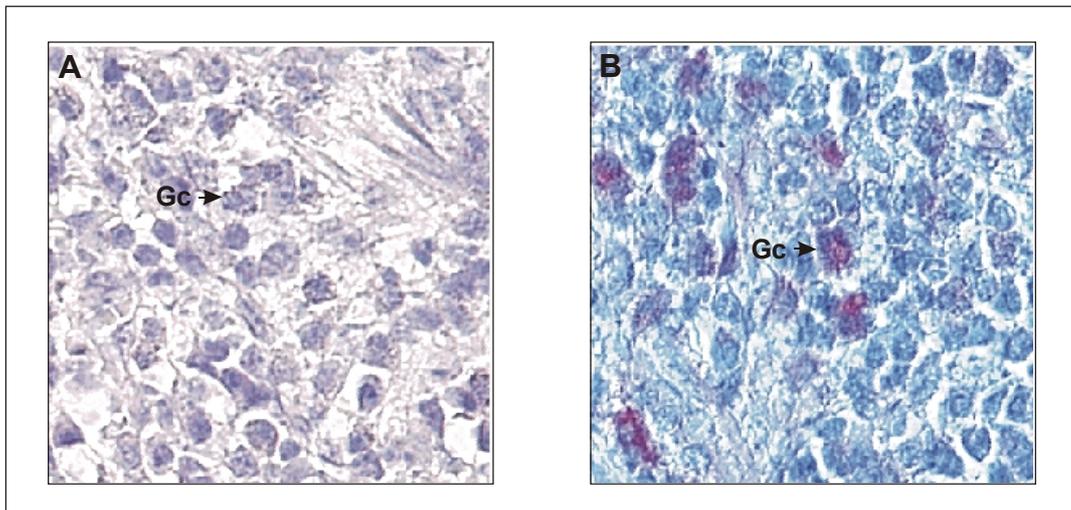


Abb. 34: Expression von ADAM 9 in Blutzellen des Dickdarmgewebes;
Vergrößerung 400-fach

A: Kontrolle mit Präimmun IgG

B: Immunreaktion in Granulozyten (Gc; Granulocytes) mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 IgG

Ebenfalls gelang der Nachweis des cytoplasmatischen Vorkommens von ADAM 9 in Endothelzellen (EnC), die die Gefäße (VW; Vessel wall) von innen auskleiden. In dem Präparat in Abb. 35 sind drei angeschnittene Gefäße sichtbar, die sich in einem Netzwerk aus Bindegewebe (CT) befinden und deren Inhalt u.a. aus Erythrozyten (Ec; Erythrocytes) und Granulozyten (Gc; Granulocytes) besteht. Eine deutliche Immunreaktion war anhand des roten Farbstoffs im Cytoplasma der Endothelzellen sowie in den sich im Gefäß befindenden Granulozyten nachweisbar.

Im Gefäß befindliche Erythrozyten exprimierten kein ADAM 9. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde wiederum eine Negativkontrolle durchgeführt.

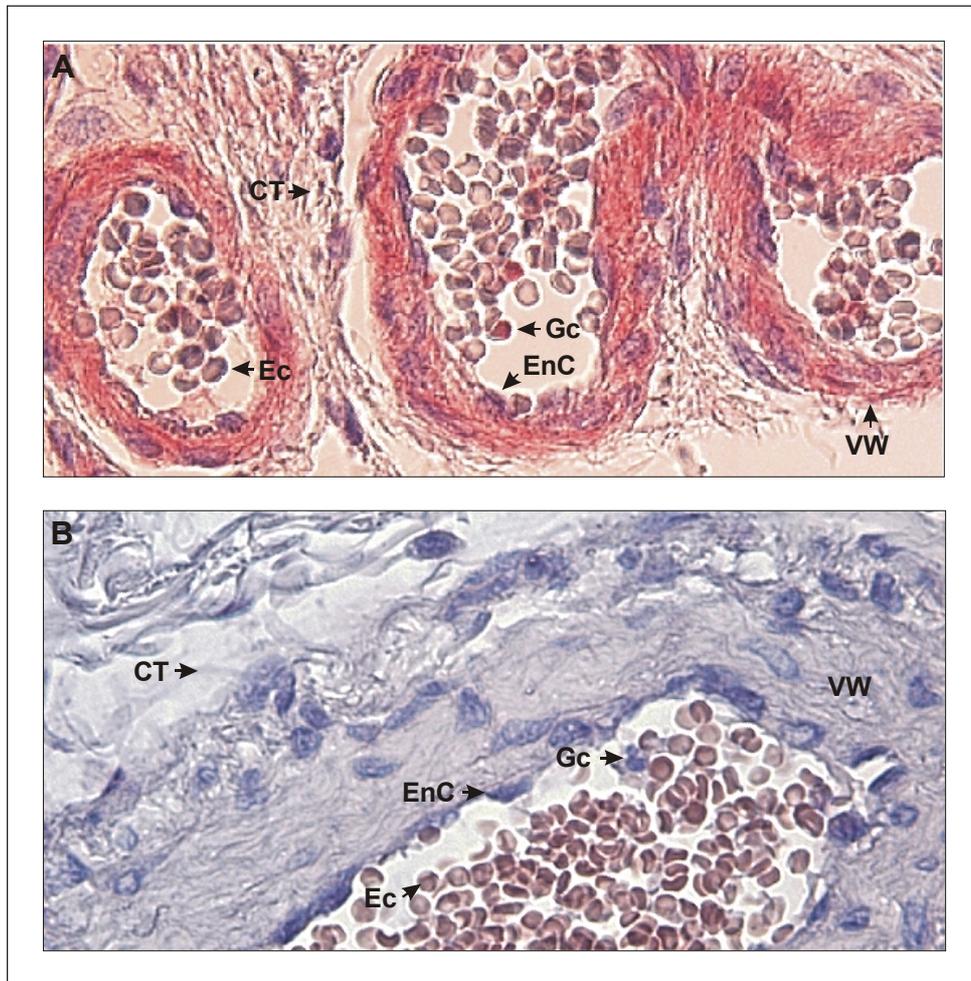


Abb. 35: Expression von ADAM 9 im Dickdarm; Vergrößerung 400-fach

A: Immunreaktion in Endothelzellen (EnC; Endothelial cell) der Gefäßwände (VW; Vessel wall) und in Granulozyten (Gc; Granulocytes) mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 IgG

B: Kontrolle mit Präimmun IgG

Durch die immunhistochemische Untersuchung an Dickdarmgewebe konnte eine cytoplasmatische Expression von ADAM 9 in den Endothelzellen der Gefäßwände sowie in Granulozyten in und außerhalb der Gefäße nachgewiesen werden.

4.4.3. Niere und Nierenzellkarzinom

Die Expression von ADAM 9 im Nephron der gesunden Niere zeigte ein räumlich eingeschränktes Muster (Abb.36).

Sie konnte eindeutig im Cytoplasma der Epithelzellen (EpC) der Tubuli-Übergangsstücke sowie in proximalen Tubulusepithelien (Tub; Tubulus) nachgewiesen werden. Dabei beschränkte sich die Immunreaktion ausschließlich auf die Epithelzellen außerhalb des Glomerulus (Glom; Glomerulus). Weder die Endothelzellen innerhalb des Glomerulus noch die der Glomeruluskapsel zeigten eine Immunreaktion.

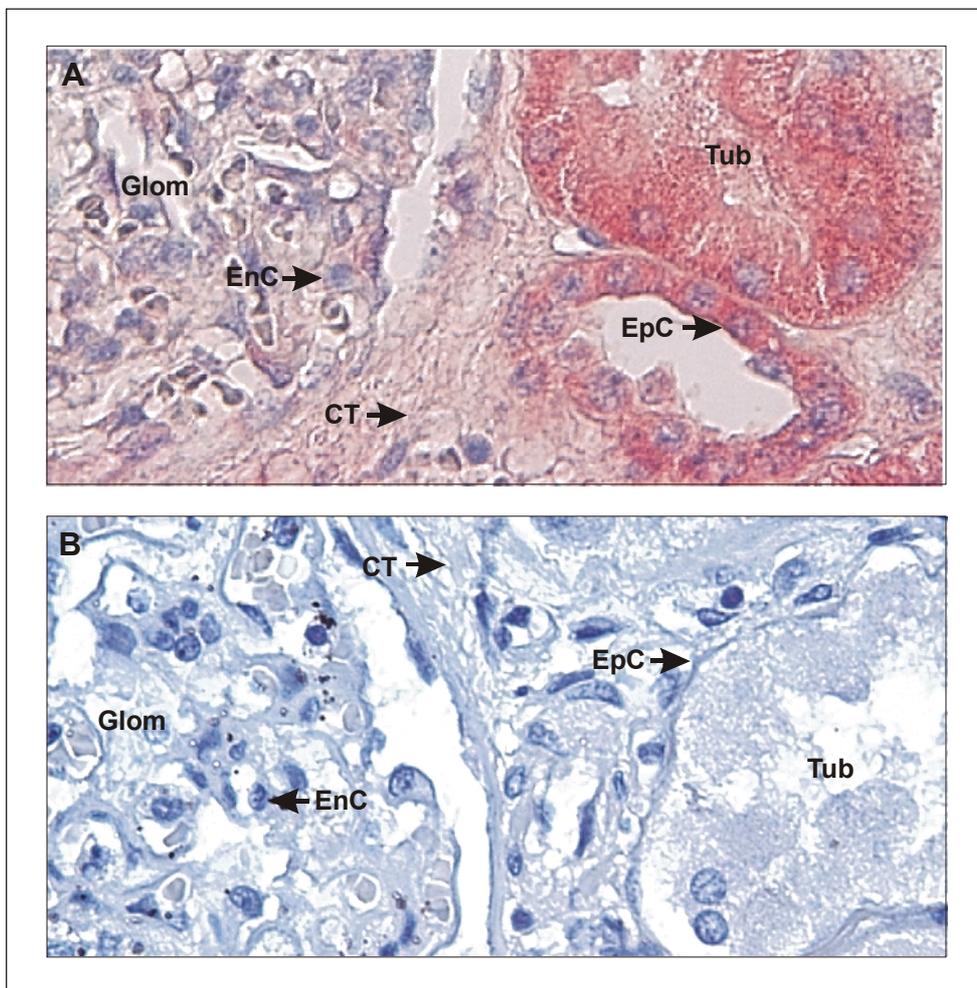


Abb. 36: Expression von ADAM 9 in gesunder Niere; Vergrößerung 400-fach

A: Immunreaktion in Epithelzellen (EpC; Epithelial cell) des Tubulus (Tub, Tubulus)

B: Kontrolle mit Präimmun IgG

Bindegewebe (CT; Connective tissue), Endothelzelle (EnC, Endothelial cell)

Beim Nierenzellkarzinom bot sich hingegen ein völlig anderes Expressionsmuster von ADAM 9 (Abb. 37).

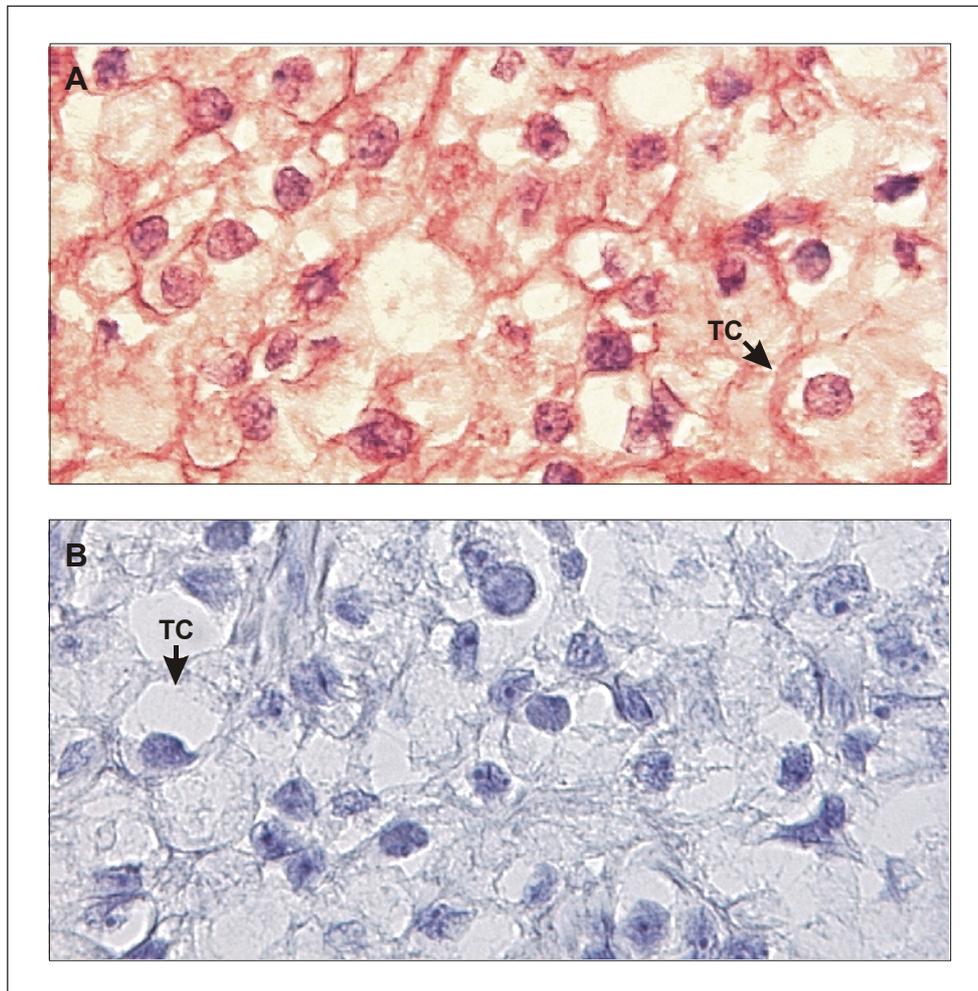


Abb. 37: Expression von ADAM 9 im Nierenzellkarzinom, Vergrößerung 400-fach

- A: Immunreaktion mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 IgG auf der Zelloberfläche von Tumorzellen (TC; Tumor cell)
B: Kontrolle mit Präimmun IgG

Das Bild zeigt einen 5 μm dicken Gewebeschnitt eines Nierenzellkarzinoms. Die Tumorzellen (TC; Tumor cell) hatten in diesem Fall andere Strukturen der Tubuli völlig verdrängt. Eine Expression von ADAM 9 konnte ausschließlich auf der Zellmembran der Tumorzellen detektiert werden. Da keine cytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen stattfand, sondern eine membranständige, entstand das Bild eines Netzes.

4.4.4. Hoden

Abb. 38 zeigt zwei quer angeschnittene Hodenkanälchen (Tubuli). ADAM 9 konnte im Cytoplasma der Leydig-Zellen (LC; Leydig cell) sowie in den Epithelzellen der Tubuluswand (TW; Tubulus wall) deutlich nachgewiesen werden.

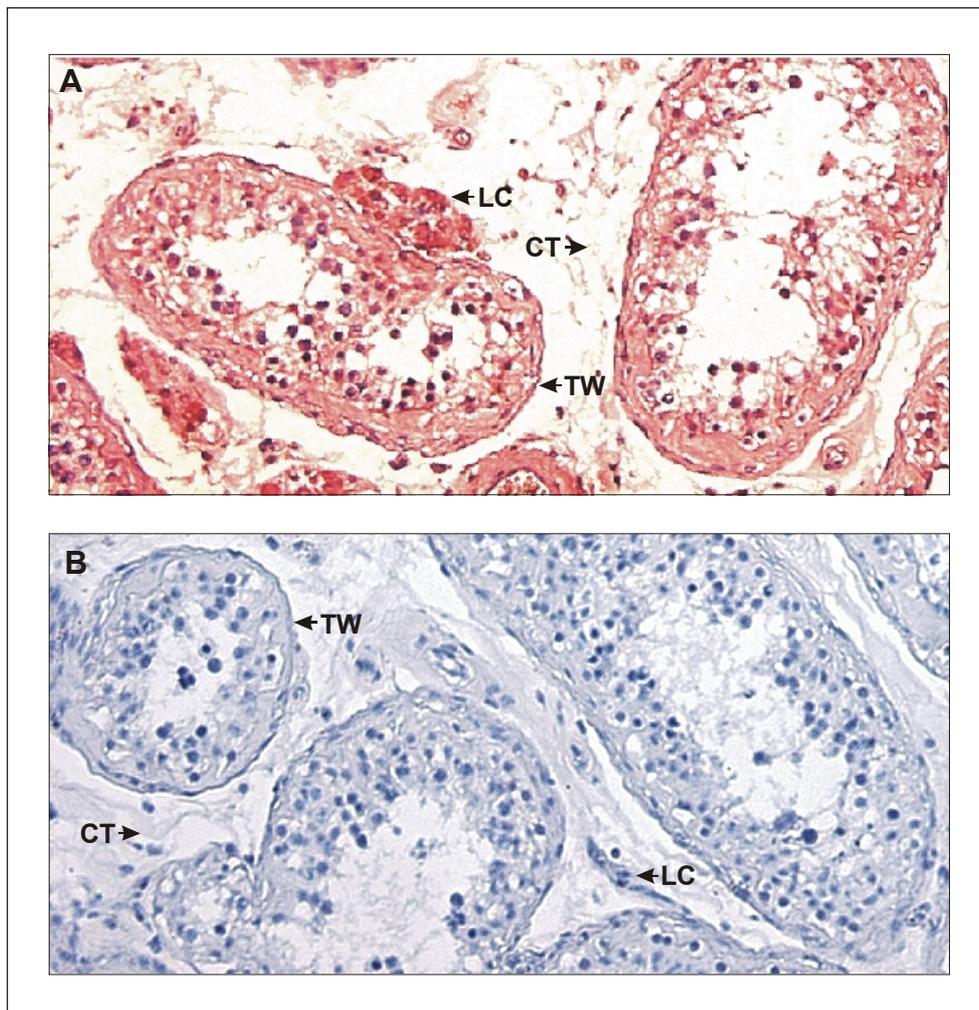


Abb. 38: Expression von ADAM 9 im Hoden; Vergrößerung 100-fach

- A: Immunreaktion von ADAM 9 in Leydig-Zellen (LC; Leydig cell) mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 IgG
B: Kontrolle mit Präimmun IgG
Tubulus Wand (TW; Tubulus wall); Bindegewebe (CT; Connective tissue)

Durch eine vergrößerte mikroskopische Aufnahme eines Hodenkanälchens konnte eine Expression von ADAM 9 auch in Zellen der Spermatogenese nachgewiesen und weiter differenziert werden (Abb. 39).

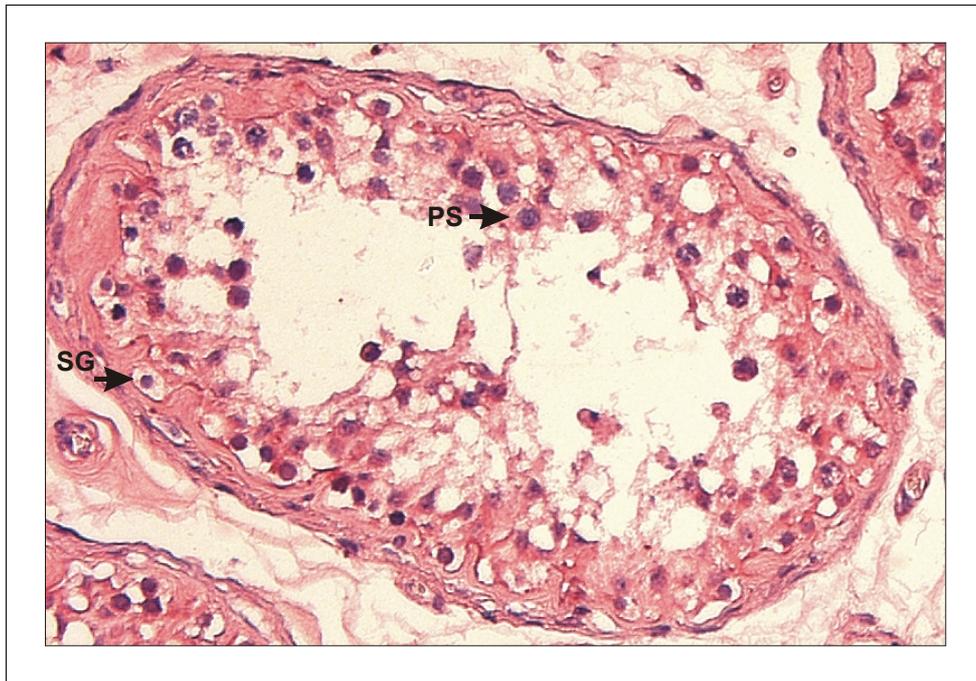


Abb. 39: Expression von ADAM 9 in spermienbildenden Zellen; Vergrößerung 250-fach

Immunreaktion in Spermatozyten (PS; Primary spermatocytes) innerhalb des Tubulus contorus

Die an der Basis des Keimepithels liegenden Spermato gonien scheinen das Antigen nicht zu exprimieren (farbloses Cytoplasma). Im Gegensatz zu den Spermato gonien war in primären Spermatozyten (PS; Primary spermatocytes) eine cytoplasmatische Anfärbung detektierbar. Diese Beobachtung wurde ebenfalls durch Negativkontrollen bestätigt.

Hiermit konnte neben dem cytoplasmatischen Vorkommen von ADAM 9 in Leydig-Zellen eine vom Entwicklungsstadium abhängige cytoplasmatische Lokalisation in spermienproduzierenden Zellen der Hodenkanälchen nachgewiesen werden.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die aus den immunhistochemischen Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse. Die Gewebetypen und Zelltypen sowie die Lokalisation von ADAM 9 sind tabellarisch zusammengefaßt:

Gewebe	Zelltyp	Expression
Mammakarzinom	Epithelzellen der Drüsen	Cytoplasma
	Tumorzellen	Cytoplasma
Dickdarm	Epithelzellen der Schleimhaut (Becher-Zellen)	Cytoplasma
	Granulozyten im Gewebe	Cytoplasma
	Granulozyten im Gefäß	Cytoplasma
	Endothelzellen der Gefäßwände	Cytoplasma
	Erythrozyten	-----
Niere	Epithelzellen der Übergangsstücke	Cytoplasma
	Proximale Tubulusepithelien	Cytoplasma
	Glomerulus	-----
Nierenzellkarzinom	Tumorzellen	Zellmembran
Hoden	Leydig-Zellen	Cytoplasma
	Epithelzellen der Tubuluswand	Cytoplasma
	Spermatogonien	-----
	Primäre Spermatozyten	Cytoplasma

Tab. 3: Expression von ADAM 9 in verschiedenen Geweben

5. Diskussion

Das Interesse an den ADAMs ist in den letzten Jahren stark gestiegen, da sie Schlüsselrollen bei der Fertilisation und der Prozessierung von Ektodomänen von Membranproteinen wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ übernehmen. An weiteren biologischen Prozessen wie der Neurogenese, der Muskelzellfusion und der Notch-vermittelten Signalübertragung sind sie ebenfalls beteiligt.

ADAMs sind membrangebundene Glykoproteine, die u.a. eine Disintegrin-Domäne und eine Metalloprotease-Domäne besitzen, welche bei 50% der ADAMs ein katalytisches Zinkbindungsmotiv enthält. Da einige der katalytisch aktiven ADAMs am Prozess der Protein-Prozessierung und als Membran-Protein-Sekretasen am Shedding von Membranproteinen beteiligt sind, ist es von Interesse zu klären, welche weiteren Substrate für die katalytisch aktiven ADAMs in Frage kommen und wie die Substratspezifität dieser Proteasen bestimmt wird. Ferner ist ein besseres Verständnis über die Regulierung der ADAMs im Hinblick auf physiologische und pathologische Prozesse besonders wichtig.

Da die rekombinante Darstellung eines Gesamtzyms aufgrund der Größe mit Schwierigkeiten verbunden sein kann, wird in vielen Fällen ein verkürztes Protein als Modellprotein dargestellt, das die zu untersuchenden Domänen umfasst. Um vom Modellprotein Rückschlüsse auf das Gesamtzym zu ziehen, sollte berücksichtigt werden, daß das Fehlen zusätzlicher C-terminaler Domänen sicherlich mit einem Verlust an Spezifität und Aktivität verbunden sein kann. Inwieweit das Spezifitäts- und Aktivitätsspektrum durch zusätzliche Domänen beeinträchtigt wird, läßt sich nur mit dem Gesamtzym klären.

Dennoch lassen sich aus verkürzten Modellproteinen viele Erkenntnisse zur Aktivität, Substratspezifität und Bindungsspezifität gewinnen, wie bereits bei einigen ADAMs gezeigt werden konnte (u.a. Lum et al., 1999; Roghani et al., 1999, Maskos et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die katalytische Domäne des humanen ADAM 9 als Modellenzym, stellvertretend für das Gesamtzym, in *Pichia pastoris* und *E. coli* rekombinant dargestellt, gereinigt und charakterisiert. Dabei konnte erstmals proteolytische Aktivität gegenüber Fibronektin, Gelatin, β -Casein und Plasminogen

nachgewiesen und quantifiziert werden. Immunhistochemische Untersuchungen mit affinitätsgereinigten anti-ADAM 9 Antikörpern detektierten eine hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation von ADAM 9 in benignen und malignen Zellen verschiedener Gewebe.

5.1. Expression in *E. coli*

Zu Beginn der Arbeit stand ein Expressionssystem zur heterologen bakteriellen Expression der katalytischen Domäne in *E. coli* zur Verfügung. Unter Kontrolle des T7 Promotors gelang die Expression des rekombinanten Proteins. Die Ablagerung erfolgte intrazellulär in Form von „inclusion bodies“, woraus die rekombinante Metalloprotease-Domäne als 24 kDa großes Protein isoliert werden konnte. Die Reinigung gestaltete sich jedoch schwierig und gelang mit chromatographischen Methoden nicht bis zur vollständigen Homogenität. Trotzdem wurde das vorgereinigte Enzym zur Renaturierung mit verschiedenen Methoden eingesetzt. Durch Aktivitätstests mittels Zymographie konnte keine proteolytische Aktivität gegenüber den eingesetzten Substraten nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen wurde eine heterologe Expression des rekombinanten Proteins in einem eukaryontischen Expressionssystem angestrebt. Da die methylo-trophe Hefe *P. pastoris* das heterologe Protein im Gegensatz zu *E. coli* glykosyliert und in nativer Form in das Kulturmedium sezerniert, sollte auf diese Weise die aufwendige und problematische Renaturierung umgangen werden. Weil für eine korrekte Faltung und damit für die katalytische Aktivität der ADAM 9 Metalloprotease-Domäne auch die Anwesenheit der Prodomäne von Bedeutung sein könnte, wurde die katalytische Domäne mit N-terminaler Prodomäne (ProMP) kloniert und zur Expression in *P. pastoris* eingesetzt.

5.2. Klonierung und Expression in *P. pastoris*

Ausgehend von der Prostatakarzinomzelllinie BM 1604 konnte die cDNA für die ProMP durch RT-PCR und TA-Klonierung gewonnen werden. Auf der Basis der bekannten DNA-Sequenz für ADAM 9 wurden vollständig homologe Oligonukleotide zur Amplifizierung der cDNA eingesetzt. Durch einen zusätzlichen PCR-Schritt konnten Restriktionsschnittstellen in die cDNA eingeführt werden, die eine Klonierung in den *P. pastoris* Expressionsvektor pPICZ α A ermöglichten. Um eine Kontrolle für Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität zur Verfügung zu haben, wurde durch Mutagenese-PCR eine Basensubstitution innerhalb des für das katalytische Glutamat³⁴⁸ codierenden Basentriplets und damit die Darstellung der cDNA für eine inaktive Variante durchgeführt. Nach Transformation der *P. pastoris*-Stämme KM71, GS115 und X33 mit linearisierter DNA und deren Insertion in das genomische *AOX1*-Gen konnte die heterologe Expression durch Methanol induziert werden. Dabei wurden über vier Tage die Expressionsprodukte beider Varianten vom *P. pastoris*-Stamm KM71 als 32 kDa große Proteine in das Kulturmedium sezerniert.

Die Bestimmung der N-Termini der Expressionsprodukte mittels Edman-Abbau zeigte, daß eine intrazelluläre Prozessierung der Prodomäne unmittelbar nach der Erkennungssequenz für die Pro-Protein-Konvertase stattgefunden hatte (Abb. 40).

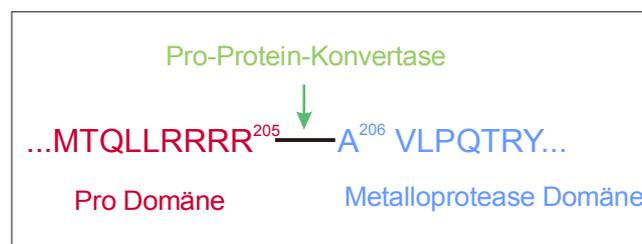


Abb. 40: Prozessierung der ADAM 9 Prodomäne durch eine Pro-Protein-Konvertase.

Dementsprechend wurde in beiden Fällen die Metalloprotease-Domäne ohne Prodomäne als 32 kDa großes Protein sezerniert. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen, in denen die Metalloprotease-Domäne des ADAM 9 mit Propeptid in COS-7 Zellen exprimiert wurde. Dort konnte ebenfalls eine Prozessierung der

Prodomäne durch eine Pro-Protein-Konvertase nachgewiesen werden (Roghani et al., 1999). Die Molekulargewichtsdifferenz von ca. 8 kDa der in *E. coli* und *P. pastoris* exprimierten Proteine ist auf die zusätzliche Glykosylierung durch *P. pastoris* zurückzuführen, zumal die Metalloprotease-Domäne zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt.

Trotz Optimierung der Kultivierungsbedingungen war eine Ausbeute über 6 mg/l nicht möglich.

Die für Aktivitätsstudien notwendige Homogenität der Proteine konnte anschließend durch Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose und hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose erreicht werden.

5.3. Charakterisierung

Der erste Nachweis, daß rekombinant dargestelltes ADAM 9 überhaupt proteolytische Aktivität besitzt, gelang 1999 durch Spaltung der Insulin B-Kette (Roghani et al., 1999). Desweiteren prozessiert die in COS-7 Zellen exprimierte katalytische Domäne synthetische Peptide, die den Spaltstellen zum Shedding von β -APP, $\text{TNF}\alpha$, p75TNFR (p75-TNF receptor) und KL-1 (c-kit ligand-1) entsprechen. Da Substrate aus der extrazellulären Matrix noch nicht identifiziert worden waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Fibronectin, Gelatin und β -Casein als Substrate für Aktivitätsstudien an rekombinanter ADAM 9 Metalloprotease-Domäne mittels Zymographie eingesetzt. Dabei konnte erstmals proteolytische Aktivität der Wild-Typ Metalloprotease gegen die drei eingesetzten Substrate nachgewiesen werden. Die im Zymogramm erkennbaren 32 kDa großen Abbaubanden waren eindeutig auf die Aktivität von ADAM 9 zurückzuführen, zumal die inaktive Variante der Metalloprotease-Domäne, bei der die Aminosäure Glutamat³⁴⁸ im katalytischen Zentrum durch Alanin ausgetauscht wurde, keine Aktivität besaß.

Zusätzlich konnte die Spaltung von humanem Fibronectin durch ADAM 9 *in vitro* im PAA-Gel bestätigt werden. Die resultierenden hochmolekularen Fragmente (>94 kDa) sowie die ca. 50 kDa und 24 kDa großen Fragmente konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Eine Bestimmung der N-Termini der Abbauprodukte ist aber deshalb von Interesse, weil eine Spaltung von Fibronectin auch zur Freisetzung

katalytisch aktiver Fibronectinasen führen kann (Schnepel und Tschesche, 2001). Hingegen zeigte in COS-7 Zellen exprimiertes ADAM 9 keine proteolytische Aktivität gegenüber Fibronectin (Blobel, persönliche Mitteilung). Deshalb ist zu klären, welchen Einfluß die von *Pichia pastoris* angefügten Kohlenhydratreste auf die Substratspezifität haben.

Auch Plasminogen konnte erstmals als Substrat für rekombinantes ADAM 9 *in vitro* identifiziert werden. Dabei entstanden aus dem ursprünglich 90 kDa großen Substrat drei Abbaubanden der Größen 50 kDa, 38 kDa und 35 kDa. Da die genauen Spaltstellen noch nicht geklärt werden konnten, lassen sich noch keine Aussagen zur physiologischen Relevanz machen. Eine Konvertierung des inaktiven Plasminogens in das aktive Plasmin durch ADAM 9 wäre von besonderer Bedeutung, da Plasmin in dem für die Tumordinvasion und Tumormetastasierung wichtigen Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator-System (u-PA-System) eine zentrale Rolle spielt (Andreasen et al., 1997). Dabei prozessiert ein Komplex aus u-PA und u-PA-Rezeptor das Plasminogen. Plasmin degradiert dann Bestandteile der extrazellulären Matrix. Außerdem werden verschiedene Matrix-Metalloproteasen durch Plasmin aktiviert, die ihrerseits wiederum die extrazelluläre Matrix abbauen können (Murphy et al., 1999).

Zur Quantifizierung der katalytischen Aktivität von ADAM 9 durch fluoreszenzkinetische Messungen diente das als TACE-Substrat bekannte fluorogene Mca-Peptid (van Dyk et al., 1997). Die berechnete Spezifitätskonstante der Hydrolyse des fluorogenen Peptid-Substrats durch ADAM 9 ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) war um den Faktor 200 niedriger als die, die für rekombinantes ADAM 9 aus COS-Zellen bestimmt wurde (Roghani et al., 1999).

Die geringere katalytische Wirksamkeit der in *P. pastoris* dargestellten Metalloprotease-Domäne ist vermutlich auf unterschiedliche Glykosylierungen der heterologen Proteine in *P. pastoris* und Säugerzellen zurückzuführen.

Sollte ADAM 9 *in vivo* in pathologische Prozesse involviert sein, die auf einer Disregulation der katalytischen Aktivität beruhen, dann ist ein Verständnis des Inhibitorprofils von Bedeutung. Hydroxamat-Inhibitoren wirken als Inhibitoren des ADAM 9 (Roghani et al., 1999). Aufgrund der durch diese Arbeit erhaltenen Ergebnisse können die natürlichen Inhibitoren TIMP-1, -2 und -4 als wirkungsvolle Inhibitoren ausgeschlossen werden. Dieses wurde zuvor auch bei ADAM 17 (TACE) beobachtet, welches ebenfalls nicht von TIMP-1, -2 und -4, hingegen aber von TIMP-3 inhibiert wird

(Amour et al., 1998). Aufgrund eines ähnlichen TIMP-Inhibitorprofils von ADAM 9 und ADAM 17 war anzunehmen, daß TIMP-3 auch die Aktivität des ADAM 9 reduziert. Die Untersuchungen hierzu sind derzeit noch nicht abgeschlossen. Zusätzlich konnte eine inhibitorische Wirkung des synthetischen Thiadiazin-Inhibitors JST-182 (2-Amino-N-allyl-5-(4-chlorphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-hydrobromid) auf die Aktivität von ADAM 9 festgestellt werden. Der bestimmte IC_{50} -Wert betrug 11 μ M. Demnach reduziert der Thiadiazin-Inhibitor JST-182 im mikromolaren Bereich die Aktivität von ADAM 9 auf die Hälfte.

5.4. Immunhistochemie

Über die Funktion von ADAMs in verschiedenen Geweben ist bisher relativ wenig bekannt. Die ADAMs sind Multidomänen-Proteine, die unterschiedliche potentielle Funktionen besitzen. Kenntnisse der unterschiedlichen Funktionen in verschiedenen Geweben erlauben letztlich eine Beurteilung der Bedeutung von ADAMs in physiologischen und pathologischen Prozessen.

Um zum Verständnis beizutragen, welche Rolle ADAM 9 in verschiedenen Organen und Geweben übernimmt, sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmals das Vorkommen von ADAM 9 in diversen benignen und malignen Geweben auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht werden. Hierzu wurden polyklonale Kaninchen anti-ADAM 9 Antikörper hergestellt. Unter Berücksichtigung der Spezifität und Antigenizität von Peptidsequenzen wurde ein 13 Aminosäuren umfassendes Peptid der katalytischen Domäne des humanen ADAM 9 synthetisiert. Aus hiermit immunisierten Kaninchen konnte das Serum nach 115 Tagen gewonnen werden. Die Aufreinigung der Serum-Antikörper gelang durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose. Nach einem weiteren affinitätschromatografischen Reinigungsschritt an Antigen-Säulenmaterial konnten immunoaffinitätsgereinigte Antikörper erhalten werden, die für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt wurden. Bei allen Immunreaktionen dienten Präimmun-Antikörper als Kontrolle.

Von folgenden Geweben wurden Schnitte angefertigt und eingesetzt: benignes Hoden-, Dickdarm- und Nierengewebe sowie malignes Mamma- und Nierengewebe.

ADAM 9 wurde in allen eingesetzten Geweben immunologisch detektiert. Dadurch konnten die bisher auf Northern-Blot-Untersuchungen basierenden Kenntnisse der Expression von ADAM 9 für Nieren-, Hoden- und Dickdarmgewebe sowie für Leukozyten auf Proteinebene bestätigt werden (Weskamp et al., 1996). Für ADAM 9 wurde ein hauptsächlich cytoplasmatisches Expressionsmuster in Endothel- und Epithelzellen beobachtet. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß ADAM 9 auch an intrazellulären Prozessierungen von Substraten beteiligt ist. Ferner könnte es als latentes Enzym innerhalb der Zelle gelagert werden, um bei Bedarf an die Zelloberfläche befördert zu werden. Obwohl ADAMs membranständige Proteine sind, wurden intrazelluläre Vorkommen u.a. auch bei ADAM 12 und 15 beobachtet (Katoda et al., 2000; Lum et al., 1998).

Im Hodengewebe konnte eine Expression von ADAM 9 in primären Spermatozyten, nicht jedoch in Spermatogonien detektiert werden. Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zu dem der ADAMs 1 und 2, welche auf der Zelloberfläche von reifen Spermien vorkommen und an der Interaktion von Spermium und Eizelle während der Befruchtung beteiligt sind (Lum und Blobel, 1997). Basierend auf diesen Beobachtungen könnte ADAM 9 als katalytisch aktives Enzym an proteolytischen Prozessen während der Reifung der Spermien beteiligt sein. Eine Beteiligung von ADAMs bei der Prozessierung von Proteinen während der Endreifung der Spermien wird auch für das membranständige ADAM 31 angenommen (Liu und Smith, 2000). Im Gegensatz zur cytoplasmatischen Lokalisation von ADAM 9 in Zellen des Mammakarzinoms, konnte ADAM 9 bei Zellen des Nierenzellkarzinoms ausschließlich auf der Zelloberfläche detektiert werden. Der Grund hierfür ist noch nicht geklärt. Dennoch scheint der Ort des Vorkommens von ADAM 9 in Tumorzellen vom Gewebetyp abhängig zu sein.

Die intrazelluläre Expression von ADAM 9 in der Niere beschränkte sich nur auf die Epithelzellen der proximalen Tubuli. Dieses konnte zuvor schon für rADAM 9 in der Niere der Ratte beobachtet werden (Mahimkar et al., 2000). Im Nierenkörperchen war ADAM 9 dagegen nicht detektierbar. Dieses räumlich eingeschränkte Expressionsbild ist deshalb von besonderem Interesse, da der als Substrat für ADAM 9 bekannte Heparinbindende Wachstumsfaktor (HB-EGF) in der Niere ebenfalls nur in Epithelien der proximalen Tubuli vorkommt (Nakagawa et al., 1997). Die prozessierte lösliche Form von HB-EGF stellt einen Ligand für den EGF-Rezeptor dar, der die gleiche Verteilung im

Nierengewebe aufweist wie ADAM 9 und HB-EGF (Gesuakdo et al., 1996). Ein Modell zur Wechselwirkung zweier membranständiger Proteine durch Shedding von Zelloberflächenproteinen verdeutlicht die Zusammenhänge (Schlöndorff und Blobel, 1999):

HB-EGF ist ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF; Higashiyama et al., 1991). Zellkultur-Untersuchungen zeigten, daß ADAM 9 HB-EGF durch proteolytische Spaltung von der Zellmembran freisetzen kann (Izumi et al., 1998). Der lösliche HB-EGF bindet an einen EGF-Rezeptor, was dessen Phosphorylierung stimuliert und somit eine Signalkaskade induziert. Wie das Shedding von $\text{TNF}\alpha$ wird auch die Freisetzung von membranständigem HB-EGF durch Phorbolester hochreguliert, welche Aktivatoren der Protein-Kinase C sind. Da Protein-Kinase C an die Cytoplasmatische Domäne von ADAM 9 binden und diese phosphorylieren kann (Izumi et al., 1998), ist anzunehmen, daß ADAM 9 am Shedding von HB-EGF mitwirkt (Schlöndorff et al., 1999). Da die Wechselwirkung zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und EGF-Rezeptoren durch das Shedding von HB-EGF vermittelt wird, ergibt sich folgendes Modell zur Signalübertragung zwischen GPCR und EGF unter Mitwirkung von ADAMs, möglicherweise ADAM 9 (Abb. 41; Blobel, 2000).

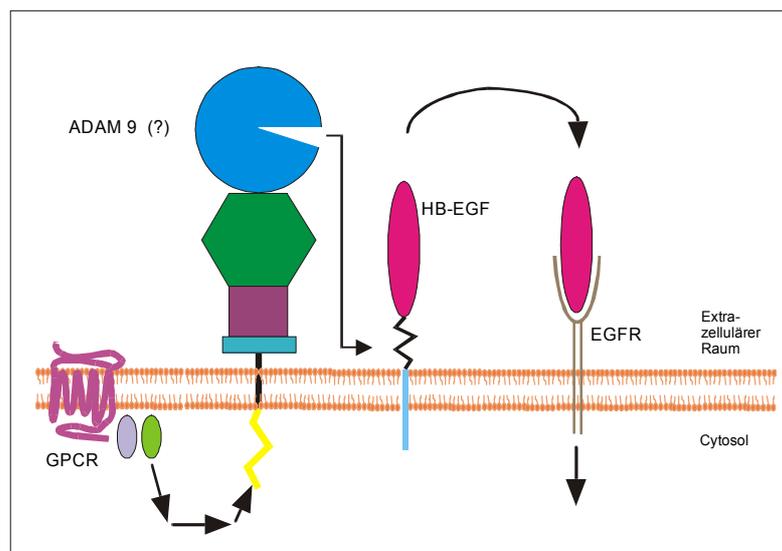


Abb. 41: Modell der autokrinen Signalübertragung zwischen GPCR und EGFR, vermittelt durch Shedding von HB-EGF.

Dabei wird ausgehend von einem GPC-Rezeptor ein ADAM stimuliert. Dieses führt zur proteolytischen Freisetzung des HB-EGFs, dessen lösliche Form anschließend einen EGF-Rezeptor aktiviert, was wiederum die intrazelluläre Phosphorylierung des Rezeptors stimuliert (Prenzel et al., 1999). Untersuchungen an ADAM 9 knock-out Mäusen könnten Klarheit darüber verschaffen, ob nun ADAM 9 die Protease ist, die für das Shedding von HB-EGF letztlich verantwortlich ist oder vielleicht eine andere, verwandte Protease. Ein Nachweis, daß ADAM 9 *in vitro* HB-EGF an der korrekten Stelle prozessieren kann, steht noch aus. Die identische Verteilung von HB-EGF, ADAM 9 und EGFR in Nierengewebe spricht jedoch für dieses Modell.

5.5. ADAMs in der Tumormetastasierung ?

Die meisten Krebspatienten sterben nach wie vor an den Folgen einer Tumormetastasierung.

Die Bildung von Tochtergeschwülsten beruht auf einer Kaskade von komplexen, interagierenden, letztlich aber unabhängigen Einzelschritten. Ein jeder dieser Schritte ist für die Metastasenentstehung unabdingbar.

Die metastatische Kaskade beginnt mit der Loslösung von Tumorzellen aus dem Zellverband durch Verlust der Zell-Zell Adhäsion. Es folgt die Invasion in die extrazelluläre Matrix durch Proteolyse sowie der Eintritt ins Blutssystem (Abb. 42).

Während der Zirkulation im Blutgefäß müssen Tumorzellen der Immunabwehr des Organismus entgehen und sich am Gefäßendothel des Metastasierungsorgans anlagern. Dort verlassen sie das Gefäßsystem, wandern in das Zielorgan ein und beginnen zu proliferieren. Überschreitet das proliferierende Gewebe eine bestimmte Größe, werden die Diffusionsstrecken für Sauerstoff und Nährstoffe zu lang, so daß Angiogenese die weitere Versorgung der wachsenden Metastase gewährleisten muß.

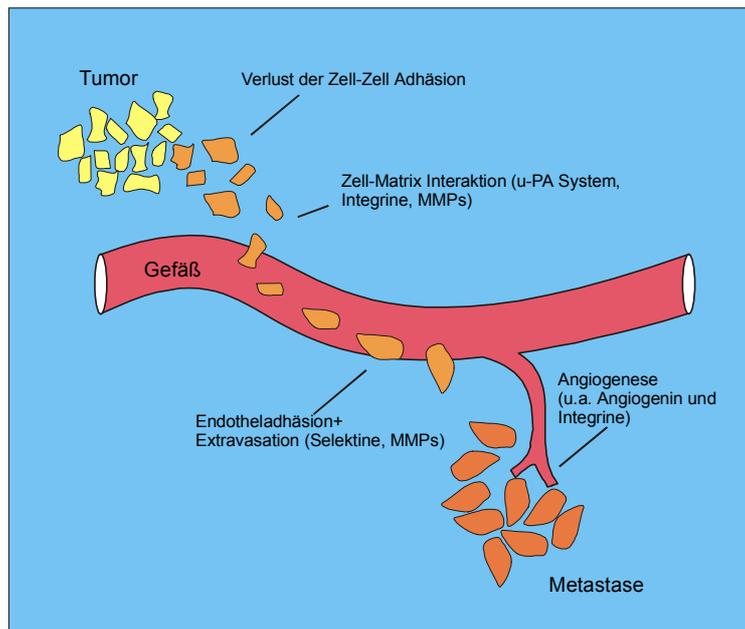


Abb. 42: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade

Das Durchdringen der Basalmembran durch Tumorzellen und das Einwandern in die Blutgefäße wird durch die Aktivität proteolytischer Enzyme reguliert, welche die extrazelluläre Matrix degradieren können sowie durch Integrine, die für die Anheftung der Tumorzellen an die Matrix verantwortlich sind. Erst durch enzymatische Proteolyse der extrazellulären Matrix werden Tumorzellmigration und -invasion ermöglicht (Liotta et al., 1980). Neben Serinproteasen kommt hierbei Metalloproteasen, insbesondere den Matrix-Metalloproteasen besondere Bedeutung zu, da sie maßgeblich am Abbau extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen, Proteoglykan, Elastin, Laminin und Fibronectin beteiligt sind (Stamenkovic, 2000).

Auch die Proteinfamilie der ADAMs zählt zu den Metalloproteasen und besitzt bei 50% der Mitglieder das zu dem der MMPs strukturell homologe katalytische Zink-Bindungsmotiv (Jia et al., 1996), weshalb sie prinzipiell gleiche oder ähnliche Funktionen im Metastasierungsgeschehen übernehmen könnten.

Daß ADAM 9 die Fähigkeit besitzt, Fibronectin als Bestandteil der extrazellulären Matrix sowie Plasminogen zu spalten, konnte in dieser Arbeit mit rekombinantem ADAM 9 demonstriert werden. Deshalb schließen sich in Zukunft Untersuchungen zur Identifizierung der Spaltstellen der Fibronectin- und Plasminogenfragmente an. Ferner

sollte eine eventuelle proteolytische Aktivität gegenüber anderen Matrixproteinen wie z.B. Laminin, Vitronektin oder Kollagen aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit etablierte rekombinante Darstellung der katalytischen Domäne von ADAM 9 in aktiver Form stellt das Enzym für solche Untersuchungen in ausreichender Menge zur Verfügung.

Auf Proteinebene konnte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich gezeigt werden, daß ADAM 9 sowohl intrazellulär, als auch auf der Zelloberfläche von Tumorzellen vorkommen kann. Die Detektion von ADAM 9 auf der Zellmembran der Tumorzellen im Fall des Nierenzellkarzinoms könnte mit der Proliferation der entarteten Zellen und deren Invasivität zusammenhängen, da in den ursprünglichen benignen Endothelien der Nierentubuli das Protein im Cytoplasma vorkam. Zudem ist durch die Domänenstruktur der membranständigen ADAMs eine funktionelle Verbindung zwischen Tumorzelloberfläche und Matrixdegradation gegeben.

Da über die biologische Funktion von ADAM 9 noch nichts bekannt ist, wurden mit dieser Arbeit erstmals Ansätze zur Aufklärung der Funktion als Protease geschaffen. Zusätzlich bietet die Etablierung des Expressionssystems die Möglichkeit, ausreichende Mengen des Proteins für Kristallisationsexperimente einzusetzen, um in Zukunft röntgenkristallographische Untersuchungen zur Strukturaufklärung durchzuführen.

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, N.A., Hollis, J.M. (1999) Cloning and characterization of ADAMTS 11, an aggrecanase from the ADAMTS-family. *J. Biol. Chem.* **274**, 23443-23450.

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

Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., Duffy, M.J. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* **72**, 1-9.

Arribas, J., Lopez-Casillas, F., Massague, J. (1997) Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor- α precursor and the β -amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* **272**, 17160-17165.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.

Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M., Almeida, E., Osbourne, L., White, J. (2000) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin β) and murine eggs. *J. Biol. Chem.* **275**, 11576-11584.

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

Black, R. 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. (1997) A metalloprotease disintegrin that releases tumour necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729-733.

Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel, J., Gotschli, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western-blot. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.

Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., White, J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252.

Blobel, C.P. (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 606-612.

Blobel, C.P. (1997) Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF α and Notch. *Cell* **90**, 589-595.

Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., Stöcker, W. (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environment (HEXXHXXGXXH and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins. *FEBS* **331**, 134-140.

Bray, S. (1998) A notch affair *Cell*. **93**, 499-503.

Buchner, J., Pastan, I., Brinkmann, U. (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal. Biochem.* **205**, 263-270.

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. (1998) Evidence that tumor necrosis factor- α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 508-524.

Buxbaum, J.D., Oishi, M., Chen, H.I., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E., Gandy, S.E., Greengard, P. (1992) Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**, 10075-10078.

Caporaso, G.L., Gandy, S.E., Buxbaum, J.D., Ramabhandran, T.V., Greengard, P. (1992) Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**, 3055-3059.

Chan, Y.M., Jan, Y.N. (1998) Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. *Cell* **94**, 423-426.

Chen, H. und Sampson, N.S. (1999) Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha_6\beta_1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β . *Chem. Biol.* **6**, 1-10.

Cho, M.S., Almeida, E.A., Huovila, A., Takahashi, Y., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., White, J.M. (1999) Evidence that distinct states of the integrin $\alpha_6\beta_1$ interact with laminin and an ADAM. *Chem. Biol.* **144**, 549-561.

Cohen, S.N., Chang, A., Boyer, H., Helling, R. (1973) Constructing of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 3240-3244.

- Colige, A., Li, S.-W., Sieron, A.L., Nusgens, B.V., Prockop, D.J., Lapiere, C.M. (1997) cDNA cloning and expression of 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* **94**, 2374-2379.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G., Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1316-1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**, 905-910.
- Cregg, J.M., Madden, K.R. (1988) Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**, 33-41.
- Edman, P., Begg, G.A. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., Gingeras, T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111-1121.
- Gesukado, L., Paolo, S.D., Calabro, A., Milani, S., Maiorano, R., Pannarale, G., Schnena, F.P. (1996) Expression of epidermal growth factor and its receptor in normal and diseased human kidney: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Kidney Int.* **49**, 656-665.
- Goudswaard, J., van der Donk, J.A., Noordzij, A. (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand. J. Immunol.* **8**, 21-28.
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S. (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**, 168-171.
- Greenwald, I. (1998) LIN-12/ Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes. Dev.* **12**, 1227-1230.
- Grinna, L. and Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**, 107-115.
- Groskopf, W.R., Hsieh, B., Summaria, L., Robbins, K.C. (1969) Studies on the active center of human plasmin. *J. Biol. Chem.* **244**, 359-365.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Heinlein, U.A., Wallat, S., Senftleben, A., Lemaire, L. (1994) Male germ cell-expressed mouse gene TAZ83 encodes a putative, cysteine rich transmembran protein (cyrtestin) sharing homologies with snake venom toxins and sperm egg fusion proteins. *Dev. Growth Differ.* **36**, 49-58.

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988) Improved silver stain procedure for fast staining in Phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.

Heussen, C., Dowdle, E.B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**, 196-202.

Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C., Klagsbrun, M. (1991) A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**, 936-939.

Hjertén, S., Rosengren, J., Pahlman, S. (1974) Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose. *J. Chromatog.* **101**, 281-288.

Hooper, N.M., Karran, E.H., Turner, A.J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem. J.* **321**, 265-279.

Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., Glynn, P., (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloproteinase expressed in various cell types. *Biochem. J.* **317**, 45-50.

Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A., Blobel, C.P. (1999) Interaction of the metalloprotease disintegrin MDC 9 and MDC 15 with two SH3 domain-containing proteins, Endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* **274**, 31693-31699.

Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580.

Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Krätschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R., Blobel, C.P. (1998) Cloning and initial characterization of mouse meltrin β and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 4180-4187.

Invitrogen (1999) A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Invitrogen Corporation, San Diego, USA.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E. (1998) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- γ /ADAM9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 24, 7260-7272.

Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason J.B., Fox, J.W. (1996) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* **34**, 1269-1276.

Katoda, N., Suzuki, A., Nakagami, Y., Izumi, T., Endo, T. (2000) Endogenous meltrin α is ubiquitously expressed and associated with the plasma membrane but exogenous meltrin α is retained in the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **128**, 941-949.

Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G. (1994) Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* **1**, 218 (2), 325-329.

Knight, C.G., Willenbrock, F., Murphy, G. (1992) A novel coumarin-labeled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS* **206**, 263-266.

Krätschmar, J., Lum, L., Blobel, C.P. (1996) Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J. Biol. Chem.* **271**, 4593-4596.

Kronvall, G., Seal, J.S., Finstad, S. (1970) Phylogenetic insight into evolution of mammalian fragment of γ G globulin using staphylococcal protein A. *J. Immunol.* **104**, 140-147.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **96**, 3922-3927.

Lewis, J. (1998) Notch signalling: A short cut to the nucleus. *Nature* **393**, 304-305.

Linder, B. und Heinlein, U.A. (1997) Decreased in vitro fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. *Dev. Growth Differ.* **39**, 243-247.

Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67-70.

Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M. (1998) Human ADAM 12 (meltrin α) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **273**, 16993-16997.

Lum, L. und Blobel, C.P. (1997) Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev. Biol.* **191**, 131-145.

- Lum, L., Reid, M.S., Blobel, C.P. (1998) Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**, 26236-26247.
- Mahimkar, R.M., Baricos, W.H., Visaya, O., Pollock, A.S., Lovett, D.H. (2000) Identification, cellular distribution and potential function of the metalloprotease-disintegrin MDC 9 in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 595-603.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., and Collins, F.S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 1154.
- 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.H., Petersen, M., Fitzner, J.N., Cerretti, D.P., March, C.J., Paxton, R.J., Black, R.A., Bode, W. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 3408-3412.
- Matthews, D.J., Goodman, L.J., Gorman, C.M., Wells, J.A. (1994) A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci.* **3**, 1197-1205.
- Millichip, M., Dallas, D., Wu, E., Dale, S., McKie, N. (1998) The metallo-disintegrin ADAM 10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **245**, 594-598.
- Moss, M.L., Jin, S.-L., Milla, M.E., Burkhart, W., Cartner, H.L., Chen, W.-J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* **385**, 733-736.
- Murphy, G., Knäuper, V., Cowell, S., Hembry, R., Stanton, H., Butler, G., Freije, J., Pendas, A.M., López-Otin, C. (1999) Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **878**, 25-37.
- Nakagawa, T., Hayase, Y., Sasahara, M., Haneda, M., Kikkawa, R., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Hazama, F. (1997) Distribution of heparin-binding EGF-like growth factor protein and mRNA in the normal kidneys. *Kidney Int.* **51**, 1774-1779.
- Nath, D., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Warn, A., Hutchinson, G.R., Yamada, K.M., Docherty, A.J., Murphy, G. (1999) Interaction of metargidin (ADAM 15) with $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins on different haemopoietic cells. *J. Cell Sci.* **112**, 579-587.
- Nelson, K.K., Schlöndorff, J., Blobel, C.P. (1999) Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor α convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2 β . *Biochem. J.* **343**, 673-680.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982) Genetransfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, **1**, 841

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L. Grimsley, G., Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Prot. Sci.*, **4**, 2411-2424.

Pan, D., und Rubin, J. (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**,271-280.

Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S. (1986) New hydrophilicity scale derived from HPLC peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425-5432.

Pharmacia (1993) Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles And Methods, Pharmacia BioProcess Technology.

Ponder, B.A., Wilkinson, M.M. (1981) Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 981-984.

Porath, J., Sundberg, L., Fornstedt, N., Olson, I. (1973) Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature* **245**, 465-466.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 883-888.

Primakoff, P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* **104**, 141-149.

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. (1999) Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 3531-3540.

Rooke, J., Pan, D., Xu, T., Rubin, G.M. (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* **273**, 1227-1230.

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. (1997) Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **272**, 24588-24593.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

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

Sato, H., Takino, T., Imai, K., Okada, Y., Stevenson, W.G., Seiki, M. (1996) Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS* **393**, 238-240.

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

Schlöndorff, J., Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* **112**, 3603-3617.

Schnepel, J., Tschesche, H. (2000) The proteolytic activity of the recombinant cryptic human fibronectin type IV collagenase from *E.coli* expression. *J. Prot. Chem.* **8**, 685-697.

Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-386.

Schwettmann, L., Tschesche, H. (2001) Cloning and expression in *Pichia pastoris* of metalloprotease domain of ADAM 9 catalytically active against fibronectin. *Prot. Expr. Purif.* **21**, 65-70.

Schwettmann, L. (1998) Klonierung der Metalloprotease-Domäne von murinem ADAM 9 und humanem ADAM 9 durch RT-PCR, Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

Selkoe, D.J. (1998) The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 447-453.

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochem.* **12**, 3055.

Simons, M., de Strooper, b., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G., Beyreuther, K. (1996) Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **16**, 899-908.

Sotillos, S., Roch, F., Campuzano, S. (1997) The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* **124**, 4769-4779.

Sreekrishna, K., Kropp, K.E. (1989) *Pichia pastoris*, In: Wolf, K. (Hrsg.) Nonconventional yeasts in biotechnology, Springer Berlin, Heidelberg, New York, 203-253.

Stamenkovic, I. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Cancer biology* **10**, 415-433.

Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., Bode, W. (1995) The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins serralysins and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840.

Stone, A.L., Kröger, M., Sand, Q.X.A. (1999) Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. *J. Prot. Chem.* **18**,4, 447-465.

Struhl, G., Adachi, A. (1998) Nuclear access and action of notch *in vivo*. *Cell* **93**, 649-660.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **207**, 365-377.

Summaria, L. and Robbins, K.C. (1971) Isolation and characterization of the S-carboxymethyl heavy chain derivative of human plasmin. *J. Biol. Chem.* **246**,2143-2146.

Tortorella, M.D., Pratta, M., Liu, R.Q., Austin, J., Ross, O.H., Abbaszade, I., Burn, T., Arner, E. (2000) Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J. Biol. Chem.* **275** (4), 18566-73.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354.

Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L. (1987) High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 1305-1308.

Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**, 339.

- Van Dyk, D.E., Marchand, P., Bruckner, R.C., Fox, J.W., Jaffee, B.D., Gunyuzlu, P.L., Davis, G.L., Nurnberg, S., Covington, M., Decicco, C.P., Trzaskos, J.M., Magdola, R.L. Copeland, R.A. (1997) Comparison of snake venom reprotin and matrix metalloproteinases as models of TNF α converting enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1219-1224.
- Van Wart, H.E. und Birkedal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **87**, 5578-5582.
- Veres, G., Gibbs, R.A., Scherer, S.E. Caskey, C.T. (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* **237**, 415-417.
- Wassarman, P.M. (1999) Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* **96**, 175-183.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**, 4543.
- Wen, C., Metzstein, M.M., Greenwald, I. (1997) SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* Kuzbanian and its role in LIN-12/Notch signaling. *Development* **124**, 4759-4767.
- Weskamp, G., Krättschmar, J.R., Reid, M, Blobel, C.P. (1996) MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J. Cell Biol.* **132**, 717-726.
- Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., White, J.M. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275-278.
- Wolfsberg, T.G. und White, J.M. (1996) ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* **180**, 389-401.
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T. Kamijo, K., Nabeshima, Y., Fujisawa-Sehara, A. (1995) A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* **377**, 652-656.
- Zhang, X.P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., Takada, J. (1998) Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC 15 (metargidin, ADAM 15) with integrin $\alpha_v\beta_3$. *J. Biol. Chem.* **273**, 7345-7350.