

**ÜBEREXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG DES  
EXTRAZELLULÄREN TEILS DER HUMANEN  
 $\alpha$ -SEKRETASE ADAM10**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

ALEXANDRA LEPTICH  
geboren in Wiesbaden

Mainz 2005

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die ADAM-Familie (a disintegrin and metallprotease)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Struktureller Aufbau der ADAMs und Funktion der einzelnen Domänen	2
1.1.2	Biologische Funktionen der ADAMs	4
1.1.3	Die „Sheddasen“: ADAM10, ADAM17 und ADAM9	6
<b>1.2</b>	<b>Die Alzheimer'sche Krankheit</b>	<b>8</b>
1.2.1	Neurofibrilläre Bündel und Amyloid-Plaques	8
1.2.2	Die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins	9
1.2.3	Mutationen innerhalb der A $\beta$ -Region	13
<b>1.3</b>	<b>Mögliche therapeutische Ansätze</b>	<b>16</b>
1.3.1	Immunisierung mit A $\beta$ -Peptiden und A $\beta$ -Antikörpern	17
1.3.2	Inhibitoren der $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase	18
1.3.3	Aktivierung der $\alpha$ -Sekretase	19
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung und Strategie der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>23</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2	Materialien	25
2.1.3	Geräte	26
2.1.4	Standards und Kits	27
2.1.5	Antikörper	27
2.1.6	Peptide	27
2.1.7	Inhibitoren	28
2.1.8	Enzyme	28
2.1.9	Plasmide und Oligonukleotide	28
2.1.10	Organismen	30
2.1.11	Medien	30
2.1.12	Puffer und Lösungen	31
<b>2.2</b>	<b>Allgemeine biochemische Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.2	Western Blot Analyse	33
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.2.3.2	Abschätzung der Proteinmenge nach ihrer Anfärbung im Polyacrylamid-Gel	35
2.2.4	Proteinfällung	35
2.2.4.1	Chloroform-Fällung	35
2.2.4.2	TCA-Fällung	35
2.2.5	Überprüfung der Proteinexpression	36
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>36</b>
2.3.1	Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	36
2.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien	37
2.3.3	Plasmid-DNA-Isolation	37
2.3.3.1	Plasmid-Minipräparation	37
2.3.3.2	Reinigung über Säulchen	37
2.3.3.3	Plasmid-Maxipräparation	38
2.3.4	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen und Modifizierung von DNA-Enden durch die T4-DNA-Polymerase	39
2.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen	40
2.3.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	40
2.3.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.3.8	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	41
2.3.9	„Annealing“ von Oligoadaptern	42

2.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.3.11	Transformation von Bakterien	42
2.3.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA	43
<b>2.4</b>	<b>Überexpression in Säugetierzellen</b>	<b>43</b>
2.4.1	Herstellung der Expressionsplasmide	43
2.4.1.1	pSecTag2C-hADAM10s-His und pcDNA3-hADAM10s-His	43
2.4.1.2	Die pIRES-Konstrukte	44
2.4.1.3	Die pcDNA5/FRT-Konstrukte	45
2.4.1.4	Die pCEP4-Konstrukte	46
2.4.2	Kultivieren von Säugetierzellen	47
2.4.3	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	47
2.4.4	Transfektion von Säugetierzellen	47
2.4.4.1	Calciumphosphatmethode	47
2.4.4.2	DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion von COS-Zellen	48
2.4.4.3	Roti <sup>®</sup> -Fect-Reagenz	48
2.4.4.4	LIPOFECTAMIN <sup>™</sup> 2000-Reagenz	49
2.4.5	Ernten der Zellüberstände und Analyse der Proteinexpression der transfizierten Säugetierzellen	49
<b>2.5</b>	<b>Überexpression in Insektenzellen</b>	<b>50</b>
2.5.1	Das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem	50
2.5.2	Transposition der pFastBac Donorplasmide	51
2.5.3	Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA	52
2.5.4	Kultivieren von Sf9-Zellen	53
2.5.5	Anlegen von Sf9-Dauerkulturen (Kryokonservierung)	53
2.5.6	Adaption von Sf9-Zellen an Serum-freies SF-900 II Medium	54
2.5.7	Transfektion von Sf9-Zellen	54
2.5.8	Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren zur Proteinherstellung	54
2.5.8.1	Herstellung der Stammlösung rekombinanter Baculoviren	55
2.5.8.2	Amplifikation von rekombinanten Baculoviren	55
2.5.8.3	Proteinexpression durch rekombinante Baculoviren und Ernten der Sf9-Zellüberstände	56
<b>2.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>58</b>
2.6.1	Reinigung der ADAM10-Proteine aus Sf9-Monolayerkulturüberständen	58
2.6.1.1	Aufkonzentration der Sf9-Zellüberstände mit Amicon Ultra Konzentratoren	58
2.6.1.2	Reinigung durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	58
2.6.1.3	Reinigung durch Lektin-Affinitätschromatographie	61
2.6.2	Charakterisierung der löslichen ADAM10-Proteine	63
2.6.2.1	Deglykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice	63
2.6.2.2	Enzymtest und Enzymtestanalyse durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	63
2.6.2.3	Inkubation von U373 hwt APP-Zellen mit den Zellüberständen von hADAM10s- und hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Zellen	65
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression von löslichen ADAM10-Proteinen in Säugetierzellen</b>	<b>67</b>
3.1.1	Transfektion verschiedener Zelllinien mit pcDNA3-hADAM10s-His und pSecTag2C-hADAM10s-His	67
3.1.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit den pIRES-Konstrukten	68
3.1.3	Transfektion von FlpIn <sup>™</sup> 293-Zellen mit den pcDNA5/FRT-Konstrukten	69
3.1.4	Transfektion von HEK-EBNA-Zellen mit den pCEP4-Konstrukten	70
<b>3.2</b>	<b>Expression von löslichen ADAM10-Proteinen durch das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem</b>	<b>72</b>
3.2.1	Herstellung der Expressionsplasmide für die Expression in Sf9-Insektenzellen	73
3.2.2	Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA	75

3.2.3	Transfektion von Sf9-Zellen mit anschließendem Expressionsnachweis der verschiedenen löslichen ADAM10-Proteine.....	75
3.2.4	Herstellung der Stammlösung von rekombinanten hADAM10s- und hADAM10splice-Baculoviren in Sf9-Insektenzellen.....	77
3.2.5	Ermittlung der für die Virusamplifikation und Proteinexpression optimalen Verdünnung der hADAM10s- und hADAM10splice-Baculovirus-Stammlösung.....	78
3.2.6	Analyse der Proteinexpression von hADAM10s und hADAM10splice.....	82
<b>3.3</b>	<b>Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice.....</b>	<b>84</b>
3.3.1	Aufkonzentration von hADAM10s und hADAM10splice aus Sf9-Zellüberständen mit anschließender Überprüfung der enzymatischen Aktivität.....	84
3.3.2	Spezifische Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie und Untersuchung ihrer Enzymaktivität.....	88
3.3.3	Analytische Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Lektin-Affinitätschromatographie und Nachweis ihrer enzymatischen Aktivität.....	94
3.3.4	Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Lektin-Affinitätschromatographie im präparativen Maßstab.....	97
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der löslichen ADAM10-Varianten.....</b>	<b>99</b>
3.4.1	Deglykosylierung der löslichen ADAM10-Varianten.....	99
3.4.2	Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften von hADAM10s und hADAM10splice.....	101
3.4.3	Einfluss der löslichen ADAM10-Proteine auf die APP $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen.....	109
3.4.4	Spaltung muriner und humaner A $\beta$ -Substrate durch hADAM10s (R&D).....	111
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der löslichen ADAM10-Proteine.....</b>	<b>113</b>
4.1.1	Wahl des Expressionssystems.....	113
4.1.2	Expression von löslichen ADAM10-Proteinen in Säugetierzellen.....	114
4.1.3	Expression von hADAM10s und hADAM10splice durch das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem.....	117
<b>4.2</b>	<b>Reinigung der ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice.....</b>	<b>119</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice.....</b>	<b>121</b>
4.3.1	Glykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice.....	121
4.3.2	Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften von hADAM10s und hADAM10splice.....	122
4.3.3	Spaltung muriner und humaner A $\beta$ -Peptide durch hADAM10s (R&D).....	128
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>131</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>143</b>
<b>7.1</b>	<b>Massenspektroskopie.....</b>	<b>143</b>
<b>7.2</b>	<b>Vektorkarten.....</b>	<b>147</b>
7.2.1	Plasmide für die Expression in Insektenzellen.....	147
7.1.2	Plasmide für die Expression in Säugetierzellen.....	149

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
Abb. 1.1:	Domänenstruktur der ADAMs	2
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung von APP <sub>695</sub>	10
Abb. 1.3:	Proteolytische Prozessierung von APP durch $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase	12
Abb. 1.4:	Mutationen an den Pos. 21 und 22 innerhalb der A $\beta$ -Sequenz	14
Abb. 1.5:	Pathologische Konformation von A $\beta$ 42 im Vergleich zu A $\beta$ 40	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
Abb. 2.1:	Genexpression mit dem Bac-To-Bac-Expressionssystem	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
Abb. 3.1:	Transiente Transfektion von HEK-EBNA-Zellen mit pCEP4-hADAM10s-His	71
Abb. 3.2:	ADAM10-Konstrukte für die Expression in Sf9-Insektenzellen	73
Abb. 3.3:	Expressionsnachweis der einzelnen löslichen ADAM10-Varianten	76
Abb. 3.4 A-B:	Proteinexpression von hADAM10s und hADAM10splice während der Viruspassagen	77
Abb. 3.5 A-B:	Auswirkung der verschiedenen eingesetzten Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen auf die Expression von hADAM10s	80
Abb. 3.6 A-B:	Auswirkung der verschiedenen eingesetzten Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen auf die Expression von hADAM10splice	81
Abb. 3.7 A-B:	Proteinexpression von hADAM10s in Sf9-Zellen	82
Abb. 3.8 A-B:	Proteinexpression von hADAM10splice in Sf9-Zellen	83
Abb. 3.9:	Nachweis von hADAM10s in der 30-100 kDa Fraktion	84
Abb. 3.10:	Nachweis von hADAM10splice in der 30-100 kDa Fraktion	85
Abb. 3.11 A-C:	Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch hADAM10s und hADAM10splice	87
Abb. 3.12 A-B:	Reinigung von hADAM10s über Ni-NTA: 500 mM Imidazol	88
Abb. 3.13 A-D:	Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice über Ni-NTA: 400 mM Imidazol	89
Abb. 3.14 A-D:	Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch hADAM10s und hADAM10splice nach Ni-NTA : 400 mM Imidazol	91
Abb. 3.15 A-D:	Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice über Ni-NTA: 100 mM NaCl	92
Abb. 3.16:	Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch die hADAM10s-Waschfraktion 1 nach Ni-NTA: 100 mM NaCl	93
Abb. 3.17 A-D:	Nachweis von hADAM10s und hADAM10splice nach der analytischen Reinigung mittels Concanvalin A	95
Abb. 3.18 A-B:	Analyse der Spaltung von APP18 durch hADAM10s und hADAM10splice nach der analytischen Reinigung mittels Concanvalin A	96
Abb. 3.19 :	Immunologischer Nachweis von hADAM10s und hADAM10splice nach der präparativen Reinigung mittels Concanvalin A	97
Abb. 3.20 A-B:	Mengenabschätzung von hADAM10s und hADAM10splice nach Coomassie-Färbung	98
Abb. 3.21:	Deglykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice	100
Abb. 3.22:	Graphische Darstellung der Spaltung der APP18-Substrate durch hADAM10s (R&D), hADAM10s bzw. hADAM10splice	102
Abb. 3.23 :	Graphische Darstellung der Spaltung von A $\beta$ 40, A $\beta$ 40A21G & A $\beta$ 40E22Q durch hADAM10s (R&D), hADAM10s bzw. hADAM10splice	104
Abb. 3.24:	Spaltung verschiedener A $\beta$ 40-Substrate durch hADAM10s (R&D)	106
Abb. 3.25 A-D:	Inhibierung der Spaltung von APP18 durch GI 254023 X	108

Abb. 3.26:	Einfluss von hADAM10s- und hADAM10splice auf die APPs $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen.....	109
Abb. 3.27:	Einfluss von hADAM10s (R&D-Systems) auf die APPs $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen.....	110
Abb. 3.28:	Spaltung humaner und muriner A $\beta$ -Substrate durch hADAM10s (R&D).....	111

## **7 Anhang**

Abb. 7.1:	Spaltung von APP18 durch hADAM10s (R&D-Systems).....	143
Abb. 7.2:	Spaltung von A $\beta$ 40 durch hADAM10s (R&D-Systems).....	144
Abb. 7.3:	Spaltung von A $\beta$ 40A21G durch hADAM10s (R&D-Systems).....	144
Abb. 7.4:	Spaltung von A $\beta$ 40E22Q durch hADAM10s (R&D-Systems).....	145
Abb. 7.5:	Spaltung von A $\beta$ 40E22K durch hADAM10s (R&D-Systems).....	145
Abb. 7.6:	Spaltung von A $\beta$ 40E22G durch hADAM10s (R&D-Systems).....	146
Abb. 7.7:	pFB-bADAM10s-His.....	147
Abb. 7.8:	pFB-hADAM10s-His.....	147
Abb. 7.9:	pFB-CD33-hADAM10s-His.....	148
Abb. 7.10:	pFB-hADAM10splice-His.....	148
Abb. 7.11:	pcDNA3-hADAM10s-His.....	149
Abb. 7.12:	pSecTag2C-hADAM10s-His.....	149
Abb. 7.13:	pIRES-bADAM10s-His.....	150
Abb. 7.14:	pIRES-hADAM10s-His.....	150
Abb. 7.15:	pIRES-hADAM10splice-His.....	151
Abb. 7.16:	pcDNA5/FRT-bADAM10s-His.....	151
Abb. 7.17:	pcDNA5/FRT-hADAM10s-His.....	152
Abb. 7.18:	pcDNA5/FRT-hADAM10splice-His.....	152
Abb. 7.19:	pCEP4-hADAM10s-His.....	153
Abb. 7.20:	pCEP4-hADAM10s-IgG1mFc.....	153

## **TABELLENVERZEICHNIS**

### **3 Ergebnisse**

Tab. 3.1:	Molekulargewichte der in Sf9-Zellen exprimierten ADAM10-Proteine.....	76
Tab. 3.2:	Proteinausbeute von hADAM10s und hADAM10splice nach deren präparativen Reinigung.....	99
Tab. 3.3:	Aminosäuresequenzen der eingesetzten APP18- und A $\beta$ 40-Substrate.....	101
Tab. 3.4:	Spaltung der APP18-Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice.....	103
Tab. 3.5:	Spaltung der A $\beta$ 40-Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice.....	104
Tab. 3.6:	Spaltung von APP18 durch hADAM10s und hADAM10splice nach 4-wöchiger Lagerung des jeweiligen Lyophilisats bei 4°C.....	107
Tab. 3.7:	Spaltung von humanen und murinen A $\beta$ -Substraten durch hADAM10s (R&D-Systems).....	112

### **4 Diskussion**

Tab. 4.1:	APP18-Substratpräferenz der Enzyme hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice.....	123
Tab. 4.2:	A $\beta$ 40-Substratpräferenz der Enzyme hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice.....	124

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
ADAM	a Disintegrin and Metalloprotease
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
APPs $\alpha$	$\alpha$ -Sekretase-gespaltenes lösliches APP-Fragment
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
HA	Hämagglutinin A
His	Histidin-Epitop
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloracetat

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DIE ADAM-FAMILIE (a disintegrin and metalloprotease)

Die ADAM-Proteinfamilie gehört zur Klasse der Metalloproteinasen, die eine Vielzahl proteolytischer Enzyme beinhaltet und sich in ungefähr 30 Familien einteilen lässt (Rawlings und Barrett, 1995). Diese 30 Familien können wiederum in fünf Gruppen unterteilt werden, von denen drei Gruppen in ihrer katalytisch aktiven Domäne das charakteristische Zinkbindungsmotiv HEXXH enthalten (X steht für jede beliebige Aminosäure). Eine dieser drei Gruppen bilden die „Metzincine“ (Bode *et al.*, 1993), deren Name von der identischen Region der Zinkbindung und einem allen Vertretern gemeinsamen vollständig konservierten Methionin-Rest geprägt wurde.

Die „Metzincine“ beinhalten neben den Serralysinen, den Astacinen, den Matrix Metalloproteinasen (Matrixine) auch die Proteinfamilie der Reprolysine (Adamalysine). Die Familie der Reprolysine besteht ihrerseits wieder aus zwei Unterfamilien, den Metalloproteinasen aus Schlangengiften (SVMPs, snake yenom metalloproteases) und den für diese Arbeit relevanten Disintegrin-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (a disintegrin and metalloprotease) (Bode *et al.*, 1993; Wolfsberg und White, 1996). Die verwandtschaftliche Beziehung dieser beiden Unterfamilien wird durch den hohen Grad an Sequenzhomologie der Zinkmetalloprotease-Domänen (> 20 %) begründet.

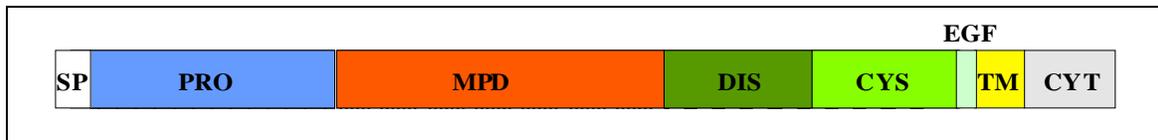
Die proteolytische Substrat-Spaltung durch Metalloproteinasen wird durch die beiden Histidin-Reste des HEXXH-Zinkbindungsmotivs unterstützt, die zwei Koordinationszentren für das in der katalytischen Domäne vorhandene und für die Proteolyse wichtige Zink-Ion bilden. Durch den Glutaminsäurerest wird der nukleophile Angriff eines gebundenen Wasser-Moleküls auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung gefördert.

Bei den „Metzincinen“ bzw. den ADAMs dient als dritter Koordinationspartner des Zink-Ions im aktiven Zentrum ein weiterer konservierter Histidin-Rest, der 6 Aminosäuren C-terminal zur Zinkbindungsstelle liegt. Die Bindung dieses Histidins wird durch ein Glycin innerhalb der erweiterten Konsensussequenz der Zinkbindungsstelle HEXXHXXGXXH ermöglicht. Dabei bewirkt der Glycin-Rest eine abrupte Änderung der helikalen Konformation der Zinkbindungsstelle und fördert die Bildung einer Haarnadelschleife. Auf diese Weise kommt der dritte Histidin-Rest in die Nähe des aktiven Zentrums, um das Zink-Ion komplexieren zu können. Der konservierte Methionin-Rest, der den „Metzincinen“ ihren Namen gibt, befindet sich 8 bis 14 Aminosäuren C-terminal zur erweiterten Konsensussequenz der Zinkbindungsstelle und bewirkt zusammen mit anderen Seitenketten

(Isoleucin, Leucin oder Valin) die Strukturhaltung des aktiven katalytischen Zentrums (Bode *et al.*, 1993; Stöcker *et al.*, 1995).

### **1.1.1 Struktureller Aufbau der ADAMs und Funktion der einzelnen Domänen**

Bei den ADAMs handelt es sich um Typ-I-Membranproteine, die sich durch eine charakteristische Domänenstruktur auszeichnen. Neben der Signalsequenz findet man eine Pro-, eine Metalloprotease-, eine Disintegrin-ähnliche, eine Cystein-reiche, eine EGF-ähnliche (epidermaler Wachstumsfaktor), eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne (Wolfsberg *et al.*, 1993; siehe Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Domänenstruktur der ADAMs

SP = Signalpeptid, PRO = Prodomäne, MPD = Metalloprotease-Domäne, DIS = Disintegrin-ähnliche Domäne, CYS = Cystein-reiche Domäne, EGF = epidermaler Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne, TM = Transmembran-Domäne, CYT = cytoplasmatische Domäne

Signalpeptid:

Das Signalpeptid ist für den Transport des reifen Proteins über den intrazellulären sekretorischen Transportweg zur Zellmembran wichtig.

Prodomäne:

Die Prodomäne übernimmt eine wichtige Aufgabe bei der Reifung der ADAMs. Zunächst wird durch die Prodomäne die Metalloprotease-Domäne in einem inaktiven Zustand gehalten (Seals and Courtneidge, 2003), so dass sie auf die katalytische Aktivität des Enzyms einen hemmenden Einfluss ausübt und erst durch ihre Abspaltung die Metalloprotease enzymatisch aktiv wird. Dieser hemmende Einfluss konnte *in vivo* an ADAM10 gezeigt werden. Durch die Zugabe der Prodomäne von ADAM10 *in trans* wurde die Aktivität des endogenen Enzyms inhibiert (Anders *et al.*, 2001). Fehlt jedoch die Prodomäne von Beginn an, war keine enzymatische Aktivität von ADAM10 *in vivo* nachweisbar. Bei einer Zugabe der Prodomäne *in trans* konnte diese fehlende Aktivität wieder hergestellt werden (Anders *et al.*, 2001). Die Prodomäne scheint als intramolekulares Chaperon für die richtige Faltung, vor allem der Metalloproteasedomäne und damit für die enzymatische Aktivität des Enzyms

wichtig zu sein (Seals and Courtneidge, 2003). Auch im Fall von ADAM17 (TACE) führt das komplette Fehlen der Prodomäne (ADAM17 $\Delta$ Pro) zu einem inaktiven Protein (Milla *et al.*, 1999).

Viele ADAMs besitzen am Ende ihrer Prodomäne die Furin-Erkennungssequenz RXX/RR, was die Vermutung nahe legt, dass die Entfernung der Prodomäne *in vivo* durch Proprotein-Konvertasen wie zum Beispiel Furin erfolgt. Für ADAM9 und ADAM15 konnte die Aktivierung durch Furin *in vitro* gezeigt werden (Roghani *et al.*, 1999; Lum *et al.*, 1998). Im Fall von ADAM10 konnte eine Aktivierung *in vivo* durch Furin und vor allem durch die Proprotein-Konvertasen 7 (PC7) nachgewiesen werden (Anders *et al.*, 2001). Bei ADAM17 (TACE) konnte als eine weitere Funktion der Prodomäne gezeigt werden, dass sie für die Sekretion dieses Enzyms eine wichtige Rolle spielt (Milla *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2005).

#### Metalloproteasedomäne:

In ihrer katalytisch aktiven Domäne enthalten die ADAMs das schon erwähnte charakteristische Zinkbindungsmotiv HEXXHXXGXXH. Doch nicht bei allen ADAMs ist dieses Motiv vollständig, und somit sind auch nicht alle von ihnen proteolytisch aktiv (Wolfsberg *et al.*, 1995; Wolfsberg und White, 1996). Die Mitglieder mit einer intakten Zinkbindungsstelle enthalten in ihrer Prodomäne einen konservierten Cystein-Rest und können vermutlich über einen „Cystein-Switch“-Mechanismus aktiviert werden (Loechel *et al.*, 1998 & 1999). Dabei handelt es sich um einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Enzymaktivität von Zink-Metalloproteinasen (Springman *et al.*, 1990; Van Wart und Birdedal-Hansen, 1990). Im inaktiven Zustand interagiert die SH-Gruppe dieses konservierten Cystein-Rests aus der Prodomäne mit dem Zink-Ion im aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch wird die Bildung des Wasser-Zink-Komplexes, der für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell ist, verhindert (Springman *et al.*, 1990). Unter dem „Cystein-Switch“ versteht man nun die Zerstörung des Cystein-Zink-Komplexes. Der Austausch von Cystein gegen Wasser weist dem Zink-Ion, das bis dahin nur strukturstabilisierende Funktion besitzt, eine katalytische Funktion zu.

#### Disintegrin-ähnliche Domäne:

Über ihre Disintegrin-ähnliche Domäne können ADAMs verschiedene Integrine erkennen und binden, so dass diese Domäne eine essentielle Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten spielen könnte (Wolfsberg und White, 1996; White, 2003; Bridges *et al.*, 2004).

### Cystein-reiche Domäne:

Die Funktion der Cystein-reichen Domäne konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden. Aufgrund der vielen Cystein-Reste liegt die Vermutung nahe, dass diese Domäne durch die Bildung von Disulfidbrücken eine strukturelle Funktion übernimmt und die Orientierung der Domänen zueinander und damit deren Funktion beeinflusst (Fox und Bjarnason, 1996). Für ADAM17 (TACE) konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle beim Entfernen der Prodomäne spielen könnte (Milla *et al.*, 1999). Es ist wahrscheinlich, dass die Cystein-reiche Domäne die Bindungskapazität der Disintegrin-ähnlichen Domäne unterstützt und ihr dadurch eine gewisse Spezifität verleiht (Seals and Courtneidge, 2003). So konnte für ADAM12 gezeigt werden, dass die Cystein-reiche Domäne *in vitro* mit Syndecan interagieren und auf diese Weise die Integrin-abhängige Ausbreitung von mesenchymalen Zellen vermitteln kann (Iba *et al.*, 2000; White, 2003). Ferner wäre eine Wechselwirkung der Cystein-reichen Domäne mit dem Substrat denkbar, um durch diese intramolekulare Kooperation die Funktion und Spezifität der Metalloproteasedomäne zu verstärken (Smith *et al.*, 2002).

Im C-terminalen Bereich der Cystein-reichen Domäne befindet sich bei den meisten ADAMs ein EGF-ähnlicher Bereich. Ferner besitzen einige ADAMs (ADAM1, 9, 11 und 12) einen einem viralen Fusionspeptid ähnelnden Bereich (Wolfsberg und White, 1996), der bei Zellfusionsprozessen eine Rolle spielen könnte (Huovila *et al.*, 1996; Bigler *et al.*, 1997).

### Cytoplasmatische Domäne:

Die cytoplasmatische Domäne der ADAMs ist im Bezug auf ihre Sequenz und Länge sehr variabel (Seals and Courtneidge, 2003). Viele der ADAMs, einschließlich ADAM9, ADAM10 und ADAM17 enthalten Prolin-reiche Sequenzen, die als Bindungsstellen für Signalmoleküle mit SH3-Domänen dienen können (Pawson, 1995). Ferner sind potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden. So kann zum Beispiel ADAM9 mit der katalytischen Domäne der Proteinkinase C assoziieren und durch sie *in vitro* phosphoryliert werden (Inzumi *et al.*, 1998; Seals and Courtneidge, 2003).

### **1.1.2 Biologische Funktionen der ADAMs**

Gegenwärtig sind 29 ADAMs bekannt, von denen vermutlich 17, basierend auf dem Vorhandensein eines vollständigen Zinkbindungsmotivs in ihrer Metalloproteasedomäne, katalytisch aktiv sind (Primakoff und Myles, 2000; White, 2003).

Die biologischen Funktionen der ADAMs sind sehr vielseitig. Mit Hilfe ihrer Disintegrin-ähnlichen Domäne spielen sie u. a. eine wichtige Rolle bei Zellfusionsprozessen. Als ein Beispiel für einen solchen Fusionsprozess sei hier die Verschmelzung von Eizelle und Spermium erwähnt (Huovila *et al.*, 1996; Snell und White, 1996). Die daran beteiligten Proteine ADAM1 (Fertilin  $\alpha$ ) und ADAM2 (Fertilin  $\beta$ ) bilden ein Heterodimer auf der Spermienoberfläche. Die beiden Untereinheiten werden während der Spermatogenese prozessiert und bestehen daraufhin nur noch aus der Disintegrin-ähnlichen, der Cysteinreichen, der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne (Bigler *et al.*, 1997). Für die Erkennung und Bindung an das Integrin  $\alpha 6 \beta 1$  in der unbefruchteten Eizelle spielt die Disintegrin-ähnliche Domäne von ADAM2 eine wichtige Rolle (Almeida *et al.*, 1995; Huovila *et al.*, 1996). Durch die Bindung von ADAM2 an das Integrin erfolgt im vorliegenden Heterodimer eine Konformationsänderung, die bei der ADAM 1-Untereinheit die Exponierung ihrer potentiellen Fusionspeptid-Domäne bewirkt. Dadurch kann ADAM1 mit der Eizelle in Kontakt treten und die Fusion von Eizelle und Spermium induzieren (Huovila *et al.*, 1996; Snell und White, 1996).

Ein anderes Beispiel bildet die Fusion von Myoblasten zu Myotuben, die durch ADAM12 (Melprin  $\alpha$ ) vermittelt wird (Yagami-Hiromasa *et al.*, 1995). Dabei kann die Expression einer löslichen Form von ADAM12 in Mäusen eine *de novo* Myogenese induzieren (Primakoff und Myles, 2000). Ferner besitzt ADAM12 auch Protease-Aktivität, wobei die physiologischen Substrate bisher unbekannt sind (Primakoff und Myles, 2000).

Eine weitere wichtige physiologische Rolle spielen einige proteolytisch aktive ADAMs in einem als „Shedding“ bezeichneten Prozess. Darunter versteht man die proteolytische Freisetzung von membranständigen Proteinen der Zelloberfläche in den Extrazellulärraum. Diese Freisetzung kann man bei einer Vielzahl von membranständigen Enzymen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen, Leukozytenantigenen, viralen Membranproteinen und Proteinen wie dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) beobachten (Hooper *et al.*, 1997; Kahn *et al.*, 1994; Mohler *et al.*, 1994; Brakebusch *et al.*, 1994; Massagué und Pandiella, 1993; Ehlers und Riordan, 1991).

Durch eine spezielle Klasse von Metalloprotease-Inhibitoren, den Hydroxamat-Inhibitoren, kann dieser Prozess unterdrückt werden. Bei den Hydroxamat-Derivaten handelt es sich um Chelatbildner, d.h. das im katalytischen Zentrum vorhandene Zink wird komplexiert und kann keine enzymatische Reaktion unterstützen (Hooper *et al.*, 1997).

### **1.1.3 Die „Sheddasen“: ADAM10, ADAM17 und ADAM9**

Im Folgenden sollen die drei als „Sheddasen“ bzw. „Sekretasen“ katalytisch aktiven ADAMs vorgestellt werden, die aktuell als mögliche  $\alpha$ -Sekretase-Kandidaten bei der Alzheimer'schen Erkrankung in Betracht gezogen werden (siehe auch 1.3.3).

#### ADAM10:

Bei ADAM10 handelt es sich vermutlich um eine  $\alpha$ -Sekretase, die durch die Spaltung ihres Substrats, dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP), die Bildung von Amyloid-Plaques während der Alzheimer'schen Krankheit verhindert und damit einen interessanten Kandidaten für die medizinische Behandlung dieser Krankheit darstellt (Lammich *et al.*, 1999; Kojro *et al.*, 2001; siehe 1.3).

ADAM10 wurde erstmals aus Rindergehirnen isoliert (Chantry *et al.*, 1989). Es spaltet *in vitro* das Myelin-Basic-Protein (Howard und Glynn, 1995), wobei nicht sicher ist, ob dieses Protein ein natürliches Substrat für ADAM10 darstellt und auch *in vivo* gespalten wird. Auch Peptidsubstrate, die auf der Sequenz des Tumor-Nekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) basieren, werden von ADAM10 *in vitro* spezifisch gespalten (Lunn *et al.*, 1997; Rosendahl *et al.*, 1997). Lammich *et al.* (1999) konnten zeigen, dass ADAM10 aus der Sequenz des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) abgeleitete Peptidsubstrate spalten kann. Aufgrund dieser Beobachtung wurde zum ersten Mal die Überlegung angestellt, dass die besagte  $\alpha$ -Sekretase und ADAM10 identisch sein könnten. Dafür sprechen zahlreiche Eigenschaften von ADAM10, die auch für die gesuchte  $\alpha$ -Sekretase beschrieben wurden. Zum Beispiel stimmt das Inhibitionsspektrum von ADAM10 mit der beschriebenen Inhibierung der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität überein (Roberts *et al.*, 1994). Die  $\alpha$ -Sekretase ist ein integrales Membranprotein, das durch Hydroxamsäure-Derivate wie zum Beispiel Batimastat, Marimastat und BB2116 inhibiert werden kann (Parvathy *et al.*, 1999).

Nach Überexpression von bovinem ADAM10 in HEK-Zellen (human embrionic kidney) konnte ebenfalls eine erhöhte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität beobachtet werden. Diese basale Aktivität konnte durch die Stimulierung der Proteinkinase C mittels Phorbolster (z.B. PMA) noch um ein Vielfaches gesteigert werden (Lammich *et al.*, 1999), was ebenfalls ein Charakteristikum der in der Literatur beschriebenen  $\alpha$ -Sekretase darstellt (Hung *et al.*, 1993; Buxbaum *et al.*, 1993). Durch eine dominant negative Form von ADAM10, bei der eine Punktmutation vorliegt, die den konservierten Glutaminsäurerest im HEXXH-Zinkbindungsmotiv betrifft, wurde die zelluläre  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität deutlich gehemmt (Lammich *et al.*, 1999).

ADAM10 wird in Neuronen im menschlichen und im Maus-Gehirn exprimiert (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). In diesem Zusammenhang sei noch die Splicevariante von ADAM10 vorgestellt, die auf mRNA-Basis im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden konnte (Yavari *et al.*, 1998). Das potentielle Protein würde dabei in löslicher Form vorliegen und wenige Aminosäuren nach der Disintegrin-ähnlichen Domäne enden.

Das ADAM10-Homologon KUZ in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erfüllt dort eine entscheidende Funktion bei der Neurogenese und während der Embryonalentwicklung (Rooke *et al.*, 1996; Fambrough *et al.*, 1996). Während der Neurogenese ist es an der selektiven Ausbildung neuronaler Zellen beteiligt, die durch die Spaltung des für die Embryonalentwicklung notwendigen Transmembranrezeptors Notch erfolgt (Pan und Rubin, 1997). Auch in ADAM10-defizienten Mäusen ist der Notch-Signalweg gestört, was für ADAM10 als hauptsächliche Notch-Sheddase sprechen könnte (Hartmann *et al.*, 2002; Huovila *et al.*, 2005).

#### ADAM17:

ADAM17 (TACE; TNF  $\alpha$  converting enzyme) ist eine weitere Sekretase aus der ADAM-Familie. Dieses Enzym ist für die Bildung des löslichen Tumor-Nekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) *in vivo* verantwortlich (Moss *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1997). Bei TNF  $\alpha$  handelt es sich um ein Cytokin, das bei Entzündungsprozessen eine wichtige physiologische Rolle spielt (Kriegler *et al.*, 1988). Ferner konnte auch für TACE durch die Phorbolster-induzierte Stimulierung der Proteinkinase C eine  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität nachgewiesen werden (Buxbaum *et al.*, 1998). Dass jedoch nicht TACE alleine als  $\alpha$ -Sekretase wirkt, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass in TACE-defizienten Zellen immer noch eine Restaktivität der  $\alpha$ -Sekretase nachgewiesen werden konnte, die allerdings nicht mehr durch Phorbolster zu steigern war (Buxbaum *et al.*, 1998). Bei der Spaltung des für die Embryonalentwicklung wichtigen Notch scheint neben ADAM10 auch TACE involviert zu sein (Huovila *et al.*, 2005; Esler und Wolfe, 2001; Brou *et al.*, 2000). Ferner reguliert es die Signalwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel TGF $\alpha$  (Huovila *et al.*, 2005).

#### ADAM9:

Die Sekretase ADAM9 ist für die Freisetzung des löslichen Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors aus seiner membrangebundenen Vorstufe verantwortlich (Inzumi *et al.*, 1998). Auch für ADAM9 (= MDC9 bzw. Meltrin  $\gamma$ ) konnte eine durch Phorbolster aktivierte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität gezeigt werden (Koike *et al.*, 1999), allerdings

spaltet es das Amyloid-Vorläufer-Protein nicht an der spezifischen  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle (Roghani *et al.*, 1999).

### **1.2 DIE ALZHEIMER'SCHE ERKRANKUNG**

Bei der Alzheimer'schen Erkrankung handelt es sich um die häufigste Form der Altersdemenz. Die typischen Symptome sind Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und des Orientierungsvermögens, Wahrnehmungsschwierigkeiten, der Verlust des logischen Denkens, des Sprachvermögens und die Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses bis hin zur Amnesie. Die Krankheit tritt in 90–95 % der Fälle sporadisch auf und bricht in der Regel nach dem 65. Lebensjahr aus („late onset“). Bei 5–10 % der Fälle ist die Ursache der Krankheit genetischen Ursprungs (Haass, 1996; Koo *et al.*, 1999). In diesen Fällen kommt es vor dem 65. Lebensjahr zum Ausbruch der Krankheit („early onset“).

#### **1.2.1 Neurofibrilläre Bündel und Amyloid-Plaques**

Als charakteristische pathologische Merkmale der Alzheimer'schen Krankheit können das Auftreten von intrazellulären neurofibrillären Bündeln und die massive Bildung von Eiweißablagerungen (Amyloid-Plaques) im extrazellulären Raum des Gehirns (Cortex und Hippocampus) und im cerebralen Blutgefäßsystem genannt werden (Übersicht von Selkoe, 1999). Im Bezug auf das chronologische Auftreten von neurofibrillären Bündeln und Amyloid-Plaques bei der Alzheimer'schen Krankheit geht man davon aus, dass die Bildung von neurofibrillären Bündeln einer cytologischen Antwort der Neurone auf die schrittweise Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden (siehe 1.2.2) entspricht (Amyloid-Kaskade-Hypothese; Oddo *et al.*, 2004; Selkoe, 2004; Hardy und Selkoe, 2002).

Neurofibrilläre Bündel bestehen aus dem unphysiologisch hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, das in gesundem neuronalem Gewebe für die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli wichtig ist. Durch die Hyperphosphorylierung wird das normalerweise lösliche Tau unlöslich und es folgt die Bildung von gepaarten, helikal gewundenen Filamenten (Goedert und Spillantini, 2000), die oft mit Ubiquitin komplexiert vorliegen (Selkoe, 2004). Diese helikalen Filamente findet man nicht nur in den neuronalen Zellkörpern, sondern auch in vielen der dystrophen Neuriten (degenerierte Axone und Dentrinen), die die Amyloid-Plaques umgeben. Die neurofibrillären Bündel treten jedoch nicht nur bei der Alzheimer'schen Krankheit auf. Man findet sie auch bei anderen neurologischen Erkrankungen, zum Beispiel Morbus Parkinson (Koo *et al.*, 1999).

Bei den für die Alzheimer'sche Krankheit charakteristischen Amyloid-Plaques handelt es sich um extrazelluläre Eiweißablagerungen, die aus unlöslichen, zusammen gelagerten Amyloidfilamenten bestehen. Die Hauptkomponente dieser Plaques stellt das Amyloid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) dar, ein extrem hydrophobes Protein von 40–42 Aminosäuren Länge (A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42; Selkoe, 2004). Da A $\beta$  unter Zellkulturbedingungen neurotoxische Eigenschaften zeigt (Übersicht von Yankner, 1996), scheint es für die neurodegenerativen Effekte der Alzheimer'schen Erkrankung verantwortlich zu sein. Aktuelle Studien gehen zum Beispiel davon aus, dass noch nicht in Fibrillen vorliegende A $\beta$ -Oligomere für die Zerstörung der Synapsenfunktion verantwortlich sein könnten. Unterstützt wird dies durch die starke Korrelation zwischen dem Verlust der Synapsen bzw. ihrer Funktion und dem Grad des dadurch hervorgerufenen klinischen Bilds der Alzheimer'schen Erkrankung, wohingegen diese bei dem zeitlichen und räumlichen Auftreten von Amyloid-Ablagerungen in senilen Plaques und der Schwere der Demenz nicht immer besteht (Tanzi, 2005; Snyder et al., 2005).

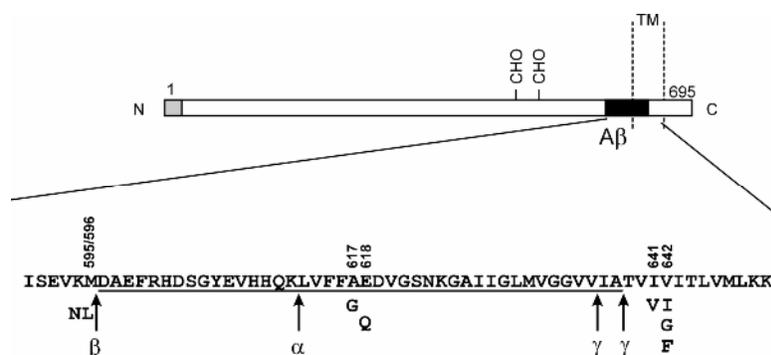
Bei neuritischen Plaques ist der Amyloidkern von degenerierten Axonen und Dendriten sowie von aktiven Mikrogliazellen und reaktiven Astrocyten umgeben (Selkoe, 2004). Vermutlich stellen sie das Endstadium der Plaquebildung dar. Eine andere Form der Plaques, die diffusen Plaques, beinhalten A $\beta$ -Peptide, die noch keine Amyloidfibrillen ausgebildet haben. In ihrer Umgebung treten keine bzw. nur wenige zellulären Veränderungen auf. Diese Form der Plaques wird auch als „prä-amyloid“ bezeichnet. Sie bestehen hauptsächlich aus A $\beta$ 42, das eher zur Aggregation neigt, als das kürzere und weniger hydrophobe A $\beta$ 40, und die Ablagerung weiterer Amyloidfibrillen induziert. Man geht deshalb davon aus, dass A $\beta$ -Plaques nicht nur in diesen beiden Extremformen vorliegen, sondern zwischen ihnen ein zeitliches Kontinuum besteht von der Entwicklung von nichtfibrillären hin zu fibrillären Strukturen, die von den Veränderungen der angrenzenden Neuronen und Gliazellen in unterschiedlichem Maße begleitet wird. Es sei noch erwähnt, dass diffuse Plaque-Formen auch in Gehirnen älterer Menschen mit normalen kognitiven Fähigkeiten zu finden sind (Selkoe, 1999 und 2004).

### **1.2.2 Die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins**

Die physiologische Rolle des einem Zelloberflächenrezeptor ähnelnden Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise könnte die membrangebundene, wie auch die sezernierte Form, in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sowie in die Regulation des Zellwachstums involviert sein, da APP in der Lage ist, an die extrazelluläre Matrix zu binden (Roch *et al.*, 1992; Milward *et al.*, 1992; Saitoh *et al.*,

1989; Schubert *et al.*, 1989). F-Spondin, ein neuronales sekretiertes Signalmolekül, das bei der Entwicklung und Reparatur von Neuronen eine Rolle spielt, kann *in vitro* an die extrazelluläre Domäne von APP binden und seine Spaltung durch die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Sekretase verhindern. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung ist jedoch noch ungeklärt (Ho und Südhof, 2004).

Das Amyloid-Vorläufer-Protein kommt meist in drei Splicevarianten von 695, 751 bzw. 770 Aminosäuren Länge vor. APP<sub>695</sub> wird überwiegend in Neuronen exprimiert (Wertkin *et al.*, 1993), während die beiden anderen Isoformen auch in nicht neuronalen Geweben vorkommen.



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung von APP<sub>695</sub>

Dargestellt sind die Sequenz des A $\beta$ -Peptids (unterstrichener Bereich) und die entsprechenden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Spaltstellen. Die der Sequenz beigefügten Zahlen bezeichnen Positionen von Punktmutationen (ebenfalls angegeben sind die entsprechenden ausgetauschten Aminosäuren), die zu einigen Fällen der vererbaren Alzheimer'schen Krankheit führen.

TM = Transmembran-Domäne, CHO = Glykosylierungsstellen

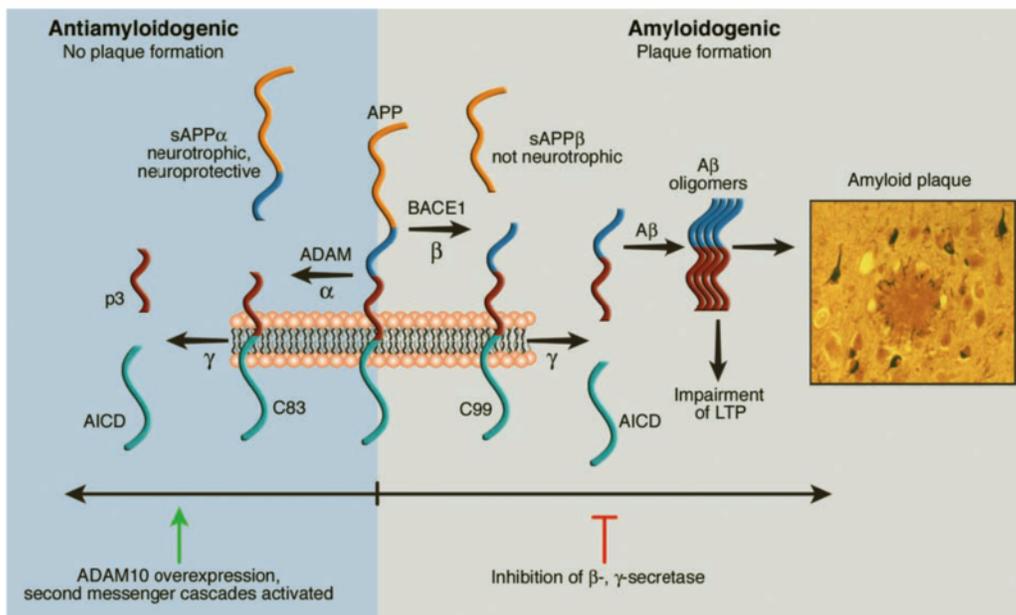
APP kann zwei unterschiedliche Prozessierungswege durchlaufen.

Über den amyloidogenen Weg erfolgt durch zwei aufeinander folgende proteolytische Spaltungen die Freisetzung des A $\beta$ -Peptids aus dem Vorläufer APP (Kang *et al.*, 1987; Haass und Selkoe, 1993). Die N-terminale Spaltung zur Freisetzung des A $\beta$ -Peptids (siehe Abb. 1.3) erfolgt durch die Aspartatprotease BACE (beta-site APP-cleaving enzyme 1; BACE), ein Typ-I-Membranprotein (Citron *et al.*, 1995; Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Die Spaltung durch BACE erfolgt entsprechend dem sauren pH-Optimum des Enzyms vorzugsweise in den Endosomen nach der Reinternalisierung des an der Zelloberfläche vorhandenen APP (Parvathy *et al.*, 1999; Haass, 2004). Dabei entsteht zum einen das lösliche APP-Derivat APPs $\beta$  und zum anderen ein ca. 12 kD großes,

membranverankertes Spaltfragment von 99 Aminosäureresten Länge (C99). Dieses Spaltfragment wird daraufhin durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert zu A $\beta$ 40 bzw. A $\beta$ 42. Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein Proteinkomplex, der sich vermutlich aus mindestens vier Membranproteinen zusammensetzt. Eines davon ist das Presenilin. Dabei handelt es sich um ein Membranprotein mit acht Transmembran-Domänen (TM-Domäne). Durch eine endoproteolytische Spaltung in der cytoplasmatischen Schleife zwischen den TM-Domänen 6 und 7, die jeweils einen der beiden für die Substratspaltung wichtigen konservierten Aspartat-Reste tragen, entsteht ein stabiles Presenilin-Heterodimer, das das katalytisch aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase darstellt (Wolfe *et al.*, 1999; Haass und Mandelkow, 1999; Haass und Steiner, 2002; Kimberly *et al.*, 2003). Mit Presenilin assoziiert liegt eine hochglykosylierte Form von Nicastrin sowie die Membranproteine APH-1 (anterior pharynx-defective phenotype) und PEN-2 (PS-enhancer) vor, die für die das Presenilin aktivierende Endoproteolyse und die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität essentiell sind (Kimberly *et al.*, 2003; De Strooper, 2003).

Das A $\beta$ -Peptid wird von gesunden Zellen das ganze Leben über gebildet und kann in der cerebrospinalen Flüssigkeit nachgewiesen werden. Von der in Nervenzellen produzierten A $\beta$ -Gesamtmenge macht A $\beta$ 40 einen Anteil von 90% und A $\beta$ 42 einen Anteil von 10% aus (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992; Selkoe, 2004). Bei der Alzheimer'schen Erkrankung wird die Produktion von A $\beta$ 40 und des hoch amyloidogenen A $\beta$ 42 durch die mit dieser Krankheit assoziierten Mutationen gesteigert. Diese Mutationen können zum einen das APP-Gen und zum anderen die Gene der Preseniline 1 und 2 betreffen, was zur erhöhten Produktion von A $\beta$ 42 führt. Die meisten Mutationen, die mit der familiären Alzheimer'schen Erkrankung assoziiert sind, liegen im Presenilin 1-Gen vor (Haass und Steiner, 2002; Selkoe, 2001a). Mittlerweile konnten über 100 autosomal dominante Presenilin-Punktmutationen identifiziert werden, die alle den frühen Ausbruch der Alzheimer'schen Krankheit bewirken (Haass, 2004). Des Weiteren kann die Veränderung des Fließgleichgewichts von A $\beta$  als Verursacher der Krankheit genannt werden. Als ein Risikofaktor dafür sei der genetische Polymorphismus im Apolipoprotein E4-Gen erwähnt, der eine erhöhte  $\beta$ -Amyloid-Plaue-Dichte und Ablagerungen in den Gefäßen dadurch bewirken kann, dass es die Stabilität von A $\beta$  erhöht und somit dessen Akkumulation fördert (Strittmatter *et al.*, 1993; Selkoe, 1999; Selkoe 2004). Eine weitere Ursache für die A $\beta$ -Akkumulation bildet vermutlich der Funktionsverlust von A $\beta$ -Peptid-abbauenden Proteasen, die normalerweise das endogen produzierte A $\beta$ -Peptid kurz nach seiner Freisetzung degradieren. Kandidaten dafür wären zum

Beispiel Nephrylin, das Insulin-Degrading-Enzym (Selkoe, 2001b; Carson und Turner, 2002; Farris *et al.*, 2003) und das Endothelin-Converting-Enzym (Eckman *et al.*, 2003).



**Abb. 1.3** Proteolytische Prozessierung von APP durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase

aus: Lichtenthaler und Haass (2004)

Amyloidogener Weg: Die Spaltung von APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase führt zur Bildung von A $\beta$ -Peptiden und der intrazellulären Domäne von APP (AICD). Die A $\beta$ -Peptide werden sekretiert und aggregieren zu Oligomeren. Diese A $\beta$ -Oligomere sind sehr toxisch und bewirken eine Verschlechterung der Synapsen-Plastizität. Letztendlich werden große Mengen an A $\beta$ -Peptiden als Amyloid-Plaques abgelagert.

Nicht-amyloidogener Weg: Die Spaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase liefert das neurotrophe und neuroprotektive APPs $\alpha$ .

Neben diesem amyloiden APP-Prozessierungsweg wird APP zum größten Teil über den konstitutiv sekretorischen Weg durch eine  $\alpha$ -Sekretase an der Zellmembran prozessiert (Parvathy *et al.*, 1999). In diesem Fall erfolgt die Spaltung von APP 12 Aminosäurereste N-terminal zur Transmembranregion, d.h. innerhalb der  $\beta$ -Amyloidregion zwischen K<sup>16</sup> und L<sup>17</sup>, was die Produktion von A $\beta$  und damit die Bildung von Amyloid-Plaques verhindert (Esch *et al.*, 1990; Maruyama *et al.*, 1991; Sisodia, 1992; Selkoe, 2004). Durch die Prozessierung werden lösliche APP-Derivate (APPs $\alpha$ ) mit einer Größe von 105 bis 125 kD gebildet und in den Extrazellulärraum abgegeben. APPs $\alpha$  wirkt neuroprotektiv und fördert das Lernvermögen und die kognitiven Fähigkeiten (Meziane *et al.*, 1998). Ferner wirkt es auf Zellen wachstumsfördernd und verstärkt die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion (Selkoe, 2004).

Das nach der  $\alpha$ -Sekretasespaltung übrig gebliebene membrangebundene C-terminale Fragment p10 (83 Aminosäurereste; C83) kann durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter zu einem 3 kD großem Fragment p3 gespalten werden (Haass *et al.*, 1992).

Der durch die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasespaltung freigewordene intrazelluläre Teil von APP (AICD) wird ins Cytoplasma entlassen. Dieses Fragment ist sehr instabil, kann jedoch durch die Komplexbildung mit dem nukleären Adaptorprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase TIP60 stabilisiert und in den Zellkern transportiert werden (Kimberly *et al.*, 2001; Cao und Sudhof, 2001; Sastre *et al.*, 2001; Kopan und Ilagan, 2004). Dort kann dieser Komplex einige durch NF- $\kappa$ B regulierte Gene aktivieren, wobei noch wenig über potentielle physiologische Zielgene bekannt ist (Baek *et al.*, 2002). Als ein Komplex-Bindungskandidat wurde der KAI1-Promotor identifiziert (Kopan und Ilagan, 2004). KAI1 gehört zur Proteinfamilie der Tetraspanine und agiert als Tumormetastasen-Suppressor (Maecker *et al.*, 1997). Da viele Oberflächenrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle, die die Funktionen des Cytoskeletts regulieren, von KAI1 beeinflusst werden, lässt sich darüber spekulieren, ob KAI1 zu späteren pathologischen Ereignissen beiträgt (Maecker *et al.*, 1997; Beak *et al.*, 2002).

### **1.2.3 Mutationen innerhalb der A $\beta$ -Region**

Lösliche A $\beta$ 40-Monomere werden normalerweise von den Neuronen zu den cerebralen Gefäßsystemen transportiert und dort ins Blut abgegeben (Herzig *et al.*, 2004). Während Mutationen in der Nähe der  $\beta$ -Sekretase-Spaltstelle, durch die Erhöhung der totalen A $\beta$ -Peptidmenge, und der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltstelle, durch die Zunahme von A $\beta$ 42, den „early-onset“ der Alzheimer'schen Erkrankung bewirken (Gandy, 2005), zeichnen sich die in unmittelbarer Nähe der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle vorliegenden eher durch unterschiedliche Auswirkungen auf den Verlauf der Demenz aus. Diese Mutationen liegen dabei innerhalb der A $\beta$ -Region konzentriert an den Positionen 21 bis 23 vor und werden als Flemish (A21G), Dutch (E22Q), Italian (E22K), Arctic (E22G) und Iowa (D23N) bezeichnet (siehe Abb. 1.4).



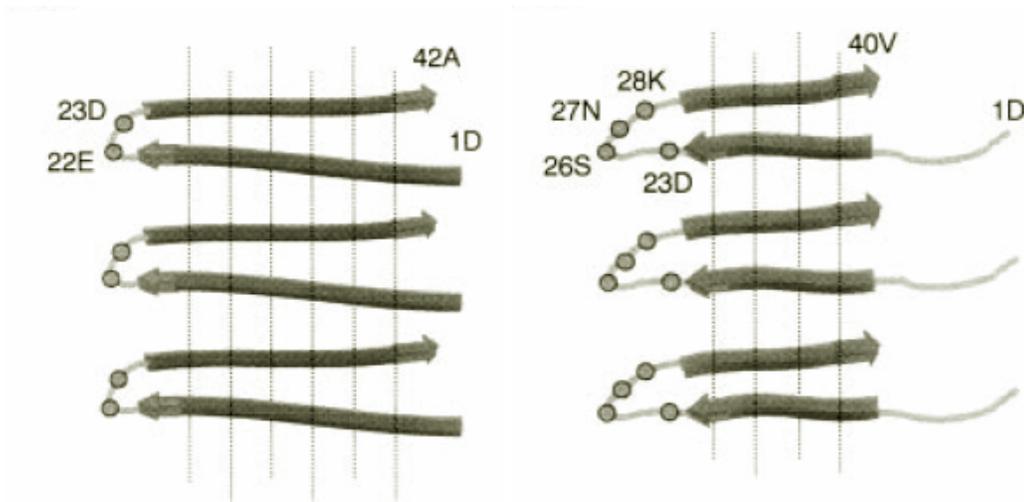
nicht durch veränderte fibrillogene Eigenschaften, sondern eher durch die hohe Menge an A $\beta$ -Peptiden, verursacht (Van Nostrand *et al.*, 2001). Einzig die Träger der Arctic-Mutation entwickeln einen klassischen Alzheimer-Phänotyp mit auffallenden parenchymalen Plaques und keiner sichtbaren Erhöhung der cerebrovaskulären Amyloid-Ablagerungen (Cheng *et al.*, 2004; Nilsberth *et al.*, 2001).

Die verschiedenen Mutationen beeinflussen die Plasmalevel von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 unterschiedlich. Während die Mutationen Dutch, Italian und Arctic eine Reduktion des Plasmalevels von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 bewirken, d.h. diese eher zu einer verstärkten Fibrillenbildung neigen, erfolgt durch die Flemish-Mutation ein Anstieg von A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Mutanten (Nilsberth *et al.*, 2001; Van Nostrand *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2005), die weniger aggregieren, jedoch nicht minder neurotoxisch sind als der Wildtyp (Walsh *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2005). Durch die verstärkte Peptidlöslichkeit und die Stabilität der Aggregate wird die Bildung größerer Ablagerungen favorisiert (Walsh *et al.*, 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass die jeweilige Mutation an Position 22 eher die Bildung von A $\beta$ -Peptiden mit veränderter Fähigkeit zur Fibrillenbildung und erhöhter Toxizität gegenüber cerebrovaskulären Zellen zu bewirken scheinen (Miravalle *et al.*, 2000), während die Mutation an Position 21 (Flemish) eher die Produktion als die biochemischen Eigenschaften von A $\beta$  beeinflusst (Van Nostrand *et al.*, 2001).

Für die Fibrillenbildung selbst scheint ein zentraler hydrophober Kern entsprechend den Aminosäuren 16-20 der A $\beta$ -Sequenz wichtig zu sein (KLVFF-Motiv), so dass Mutationen an Position 21-23 einen besonderen Einfluss auf die Struktureigenschaften der jeweiligen A $\beta$ -Peptide ausüben könnten, die wiederum in verschiedene fibrillogene Eigenschaften und cytotoxische Effekte übersetzt werden. (Miravalle *et al.*, 2000; Nilsberth *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001; Serpell, 2000). Dabei scheint die Veränderung (Italian) oder sogar der Verlust der Ladung (Dutch, Arctic) der an Position 22 vorliegenden Aminosäure für die pathogenen Eigenschaften der A $\beta$ -Peptide verantwortlich zu sein, während der Erhalt der Ladung an Position 21 (Flemish) die Eigenschaften des Wildtyps konserviert (Miravalle *et al.*, 2000; Melchor *et al.*, 2000). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die durch die Mutationen an Position 22 hervorgerufenen veränderten sterischen Eigenschaften der Aminosäuren-Seitenkette und der damit verbundenen Konformationsänderungen des kompletten A $\beta$ -Peptids die Neurotoxizität und Aggregationsfähigkeiten beeinflusst (Irie *et al.*, 2005; Pääviö *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2002). Tatsächlich erfolgt durch die Dutch- und Italian-Mutation im Vergleich zum Wildtyp eine beschleunigte Bildung von Protofibrillen *in vitro*, die bei der

Arctic-Mutation noch eine weitere Steigerung erfährt, während sie bei der Flemish-Mutation eher zurückgeht und die A $\beta$ -Löslichkeit zunimmt (Nilsberth *et al.*, 2001).

Betrachtet man die für die Bildung von Protofibrillen wichtige Sekundärstruktur der jeweiligen A $\beta$ -Peptide, so ist tatsächlich der Gehalt an  $\beta$ -Faltblattstrukturen bei Dutch, Italian und Arctic im Vergleich zum Wildtyp (34 %) deutlich erhöht (ca. 50 %), bei Flemish dagegen reduziert (ca. 24 %; Murakami *et al.*, 2002). Daneben liegt bei diesen Mutationen an der Position 22 und 23 (im Wildtyp erst an Position 26 und 27) ein „ $\beta$ -turn“ vor, der vermutlich die Bildung stabiler intramolekularer antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter und intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen und damit die Fibrillenbildung induziert (Murakami *et al.*, 2002 und 2003; Morimoto *et al.*, 2002; siehe Abb. 1.5). Er entspricht damit der Schlüssel-Sekundärstruktur, die mit der Neurotoxizität und der Fähigkeit, Aggregate zu bilden, gekoppelt ist und erklärt, warum viele CAA-Mutationen an den Positionen 22 und 23 des A $\beta$ -Peptids konzentriert vorliegen (Irie *et al.*, 2005).



**Abb. 1.5** Pathologischen Konformation von A $\beta$ 42 (links) im Vergleich zu A $\beta$ 40 (rechts)  
aus: Murakami *et al.*, 2003

### 1.3 MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE

Gegenwärtig sind Arzneimittel im Gebrauch, die lediglich die Symptome der Alzheimer'schen Erkrankung behandeln, wie zum Beispiel die Acetylcholinesterase-Inhibitoren. Diese Inhibitoren helfen dem Gehirn, den Verlust an Neuronen zu kompensieren, die über den Neurotransmitter Acetylcholin kommunizieren. Ein anderes Arzneimittel ist der N-Methyl-D-Aspartat-Antagonist Memantin, der die Wirkung des Neurotransmitters

Glutamat blockiert. Glutamat liegt in Gehirnen von Alzheimer-Patienten in zu großen Mengen vor, d.h. die durch Glutamat aktivierten Neurone werden überreizt und sterben ab. Die genannten Medikamente bewirken zwar eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs, ein direktes Eingreifen in das Krankheitsgeschehen erfolgt jedoch nicht (Helmuth, 2002; Selkoe, 2004).

Im Folgenden werden einige mögliche therapeutische Ansätze vorgestellt, die zum Ziel haben, direkt in die Pathologie der Alzheimer'schen Erkrankung einzugreifen.

### **1.3.1 Immunisierung mit A $\beta$ -Peptiden und A $\beta$ -Antikörpern**

Viele Studien an APP-transgenen Mäusen beschäftigen sich mit immunologischen Methoden, um die Mengen an A $\beta$ -Aggregaten zu reduzieren. Tatsächlich kann eine Immunisierung mit A $\beta$ -Peptiden die A $\beta$ -Ablagerungen in den Gehirnen der Testmäuse reduzieren und die daraus resultierenden Lerndefizite vermindern (Schenk *et al.*, 1999; Younkin, 2001; Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000). Da die bei der Immunisierung entwickelten anti-A $\beta$ -Antikörper im Gehirn in der Lage sind, eine Vielfalt an A $\beta$ -Spezies zu binden (Mono-, Oligomere und Aggregate), könnten sie verschiedene Effekte hervorrufen, wie zum Beispiel die Verstärkung der Phagozytose durch Gliazellen, die Neutralisierung der toxischen A $\beta$ -Spezies (Mono- und Oligomere) und die Inhibierung der Fibrillenbildung (Younkin, 2001). Sogar die passive Gabe von monoklonalen anti-A $\beta$ -Antikörpern kann diese A $\beta$ -Beseitigung erreichen, so dass die Verabreichung aktiver Vakzine vermeidbar ist (Bard *et al.*, 2000). Die A $\beta$ -Immuntherapie führt jedoch nicht nur zur Reduktion der extrazellulären A $\beta$ -Plaques, sondern auch zum Rückgang der intrazellulären Akkumulation von A $\beta$  und zur Beseitigung früher Tau-Aggregate durch das Proteasom, wobei diese Beseitigung vom Tau-Phosphorylierungsgrad abhängt. Hyperphosphorylierte Tau-Aggregate werden durch die Antikörperbehandlung nicht beeinflusst (Oddo *et al.*, 2004). Dies unterstützt die Amyloid-Kaskade-Hypothese, die besagt, dass die A $\beta$ -Akkumulation den Beginn der Alzheimer'schen Krankheit einleitet und die Hyperphosphorylierung von Tau mit anschließender Bildung neurofibrillärer Bündel und späterem Zelltod als Konsequenz der A $\beta$ -Aggregation mit sich bringt (Oddo *et al.*, 2004; Hardy und Selkoe, 2002).

Die Gabe von A $\beta$ 42-Aggregaten an Patienten mit einer leichten bis moderaten Alzheimer'schen Erkrankung führte bei einem kleinen Teil der Testpersonen, die einen hohen Antikörpertiter entwickeln konnten, zu einer Verlangsamung ihres kognitiven Verfalls (Hock *et al.*, 2003). Da es jedoch in 6% der Fälle zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion im

Zentralen Nervensystem, ähnlich einer postvaxzinalen Meningoencephalitis, kam, wurde dieser Therapie-Versuch vorläufig abgebrochen (Selkoe, 2004).

### **1.3.2 Inhibitoren der $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase**

Eine andere Möglichkeit, in den Krankheitsverlauf der Alzheimer'schen Erkrankung einzugreifen, ist der Einsatz von Inhibitoren der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Mit deren Entwicklung sind hohe Ansprüche verknüpft: Die Substanzen müssen in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, um von den Neuronen aufgenommen zu werden. Ferner müssen sie sehr selektiv wirken, um die Beeinträchtigung anderer intrazellulärer Proteasen und wichtiger Signalwege zu minimieren.

Im Fall von BACE konnte gezeigt werden, dass BACE-defiziente Mäuse keinen nachteiligen Phänotyp und keine detektierbaren Mengen an A $\beta$  aufweisen (Roberds *et al.*, 2001). Da die Abwesenheit des Enzyms offensichtlich keine ernsthaften Konsequenzen für das Tier bedeutet, könnte BACE als Ziel einer Inhibierung in der Therapie gegen die Alzheimer'sche Erkrankung in Betracht gezogen werden (John *et al.*, 2003). So könnte durch die Inhibierung von BACE eine Förderung des nicht-amyloidogenen Weges, also die APP-Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase und damit indirekt eine Verstärkung dieses Prozessierungsweges, erfolgen (John *et al.*, 2003). Und doch muss die Inhibierung spezifisch auf die Spaltung von APP wirken, da für BACE auch andere Substrate identifiziert wurden, wie z.B. der P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (Lichtenthaler *et al.*, 2003; Haass, 2004). Hinzu kommt, dass BACE eine große katalytische Substratbindungsstelle besitzt, was die Herstellung kleiner spezifischer Inhibitoren erschwert (Lichtenthaler und Haass, 2004).

Im Falle einer Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase muss beachtet werden, dass dieses Enzym nicht nur für die Spaltung von APP verantwortlich ist, sondern vermutlich eine Vielzahl von Transmembranproteinen prozessiert (Kopan und Ilagan, 2004). Ein solches Transmembranprotein ist der Zelloberflächen-Rezeptor Notch, der eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen während der Embryogenese und im adulten Organismus spielt (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Die Entwicklung eines nur für A $\beta$ -Produktion spezifischen Inhibitors, der die anderen Prozessierungsmechanismen, an denen die  $\gamma$ -Sekretase beteiligt ist, nicht betrifft, dürfte sich als schwierig erweisen. Optimal wäre ein Inhibitor, der die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität für die entsprechenden Signalwege gestattet, die A $\beta$ -Produktion jedoch soweit reduziert, dass die Bildung, Aggregation und Ablagerung von A $\beta$  verzögert wird (Haass, 2004).

Als mögliche „ $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren“ seien noch die NSAIDs (nonsteroidal antiinflammatory drugs) erwähnt, die als spezifische Inhibitoren der Cyclooxygenase-1 agieren (zum Beispiel Ibuprofen). Sie beeinflussen die  $\gamma$ -Sekretasespaltung von APP, was eine Reduktion von A $\beta$ 42 zur Folge hat. Die Spaltung von Notch wird dadurch nicht beeinträchtigt (Weggen *et al.*, 2001; Selkoe, 2004).

### **1.3.3 Aktivierung der $\alpha$ -Sekretase**

Als ein weiterer Therapieansatz sei die direkte Aktivierung des  $\alpha$ -Sekretase-Wegs genannt. Die Tatsache, dass die  $\alpha$ -Sekretase durch die Spaltung innerhalb der A $\beta$ -Peptid-Domäne nicht nur die Bildung des neurotoxischen A $\beta$ -Peptids verhindert, sondern dadurch auch die Bildung des neuroprotektiven APPs $\alpha$  bewirkt, gibt diesem Therapieweg den Vorzug.

Es ist bekannt, dass die Proteolyse von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase durch Aktivatoren der Proteinkinase C (PKC), wie zum Beispiel Phorbol ester (z.B. PMA, Phorboldibutyrate), über den basalen Level hinaus aktiviert werden kann. Außerdem kann die Aktivierung von Rezeptoren, die mit der PKC kommunizieren, eine Verstärkung der  $\alpha$ -Sekretasespaltung bei gleichzeitiger Reduzierung der  $\beta$ -Spaltung von APP bewirken (Esler und Wolfe, 2001). Ebenso können Agonisten der muscarinischen Rezeptorsubtypen M1 und M3 die A $\beta$ -Produktion reduzieren (Lin *et al.*, 1999; Esler und Wolfe, 2001). Allerdings stellt die Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase über intrazelluläre Signalkaskaden eine eher unselektive Methode mit unerwünschten Nebeneffekten dar.

Aktuell kommen als  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 (Lammich *et al.*, 1999), ADAM17 (Buxbaum *et al.*, 1998) und ADAM9 (Koike *et al.*, 1999) in Betracht, wobei noch unklar ist, ob nur eine oder alle drei zusammen die physiologisch relevante  $\alpha$ -Sekretase bilden (Lichtenthaler und Haass, 2004). ADAM17 wird im Zentralen Nervensystem in Endothel- und Gliazellen (Goddard *et al.*, 2001), weniger in Neuronen exprimiert, und spielt daher vermutlich keine relevante Rolle bei der Pathologie und Therapie der Alzheimer'schen Erkrankung, ganz im Gegensatz zu ADAM9 und ADAM10, die in Neuronen im ganzen ZNS exprimiert werden (Hartmann *et al.*, 2002; Kärkkäinen *et al.*, 2000).

*In situ*-Hybridisierungsversuche an kortikalen Neuronen in Mäusen während der prä- und postnatalen Entwicklung und im adulten Tier konnten weitere Hinweise auf die Art der  $\alpha$ -Sekretasespaltung liefern. Dabei scheint APP je nach Entwicklungsstadium im Gehirn mit verschiedenen  $\alpha$ -Sekretasen zusammen vorzuliegen. In frühen Stadien der Embryogenese erfolgt die  $\alpha$ -Sekretasespaltung hauptsächlich durch ADAM17, das dann im weiteren

Entwicklungsverlauf in seiner Funktion als  $\alpha$ -Sekretase von ADAM10 abgelöst wird. Im adulten Organismus überwiegt die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Auch bei Hybridisierungsversuchen an Neuronen aus dem humanen Cortex konnte eine Koexistenz von ADAM10 und APP nachgewiesen werden (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Was weiterhin für ADAM10 als relevante  $\alpha$ -Sekretase spricht ist die Tatsache, dass in Blutplättchen von Alzheimer-Patienten, die an der sporadisch auftretenden Form leiden, eine signifikante Reduktion des ADAM10-Proteingehalts vorliegt. Ferner war sowohl die Menge an APP $\alpha$ , die durch die Blutplättchen freigesetzt wurde als auch die in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Alzheimer-Patienten stark herabgesetzt (Colciaghi *et al.*, 2002).

Des Weiteren hängt die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase und wie auch die von ADAM10 vom Cholesteringehalt der Zellmembran ab (Kojro *et al.*, 2001). Nach der Behandlung verschiedener neuronaler Zell-Linien mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (Agens, das der Zelle Cholesterin entzieht) erfolgte eine deutlich erhöhte APP $\alpha$ -Sekretion, d. h. eine niedrige zelluläre Cholesterinmenge fördert den nicht-amyloidogenen  $\alpha$ -Sekretase-Weg und verringert die A $\beta$ -Sekretion (Kojro *et al.*, 2001). Tatsächlich ist die Wahrscheinlichkeit, an Alzheimer zu erkranken, für Menschen mit einem erhöhten Cholesterinspiegel gesteigert. Die Reduktion des Cholesterins und die damit verbundene Stimulierung des nicht-amyloidogenen Wegs der APP-Spaltung könnte durch Statine (Inhibitoren der für die Cholesterin-Synthese wichtigen Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Reduktase) bewirkt werden (Kojro *et al.*, 2001, Helmuth, 2002).

Eine detaillierte Analyse der als  $\alpha$ -Sekretase in Frage kommenden ADAMs in neuronalen Zellen wurde bisher durch die frühe Letalität von ADAM10- und ADAM17-defizienten Tieren verhindert. Wohingegen ADAM9-defiziente Mäuse keine besonderen Anomalitäten während ihrer Entwicklung oder im adulten Tier zeigen. Auch die A $\beta$ -Produktion und die  $\alpha$ -Sekretasespaltung in Neuronen aus dem Hippocampus dieser Mäuse weisen keinen Unterschied zu Wildtyp-Mäusen auf (Westkamp *et al.*, 2002; Allison *et al.*, 2003), was gegen die Funktion von ADAM9 als hauptsächliche  $\alpha$ -Sekretase spricht.

Um im Falle von ADAM10 das Problem der Letalität zu umgehen, wurden in unserer Arbeitsgruppe transgene Mäuse hergestellt, die bovines ADAM10 bzw. eine katalytisch inaktive ADAM10-Mutante (hemmt die endogene  $\alpha$ -Sekretasespaltung in HEK293-Zellen, Lammich *et al.*, 1999) überexprimieren (Postina *et al.*, 2004). Diese transgenen Mäuse wurden dann mit einem Mäusestamm gekreuzt, der das humane APP überexprimiert. Durch die neuronale Überexpression von ADAM10 in den APP/ADAM10-Mäusen wurde die

Sekretion von APPs $\alpha$  erhöht und die A $\beta$ -Peptidbildung in dem Maße reduziert, dass die Bildung von Amyloid-Plaques verhindert wurde. Doch nicht nur die Amyloid-Plaquebildung konnte durch die Überexpression von ADAM10 reduziert werden, auch die Defizite bezüglich ihres räumlichen Lernvermögens und die Veränderungen der Synapsen-Plastizität, die normalerweise bei APP-transgenen Mäusen zu beobachten ist, wurden gelindert. Die Überexpression der dominant-negativen ADAM10-Mutante in den APP/dnADAM10-Mäusen hatte indessen den gegenteiligen Effekt, d.h. die  $\alpha$ -Sekretasespaltung wurde inhibiert, die Menge an A $\beta$ -Peptiden sowie die Anzahl und Größe der Amyloid-Plaques erhöht. Auf diese Weise konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die neuronale Überexpression von ADAM10 die  $\alpha$ -Sekretasespaltung von APP erhöht und somit auch erstmals ein Beweis dafür geliefert werden, dass eine Proteinase der ADAM-Familie als effektive  $\alpha$ -Sekretase *in vivo* agiert (Postina *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen müssen sich nun damit beschäftigen, ob eine Erhöhung der  $\alpha$ -Sekretaseaktivität in späteren Stadien des Lebens, wenn die ersten Plaques schon gebildet wurden, die gleichen positiven Effekte bewirken kann.

Wie dieses ADAM10 dem Organismus verfügbar gemacht werden kann birgt neue Herausforderungen. Eine ADAM10-Überexpression in Neuronen mittels Gentherapie ist nicht einfach durchführbar, so dass es wichtig ist, auch andere Wege zur Erhöhung der  $\alpha$ -Sekretase-Expression und -Aktivität *in vivo* zu finden (Lichtenthaler und Haass, 2004). Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass durch ADAM10 neben APP noch andere Substrate gespalten werden, wie zum Beispiel der Notch-Rezeptor und der Notch-Ligand Delta, das Protein L1 (Integrin, das Zellbindung vermittelt), Ephrin-A2 (wichtig für das Auswachsen der Axone; McFarlane 2003; Hattori *et al.*, 2000) oder Fraktalkin (Chemokin, das die Chemotaxis von Monocyten fördert, Hundhausen *et al.*, 2003). Eine geregelte Metalloproteinaseaktivität ist für das Funktionieren dieser Signalwege Voraussetzung (Seals and Courtneidge, 2003; White, 2003; Moss und Lambert, 2002).

Einen Beitrag dazu liefert unter Umständen die Überexpression löslicher humaner ADAM10-Varianten und deren Charakterisierung *in vitro* für einen möglichen Einsatz *in vivo*.

#### 1.4 ZIELSETZUNG UND STRATEGIE DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, lösliche Varianten der humanen  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 in einem geeigneten Überexpressionssystem zu produzieren und nach ihrer Reinigung zu charakterisieren. Dabei soll eine lösliche ADAM10-Variante dem extrazellulären Bereich des Enzyms entsprechen, d.h. ihr fehlt die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne. Eine weitere Variante soll mit einer im menschlichen Gehirn auf mRNA-Ebene nachgewiesenen Splicevariante übereinstimmen, die zusätzlich noch durch das Fehlen der Cystein-reichen Domäne gekennzeichnet ist. An die Expression und Reinigung anschließend soll die katalytische Aktivität der löslichen ADAM10-Varianten durch die Spaltung entsprechender sich von der A $\beta$ -Sequenz des Amyloid-Vorläufer-Proteins abgeleiteten Peptidsubstrate, die die charakteristische  $\alpha$ -Sekretasestelle beinhalten, bestimmt und verglichen werden. Dabei ist vor allem interessant, ob und inwieweit die Cystein-reiche Domäne die Aktivität der Protease beeinflusst, da man dieser Domäne eine wichtige Struktur-stabilisierende Bedeutung zuspricht.

Durch diese Arbeit soll die Bereitstellung analytisch nutzbarer, löslicher ADAM10-Proteine erfolgen, die zum Einen für die Aufklärung ihrer 3D-Struktur und zum Anderen für Versuche eingesetzt werden könnten, die sich mit der Untersuchung der Interaktionspartner dieser Protease beschäftigen.

Ferner könnten, unterstützt durch die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse, Rückschlüsse auf mögliche Funktionen verschiedener löslicher ADAM10-Varianten in den entsprechenden menschlichen Geweben *in vivo* gezogen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERWENDETE MATERIALIEN

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

##### Molekularbiologische Methoden

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bactoagar	AppliChem, Darmstadt
Bluo-Gal	Life Technology, Freiburg
Diethylether	Fisher Chemicals, UK
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Bundesmonopolverw. für Branntwein, Offenbach a. M.
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Gentamicin	PAA, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fisher Chemicals, UK
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Luria Agar (Miller's LB Agar)	Gibco BRL, Karlsruhe
Phenol	AppliChem, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Trypton	AppliChem, Darmstadt

##### Proteinchemische Methoden

Aceton	Acros Organics, Geel, Belgien
Acetonitril (gradient grade)	Fisher Chemicals, UK
Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	AppliChem, Darmstadt
Ammoniak	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München

Brij <sup>®</sup> 35 (protein grade)	Calbiochem, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Fisher Chemicals, UK
Citronensäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie-Färbelösung	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma, Taufkirchen
I-Block	Applied Biosystems, Darmstadt
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol (gradient grade)	Fisher Chemicals, UK
Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
RotiQuant Bradfordreagenz	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	BioRad, München
Silbernitrat zur Proteinfärbung	Roth, Karlsruhe
TCA (Trichloracetat)	AppliChem, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	BioRad, München
TFA (Trifluoressigsäure)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid	Sigma, Taufkirchen

### **Zellkultur**

BSA, Fettsäure-frei	Sigma, Taufkirchen
FCS (fetal calf serum)	PAA, Cölbe
CellFECTIN <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
G 418-Sulfat	Calbiochem, Darmstadt
Glutamin	PAA, Cölbe
Hygromycin B	PAA, Cölbe
LIPOFECTAMIN <sup>™</sup> 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MEM NEAA (non essential amino acids)	PAA, Cölbe

Natriumpyruvat-Lösung	PAA, Cölbe
Nu-Serum	JRH Biosciences, Hampshire, UK
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Roti <sup>®</sup> -Fect	Roth, Karlsruhe
SF 900 II SFM L-Aminoacids	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley (Schottland)
SF 900 II Supplement	
Trypsin/EDTA (10x konz)	PAA, Cölbe
Zeocin <sup>™</sup>	Invitrogen, Karlsruhe

### **Sonstige Chemikalien und Reagenzien**

Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt

## **2.1.2 Materialien**

### **Chromatographiematerialien**

Concanvalin A Sepharose 4B	Sigma, Taufkirchen
ImmunoPure <sup>®</sup> Immobilized Protein A/G	Pierce, Rockford, USA
NAP <sup>™</sup> -10 Gelfiltrationssäulchen	Amersham Biosciences, UK
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Vydac RP C18-HPLC-Säule 5µm (4.6 x 250mm)	MZ Analysentechnik, Mainz
Vydac RP C18-HPLC-Vorsäule 10µm	MZ Analysentechnik, Mainz

### **Gelelektrophorese und Western Blot Analyse**

3MM-Filterpapier	Whatman, Springfield (England)
Hybond ECL Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences, UK
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, UK
PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid)	Serva, Heidelberg

### **Zellkultur**

Cellscraper	Sarstedt, Nürnberg
Filter Tips	Starlab, Ahrensburg

Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
VacuCap 90 0,21 µm Vakuumfilter	Gelman Sciences, Ann Arbor USA
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnbrecht

**Sonstige Materialien**

Acrylhalbmikroküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nürnbrecht
Amicon Ultra Konzentratoren (30 kDa, 100 kDa)	Millipore, Eschborn
Kunststoffzentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zentrifugenbecher (50 ml, 250 ml)	Beckmann, München

**2.1.3 Geräte**

**Chromatographieapparate**

Merck-Hitachi-HPLC-Anlage:	Merck, Darmstadt
L-6220 Intelligent Pump	
L-4250 UV-VIS Detektor	
D-2500 A Chromato-Integrator	

**Gelelektrophorese und Western Blot Analyse**

Elektrophoreseapparatur für Minigele	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseapparatur für große Gele	BioRad, München
Fuji BAS 1800 Bio-Imaging Analyzer	Raytest GmbH, Straubenhardt
Semi-Dry-Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Power-All 3000 V/ 200 mA	Serva, Heidelberg
VersaDoc Kamerasystem	BioRad, München

**Zellkultur**

CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Kühlbrutschrank Typ BK 600 für Insektenzellen	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Umkehr-Phasenkontrastmikroskop	Olympus, Hamburg

**Zentrifugen**

Kühlzentrifuge J2-21 (Rotoren JA 14 und JA 20)	Beckmann, München
TechnoSpin	Sorvall, Bad Nauheim
Tischzentrifugen (5415C)	Eppendorf, Hamburg

Tischkühlzentrifuge (5415R)

Eppendorf, Hamburg

**Sonstige Geräte**Brutschrank für *E. coli*

Heraeus, Hanau

Bakterien-Kulturenschüttler

Infors, Bottmingen, Schweiz

pH-Meter

Schott-Geräte GmbH, Mainz

Savant Speed Vac Concentrator

Bachofer, Reutlingen

Spektralphotometer U2000

Hitachi, Japan

Sterilwerkbank für *E. coli*

Biochrom KG, Berlin

Überkopfschüttler

Fröbel Labortechnik, Lindau

**2.1.4 Standards und Kits**

SDS-PAGE Standards, Low Range

BioRad, München

See-Blue Plus 2 Prestained Protein Standard

Invitrogen, Karlsruhe

GeneRuler 1 kB DNA-Marker

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

CDP-Star Western Blotting Kit

Applied Biosystems, Darmstadt

Gelextraktions-Kit

Qiagen, Hilden

PCR Reinigungs-Kit

Qiagen, Hilden

Plasmid-Minipräparations-Kit

Peqlab, Erlangen

**2.1.5 Antikörper**

Anti-Penta-His Antikörper, monoklonal

Qiagen, Hilden

Anti-APP $\alpha$ -Antikörper 6E10

Signet Laboratories, USA

Anti-Maus IgG, alkalische-Phosphatase-konjugiert

Applied Biosystems, Darmstadt

Anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert

Amersham Biosciences, UK

<sup>35</sup>S-anti-Maus IgG

Amersham Pharmacia, Freiburg

**2.1.6 Peptide**

APP18 Peptide (Human):

Z.Grzonka, Institut für Chemie,

Wildtyp, Flemish, Dutch, Italian, Arctic

Universität Danzig, Polen

A $\beta$ 1-40 (Rat)

Calbiochem, Darmstadt

A $\beta$ 1-40 (Human)

Bachem, Weil am Rhein

A $\beta$ 1-40A21G und A $\beta$ 1-40E22Q (Human)

Merck Biosciences, Darmstadt

A $\beta$ 1-40E22K und A $\beta$ 1-40E22G (Human)

K.Irie, Kyoto Universität, Japan



MB23A (hADAM10fl-HA)	M. Bukulin, Inst. für Biochemie, Joh. Gutenberg-Universität Mainz
pcDNA3.1_mIgG1Fc und pCEP4	J. Frey, Fakultät für Chemie Universität Bielefeld
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA5/FRT	Invitrogen, Karlsruhe
pFastBac1	Invitrogen, Karlsruhe
pIRES1hyg	BD Biosciences, Heidelberg
pSecTag2C	Invitrogen, Karlsruhe

**Primer**

Sigma-ARK, Darmstadt

hAd10for4	5'-CAACTTGTGCCAGTACAG-3'
hAd10for5	5'-CTCTGCCATTTCACTCTGTCA-3'
Protease 1 (for)	5'-GTGCTCGAGATGGTGTGCTGAGAGTGTTAATT-3'
Protease 4 (rev)	5'-TCAGAATTCAGCTCCAGAACTTCTCC-3'
Protease5rev	5'-GAAGTATCCCTCTTCATTCG-3'
RPos5	5'-GTGTCGGGATGATTCAGA-3'
CMV_for	5'-AGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
pcDNA3.1_rev	5'-CCTCGACTGTGCCTTCTA-3'
pIRES_rev	5'-TACTCACCCCAACAGCT-3'

CD33-forward Primer für pFBr-CD33-hADAM10s-His:

*Signalsequenz von CD33*

**hADAM10**

5'-TTGTCTCGAGATGCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTCAGTAT  
GGGAATCCTTTAAATAA-3'

**Oligonukleotide**

Sigma-Genosys, Darmstadt

Für bADAM10s-His:

**SacI**    **Nhe I**    **STOP** **SplI**  
 5' - C **GCT AGC** CAT CAT CAT CAT CAT CAT **TGA** C-3'  
 3' -TC **GAG CGA TCG** GTA GTA GTA GTA GTA GTA **ACT** GCA TG-5'

Für hADAM10s-His:

**SacI**    **Nhe I**    **STOP** **SalI**  
 5' - C **GCT AGC** CAT CAT CAT CAT CAT CAT **TGA** G-3'  
 3' -TC **GAG CGA TCG** GTA GTA GTA GTA GTA GTA **ACT** CAG CT-5'

Für hADAM10splice-His:

**Clal**    **Nhe I**    **STOP** **SplI**  
 5' -CG **ATG CTA GCT** CAT CAT CAT CAT CAT CAT **TGA** C-3'  
 3' -TAC **GAT CGA** GTA GTA GTA GTA GTA GTA **ACT** GCA TG-5'

### 2.1.10 Organismen

#### Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Clontech, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> DH10Bac	Invitrogen, Karlsruhe

#### Eukaryotische Zelllinien

CHO (Chinese hamster ovary)	ATCC (USA), Nr. CCL61
COS-7 (African green monkey)	ATCC (USA), Nr. CRL-1651
FlpIn <sup>TM</sup> 293	Invitrogen, Karlsruhe
HEK293 (humane embryonic kidney)	ATCC (USA), Nr. CRL1573
HEK-EBNA	J. Frey, Fakultät für Chemie Universität Bielefeld
Sf 9 ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	ATCC (USA), Nr. CRL1711
U373 human wildtyp (hwt) APP	M. Kostka, Boehringer Ingelheim

### 2.1.11 Medien

#### Bakterien

##### LB-Agarplatten mit Ampicillin:

1 % (w/v) NaCl; 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1,5 % (w/v) Bactoagar;  
0,1 % (v/v) Ampicilin (400 mg/ml)

##### LB-Flüssigmedium mit Ampicillin:

1 % (w/v) NaCl; 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,1 % (v/v) Ampicillin  
(400 mg/ml)

##### Luria-Agarplatten (für 200 ml):

7,4 g Luria Agar; 20 min autoklavieren, abkühlen auf 55°C  
Zugabe von 50  $\mu$ g/ml Kanamycin; 7  $\mu$ g/ml Gentamicin; 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin; 150  $\mu$ g/ml  
Bluo-Gal; 40  $\mu$ g/ml IPT G

#### Eukaryotische Zellen

DMEM high Glucose	PAA, Cölbe
Hams F-12	Sigma, Taufkirchen
MEM	Sigma, Taufkirchen
SF-900 II Medium	Invitrogen, Karlsruhe

DMEM-Komplettmedium (HEK, HEK-EBNA, FlpIn™ 293, COS):

500 ml DMEM-Flüssigmedium werden durch Zugabe von 1 % (v/v) 200 mM Glutamat; 1 % (v/v) Pen/Strep; 10 % (v/v) FCS supplementiert.

Hams F-12-Komplettmedium (CHO):

500 ml Hams F-12-Flüssigmedium werden durch Zugabe von 1 % (v/v) 200 mM Glutamat; 1 % (v/v) Pen/Strep; 10 % (v/v) FCS supplementiert.

MEM-Komplettmedium (U373 hwt APP):

500 ml MEM-Flüssigmedium werden durch Zugabe von 1 % (v/v) 200 mM Glutamat; 1 % (v/v) MEM NEAA; 1 % (v/v) Natriumpyruvat; 10 % (v/v) FCS supplementiert.

SF-900-Insektenzellmedium (für 4 l):

152,4 g SF-900 II SFM L-Aminoacids; 3,5 l H<sub>2</sub>O; 3,2 ml SF-900 II Supplement; pH-Wert mit 5 mM NaOH auf 5,9 ± 0,1 einstellen; 1,4 g NaHCO<sub>3</sub> (⇒ pH 6,28-6,3)  
Sterilfiltration mit VacuCap 90/0,21 µm Vakuumfilter

**2.1.12 Puffer und Lösungen****Molekularbiologie**

Agarosegele: 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer; 0,01 % (v/v) 1 % Ethidiumbromid-Lösung

DNA-Auftragspuffer: 0,4 % (w/v) Bromphenolblau; 0,4 % (w/v) Xylencyanol; 50 % (v/v) Glycerin

STET-Puffer: 8 % (w/v) Saccharose; 5 % (w/v) Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA, pH 8,4 in 1 l H<sub>2</sub>O

TE-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8

**Gelelektrophorese**

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS

2 x SDS-PAGE-Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 6 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau

**Western Blot Analyse**

Towbin-Transfer-Puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 193 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,05 % (w/v) SDS

I-Block-Puffer: 0,2 % (w/v) I-Block; 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS

### Silberfärbung

Färbelösung: 0,8 % (w/v) Silbernitrat; 1,5 ml 25 % NH<sub>3</sub>; 10 ml 3,6 % (w/v) NaOH in 100 ml H<sub>2</sub>O

Entwicklerlösung: 50 mg Citronensäure; 0,5 ml Formaldehyd in 1 l H<sub>2</sub>O

### High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

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

Puffer B: 90 % (v/v) Acetonitril (gradient grade); 9,9 % (v/v) H<sub>2</sub>O;  
0,1 % (v/v) TFA

### Zellkultur

BBS-Puffer: 50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,95

PBS-Puffer: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O;  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

Poly-Lysin-Lösung: 1 mg Poly-L-Lysin in 1 ml H<sub>2</sub>O

## **2.2 ALLGEMEINE BIOCHEMISCHE METHODEN**

### **2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde nach Lämmli (1970) durchgeführt und erfolgte in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen. Für Polyacrylamid-Gele mit der Abmessung 10 x 8 cm (Minigele) wurde eine Elektrophoreseapparatur der Firma Biometra, für Polyacrylamid-Gele mit einer Abmessung von 12 x 16 cm eine Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad eingesetzt. Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 30 : 0,8 (Roth) verwendet. Dabei wurde für das jeweilige Trenngel 7,5 bzw. 10 % (v/v) Acrylamid bei einer Pufferkonzentration von 0,3 M Tris/HCl, pH 8,9; 0,1 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) APS und 0,05 % (v/v) TEMED, für das jeweilige Sammelgel 3 % (v/v) Acrylamid bei einer Pufferkonzentration von 0,05 M Tris/HCl, pH 6,7; 0,1 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) APS und 0,2 % (v/v) TEMED eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 2.1.12) versetzt. Alle für die SDS-PAGE vorbereiteten Proben wurden nach der Zugabe von 100 mM DTT für 10 min bei 100°C erhitzt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Coomassie-Blue- bzw. Silberfärbung (siehe unten) visualisiert oder immunologisch durch Western Blot Analyse

(siehe 2.2.2) nachgewiesen. Für eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blue- bzw. Silberfärbung wurde der ungefärbte SDS-PAGE Standard Low Range, für eine mit anschließendem immunologischen Nachweis der gefärbte See-Blue Plus 2 Prestained Standard verwendet.

- Coomassie-Blue-Färbung:

Das Proteingel wurde für mindestens eine Stunde mit der Coomassie-Färbelösung (Roth) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden im Polyacrylamid-Gel erfolgte durch dessen Inkubation mit 25 % (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O.

- Silberfärbung:

Die Silberfärbung wurde nach Wray *et al.* (1981) durchgeführt. Durch die mindestens zweistündige Inkubation des Gels in Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1 wurden die Proteinbanden fixiert. Darauf folgten drei Waschschrte mit H<sub>2</sub>O von jeweils 15 min Dauer. Anschließend wurde das Gel 15 min mit der Färbelösung (siehe 2.1.12) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen des Gels mit H<sub>2</sub>O für jeweils 5 min wurden die Proteinbanden mit Hilfe der Entwicklerlösung (siehe 2.1.12) visualisiert.

## 2.2.2 Western Blot Analyse

Nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE (2.2.1) wurden die Proteine zum immunologischen Nachweis auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- bzw. Nitrozellulose-Membran mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotapparatur (Biometra) übertragen. Dazu wurden die Membran und sechs 3MM-Filterpapiere (Whatman) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Towbin-Transfer-Puffer (siehe 2.1.12) vorinkubiert. Das Blot-Sandwich bestand aus drei Lagen 3MM-Filterpapier, der Blot-Membran auf der Anodenseite des Gels, dem Gel selbst und einer weiteren Lage aus drei 3MM-Filterpapieren. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA und Raumtemperatur (RT) für 90 min (Trenngelgröße: 6 x 8 cm) bzw. 3 h (Trenngelgröße: 8 x 16 cm).

Nach dem Proteintransfer schloss sich zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran deren Inkubation in I-Block-Puffer (siehe 2.1.12) für 1 h bei RT an. Danach erfolgte die Erstantikörperreaktion für 1 h ebenfalls bei RT bzw. für 18 h bei 4°C. Zum Nachweis der überexprimierten ADAM10-Proteine wurde der monoklonale murine anti-Penta-His-Antikörper der Firma Qiagen in den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 in I-Block-Puffer eingesetzt. Zum Nachweis von APPs $\alpha$  wurde der monoklonale murine Antikörper 6E10 (gegen die Aminosäuren 597-613 von APP<sub>695</sub>) der Firma Signet Laboratories in der Verdünnung 1:1000 in I-Block-Puffer eingesetzt.

Zum Entfernen des Erstantikörpers wurde die Membran 1 x 10 min und 3 x 5 min mit PBS; 0,1 % (v/v) Tween-20 bzw. I-Block-Puffer gewaschen. Für die folgende Zweitantikörperreaktion zum Nachweis der spezifisch an die exprimierten ADAM10-Proteine gebundenen Primärantikörper wurden Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper genutzt, die mit alkalischer Phosphatase bzw. Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind. Der Peroxidase-konjugierte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 (in I-Block-Puffer), der mit alkalischer Phosphatase konjugierte in einer Verdünnung von 1:8000 (in I-Block-Puffer) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Nach 1 x 10- und 3 x 5-minütigem Waschen der Membran mit 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS bzw. I-Block-Puffer wurde die Blotmembran entwickelt. Im Falle des mit alkalischer Phosphatase konjugierten Zweitantikörpers wurde die Membran mit dem CDP-Star Western Blotting System von Tropix nach den Angaben des Herstellers behandelt. Bei der Substratumsetzung durch die alkalische Phosphatase wird Chemilumineszenz ausgesandt, die mit Hilfe des VersaDoc-Systems von BioRad bzw. durch die Schwärzung eines ECL-Films der Firma Amersham-Pharmacia Biotech nachgewiesen wurde.

Im Falle des Zweitantikörpers mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase wurde die Membran 5 min mit der Substratlösung (100 mM Tris/HCl pH 8,5; 1,25 mM Luminol in DMSO; 0,2 mM p-Cumarsäure in DMSO; 0,01 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert. Die durch die gekoppelte Peroxidase vermittelte Oxidation des cyclischen Diacylhydrazids Luminol ausgesandte Chemilumineszenz wurde ebenfalls mit Hilfe des VersaDoc-Systems bzw. durch die Schwärzung eines ECL-Films nachgewiesen.

Der Nachweis des spezifisch an APPs $\alpha$  gebundenen 6E10-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des <sup>35</sup>S-anti-Maus-IgG der Firma Amersham Pharmacia, der in einer Verdünnung von 1:1000 in I-Block-Puffer eingesetzt wurde. Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe des BAS 1800 Bio-Imaging Analyzer der Firma Fuji.

### **2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **2.2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

In diesem Test wurde die Proteinkonzentration nach der von Bradford (1976) entwickelten Methode mit Hilfe der RotiQuant-Lösung der Firma Roth bestimmt. Jedem Messergebnis liegt eine Dreifachbestimmung zugrunde.

Die jeweilige Probe wurde in 50  $\mu$ l Ameisensäure aufgenommen und auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach 20-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von jeweils 900 µl des 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnten Bradford-Reagenz. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm in Acrylhalbmikroküvetten (Sarstedt) gegen eine Nullprobe gemessen. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Hilfe einer Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 2 bis 10 mg/ml H<sub>2</sub>O erstellt.

### **2.2.3.2 Abschätzung der Proteinmenge nach ihrer Anfärbung im Polyacrylamid-Gel**

Die Menge der exprimierten ADAM10-Proteine nach deren präparativen Reinigung (siehe 2.6.1.3) wurde in einem mit Coomassie-Blue gefärbten Polyacrylamid-Gel abgeschätzt. Dafür wurde der ungefärbte SDS-PAGE Low Range Standard der Firma BioRad eingesetzt, bei dem die Konzentration der jeweiligen Markerbanden 2 µg Protein/µl Markerlösung entspricht. Der eingesetzte Marker konnte somit in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und die Farbintensität der jeweiligen Proteinbande nach Coomassie-Blue-Färbung mit der des zu analysierenden Proteins verglichen werden.

## **2.2.4 Proteinfällung**

### **2.2.4.1 Chloroform-Fällung**

Diese Proteinfällung basiert auf der Methode der Chloroform/Methanol-Präzipitation nach Wessel und Flügge (1984). Dabei wurden 100 µl der jeweiligen Proteinlösung mit 400 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 300 µl H<sub>2</sub>O versetzt und bei 9000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Da die Proteine am Phasenübergang gefällt vorliegen, wurde die obere Phase (Chloroform) vorsichtig abgenommen und die Probe nach der Zugabe von 300 µl Methanol erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die gefällten Proteine sedimentieren als unlösliches Pellet, das nach dem Trocknen in 100 µl 100 % Ameisensäure für eine anschließende Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3.1) bzw. in 20 µl 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer für eine anschließende SDS-PAGE (siehe 2.2.1) gelöst wurde.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass selbst geringe Mengen Protein ausgefällt werden können und dass hydrophobe Proteine leicht zu lösen sind.

### **2.2.4.2 TCA-Fällung**

Eine andere Möglichkeit der Proteinfällung besteht darin, die Proteine mit Hilfe von 6,1 M Trichloressigsäure (TCA) zu präzipitieren. Zu 1500 µl der Proteinlösung wurden 170 µl 6,1 M TCA gegeben. Der Ansatz wurde durch Invertieren gemischt und anschließend

bei 16000 x g für 4 min zentrifugiert. Das gefällte Proteinpellet wurde zweimal mit 750 µl eiskaltem Aceton gewaschen, bei 16000 x g für 4 min zentrifugiert und nach seiner Trocknung in 20 µl 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst, mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.1) aufgetrennt und entsprechend analysiert.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass große Mengen an Proteinen gefällt werden können. Von Nachteil kann die schwere Löslichkeit des Pellets sein.

### 2.2.5 Überprüfung der Proteinexpression

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden jeweils 500-750 µl des entsprechenden die ADAM10-Proteine enthaltenden Zellüberstands abgenommen und für eine TCA-Fällung (siehe 2.2.4.2) bzw. 100 µl der entsprechenden ADAM10-Proteinlösung (z.B. nach dem jeweiligen Reinigungsschritten) für eine Chloroform-Fällung (siehe 2.2.4.1) eingesetzt. Das getrocknete Pellet wurde jeweils in 20 µl 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 2.1.12), 100 mM DTT gelöst und für 10 min bei 100°C inkubiert. Die Analyse der Probe erfolgte dann mittels SDS-PAGE und anschließender Visualisierung durch Silberfärbung (siehe 2.2.1) bzw. Western Blot Analyse (siehe 2.2.2). Für letzteres wurde als Erstantikörper der  $\alpha$ -Penta-His-Antikörper der Firma Qiagen eingesetzt. Die Proteinkonzentration der die exprimierten löslichen ADAM10-Proteine enthaltenden geernteten Sf9-Zellüberstände wurde nach Bradford (siehe 2.2.3.1) ermittelt.

## 2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.3.1 Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Für das Anlegen einer Dauerkultur wurde der Bakterienstamm oder *E. coli*-Transformant auf einer das entsprechende Selektionsantibiotikum enthaltenden LB-Agarplatte (siehe 2.1.11) ausgestrichen und für 18 h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Bakterien wurde in 2 ml mit dem gleichen Antibiotikum versetzten LB-Flüssigmedium (siehe 2.1.11) überführt und für 5-8 h bei 37°C und 120 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Anschließend wurden die restlichen Bakterien von der LB-Agarplatte zur Bakteriensuspension gegeben, auf 20 % (v/v) steriles Glycerin eingestellt und bei -80°C gelagert.

### **2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien**

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 2 ml LB-Flüssigmedium (siehe 2.1.11) mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und für 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-Flüssigmedium mit der Übernachtskultur inokuliert. Die Inkubation bei 37°C und 120 rpm im Kulturschüttler erfolgte bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7. Danach wurden die Bakterien für 10 min bei 3500 x g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem 50 mM Calciumchlorid resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 3500 x g und 4°C für 10 min. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem 50 mM Calciumchlorid/10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und erneut für mindestens 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die kompetenten Bakterien in 200 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.3.3 Plasmid-DNA-Isolation**

#### **2.3.3.1 Plasmid-Minipräparation**

Die zu untersuchenden Bakterienklone wurden auf LB/Ampicillin-Agarplatten (siehe 2.1.11) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die ausgestrichenen Bakterien wurden dann zur Zellyse in 350 µl STET-Puffer (siehe 2.1.12) gelöst und nach der Zugabe von jeweils 25 µl Lysozymlösung (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 50 s bei 100°C erhitzt und für 15 min bei RT und 16000 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde entfernt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden zur verbliebenen Lösung 38 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) gegeben und gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl Isopropanol. Nach erneutem Mischen wurde die Probe für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Nukleinsäuren mit 400 µl 75 % (v/v) Ethanol erneut für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Waschalkohols und Trocknen des Pellets wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bis zu ihrem Einsatz bei -20°C aufbewahrt.

Für eine analytische Restriktion wurde 1 µl der gelösten DNA eingesetzt (siehe 2.3.4).

#### **2.3.3.2 Reinigung über Säulchen**

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA, die besonders rein vorliegen sollte, wurde der Minipräparations-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

### **2.3.3.3 Plasmid-Maxipräparation**

Zur Gewinnung von größeren DNA-Mengen wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die Bakterien einer 400 ml LB/Ampicillin-Flüssigkultur (siehe 2.1.11) wurden für 20 min bei 3500 x g und 4°C sedimentiert. Anschließend erfolgte ihre alkalische Lyse durch das Resuspendieren des Bakterienpellets in 8 ml Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA) und der anschließenden 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Nach der Zugabe von 8 ml Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) wurde die Probe vorsichtig gemischt und für weiter 7 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) dazugegeben, die Probe erneut vorsichtig gemischt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden für 30 min bei 21000 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.

Durch die Zugabe von 20 ml Isopropanol zu diesem Überstand wurden die darin enthaltenen Nukleinsäuren gefällt. Dazu wurde die Probe gut gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und für 20 min bei 21000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 21000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 6 ml H<sub>2</sub>O gelöst, mit 5 ml 10 M Ammoniumacetat versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurde die in der Probe vorhandene RNA gefällt und durch die sich daran anschließende 20-minütige Zentrifugation bei 17000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 7 ml Isopropanol wurde die gut gemischte Probe für 20 min auf Eis inkubiert. Durch die Zentrifugation bei 17000 x g und 4°C für 20 min wurde die dadurch gefällte DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 3 ml 75 % (v/v) Ethanol versetzt und erneut für 5 min bei 17000 x g und 4°C zentrifugiert.

Um die Reste kontaminierender RNA zu entfernen, wurde die sedimentierte DNA in 800 µl H<sub>2</sub>O gelöst und mit 6 µl RNase A (10 mg/ml H<sub>2</sub>O) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 0,5 ml 13 % (w/v) PEG 8000; 1,6 M NaCl und 20-minütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4000 x g sedimentiert.

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dabei wurde die Probe mit 600 µl TE-gesättigtem Phenol versetzt und gemischt. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 16000 x g für 3 min. Die obere Phase wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) vermischt. Die Phasentrennung erfolgte durch erneute Zentrifugation. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, wobei jeweils die obere Phase in ein

neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Phenolreste wurden durch die Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether (3 x 1 ml) entfernt, wobei die Probe jeweils für 3 min bei 16000 x g zentrifugiert wurde. Die obere Phase wurde verworfen, die Reste des Ethers durch Abdampfen bei 37°C entfernt.

Abschließend wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen an P 3 und nach dem Mischen der Probe die Zugabe von 1,5 ml 100 % Ethanol. Nach erneutem Durchmischen wurde die Probe bei -20°C für mehrere Stunden inkubiert. Durch die darauf folgende 30-minütige Zentrifugation bei 16000 x g wurde die gefällte Plasmid-DNA sedimentiert. Nach einem letzten Waschschrift mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol und der anschließenden Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min wurde die getrocknete DNA in H<sub>2</sub>O gelöst und nach der Bestimmung ihrer Konzentration und Reinheit (siehe 2.3.6) bei -20°C gelagert.

#### **2.3.4 Spaltung der Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme und Modifizierung von DNA-Enden durch die T4-DNA-Polymerase**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen eingesetzt.

Die analytischen Restriktionen (z.B. zur Überprüfung von positiven Transformanden) wurden in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt. Dabei wurde 1 µl von der zu analysierenden DNA-Lösung zusammen mit dem entsprechenden 10 x Restriktionspuffer und 1 µl des Restriktionsenzym versetzt. Der Ansatz wurde mindestens 1 h bei der für das Enzym vorgeschriebenen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend nach der Zugabe von 4 µl DNA-Auftragspuffer (siehe 2.1.12) auf ein 1 % Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel (siehe 2.1.12) aufgetragen.

Die präparativen Restriktionsansätze unterschieden sich in den entsprechend vergrößerten Reaktionsvolumina. Der entsprechende Ansatz wurde für mindestens 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der entsprechenden Ziel-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Probe mit dem entsprechenden Volumen an ungefärbten 2 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Probe wurde anschließend in einem 1 % Ethidiumbromid-freien Agarosegel (präparatives Agarosegel) aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment aus der Agarose eluiert (siehe 2.3.5). Wurden bei der präparativen Restriktion nur wenige Nukleotide entfernt oder erfolgte lediglich eine Linearisierung der Plasmid-DNA, wurde die Aufreinigung mit Hilfe des PCR-Reinigungskits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die fehlenden Nukleotide von 3'-zurückstehenden DNA-Enden wurden durch die T4-DNA-Polymerase aufgefüllt bzw. 3'-Überhang-Enden durch dieses Enzym abgebaut. Für die einzelnen Reaktionen wurde das Enzym nach Angaben des Herstellers (MBI-Fermentas) eingesetzt.

### **2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen**

Nach der Auftrennung der DNA-Probe in einem präparativen Agarosegel wurde die Markerspür und ein kleiner Längsstreifen der Probenspür aus dem Ethidiumbromid-freien Agarosegel herausgeschnitten und mit Ethidiumbromid angefärbt, um die Position der gewünschten DNA-Bande zu ermitteln. Der ermittelte Bereich des Agarosegels, der das gewünschte Fragment enthält, wurde herausgeschnitten und die DNA daraus mit Hilfe des Gelextraktions-Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers eluiert.

### **2.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Zum einen erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration durch eine Mengenabschätzung in einem 1 % Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel. Dabei wurde die Intensität der zu bestimmenden Bande mit einer ebenfalls aufgetragenen DNA-Probe bekannter Menge verglichen.

Des Weiteren wurde die Konzentration und Reinheit präparierter DNA durch die Messung der Extinktionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  stellt ein Maß für die Reinheit der DNA im Bezug auf Proteinverunreinigungen dar und sollte für proteinfreie Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein Absolutwert der Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

### **2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die *in vitro*-Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen erfolgte über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wurden 20 ng Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 50 pM eingesetzt. Die finale Nukleotidkonzentration betrug 0,2 mM pro Nukleotid. Für die Reaktion wurde die Taq-Polymerase nach Angaben des Herstellers (MBI-Fermentas) eingesetzt.

***Herstellung des CD33-Oligoadapters für die Klonierung von pFBr-CD33-hADAM10s-His***

PCR-Programm für die Herstellung des CD33-Oligoadapters (siehe 2.1.9 und 3.2.1):

Denaturierung:	1 min 95°C
Anlagerung der Primer:	1 min 51°C
Polymerisation:	1 min 72°C

Nach 40 Zyklen wurde die Polymerisation durch eine zehnminütige Inkubation bei 72°C vervollständigt und die Reaktion durch das Abkühlen auf 4°C gestoppt.

***PCR-Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA***

PCR-Programm für Bacmid-DNA-Analyse:

Denaturierung:	1 min 95°C
Anlagerung der Primer:	1 min 56°C
Polymerisation:	3,5 min 72°C

Nach 35 Zyklen wurde auch hier durch die zehnminütige Inkubation bei 72°C die Polymerisation vervollständigt und die Reaktion durch das Abkühlen auf 4°C gestoppt.

Für die PCR-Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA (siehe 2.5.3) wurden folgende Primer eingesetzt:

pFBr-bADAM10s-His, pFBr-hADAM10s-His und pFBr-hADAM10splice-His:

Protease 1 und Protease 4

pFBr-CD33-hADAM10s-His:

hAd10for5 und Protease 4

Die „forward“ Primer Protease 1 und hAd10for5 binden an die DNA der Signalsequenz bzw. der Prodomäne, der „reverse“ Primer Protease 4 an die der katalytischen Domäne von ADAM10.

**2.3.8 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Um bei „blunt end“-Klonierungen eine Religation der mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelten Vektor-DNA zu verhindern, müssen die entstandenen 5'-Enden dephosphoryliert werden. Die Hydrolyse der Phosphatgruppe erfolgte durch die Behandlung mit einer aus Kälberdarm gereinigten alkalischen Phosphatase (CIAP) der Firma MBI-Fermentas. Dabei wurde die DNA mit 0,6 U CIAP und dem entsprechenden 10 x CIAP-Puffer (MBI-Fermentas) zweimal für jeweils 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert.

### **2.3.9 „Annealing“ von Oligoadaptoren**

Für das „Annealing“ von Oligoadaptoren wurden die benötigten Primer in H<sub>2</sub>O gelöst und 2 h bei 25°C inkubiert, wobei die Endkonzentration der Primer 1 µg/µl betragen sollte. Für einen 50 µl „Annealing“-Ansatz wurden von dem „reverse“ und „forward“ Primer jeweils 4 ng eingesetzt und mit dem entsprechenden Volumen an 10 x „Annealing“-Puffer (final: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl) versetzt. Nach dreiminütiger Behandlung bei 90°C wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung des Oligoadapters erfolgte bei -20°C. Für die Ligation wurde der Oligoadapter in einer Konzentration von 8 ng/µl eingesetzt.

### **2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der Ligation werden 5'-phosphorylierte und 3'-hydroxylierte DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung kovalent verknüpft. Für diese Verbindung eines DNA-Inserts mit der entsprechenden linearisierten Vektor-DNA wurden eine T4-DNA-Ligase und der entsprechende 10 x Ligase-Puffer der Firma MBI-Fermentas verwendet. Bei der Reaktion wurde das Insert im Vergleich zur Plasmid-DNA in einem 3 bis 5-fachen molaren Überschuss in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt und anschließend für 18 h bei 14°C inkubiert. Für die Ligation von glatten Enden („blunt ends“) wurden 15 U, für die Ligation von überstehenden Enden („sticky ends“) wurden 5 U Ligase eingesetzt. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* eingesetzt (siehe 2.3.11).

### **2.3.11 Transformation von Bakterien**

Zur Transformation wurden kompetente Zellen des *E. coli*-Bakterienstamms DH5α verwendet. Dabei wurden pro 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes 100 µl der kompetenten Bakterien eingesetzt. Anschließend wurde die mit der DNA versetzte Bakteriensuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C und dem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurden sie in 600 µl LB-Flüssigmedium (siehe 2.1.11) aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 120 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf zwei LB/Ampicillin-Agarplatten (siehe 2.1.11) ausgestrichen (1/3 bzw. 2/3 des Ansatzes) und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die ausgewählten Klone wurden erneut auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde ihre Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.3.3) und mittels Restriktionsanalyse (siehe 2.3.4) untersucht. Von den als positiv identifizierten Klonen wurden Dauerkulturen erstellt (siehe 2.3.1). Handelte es sich bei dem

Insert um ein PCR-Produkt oder musste das Einhalten des Leserahmens überprüft werden, wurde die Plasmid-DNA einer Sequenzierung unterzogen (siehe 2.3.12).

### **2.3.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise, Mainz, durchgeführt.

Zur Überprüfung der jeweiligen DNA-Konstrukte wurden für die einzelnen Sequenzierungen folgende ADAM10-sequenzspezifische Primer (siehe 2.1.9.) eingesetzt:

<u>hAd10for4:</u>	bindet an die DNA in der Cystein-reichen Domäne von ADAM10
<u>Protease5rev:</u>	bindet an die DNA der Prodomäne von ADAM10
<u>RPos5:</u>	bindet an die DNA der Disintegrin-Domäne von ADAM10

Ferner wurden die Vektor-DNA-spezifischen Primer pIRES\_rev, pcDNA3\_rev und CMV\_for (siehe 2.1.9.) eingesetzt.

## **2.4 ÜBEREXPRESSION IN SÄUGETIERZELLEN**

### **2.4.1 Herstellung der Expressionsplasmide**

#### **2.4.1.1 pSecTag2C-hADAM10s-His und pcDNA3-hADAM10s-His**

Die Sequenz des löslichen humanen ADAM10 (hADAM10s) wurde für diese Klonierung aus dem Vektor pUC57-hADAM10full-length (bereitgestellt von R. Postina) über SacI (Schnittstelle liegt vor der Transmembrandomäne von ADAM10) und XhoI (vor der Signalsequenz von ADAM10) herausgeschnitten und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt. Das Insert wurde in den Expressionsvektor pSecTag2C im Leserahmen zu der dort vorhandenen Signalsequenz des IgκB (im Protein N-terminal) und dem myc- und Poly-Histidin-Epitop (im Protein C-terminal) einkloniert. Der Vektor pSecTag2C wurde dafür mit SfiI und Bsp120I geschnitten und nach darauf folgender T4-DNA-Polymerase-Behandlung dephosphoryliert (siehe 2.3.8), um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Für die Herstellung von pcDNA3-hADAM10s-His wurde das lösliche humane ADAM10 mit dem Poly-Histidin-Epitop (hADAM10s-His) über XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) und PmeI aus dem Expressionsvektor pSecTag2C-hADAM10s-His herausgeschnitten und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung über ein präparatives

Agarosegel gereinigt. Für die Ligation mit dem Insert wurde der Vektor pcDNA3 mit KpnI geschnitten, mit der T4-DNA-Polymerase behandelt und dephosphoryliert.

#### **2.4.1.2 Die pIRES-Konstrukte**

##### ***pIRES-bADAM10s-His***

Der Ausgangsvektor für diese Klonierung war das von R. Postina bereitgestellte Konstrukt 116\_1, das die Sequenz des bovinen full-length ADAM10 mit HA-Epitop (bADAM10fl-HA) trägt. Da dieses Epitop aus dem Hämagglutinin A (YPYDVDPDYA) für die spätere Reinigung nicht geeignet ist, wurde es durch ein Poly-Histidin-Epitop ersetzt. Dafür wurde zunächst bADAM10fl-HA über ClaI mit daran anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung und XbaI aus dem Konstrukt 116\_1 herausgeschnitten und über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt. Als Zielvektor wurde pUC19 ausgewählt, bei dem als erstes die die weiteren Klonierungsschritte störende SacI-Schnittstelle durch Restriktion mit SacI, anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung und der Religation des Vektors entfernt werden musste. Der daraus resultierende Vektor pUC19ΔSacI wurde mit KpnI geschnitten. Nach der anschließenden T4-DNA-Polymerase-Behandlung erfolgte eine weitere Restriktion mit XbaI. Der geschnittene Vektor wurde dann über ein präparatives Agarosegel gereinigt. In dem aus der Ligation der beiden DNAs resultierenden Expressionsvektor pUC19ΔSacI-bADAM10fl-HA wurde nun ein Oligonukleotid eingefügt, der das für die Proteinreinigung wichtige Poly-Histidin-Epitop codiert (siehe 2.1.9). Die Insertion erfolgte über die Schnittstellen SacI (vor der Transmembrandomäne von ADAM10) und SphI, wodurch nicht nur die Sequenz des HA-Epitops sondern auch die der Transmembran- und der cytosolischen Domäne von bADAM10 entfernt wurde.

Zur Herstellung von pIRES-bADAM10s-His wurde das lösliche bADAM10s-His über HindIII und XhoI aus pUC19ΔSacI-bADAM10s-His herausgeschnitten und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung mittels präparativem Agarosegel gereinigt. Der Expressionsvektor pIRES<sub>hyg1</sub> wurde für diese Klonierung mit BamHI geschnitten, T4-DNA-Polymerase-behandelt und dephosphoryliert (siehe 2.3.8).

##### ***pIRES-hADAM10s-His***

Für diese Klonierung wurde aus dem Konstrukt MB23A (bereitgestellt von M. Bukulin) hADAM10full-length mit HA-Epitop über SmaI und KpnI herausgeschnitten und über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt. Die Ligation mit pUC19ΔSacI erfolgte über die dort vorhandenen Schnittstellen XbaI und KpnI. Dabei wurde zunächst die Restriktion mit

XbaI, anschließend die Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase und schließlich die Restriktion mit KpnI durchgeführt. Danach wurden die die Transmembran- und die cytosolische Domäne sowie das HA-Epitop codierende Sequenz durch die des Poly-Histidin-Epitops (siehe 2.1.9) über das Einbringen eines entsprechenden Oligoadapters ersetzt. Dies erfolgte über die Schnittstellen SacI (vor der Transmembrandomäne von ADAM10) und Sall (in pUC19 $\Delta$ SacI). Anschließend wurde aus dem dabei entstandenen Vektor pUC19 $\Delta$ SacI-hADAM10s-His das hADAM10s-His-Insert über KpnI und HindIII herausgeschnitten, nach erfolgter T4-DNA-Polymerase-Behandlung über ein präparatives Agarosegel gereinigt und in pIRESHyg1 eingebracht. Der Vektor pIRESHyg1 wurde dafür mit BamHI geschnitten, T4-DNA-Polymerase-behandelt und dephosphoryliert (siehe 2.3.8).

#### ***pIRES-hADAM10splice-His***

Der Ausgangsvektor dieser Klonierung war pIRES-hADAM10splice-HA (bereitgestellt von M. Bukulin). Auch hier wurde die für das HA-Epitop codierende Sequenz durch die für das Poly-Histidin-Epitop ersetzt. Dies erfolgte durch das Einbringen eines entsprechenden Oligoadapters (siehe 2.1.9) über die Schnittstellen ClaI (vor dem HA-Epitop) und SphI.

#### **2.4.1.3 Die pcDNA5/FRT-Konstrukte**

##### ***pcDNA5/FRT-bADAM10s-His***

Bei dieser Klonierung wurde bADAM10s aus dem Vektor pIRES-bADAM10s-His (siehe 3.1.1.2) über SphI (hinter dem Poly-Histidin-Epitop) und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und in den Vektor pcDNA5/FRT einkloniert, der dafür mit Bsp120I und nach erfolgter T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI geschnitten wurde.

##### ***pcDNA5/FRT-hADAM10s-His***

Ausgangsvektor für diese Klonierung war pIRES-hADAM10s-His (siehe 3.1.1.2). Hier wurde hADAM10s über HindIII (in pIRES) und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und in pcDNA5/FRT einkloniert. Der Zielvektor pcDNA5/FRT wurde für diese Klonierung mit Bsp120I und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI geschnitten.

***pcDNA5/FRT-hADAM10splice-His***

Die DNA von hADAM10splice-His wurde aus pIRES-hADAM10splice-His (siehe 3.1.1.2) über SphI (hinter dem Poly-Histidin-Epitop) und nach erfolgter T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und in pcDNA5/FRT einkloniert. Der Zielvektor pcDNA5/FRT wurde dafür mit Bsp120I und nach anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI geschnitten.

**2.4.1.4 Die pCEP4-Konstrukte*****pCEP4-hADAM10s-mIgG1Fc***

Die Sequenz von hADAM10s wurde bei dieser Klonierung aus dem Vektor pUC57-hADAM10full-length (bereitgestellt von R. Postina) über SacI (vor der Transmembran-Domäne) und XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) herausgeschnitten, einer T4-DNA-Polymerase-Behandlung unterzogen und über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt. Das Insert wurde in den Vektor pcDNA3.1-mIgG1Fc (bereitgestellt von J. Frey) nach dessen Behandlung mit XhoI, der T4-DNA-Polymerase und anschließender Dephosphorylierung (siehe 2.3.8) einkloniert. Das lösliche humane ADAM10 wurde dadurch mit der konstanten Region des IgG1-Antikörpers aus der Maus (mIgG1Fc; im Protein C-terminal) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde die DNA von hADAM10s-mIgG1Fc über die Restriktionsstellen NotI und XbaI herausgeschnitten, um sie nach erfolgter T4-DNA-Polymerase-Behandlung und Reinigung über ein präparatives Agarosegel in den Expressionsvektor pCEP4 zu integrieren. Der Vektor wurde dafür mit KpnI geschnitten, T4-DNA-Polymerase-behandelt und dephosphoryliert.

***pCEP4-hADAM10s-His***

Für dieses Konstrukt wurde hADAM10s-His über XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) und PmeI (hinter dem Poly-His-Epitop) aus pSecTag2C-hADAM10s-His (siehe 3.1.1.1) herausgeschnitten, mit der T4-DNA-Polymerase behandelt und über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt. Der Zielvektor pCEP4 wurde für diese Klonierung mit KpnI geschnitten, T4-DNA-Polymerase-behandelt und dephosphoryliert (siehe 2.3.8).

## **2.4.2 Kultivieren von Säugetierzellen**

Alle Arbeiten mit Säugetierzellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Lösungen, die mit Zellen in Berührung kamen, wurden durch Autoklavieren (30 min, 121°C), hitzeempfindliche Lösungen durch Filtration (Porengröße 0,2 µm), Glasmaterialien durch trockene Hitze (4 h, 180°C) sterilisiert. Die benutzten Gerätschaften und Medienflaschen wurden direkt vor dem Einbringen unter die Sterilbank mit 80 % (v/v) Ethanol bzw. einem Flächendesinfektionsmittel der Firma Roth desinfiziert, die Glaspipetten unmittelbar vor ihrer Benutzung unter der Sterilbank abgeflammt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % wassergesättigter Luft in einem Zellkulturbrutschrank. Die adhärennten Zellen wurden auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser im entsprechenden Kompletmedium (siehe 2.1.11) bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Passage wurde das überstehende Medium vorsichtig entfernt und die Zellen für wenige Minuten mit Trypsin/EDTA (in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 110 x g zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der pelletierten Zellen mit dem jeweiligen Kompletmedium wurden sie im Verhältnis 1:4 bis 1:10 auf neue Zellkulturschalen verteilt.

## **2.4.3 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)**

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Zellen eines 70 % konfluenten Zellrasens mit dem vorhandenen Medium suspendiert und für 5 min bei 110 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1,5 ml Gefriermedium (Kompletmedium; 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein vorbereitetes Kryoröhrchen überführt. Die Dauerkulturen wurden nacheinander bei -20°C bzw. -80°C für wenige Stunden aufbewahrt und schließlich in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

## **2.4.4 Transfektion von Säugetierzellen**

### **2.4.4.1 Calciumphosphatmethode**

Für die transiente und stabile Transfektion von HEK-, HEK-EBNA- und CHO-Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode angewendet. HEK-Zellen wurden für die Transfektion auf Poly-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert, wodurch das leichte Ablösen von der Zellkulturschale verhindert werden sollte. Die für die Transfektion eingesetzten Zellen waren 40-60 % konfluent. Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen für

4,5 h bei 37°C und 3 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit der Transfektionslösung (10 µg DNA; 750 µl H<sub>2</sub>O; 250 µl CaCl<sub>2</sub>; 1 ml BBS; gut mischen und 3 min bei Raumtemperatur inkubieren; 8 ml MEM + 10 % (v/v) Nu-Serum + 1 % (v/v) Glutamin) inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen bei Raumtemperatur für 3 min mit 2 ml 10 % (v/v) Glycerin in PBS überschichtet. Nach dem Absaugen der Glycerinlösung wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, bevor sie in dem entsprechenden Komplettmedium weiterkultiviert wurden.

Im Falle einer transienten Transfektion wurden die Zellen für 4-24 h mit DMEM bzw. Hams F-12, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) Pen/Strep, 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) inkubiert und geerntet (siehe 2.4.4). Zur Herstellung von stabil transfizierten Zellen wurde das Zellkulturmedium nach 24 h durch ein entsprechendes Selektionsmedium ausgetauscht.

### **2.4.4.2 DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion von COS-Zellen**

Diese Methode wurde für die transiente Transfektion von COS-Zellen verwendet. Die zu transfizierenden Zellen sollten zu 80 % konfluent sein. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit DMEM ohne Zusätze wurden sie für 4,5 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 5 ml DEAE-Dextran-Transfektionsmedium (2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin; 7 % (v/v) Nu-Serum; 0,1 mM Chloroquin; 0,2 mg/ml DEAE-Dextran (500000 g/mol); 1,2 µg Plasmid-DNA in DMEM) inkubiert. Daran anschließend wurden die Zellen für 3 min mit 5 ml PBS/10 % (v/v) DMSO behandelt. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Zellen einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit DMEM, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) Pen/Strep, 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) für weitere 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet (siehe 2.4.4).

### **2.4.4.3 Roti<sup>®</sup>-Fect-Reagenz**

Zur Transfektion einer 10 cm-Zellkulturschale HEK-EBNA-Zellen wurden zwei Lösungen vorbereitet:

- Lösung A: 10 µg DNA ; 200 µl DMEM ohne Antibiotika
- Lösung B: 50 µl Roti<sup>®</sup>-Fect-Reagenz; 200 µl DMEM ohne Antibiotika

Die beiden Lösungen wurden vereinigt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen 70-80 % konfluent. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit DMEM ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden 3 ml MEM, 7 % (v/v) Nu-Serum, 1 % (v/v) Glutamin ohne Antibiotika und die miteinander

inkubierten Transfektionslösungen A und B auf die Zellen gegeben. Nach sechsständiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden 7 ml DMEM-Komplettmedium dazu gegeben und die Zellen für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Im Falle einer transienten Transfektion wurde nach dieser 24-stündigen Inkubation das Transfektionsmedium durch 3 ml DMEM, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) Pen/Strep, 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) ersetzt und die Zellen nach weiteren 24 h geerntet (siehe 2.4.4). Im Falle einer stabilen Transfektion erfolgte lediglich der Austausch des Transfektionsmediums gegen das entsprechende Selektionsmedium.

#### **2.4.4.4 LIPOFECTAMIN™ 2000-Reagenz**

Zur Transfektion einer 10 cm-Zellkulturschale HEK-, FlpIn™293- bzw. CHO-Zellen wurden folgende Lösungen vorbereitet:

- Lösung A: 2-4 µg DNA; 300 µl MEM ohne Zusätze
- Lösung B: 20 µl LIPOFECTAMIN™ 2000-Reagenz; 300 µl MEM ohne Zusätze

Die beiden Lösungen wurden vereinigt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen 70-80 % konfluent. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit MEM ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden 3 ml MEM, 7 % (v/v) Nu-Serum, 1 % (v/v) Glutamin ohne Antibiotika und die miteinander inkubierten Transfektionslösungen A und B auf die Zellen gegeben. Nach fünfständiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Transfektionsgemisch durch das entsprechende Komplettmedium ersetzt und die Inkubation weitere 24 h fortgesetzt.

Im Falle einer transienten Transfektion wurde daran anschließend das jeweilige Komplettmedium durch DMEM bzw. Hams F-12, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) Pen/Strep, 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) ersetzt und die Zellen nach weiteren 24 h geerntet (siehe 2.4.4). Im Falle einer stabilen Transfektion wurde nach dieser 24-stündigen Inkubation das Medium gegen das entsprechende Selektionsmedium ausgetauscht.

#### **2.5.4 Ernten der Zellüberstände und Analyse der Proteinexpression der transfizierten Säugetierzellen**

Da das im Medium vorhandene BSA den Nachweis der löslichen ADAM10-Varianten aufgrund ihrer ähnlichen Molekulargewichte stört, wurden die mit den entsprechenden Konstrukten transfizierten Zellen vor dem eigentlichen Ernten für 4 h bzw. 24 h mit mindestens 4,5 ml DMEM Zellkulturmedium ohne FCS (HEK, HEK-EBNA, FlpIn™293,

COS) bzw. Hams F-12 ohne FCS (CHO) inkubiert. Das FCS im entsprechenden Komplettmedium (siehe 2.1.11) wurde durch Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) ersetzt.

Das Ernten der Zellen erfolgte durch Abnahme des jeweiligen Zellüberstands und dessen Zentrifugation bei 110 x g für 5 min, um noch vorhandenes Zellmaterial zu pelletieren. Der Überstand wurde anschließend in ein frisches 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt. Für die folgende Proteinanalyse wurde der Zellüberstand einer TCA-Fällung (siehe 2.2.4.2) unterzogen, das getrocknete Pellet entsprechend in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 2.1.12), 100 mM DTT gelöst und die Proteinexpression wie unter 2.2.5 beschrieben überprüft. Für eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3.1) wurden 100-500 µl des jeweiligen Zellüberstands aufbewahrt.

## 2.5 ÜBEREXPRESSION IN INSEKTENZELLEN

### 2.5.1 Das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem

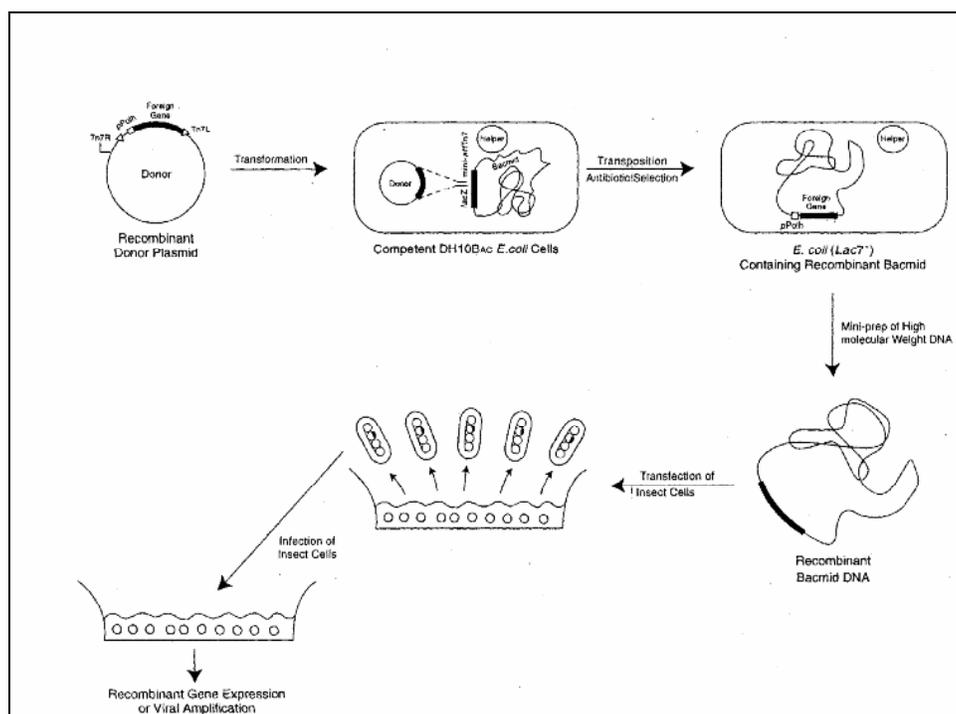
Für die Produktion löslicher ADAM10-Proteine in Sf9-Insektenzellen aus dem Ovar der Gemüseeulen-Larve *Spodoptera frugiperda* wurde das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem der Firma Invitrogen eingesetzt (siehe Abb. 2.1).

Der Expressionsvektor pFastBac1 dient in diesem System als Donorplasmid. Es trägt ein mini-Tn7-Element, das eine Expressionskassette mit einem Gentamicin-Resistenzgen, einem Baculovirus-spezifischen Promotor (Polyhedrin-Promotor des *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcNPV), einer „multiple cloning site“ und einem SV 40 Poly-(A)-Signal zwischen dem linken und rechten Arm des Transposons 7 (Tn7) enthält.

Das Donorplasmid mit dem einklonierten Zielgen wird zur Transformation des Bakterienstamms DH10Bac verwendet. Dieser *E. coli*-Stamm enthält den Baculovirus-Shuttle-Vektor (Bacmid) bMON 14272, der dem Bakterium eine Kanamycin-Resistenz verleiht. Daneben enthält er ein DNA-Segment, welches das *lacZ*α-Peptid kodiert und somit die *lacZ*-Deletion des Bakteriums komplementieren kann. Das heißt die Bakterien sind dadurch in der Lage, in der Gegenwart eines farblichen Substrats, wie z.B. Bluo-gal oder X-gal, und des Induzierers Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG), blaue Kolonien (*lac*<sup>+</sup>) zu bilden. Rekombinante Bacmide werden nun dadurch gebildet, dass das mini-Tn7-Element des Donorplasmids in die innerhalb des *lacZ*α-Gens liegende „attachment site“ für das bakterielle Transposon 7 (mini-*att*Tn7) transponiert, wobei die Transpositionsfunktion *in trans* bereitgestellt werden muss. Dies erfolgt durch das ebenfalls im DH10Bac-Stamm

vorliegende Helferplasmid pMON 7124, das einen Tetracyclin-Resistenzmarker trägt und die nötigen Transposasen kodiert. Durch die Insertion der mini-Tn7-Expressionskassette wird der Leserahmen des *lacZ $\alpha$* -Gens unterbrochen, so dass das Protein *LacZ $\alpha$*  nicht exprimiert wird und keine  $\alpha$ -Komplementation erfolgt. Demnach können die Bakterienklone, die das rekombinante Bacmid tragen, das Substrat Bluo-gal nicht mehr umsetzen und erscheinen weiß (*lac<sup>-</sup>*). Ferner tragen Bakterien, die das rekombinante Bacmid beinhalten, zusätzlich zur Tetracyclin- (durch das Helferplasmid) und zur Kanamycin- (durch das Bacmid) noch eine Gentamicin-Resistenz (durch die mini-Tn7-Expressionskassette).

Die rekombinante Bacmid-DNA aus den als positiv identifizierten DH10Bac-Klonen wird anschließend für die Transfektion der ausgewählten Insektzellen eingesetzt.



**Abb. 2.1:** Genexpression mit dem Bac-To-Bac-Expressionssystem

nach: Instruction Manual – Bac-To-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen)

## 2.5.2 Transposition der pFastBac Donorplasmide

Die hergestellten Konstrukte pFB-bADAM10s-His, pFB-hADAM10s-His, pFB-CD33-hADAM10s-His und pFB-hADAM10splice (siehe 3.2.1 und Abb. 3.2) wurden für die Transformation des *E. coli*-Stamms DH5 $\alpha$  eingesetzt (siehe 2.3.11). Durch die

Restriktionsanalyse der Plasmid-Minipräparations-DNA (siehe 2.3.3) wurde jeweils ein positiver Klon ermittelt. Um Verschiebungen im Leserahmen auszuschließen, wurden die DNA-Konstrukte sequenziert und anschließend für die Transposition des Bakterienstamms DH10Bac verwendet.

Pro Transposition wurden 100 µl der DH10Bac-Bakteriensuspension eingesetzt und nach der Zugabe von 0,5 µl der jeweiligen Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende 45-sekündige Hitzeschock bei 42°C diente dazu, dass die Bakterien die Fremd-DNA aufnehmen können. Danach wurden sie für 2 min auf Eis abgekühlt, in 450 µl LB-Flüssigmedium (siehe 2.1.11) aufgenommen und für 4 h bei 37°C inkubiert. Daran anschließend wurde von jeder Probe eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10; 1:100; 1:1000). Von der entsprechenden Verdünnung wurden jeweils 100 µl auf Luria-Agarplatten (siehe 2.1.11) ausgestrichen und für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die ausgewählten weißen, d.h. positiven Klone zur eindeutigen Bestimmung des Phänotyps auf frischen Luria-Agarplatten ausgestrichen und für weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Als Phänotyp-Kontrolle wurde ebenfalls ein blauer, also negativer Klon ausgestrichen.

### **2.5.3 Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA**

Zur Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA wurde von den entsprechenden weißen Klone eine Flüssigkultur (2 ml LB-Medium, 50 µg/ml Kanamycin; 7 µg/ml Gentamicin; 10 µg/ml Tetracyclin) angesetzt und für 18 h bei 37°C und 120 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 0,3 ml Lösung I (15 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,3 ml Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % SDS) wurde die Probe durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Präzipitierung der bakteriellen Proteine und genomischen DNA wurden 0,3 ml 3 M Kaliumacetat pH 5,5 hinzugefügt. Daraufhin wurde die Probe 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei RT und 16000 x g zentrifugiert. Zum Fällen der Bacmid-DNA wurde der Überstand in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen mit 0,8 ml Isopropanol überführt, erneut für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol versetzt und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Waschschritts wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die

getrocknete DNA wurde in 40 µl TE-Puffer (siehe 2.1.12) aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Insertion der entsprechenden ADAM10-DNA wurde eine PCR-Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA mit sequenzspezifischen hADAM10-Primern durchgeführt (siehe 2.3.7).

#### **2.5.4 Kultivieren von Sf9-Zellen**

Alle Arbeiten mit Insektenzellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Lösungen, die mit Zellen in Berührung kamen, wurden durch Autoklavieren (30 min, 121°C), hitzeempfindliche Lösungen durch Filtration (Porengröße 0,2 µm), Glasmaterialien durch trockene Hitze (4 h, 180°C) sterilisiert. Die benutzten Gerätschaften und Medienflaschen wurden direkt vor dem Einbringen unter die Sterilbank mit 80 % (v/v) Ethanol bzw. einem Flächendesinfektionsmittel der Firma Roth desinfiziert. Da bei allen Versuchen mit Insektenzellen keine Antibiotika zum Einsatz kamen, wurden sämtliche Glaspipetten unmittelbar vor ihrer Verwendung unter der Sterilbank abgeflammt.

Die Insektenzellen wurden im Serum-freien Nährmedium SF-900 II (siehe 2.1.1.1) der Firma Invitrogen auf Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser in einem Kühlbrutschrank (Heraeus) bei 27°C kultiviert. Zur Passage wurde das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen wenige Minuten mit Trypsin/EDTA (in PBS) behandelt und anschließend in ein Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 110 x g für 5 min wurden die sedimentierten Zellen in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue Kulturschalen verteilt.

Die Vitalität der Sf9-Zellen wurde durch das Anfärben mittels Trypanblau überprüft. Da dieser Farbstoff die Membran lebender Zellen nicht passieren kann, werden nur abgestorbene Zellen angefärbt. Die entsprechende Zellsuspension wurde für 5 min mit 10 µl Trypanblau-Lösung inkubiert und die Zellen anschließend mit Hilfe einer Thoma-Kammer ausgezählt. Die Zellvitalität in Prozent ergab sich aus dem Quotient der Zahl der ungefärbten Zellen zu der Gesamtzahl an Zellen und sollte im Idealfall > 90 % sein.

#### **2.5.5 Anlegen von Sf9-Dauerkulturen (Kryokonservierung)**

Das Anlegen von Sf9-Dauerkulturen erfolgte durch das Ernten von Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Dabei wurden die Sf9-Zellen mit dem vorhandenen Medium vorsichtig von der Platte gelöst, suspendiert und in ein 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt. Durch die anschließende Zentrifugation bei 110 x g

für 5 min wurden die Zellen sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1,5 ml Gefriermedium (SF-900 II Medium; 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein vorbereitetes Kryoröhrchen überführt. Die Dauerkulturen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für wenige Stunden aufbewahrt und daran anschließend in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.5.6 Adaption von Sf9-Zellen an Serum-freies SF-900 II Medium**

Für die durchgeführten Überexpression in Sf9-Zellen war es nötig, die Versuche mit BSA-freiem Medium durchzuführen, da die Molekulargewichte der zu exprimierenden löslichen ADAM10-Varianten im gleichen Größenbereich lagen. Aus diesem Grund mussten die verwendeten Sf9-Zellen an Serum-freies Medium adaptiert werden. Dafür wurde bei bis zu 50 % konfluenten Sf9-Zellen 25 % des FCS-haltigen durch Serum-freies SF-900 II Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Nach der nächsten Passage wurde das vorhandene Medium bei 50 % Konfluenz der Zellen durch 50 % Serum-freies SF-900 II Medium ersetzt und die Zellen wieder bis zur vollen Konfluenz weiter kultiviert. Diese Kultivierungsschritte wurden noch zweimal wiederholt, wobei dann jeweils 75 % bzw. 100 % Serum-freies Medium eingesetzt wurde.

### **2.5.7 Transfektion von Sf9-Zellen**

Zur Transfektion einer 10 cm-Zellkulturschale wurden zwei Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 10  $\mu\text{l}$  Bacmid-DNA; 200  $\mu\text{l}$  SF-900 II Insektenzellmedium

Lösung B: 12  $\mu\text{l}$  CellFECTIN<sup>®</sup>-Reagenz; 200  $\mu\text{l}$  SF-900 II Insektenzellmedium

Die beiden Lösungen wurden vereinigt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Sf9-Zellen 80-90 % konfluent, d.h. sie befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Nach dem Waschen der Zellen mit SF-900 II Medium erfolgte die Zugabe der miteinander inkubierten Transfektionslösungen A und B sowie 2 ml SF-900 II Medium. Nach fünfständiger Inkubation der Zellen bei  $27^{\circ}\text{C}$  wurde das Transfektionsgemisch gegen 4 ml SF-900 II Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden anschließend für mindestens 72 h bei  $27^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dieses Stadium diente hauptsächlich der Virusvermehrung, weniger der Proteinproduktion.

### **2.5.8 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren zur Proteinherstellung**

Für die Herstellung der Baculovirus-Stammlösung, die Amplifikation von rekombinanten Baculoviren und die anschließende Proteinexpression wurden Sf9-Monolayerkulturen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser verwendet.

### **2.5.8.1 Herstellung der Stammlösung rekombinanter Baculoviren**

Um die Vermehrung der rekombinanten Baculoviren zu gewährleisten, wurde der 72 h nach der Transfektion geerntete Sf9-Zellüberstand von jeweils 4 ml Volumen auf zwei neue Sf9-Zellkulturschalen verteilt und für weitere 48 h bei 27°C inkubiert. Diese Viruspassage wurde anschließend noch einmal wiederholt. Dabei wurde der jeweils eingesetzte Virus-haltige Zellüberstand mit dem SF-900 II Kulturmedium entsprechend aufgefüllt, um das für die Infektion der Sf9-Zellen nötige Kulturvolumen von insgesamt 10 ml zu erhalten. Nach jedem der beiden Virusvermehrungsschritte wurden 500 µl des jeweiligen Zellüberstands für eine TCA-Fällung (siehe 2.2.4.1) eingesetzt und die Proteinexpression wie unter 2.2.5 beschrieben analysiert. Die gewonnenen Virusamplifikate wurden abgenommen und für 5 min bei 110 x g zentrifugiert, um verunreinigende Zelltrümmer zu entfernen. Die nun vorliegende Baculovirus-Stammlösung wurde in ein frisches 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und bis zu ihrer Verwendung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Um die für die Proteinproduktion ideale Viruskonzentration zu ermitteln (siehe 2.5.8.2 und 2.5.8.3), wurden frische Sf9-Monolayerkulturen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung inkubiert.

### **2.5.8.2 Amplifikation von rekombinanten Baculoviren**

Eine geeignete Strategie, um Viren zu vermehren bzw. Virenstöcke zu vergrößern, ist der Einsatz von Virus-Lösungen mit einer niedrigen Virusmenge. Dadurch werden nicht alle Zellen gleichzeitig und unmittelbar, sondern nur ein kleiner Teil von ihnen infiziert. Diese Zellen replizieren dann ihrerseits den Virus und produzieren hinreichend viele Viruspartikel, um die restlichen Zellen in der Kultur zu infizieren. Diese sekundär infizierten Zellen sind dann die Hauptproduzenten der rekombinanten Baculoviren (Bruinzeel *et al.*, 2002).

Eine quantitative Bestimmung des Virustiters kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Eine klassische Methode, die zunächst auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, ist die Virusbestimmung durch einen Plaque-Assay. Dabei wird ein subkonfluent Monolayer mit den rekombinanten Baculoviren inkubiert und anschließend mit Agarose überschichtet. Diese Überschichtung sollte eine Beschränkung der Infektionsfoci zu den angrenzenden Zellen bewirken. Da jeder Plaque von einem infektiösen Partikel ausgehend entsteht, kann die Konzentration des infektiösen Virus in der eingesetzten Virusverdünnung durch das Auszählen dieser Plaques ermittelt werden. Bei der Durchführung dieser Methode war es wichtig, dass die getesteten Zellen gut an der Unterlage haften, so dass sie durch die Zugabe und das Entfernen der Viruslösung und die anschließende Überschichtung mit Agarose nicht

gestört oder sogar abgetötet werden. Vor allem diese Übersichtung der Zellen erfordert eine vorsichtige Temperaturkontrolle, da die Zellen keinen Hitzeschock oder den Zelltod erleiden dürfen (Lynn, 2002). Neben diesen methodischen Aspekten und dem erheblichen Zeitaufwand erwies sich die auftretende hohe Kontaminationsanfälligkeit als weiterer Nachteil, weshalb im Folgenden von einer Virustiterbestimmung durch diese Methode abgesehen wurde. Vielmehr kam in der vorliegenden Arbeit eine modifizierte Form der Endpunktverdünnung (Reed und Münch, 1983) zum Einsatz. Mit deren Hilfe wurde das infektiöse Potential der eingesetzten Virusverdünnung anhand der nach den entsprechenden gewählten Inkubationszeiten auftretenden, im Lichtmikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen bewertet.

Für die Virusamplifikation wurden Sf9-Zellen ausgewählt, die 60 % konfluent waren (Wong *et al.*, 1996). Diese Zellen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$ ) der hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Baculovirus-Stammlösungen infiziert und für 24 h bei 27°C inkubiert. Zeigt die Kultur nach dieser Inkubationszeit keine Anzeichen von eingestelltem Zellwachstum oder angeschwollenen Zellkörpern (Rosinski *et al.*, 2000), kann man erfahrungsgemäß von einer noch unzureichenden Menge an vorhandenen Viren ausgehen, d.h. es konnten noch nicht alle Zellen sekundär infiziert werden. Die Zellen können dann für weitere 24 h bei 27°C inkubiert werden. Da die Zellzahl nach dieser weiteren Inkubation nicht mehr anstieg und die Zellen eine deutliche Schwellung aufwiesen, konnte folglich davon ausgegangen werden, dass alle Zellen infiziert wurden und rekombinante Baculoviren produzieren (Rosinski *et al.*, 2000). Der Zellüberstand wurde daran anschließend abgenommen, für 5 min bei 110 x g zentrifugiert, um Zellverunreinigungen zu sedimentieren, und in ein frisches 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt. Die geernteten Baculoviren wurden bis zu ihrer Verwendung, d.h. der Infektion von Sf9-Zellen zur Expression der Zielproteine (siehe 2.5.8.3), lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

### **2.5.8.3 Proteinexpression durch rekombinante Baculoviren und Ernten der Sf9-Zellüberstände**

Für die Proteinproduktion bietet sich die synchrone Infektion der vorhandenen Insektenzellen an, d.h. die Infektion mit einer im Vergleich zur Virusamplifikation höheren Viruskonzentration. Wichtig ist jedoch, dass die Virusmenge nicht zu hoch gewählt ist, da die Zellen sonst sterben, bevor sie ihre ganzen Ressourcen für die Proteinexpression aufbrauchen konnten. Ideal ist die Infektion mit einer Virusmenge, die das Wachstum der infizierten Zellen sofort zum Stillstand führt, so dass Zellteilungsprozesse, die mit der Virusproduktion

und der daraus resultierenden Herstellung des rekombinanten Proteins um die essentiellen Nährstoffe konkurrieren könnten, verhindert werden (Dee und Shuler, 1997). Aus diesem Grund wurden anders als bei der Virusvermehrung höher konfluente Sf9-Monolayerkulturen ausgewählt, damit möglichst viele Zellen für die angestrebte Proteinproduktion zur Verfügung stehen (Wong *et al.*, 1996). Die Konfluenz sollte jedoch noch nicht erreicht sein, da bekannt ist, dass mit steigender Zelldichte zum Zeitpunkt der Infektion die spezifische Produktivität der Insektenzellen abnimmt, da dann die Nährstoffbereitstellung in der Kultur nur noch mangelhaft erfolgt, so dass der gesamte Replikationszyklus der Zellen verlangsamt abläuft und die Proteinexpression deutlich beeinträchtigt wird (Taticek und Shuler, 1997; Wong *et al.*, 1996).

Für die Proteinexpression wurden die Virus-haltigen Zellüberstände aus 2.5.8.2, die aus den unterschiedlich eingesetzten Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung ( $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$ ) resultieren, für die jeweilige Infektion einer Sf9-Monolayerkultur eingesetzt, um die für die Proteinproduktion geeignete Virusmenge zu ermitteln. Dabei wurden die jeweils bis zu 80 % konfluenten Sf9-Monolayerkulturen mit den einzelnen Virusamplifikaten für 48-72 h bei 27°C inkubiert, das pro Platte maximal 20 % des Zellkulturmediums ausmachte. Man kann davon ausgehen, dass in diesem gewählten Zeitraum, nach der Etablierung des Virus, seiner Replikation und der Übernahme der Biosyntheseprozesse der Sf9-Wirtszellen die Menge des hergestellten Proteinprodukts ihr Maximum erreicht (Rosinski *et al.*, 2002; Massotte, 2003). Nach dieser Inkubation wurde der jeweilige das lösliche ADAM10-Protein enthaltende Zellüberstand abgenommen, für 5 min bei 110 x g zentrifugiert und in ein frisches 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt.

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden jeweils 500-750 µl des entsprechenden Zellüberstands abgenommen und wie unter 2.2.5 beschrieben eingesetzt. Die Proteinkonzentration der geernteten Sf9-Zellüberstände wurde nach Bradford (siehe 2.2.3.1) ermittelt.

Für die weitere Proteinexpression wurden Virusamplifikate, die aus der Inkubation einer Sf9-Monolayerkultur mit der  $10^{-3}$  bzw. der  $10^{-4}$  Verdünnung der Baculovirus-Stammlösung hervorgingen, für die Infektion jeweils neuer Sf9-Monolayerkulturen eingesetzt. Die daraus resultierenden Zellüberstände wurden geerntet (5 min bei 110 x g) und bis zur Aufreinigung der jeweils darin enthaltenen ADAM10-Proteine (siehe 2.6.1) bei -20°C aufbewahrt.

## 2.6 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 2.6.1 Reinigung der ADAM10-Proteine aus Sf9-Monolayerkulturüberständen

#### **2.6.1.1 Aufkonzentration der Sf9-Zellüberstände mit Amicon Ultra Konzentratoren**

Vor der eigentlichen Reinigung wurden die geernteten Überstände von hADAM10s- und hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Zellen mit Hilfe von Amicon Ultra Konzentratoren der Firma Millipore nach Angaben des Herstellers bei 4°C aufkonzentriert und entsalzt. Aufgrund der Molekulargewichte von hADAM10s (ca. 60 kDa prozessiert, ca. 80 kDa unprozessiert) und hADAM10splice (ca. 50 kDa prozessiert, ca. 70 kDa unprozessiert) wurden die Filtrationsröhrchen mit einer Porengröße von 100 kDa bzw. 30 kDa seriell eingesetzt. So wurden zunächst entsprechende Proteinverunreinigungen >100 kDa aus den Sf9-Überständen mit Hilfe des 100 kDa-Konzentrators entfernt. Der aus diesem Schritt resultierende Filtrationsdurchfluss wurde anschließend durch einen Konzentrator mit einer Filterporengröße von 30 kDa weiterbehandelt, so dass auf diese Weise noch eine Aufkonzentration des Zielproteins erreicht werden konnte.

Für einen Vorversuch wurden 90 ml Zellüberstände von 10 hADAM10s- bzw. 64 ml von 8 hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen aufkonzentriert. Die Proteinmenge wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.3.1). Von den 1,8 ml hADAM10s (ca. 358 µg Protein) bzw. den 2,9 ml hADAM10splice 30-100 kDa-Konzentrat (ca. 300 µg Protein) wurden jeweils 100 µl nach Chloroform-Fällung (siehe 2.2.4.1) für die Proteinanalyse (siehe 2.2.5) eingesetzt. Anschließend wurde das vorliegende hADAM10s bzw. hADAM10splice 30-100 kDa-Konzentrat mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von hADAM10s bzw. hADAM10splice (siehe 2.6.2.2) wurden 50 µl des jeweiligen 30-100 kDa-Konzentrats eingesetzt.

#### **2.6.1.2 Reinigung durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie**

Für die spezifische Reinigung der ADAM10-Proteine über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie wurde die Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen ausgewählt (Bindungskapazität 5–10 mg Protein mit Histidin<sub>6</sub>-Epitop/ml). Das Prinzip der Aufreinigung besteht darin, dass das exprimierte Protein über die Imidazolringe des Poly-Histidin-Epitops durch deren Komplexbildung durch die Nickel-Ionen an die Ni-NTA-Matrix gebunden wird.

Durch die Zugabe an freiem Imidazol in hohen Konzentrationen kann das Protein durch die Verdrängung von den Nickel-Ionen von der Säulenmatrix eluiert werden.

Für die jeweiligen Reinigungen wurden mehrere Überstände von hADAM10s- bzw. hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen vereinigt und über seriell eingesetzte 100 und 30 kDa Amicon Ultra Konzentratoren eingengt (siehe 2.6.1.1). Die Inkubation des jeweiligen hADAM10s bzw. hADAM10splice 30-100 kDa-Konzentrats mit der Ni-NTA-Agarose erfolgte für 2 h bei 4°C. Anschließend wurde das Säulenmaterial in eine Glas-Chromatographiesäule überführt. Das Entsalzen der jeweiligen Eluatfraktionen erfolgte unmittelbar nach der durchgeführten Affinitätschromatographie.

Für die unter 2.2.5 beschriebene Proteinanalyse wurden vom jeweiligen Säulendurchfluss bzw. von den einzelnen Eluat- und Waschfraktionen je 100 µl nach Chloroform-Fällung (siehe 2.2.4.1) eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe 2.2.3.1). Die enzymatische Aktivität der in der Probe vorliegenden Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurde wie unter 2.6.2.2 beschrieben bestimmt.

Die Lagerung der jeweiligen Proteinlösungen erfolgte bei 4°C.

#### Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol:

Für diese Reinigung wurden 100 ml Zellüberstand von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen auf 3 ml aufkonzentriert (ca. 729 µg Protein). Das hADAM10s-Konzentrat wurde mit 800 µl Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Säulenmaterials mit 3 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol) wurde hADAM10s durch die dreimalige Inkubation des Säulenmaterials mit jeweils 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol) eluiert.

Die 1,5 ml Eluatfraktion 1 wurden mit Hilfe eines Amicon Ultra Konzentratoren mit 30 kDa Porengröße auf 280 µl, die vereinigten 5 ml Eluatfraktionen 2-5 (E 2-5) auf 400 µl aufkonzentriert und jeweils mit einer äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) versetzt.

#### Elutionspuffer mit 400 mM Imidazol:

Ein Drittel des 2,8 ml hADAM10s 30-100 kDa-Konzentrats (ca. 138 µg Protein) aus 96 ml Sf9-Monolayerkulturüberständen wurde mit 250 µl Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach zweimaligem Waschen des Säulenmaterials mit 1,5 ml Waschpuffer wurde hADAM10s eluiert. Dafür wurde das Säulenmaterial dreimal mit jeweils 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 500 mM NaCl; 400 mM Imidazol) inkubiert.

Da in dieser Versuchsphase die Expression von hADAM10splice nicht so stark erfolgte, wurde das komplette aus 136 ml Zellüberständen hergestellte hADAM10splice-Konzentrat von 4,5 ml (441 µg) mit 900 µl Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Säulenmaterials mit 4 ml Waschpuffer erfolgte die Elution von hADAM10splice durch die fünfmalige Inkubation des Säulenmaterials mit jeweils 1 ml Elutionspuffer.

Das Entfernen des Imidazols aus den jeweiligen Eluatfraktionen erfolgte mit Hilfe von NAP-10 Gelfiltrationssäulchen der Firma Amersham Pharmacia nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden die einzelnen Eluatfraktionen von jeweils 1 ml auf das entsprechende NAP-10 Gelfiltrationssäulchen gegeben. Nach dem Einlaufen der jeweiligen Probe wurde sie mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer eluiert.

### Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol:

Die Hälfte des aus 90 ml Zellüberständen von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen hergestellte 30-100 kDa-Konzentrat von 1,8 ml (ca. 358 µg Protein) wurde mit 500 µl Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Säulenmaterials mit 3 ml Waschpuffer erfolgte die Elution von hADAM10s. Dafür wurde das Säulenmaterial fünfmal mit jeweils 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 500 mM NaCl; 250 mM Imidazol) inkubiert.

Die 1,5 ml der Eluatfraktion 1 (E 1) wurden mit Hilfe eines Amicon Ultra Konzentratoren mit 30 kDa Porengröße auf 500 µl, die vereinigten 7,5 ml Eluatfraktionen 2-5 (E 2-5) auf 800 µl aufkonzentriert und jeweils mit einer äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer versetzt.

### Wasch- und Elutionspuffer mit 100 mM Natriumchlorid:

Für diese Reinigung wurden die 90 ml Zellüberstand von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen auf 1,8 ml (ca. 358 µg Protein), die 64 ml von hADAM10splice-exprimierenden auf 2,9 ml (ca. 300 µg Protein) eingengt. Die Hälfte des hADAM10s 30-100 kDa-Konzentrats wurde mit 500 µl bzw. ein Drittel des hADAM10splice-Konzentrats mit 250 µl Ni-NTA-Agarose inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen des Säulenmaterials mit 3 (hADAM10s) bzw. 1,5 ml (hADAM10splice) Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 100 mM NaCl; 20 mM Imidazol) erfolgte die Elution der Zielproteine. Dafür wurde das Säulenmaterial fünfmal mit jeweils 1,5 ml (hADAM10s) bzw. dreimal mit 1 ml (hADAM10splice) Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 100 mM NaCl; 300 mM Imidazol) inkubiert.

Die 1,5 ml hADAM10s Eluatfraktion 1 (E 1) wurde mit Hilfe eines 30 kDa Amicon Ultra Konzentrators auf 300 µl, die 7,5 ml der vereinigten Eluatfraktionen 2-5 (E 2-5) auf 700 µl aufkonzentriert. Die drei 1 ml hADAM10splice Eluate wurden mittels NAP-10 Gelfiltrationsröhrchen mit der entsprechenden Menge an Enzym-Assaypuffer entsalzt.

### **2.6.1.3 Reinigung durch Lektin-Affinitätschromatographie**

Neben der spezifischen Reinigung der in den Sf9-Insektenzellen exprimierten ADAM10-Proteine über das Histidin-Epitop erfolgte die Reinigung mittels einer Lektin-Affinitätschromatographie über Concanvalin A Sepharose 4B (Sigma; Bindungskapazität 20-45 mg Thyroglobulin/ml). Das Lektin Concanvalin A besteht aus identischen Untereinheiten mit 237 Aminosäureresten ohne kovalent gebundene Kohlenhydrate oder andere prosthetische Gruppen. Es liegt als Dimer vor (53 kDa) und erreicht seine optimale Aktivität bei einem pH-Wert von 7. Pro Monomer bindet Concanvalin A zwei Metall-Ionen,  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ , die für die Saccharidbindung essentiell sind und durch die entsprechenden Puffer bereitgestellt werden müssen. Die Bindung erfolgt an  $\alpha$ -D-Glucose und  $\alpha$ -D-Mannose, wohingegen Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid als kompetitiver Inhibitor des Lektins wirkt, so dass das gebundene Zielprotein damit eluiert werden kann.

Die Äquilibrierung der Concanvalin A Sepharose 4B erfolgte mit Puffer A ohne  $NaN_3$  (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ ; 0,1 % (v/v) Triton X-100). Für die sich der jeweiligen Reinigung anschließenden Proteinanalyse wurden, wie unter 2.2.5 beschrieben, von den entsprechenden Eluaten jeweils 100 µl nach Chloroform-Fällung (siehe 2.2.4.1), von den einzelnen Waschfraktionen bzw. vom Säulendurchfluss jeweils 250 µl nach TCA-Fällung (siehe 2.2.4.2) eingesetzt. Der Nachweis der Zielproteine hADAM10s und hADAM10splice erfolgte durch Visualisierung mittels Silberfärbung (siehe 2.2.1) bzw. immunologisch über das Poly-Histidin-Epitop (siehe 2.2.2). Die enzymatische Aktivität der gereinigten Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurde wie unter 2.6.2.2 beschrieben bestimmt.

### **Reinigung im analytischen Maßstab:**

Für die analytische Aufreinigung von hADAM10s und hADAM10splice wurden jeweils 64 ml Zellüberstände von den mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus infizierten Sf9-Monolayerkulturen über seriell eingesetzte 100 und 30 kDa Amicon Ultra Konzentratoren (siehe 2.6.1.1) auf 3 ml aufkonzentriert (hADAM10s-Konzentrat: ca. 282 µg Protein; hADAM10splice-Konzentrat: ca. 253 µg Protein) und mit der gleichen Menge an Enzym-

Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) versetzt. Ein Drittel des jeweiligen Ansatzes (hADAM10s-Konzentrat: ca. 94 µg Protein; hADAM10splice-Konzentrat: ca. 84 µg Protein) wurde mit je 750 µl Concanvalin A Sepharose 4B für 18 h bei 4°C schüttelnd inkubiert und anschließend in eine Glas-Chromatographiesäule überführt. Das Säulenmaterial wurde je dreimal mit 4 ml Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>), Puffer B (Puffer A ohne Triton X-100) und Puffer C (Puffer B mit 0,3 % (v/v) CHAPS) gewaschen. Die Elution der gebundenen Glykoproteine erfolgte durch zweistündige Inkubation des Säulenmaterials bei Raumtemperatur mit 2,5 ml 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid in Puffer C. Das 2,5 ml hADAM10s-Eluat wurde mit Hilfe eines 30 kDa Amicon Konzentrators auf 200 µl, das 2,1 ml hADAM10splice-Eluat auf 500 µl eingengt. Die aufkonzentrierte hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Lösung wurde jeweils mit der äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Für die Überprüfung der Enzymaktivität von hADAM10s bzw. hADAM10splice wurden jeweils 25 µl der entsprechenden Proteinlösung eingesetzt.

### Reinigung im präparativen Maßstab:

Für die Reinigung im präparativen Maßstab wurden von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen 248 ml, von hADAM10splice-exprimierenden 376 ml Zellüberstand eingesetzt und aufkonzentriert (siehe 2.6.1.1). Von den einzelnen 30-100 kDa-Konzentraten (9 ml hADAM10s- bzw. 8 ml hADAM10splice-Konzentrat) wurde je ein Aliquot von 1 ml (hADAM10s-Konzentrat: ca. 128 µg Protein; hADAM10splice-Konzentrat: 222 µg Protein) mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer versetzt und, wie unter 2.2.5 beschrieben, für die Proteinanalyse verwendet.

Für die Reinigung wurden die 8 ml des hADAM10s-Konzentrats (ca. 1 mg Protein) nach der Zugabe von 2 ml Enzym-Assaypuffer mit 1 ml Concanvalin A Sepharose 4B, die 7 ml des hADAM10splice-Konzentrats (ca. 1,6 mg Protein) nach der Zugabe von 3 ml Enzym-Assaypuffer mit 1,5 ml Concanvalin A Sepharose 4B versetzt, für 18 h bei 4°C schüttelnd inkubiert und anschließend in eine Glas-Chromatographiesäule überführt. Das Säulenmaterial wurde analog der analytischen Reinigung jeweils dreimal mit 6 ml Puffer A, Puffer B bzw. Puffer C gewaschen. Die Elution von hADAM10s erfolgte nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 6 ml, die von hADAM10splice durch 5 ml 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid in Puffer C. Das 8 ml hADAM10s-Eluat (ca. 400 µg) wurde mit Hilfe eines 30 kDa Amicon Konzentrators auf 2,5 ml, das 7 ml hADAM10splice-Eluat (ca. 660 µg Protein) auf 3,5 ml eingengt. Die aufkonzentrierten Eluate wurden jeweils mit der

äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer versetzt. Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden von der hADAM10s-Proteinlösung 25 µl, von der hADAM10splice-Lösung 45 µl eingesetzt.

Die Menge der in der Proteinlösung vorliegenden prozessierten Form von hADAM10s bzw. hADAM10splice wurde mit Hilfe bekannter Mengen des ungefärbten SDS-PAGE-Standard Low Range der Firma Biorad nach erfolgter SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung abgeschätzt (siehe 2.2.3.2). Anschließend wurden die hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Proteinlösungen aliquotiert, in der Speed Vac-Zentrifuge lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

## **2.6.2 Charakterisierung der löslichen ADAM10-Proteine**

### **2.6.2.1 Deglykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice**

Zur Untersuchung, wie stark die in Sf9-Zellen exprimierten Proteine hADAM10s und hADAM10splice glykosyliert sind, wurde die Deglykosylierung durch die Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) durchgeführt. Dieses Enzym spaltet Glykoproteine zwischen dem innersten N-Acetylglucosaminrest und Asparagin.

Für die Deglykosylierung wurden 500 µl des jeweiligen Sf9-Zellüberstands einer TCA-Fällung (siehe 2.2.4.2) unterzogen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl Glykoprotein-Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol; NEB) aufgenommen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 1/10 Volumen 10 x G7-Puffer (0,5 M Natriumphosphat; pH 7,5; NEB) und 1/10 Volumen 10 % Nonidet P-40 (NEB) wurde die Probe für 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der beiden löslichen hADAM10-Varianten durch Western Blot Analyse (siehe 2.2.2) mit Hilfe des anti-Penta-His Antikörpers (Qiagen).

### **2.6.2.2 Enzymtest und Enzymtestanalyse durch High Performance Liquid**

#### **Chromatography (HPLC)**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Enzymtests erfolgten in Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris-HCl, pH 9; 2,5 µM ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) in einem Endvolumen von 50 µl. Die Enzyme hADAM10s, hADAM10splice und hADAM10s (R&D-Systems) wurden pro Enzymtest in einer Konzentration von 100 nM (entspricht ca. 300 ng Enzym/50 µl Ansatz), die jeweiligen Peptidsubstrate in einer Endkonzentration von 30 µM eingesetzt. Der für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 spezifische Peptid-Inhibitor GW 280264 X

(GlaxoSmithKline) wurde in einer Endkonzentration von 20 nM, das für die spezifische Inhibierung von ADAM10 verantwortliche Hydroxamatsäure-Derivat GI 254023 X (GlaxoSmithKline) in einer Endkonzentration von 10 nM ( $IC_{50} = 5,3$  nM für ADAM10; Hundhausen *et al.*, 2003) eingesetzt.

Zur qualitativen Bestimmung der enzymatischen Aktivität der in Sf9-Insektenzellen exprimierten Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurde das Peptidsubstrat APP18 eingesetzt. Die Peptidsequenz dieses Substrats entspricht den Aminosäuren 11-28 des A $\beta$ -Peptids und trägt somit die für die  $\alpha$ -Sekretase bzw. ADAM10 spezifische Spaltstelle des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) (Esch *et al.*, 1990).

Für die Charakterisierung der löslichen hADAM10-Proteine wurden neben APP18 die Substrate APP18-Flemish, APP18-Dutch, APP18-Italian und APP18-Arctic sowie das Peptid A $\beta$ 40 und die entsprechenden Mutanten A $\beta$ 40A21G, A $\beta$ 40E22Q, A $\beta$ 40E22K und A $\beta$ 40E22G eingesetzt (Peptidsequenzen siehe 3.4.2, Tabelle 3.3). Pro Peptidsubstrat wurde mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Untersuchung des unterschiedlichen Spaltverhaltens von hADAM10s (R&D-Systems) bezüglich muriner und humaner A $\beta$ -Peptide wurde humanes A $\beta$ 40 (Bachem) und A $\beta$ 40 der Ratte (Calbiochem) eingesetzt. Bei diesem Versuch wurde ebenfalls pro Peptidsubstrat mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Der jeweilige Enzymtest erfolgte bei der qualitativen Spaltung für 30 min, 6 h bzw. 18 h, bei der quantitativen Spaltung für 6 h bei 37°C und wurde durch die Zugabe von 2  $\mu$ l Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt.

Die Analyse der enzymatischen Spaltung erfolgte mittels einer HPLC-Apparatur der Firma Merck-Hitachi. Die Auftrennung der eingesetzten Peptide erfolgte über eine Vydac RP C18-HPLC-Säule 5  $\mu$ m (4.6 x 250 mm) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min durch folgenden Gradienten:

0–5 min:	0 % Puffer B
5–45 min:	0–70 % Puffer B
45–50 min:	70–100 % Puffer B
50–65 min:	100 % Puffer B
65–70 min:	100–0 % Puffer B

Bei der verwendeten HPLC-Apparatur der Firma Merck-Hitachi wurden die HPLC-Puffer A und B (siehe 2.1.12) entsprechend der oben angegebenen Flussrate gefördert und hinter der L-6220 Intelligent Pumpe vermischt. Der Probenauftrag erfolgte manuell über ein

Injektionsventil. Nach der Probeninjektion wurde die mobile Phase über die Chromatographiesäule geleitet und zum L-4250 UV-VIS Detektor geführt. Dort wurde die UV-Absorption der aufgetragenen Peptide bei 220 nm bestimmt. Dokumentiert wurde der Chromatographie-Lauf von einem D-2500 A Chromato-Integrator.

### **2.6.2.3 Inkubation von U373 hwt APP-Zellen mit den Zellüberständen von hADAM10s- und hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Zellen**

Zur Überprüfung, welchen Einfluss die in Sf9-Insektenzellen exprimierten löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice auf die APPs $\alpha$ -Produktion im Zellsystem haben könnten, wurde die neuronale Zell-Linie U373, die humanes wildtyp (hwt) APP stabil exprimiert mit den entsprechenden Insektenzellüberständen inkubiert.

Für diese Versuche wurden jeweils eine konfluente U373 hwt APP-Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser mit dem Zellüberstand einer hADAM10s-, einer hADAM10splice-exprimierenden bzw. einer nicht-infizierten Sf9-Monolayerkultur inkubiert. Die jeweils 8 ml Sf9-Zellüberstand wurden dafür mit Hilfe der seriell eingesetzten 100 und 30 kDa Amicon Ultra Konzentratoren nach Angaben des Herstellers auf 1,5 bis 2 ml aufkonzentriert (siehe 2.6.1.1) und mit einer entsprechenden Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris-HCl, pH 9; 2,5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) auf ein Endvolumen von 3 ml eingestellt. Die enzymatische Aktivität des jeweiligen ADAM10-Protein-Konzentrats wurde wie unter 2.6.2.2 beschrieben überprüft.

Zur Versuchsvorbereitung wurden die U373-Zellen zwei- bis dreimal mit MEM-Zellkulturmedium ohne FCS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 4 h bei 37°C mit 1,5 ml des jeweiligen 30-100 kDa-Konzentrats und 1,5 ml MEM; 1 % (v/v) NEAA; 1 % (v/v) Natriumpyruvat; 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) inkubiert.

Als Kontrollexperiment erfolgte die Inkubation von U373 hwt APP-Zellen mit löslichem humanem ADAM10 der Firma R&D-Systems. Dafür wurden die Zellen mit 300 bzw. 900 ng hADAM10s in 3 ml MEM; 1 % (v/v) NEAA; 1 % (v/v) Natriumpyruvat; 1 % (v/v) Fettsäure-freies BSA (1 mg/ml) für 4 h bei 37°C inkubiert.

An die Inkubationszeit anschließend wurden die Zellüberstände abgenommen und für 5 min bei 110 x g zentrifugiert, um mögliche Zelltrümmer zu entfernen. Der jeweilige Überstand wurde in ein neues Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und einer TCA-Fällung (siehe 2.2.4.2) unterzogen. Das getrocknete Pellet wurde in 40  $\mu$ l 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 2.1.12), 32  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 8  $\mu$ l 1 M DTT aufgenommen und für 10 min bei 100°C inkubiert.

Die Analyse der Zellüberstände erfolgte durch Auftrennung der Proben in einem 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel (siehe 2.2.1), der Nachweis und die Quantifizierung des in den jeweiligen Überständen vorhandenen APPs $\alpha$  erfolgte durch Western Blot Analyse mit Hilfe des Erstantikörpers 6E10 der Firma Signet Laboratories und des <sup>35</sup>S-anti-Maus-Zweitantikörpers (siehe 2.2.2).

Die inkubierten U373 hwt APP-Zellen wurden mit 2 ml eiskaltem PBS und einem Cellscraper von der Platte gelöst. Nach der Zentrifugation bei 800 x g für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 300  $\mu$ l eiskaltem PBS resuspendiert. Von dem gelösten Pellet wurden 50  $\mu$ l abgenommen, mit 450  $\mu$ l Ameisensäure versetzt und für die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3.1) eingesetzt. Das restliche Zellpellet wurde bei -20°C nach Entfernen des PBS durch erneute Zentrifugation aufbewahrt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 EXPRESSION VON LÖSLICHEN ADAM10-PROTEINEN IN SÄUGETIERZELLEN

Für die Überexpression des extrazellulären Teils von bovinem bzw. humanem ADAM10 und einer Splicevariante von humanem ADAM10 (Yavari *et al.*, 1998) wurden neben dem Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem (siehe 3.2) auch Säugetierzellen eingesetzt. Der extrazelluläre Teil des Enzyms zeichnet sich durch das Fehlen der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne aus (entspricht den Aminosäuren 1-664 des insgesamt 748 Aminosäuren langen Proteins), während der Splicevariante zusätzlich noch die Cystein-reiche Domäne fehlt (entspricht den Aminosäuren 1-565). Die entsprechende ADAM10-DNA wurde dafür in unterschiedliche Expressionsvektoren eingebracht (siehe 2.4.1).

Alle hergestellten DNA-Konstrukte wurden zur Transformation des *E. coli*-Stamms DH5 $\alpha$  verwendet (siehe 2.3.11). Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse der Plasmidminipräparations-DNA (siehe 2.3.3 und 2.3.4) ermittelt. Um Verschiebungen im Leserahmen auszuschließen wurden entsprechende Abschnitte der DNA-Konstrukte sequenziert (siehe 2.3.12). Die so kontrollierten DNA-Konstrukte wurden daraufhin für die Transfektion von Säugetierzellen eingesetzt.

##### 3.1.1 Transfektion verschiedener Zelllinien mit pcDNA3-hADAM10s-His und pSecTag2C-hADAM10s-His

Mit den beiden Expressionsplasmiden pSecTag2C-hADAM10s-His und pcDNA3-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.1. und 7.2.2; Abb. 7.11 und 7.12) wurden HEK293-, COS- und CHO-Zellen transfiziert, um eine für die Expression geeignete Zelllinie zu ermitteln. Dabei erfolgte die transiente und stabile Transfektion der Zelllinien HEK293 und CHO nach der Calciumphosphatmethode (siehe 2.4.4.1) und mit Hilfe des LIPOFECTAMIN<sup>TM</sup> 2000-Reagenz (siehe 2.4.4.4), COS-Zellen wurden transient nach der DEAE-Dextran-Methode (siehe 2.4.3.2) transfiziert.

Im Falle des Expressionsvektors pSecTag2C, der sich von dem Expressionsvektor pcDNA3 ableitet, steht die inklonierte DNA von löslichem humanem ADAM10 unter der Kontrolle des starken Cytomegalovirus-Promotors (CMV), der eine kontinuierliche Expression des rekombinanten Proteins bewirken soll (Andersson *et al.*, 1989; Boshart *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987). Für die Sekretion des Genprodukts sorgt die Signalsequenz der

Maus-Ig $\kappa$ -Kette (Coloma *et al.*, 1992). Die Selektion stabil transfizierter Zellen konnte hier durch 0,5 mg Zeozin<sup>TM</sup>/ml Zellkulturmedium erfolgen.

Parallel wurde das Konstrukt pcDNA3-hADAM10s-His eingesetzt, da mit diesem einfachen Expressionsvektor das komplette bovine ADAM10 erfolgreich exprimiert werden konnte. Die inklonierte DNA steht bei diesem Expressionsvektor ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors, die Sekretionssignalsequenz der murinen Ig $\kappa$ -Kette fehlt. Die mit dem pcDNA3-Konstrukt stabil transfizierten Zellen konnten mit 1,25 mg G 418-Sulfat/ml Zellkulturmedium selektiert werden.

Der Einsatz beider Vektoren diente zur Überprüfung, ob durch das pSecTag2C Sekretionssignal tatsächlich eine höhere Expression des Zielproteins erreicht werden könnte. Dafür erfolgte die Analyse der Proteinexpression nach der Inkubation der Zellen für 4 bzw. 24 h im Serum-freien Kulturmedium (siehe 2.5.4) durch Western Blot Analyse (siehe 2.2.2) mit Hilfe des  $\alpha$ -Penta-His-Antikörpers der Firma Qiagen.

Durch den Einsatz dieser beiden Expressionskonstrukte war es nach transienter Transfektion der oben genannten Zelllinien nicht möglich, lösliches ADAM10 nachzuweisen. Auch eine stabile Expression von hADAM10s konnte trotz der erfolgreichen Selektion mit dem jeweiligen Antibiotikum im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen nicht erreicht werden. Aufgrund der mangelnden Proteinproduktion durch die eingesetzten Expressionsplasmide kamen als Alternative zu diesen drei weitere Expressionssysteme für die Herstellung löslicher ADAM10-Proteine zum Einsatz.

### 3.1.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit den pIRES-Konstrukten

Für die Expression der extrazellulären Domäne von bovinem und humanem ADAM10 bzw. der Splicevariante von humanem ADAM10 in HEK293-Zellen wurde der Expressionsvektor pIREShyg1 eingesetzt (siehe 2.4.1.2 und 7.2.2, Abb. 7.13 bis 7.15). Bei diesem Vektor liegt die inklonierte ADAM10-DNA zusammen mit einem Hygromycin-Resistenzgen in der gleichen Expressionskassette unter der Kontrolle des starken Cytomegalovirus-Promotors (CMV) vor. Das Resistenzgen steht somit nicht wie bei den unter 3.1.1.1 beschriebenen Expressionsplasmiden unter der Kontrolle eines eigenen Promotors (P<sub>SV40</sub>).

Eine weitere Besonderheit dieses Expressionsvektors ist die vorhandene „internal ribosomal entry site“ (IRES) des Encephalomyocarditis Virus (ECMV), die diesem Vektor seinen Namen gibt. Dieser Sequenzabschnitt erlaubt die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA, so dass dadurch die Ribosomen sowohl am 5'-Ende an die

bicistronische mRNA, um das Zielgen als auch an der ECMV IRES binden können, um den antibiotischen Resistenzmarker zu exprimieren. Durch das Antibiotikum Hygromycin B sollte somit der Selektionsdruck auf die gesamte Expressionskassette wirken und in der gleichmäßigen Expression beider Gene resultieren.

Die transiente und stabile Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte sowohl durch die Calciumphosphatmethode (siehe 2.4.4.1) als auch mit Hilfe des LIPOFECTAMIN<sup>TM</sup> 2000-Reagenz (siehe 2.4.4.4).

Nach transientscher Transfektion von HEK293-Zellen konnte weder im Zellkulturüberstand noch im Zelllysats die Expression der ADAM10-Proteine nachgewiesen werden. Stabil transfizierte HEK293-Zellen ließen sich im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen mit dem Antibiotikum Hygromycin B (0,4 mg/ml Zellkulturmedium) selektieren, ohne jedoch das gewünschte Protein zu exprimieren. Auch nach der Vereinigung mehrerer Zellüberstände für die proteinchemische Analyse konnten die Zielproteine im Western Blot mit dem spezifischen anti-Penta-His-Antikörper gegen das Poly-Histidin-Epitop nicht nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die auf die pIRESHyg1-Konstrukte basierenden Expressionsversuche nicht weiter verfolgt.

### 3.1.3 Transfektion von FlpIn<sup>TM</sup>293-Zellen mit den pcDNA5/FRT-Konstrukten

Als ein weiteres Expressionssystem wurde das FlpIn<sup>TM</sup>-System der Firma Invitrogen eingesetzt. Dabei wurden die unter 2.4.1.3 beschriebenen DNA-Konstrukte (siehe 7.2.2, Abb. 7.16 bis 7.18) für die Transfektion der FlpIn<sup>TM</sup>293-Zellen mit Hilfe des LIPOFECTAMIN<sup>TM</sup> 2000-Reagenz (siehe 2.4.4.4) eingesetzt. Diese Zellen unterscheiden sich von HEK293-Zellen durch das Vorhandensein einer „Flp Recombination Target“-Stelle (FRT-Stelle) im Genom. Das zu exprimierende Gen wird an dieser definierten Position durch DNA-Rekombination in das Genom der FlpIn<sup>TM</sup>293-Zellen integriert, was dadurch gewährleistet wird, dass zum einen der Expressionsvektor pcDNA5/FRT ebenfalls eine solche FRT-Stelle trägt und zum anderen die dafür nötige Rekombinase durch Kotransfektion mit dem entsprechenden Expressionsplasmid pOG44 (9 µg zu 1 µg Ziel-DNA) *in trans* bereitgestellt wurde. Zusammen mit der Ziel-DNA erfolgt auch die Insertion des im pcDNA5/FRT-Vektor vorhandenen Hygromycin B-Resistenzgens in das Genom der Wirtszelle, wobei dessen Expression mit der des Zielgens gekoppelt ist. Da dem Hygromycin B-Resistenzgen der Promotor und das ATG Initiationscodon fehlen, wird seine Expression nur durch die erfolgreiche Insertion ins Wirtsgenom im Leserahmen zum entsprechenden Promotor SV40 und dem Initiationscodon gewährleistet. Die Expression des

Zielgens steht dabei wieder unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors, der sich an das Hygromycin B-Resistenzgen anschließt.

Tatsächlich war nach der stabilen Transfektion von FlpIn™293-Zellen mit den bADAM10s-, hADAM10s- und hADAM10splice-Konstrukten eine Selektion mit dem Antibiotikum Hygromycin B (0,4 mg/ml Zellkulturmedium) im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen möglich, d.h. die Ziel-DNA sollte erfolgreich in das Genom dieser modifizierten HEK-Zellen integriert worden sein. Allerdings konnte hier, wie auch nach der transienten Transfektion keines der ADAM10-Konstrukte immunologisch nachgewiesen werden.

### 3.1.4 Transfektion von HEK-EBNA-Zellen mit den pCEP4-Konstrukten

Zunächst wurde das für diese Expressionsversuche eingesetzte lösliche humane ADAM 10-Protein mit der konstanten Region des IgG1-Antikörpers der Maus (mIgG1-Fc) fusioniert (siehe 2.4.1.4 und 7.2.2, Abb. 7.20). Dieser Versuchsansatz wurde aufgrund der erfolgreichen Charakterisierung des nahe verwandten ADAM 17 (TACE) mit Hilfe dieses Expressionsplasmids gewählt (Rosendahl *et al.*, 1997). Parallel wurde ein Expressionsplasmid hergestellt, in dem die DNA des löslichen humanen ADAM10 mit einer Poly-Histidin-Epitop codierenden Sequenz fusioniert wurde (siehe 2.4.1.4 und 7.2.2, Abb. 7.19).

Mit Hilfe des Expressionsvektors pCEP4 sollten dieses beiden Fusionsproteine in der HEK-EBNA-Zelllinie überexprimiert werden, wobei es sich um eine modifizierte Form der üblichen HEK293-Zellen handelt. Diese Zellen zeichnen sich durch die stabile Expression des Epstein Barr Virus (EBV) EBNA-1 Gens (Selektion erfolgt durch G 418-Sulfat) aus. Der Vektor pCEP4 dagegen enthält einen EBV-Replikationsursprung, so dass auf diese Weise die extrachromosomale Expression des Zielgens ermöglicht werden soll.

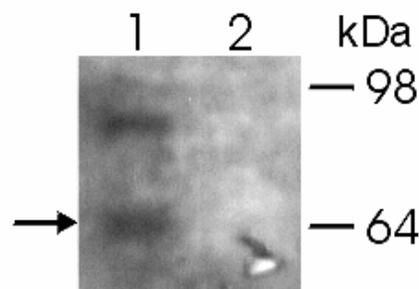
Der Nachweis und die Aufreinigung des überexprimierten löslichen humanen ADAM10 sollte im Fall der konstanten Antikörperregion (Fc) des murinen IgG1 mit Hilfe einer Protein A/G-Sepharosematrix, im Fall des Poly-Histidin-Epitops mittels Nickel-NTA-Sepharose erfolgen.

Mit den beiden Konstrukten pCEP4-hADAM10s-His und pCEP4-hADAM10s-mIgG1Fc wurden HEK-EBNA-Zellen transient und stabil nach der Calciumphosphatmethode (siehe 2.4.3.1) und mit Hilfe des Roti®-Fect-Reagenz (siehe 2.4.3.3) transfiziert. Die Selektion der stabil transfizierten HEK-EBNA-Zellen erfolgte durch die Antibiotika Hygromycin B (bis zu 0,4 mg/ml Zellkulturmedium; Resistenzgen wurde durch pCEP4 bereitgestellt) und G 418-Sulfat (1,25 mg/ml Zellkulturmedium).

Für den Nachweis der Proteinexpression wurden die Zellen für 4 h bzw. 24 h in Serum-freiem DMEM-Kulturmedium kultiviert. Wie schon bei den anderen Transfektionsversuchen beobachtet wurde, war es auch hier möglich, die stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen mit Hygromycin B und G 418-Sulfat zu selektieren, ohne die Expression der ADAM10-Proteine nachweisen zu können. Der Vektor wurde offensichtlich erfolgreich in die Zellen eingebracht und exprimierte auch das entsprechende Resistenzgenprodukt, wohingegen die löslichen hADAM10-Varianten in zu geringen Mengen vorlagen.

Um auszuschließen, dass das jeweilige von einer Monolayerkultur hergestellte ADAM10-Protein unterhalb der Nachweisgrenze vorlag, wurden für die Proteinanalyse die Zellüberstände von bis zu fünf mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten HEK-EBNA-Monolayerkulturen (10 cm Durchmesser) vereinigt. Diese Überstände wurden zum einen direkt, zum anderen nach ihrer Vorreinigung und Aufkonzentration durch die Inkubation mit Protein A/G-Sepharose (Fc-Reinigungsepitop) bzw. einer Nickel-NTA-Matrix (Poly-Histidin-Tag) analysiert. Doch auch nach dieser Behandlung war kein Nachweis von hADAM10s im Western Blot (siehe 2.2.2) möglich.

Dagegen konnte nach der transienten Transfektion von HEK-EBNA-Zellen mit pCEP4-hADAM10s-His lösliches humanes ADAM10 nachgewiesen werden. In Abbildung 3.1 ist die reife Form von hADAM10s, d.h. nach Entfernen der Prodomäne bei ca. 64 kDa, die unreife, nicht prozessierte Form bei ca. 80 kDa in Spur 1 zu erkennen. Allerdings war die Expressionsrate des Proteins hier so gering, dass sich diese Methode für eine Überexpression der ADAM10-Proteine als nicht geeignet erwies. Eine transiente Transfektion mit pCEP4-hADAM10s-mIgG1Fc führte zu keinem positiven Expressionsnachweis.



**Abb 3.1:** **Transiente Transfektion von HEK-EBNA-Zellen mit pCEP4-hADAM10s-His**  
 Spur 1: Überstand von pCEP4-hADAM10s-transfizierten HEK-EBNA-Zellen  
 Spur 2: Überstand von pCEP4-transfizierten HEK-EBNA-Zellen  
 Der Pfeil markiert die reife Form von hADAM10s bei ca. 64 kDa.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse erwiesen sich die hier eingesetzten, auf die Proteinproduktion in Säugetierzellen basierenden Expressionssysteme für die Herstellung der gewünschten löslichen ADAM10-Proteine als nicht geeignet.

Es lag die Vermutung nahe, dass das jeweilige ADAM10-Protein generell in zu geringen Mengen exprimiert wurde. Die trotz fehlender Proteinexpression vorhandene Selektierbarkeit der stabil transfizierten Zellen durch die entsprechenden Antibiotika (Hygromycin B, G 418-Sulfat und Zeozin™) könnte einen Hinweis darauf geben, dass durch den Selektionsdruck die Expression des Resistenzmarkers stärker erfolgte als die des Zielgens. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die exprimierten ADAM10-Proteine selbst nach ihrer Expression einem starken Abbau durch die Wirtszelle unterworfen waren und dadurch unter der Nachweisgrenze vorlagen. Hierfür könnte der Nachweis von hADAM10s nach transients, nicht aber nach stabiler Expression mit pCEP4-hADAM10s-His einen Hinweis liefern.

Nachteilig wirkte sich auch die Abhängigkeit der Säugetierzellen von Serum-haltigem Kulturmedium aus. Da das darin enthaltende Rinderserumalbumin (BSA) im gleichen Molekulargewichtsbereich lag wie die exprimierten ADAM10-Proteine, musste das eigentliche Kulturmedium, um dieses störende BSA zu entfernen, durch ein separates Serum-freies Inkubationsmedium ersetzt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass durch diesen Mediumwechsel exprimiertes lösliches ADAM10 für den Proteinnachweis verloren gegangen sein könnte.

Da durch das parallel eingesetzte Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem die Herstellung von löslichem ADAM10 erfolgreich war (siehe 3.2), wurden die möglichen Ursachen der mangelnden Expression in den jeweiligen Säugetierzellen nicht weiter analysiert.

### **3.2 EXPRESSION VON LÖSLICHEN ADAM10-PROTEINEN DURCH DAS BAC-TO-BAC BACULOVIRUS EXPRESSIONSSYSTEM**

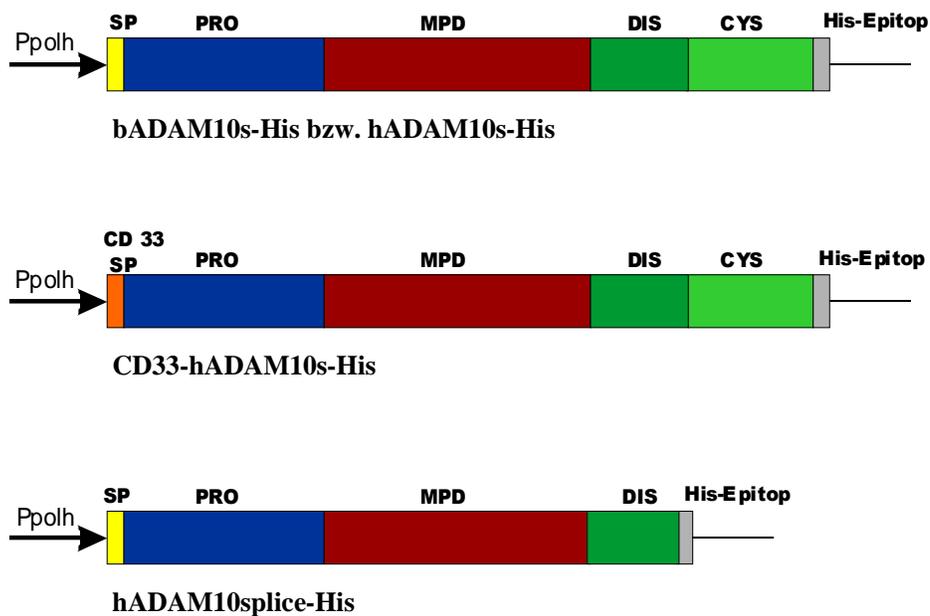
Parallel zu den auf die Expression in Säugetierzellen basierenden Versuchen kam das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem der Firma Invitrogen zum Einsatz (siehe 2.5.1). Bei diesem System werden rekombinante Baculoviren genutzt, um verschiedenartige Gene in Insektenzellen und Insektenlarven zu exprimieren. Die rekombinanten Proteine werden dabei in der Regel prozessiert, modifiziert und zu ihrer entsprechenden zellulären Lokalisation gebracht (Luckow, 1993; Luckow *et al.*, 1993; Davies, 1994).

Die verschiedenen löslichen ADAM10-Proteine wurden mit Hilfe dieses Expressionssystem in Sf9-Insektenzellen hergestellt. Diese Zellen stammen aus dem Ovar der Gemüseeulen-Larve *Spodoptera frugiperda* und konnten erfolgreich an Serum-freies SF-900

II Medium adaptiert werden (siehe 2.5.6), so dass hier im Unterschied zur Expression in Säugetierzellen kein den Proteinnachweis störendes Rinderserumalbumin (BSA) im Kulturmedium vorlag.

### 3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide für die Expression in Sf9-Insektzellen

Zunächst wurden DNA-Konstrukte hergestellt, die dem extrazellulären Teil von humanem und bovinem ADAM10, d.h. den Aminosäuren 1-664 des insgesamt 748 Aminosäuren langen Proteins entsprechen. Ferner wurde ein Konstrukt hergestellt, das die DNA einer Splicevariante von humanem ADAM10 (Yavari *et al.*, 1998) beinhaltet, die durch das zusätzliche Fehlen der Cystein-reichen Domäne gekennzeichnet ist (entspricht den Aminosäuren 1-565). Für die Expression von löslichem humanem ADAM10 in Sf9-Insektzellen diente der Expressionsvektor pFastBac1 (pFB) der Firma Invitrogen als Donorplasmid (siehe 2.5.1). Die entsprechenden ADAM10-Konstrukte sind in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abb. 3.2:** ADAM10-Konstrukte für die Expression in Sf9-Insektzellen

- SP = Signalpeptid von ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 1-19)
  - CD33 SP = Signalpeptid von CD33 (entspricht den Aminosäuren 1-16: MPLLLLLPLLWAGALA)
  - PRO = Prodomäne von ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 20-212)
  - MPD = Metalloproteinase-Domäne von ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 213-455)
  - DIS = Disintegrin-Domäne von ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 456-548)
  - CYS = Cystein-reiche Domäne von ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 549-673)
- Die extrazelluläre Domäne von ADAM10 endet in diesen Konstrukten nach der Aminosäure 664, das Konstrukt der ADAM10-Splicevariante nach der Aminosäure 565.  
His-Epitop = Poly-Histidin-Epitop bestehend aus 6 Histidin-Resten

***pFB-hADAM10s-His***

Für die Herstellung dieses Konstrukts (siehe 7.2.1, Abb. 7.8) wurde die DNA des kompletten extrazellulären Teils von humanem ADAM10 (hADAM10s) mit dem Poly-Histidin-Epitop aus dem Expressionsvektor pSecTag-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.1) mit XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) und PmeI (nach dem Poly-Histidin-Epitop) herausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde mittels präparativem Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und in pFB einkloniert. Der Vektor wurde dafür zunächst mit KpnI und nach einer durchgeführten T4-DNA-Polymerase-Behandlung mit XhoI geschnitten.

***pFB-bADAM10s-His***

Für diese Klonierung wurde aus dem Konstrukt pUC19ΔSacI-bADAM10s-His (siehe 2.4.1.2) bADAM10s-His über HindIII (nach dem Poly-Histidin-Epitop) und XhoI (vor der ADAM10-Signalsequenz) herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und in den ebenfalls mit HindIII und XhoI geschnittenen Vektor pFB einkloniert (siehe 7.2.1, Abb. 7.7).

***pFB-CD33-hADAM10s-His***

Zur Herstellung dieses DNA-Konstrukts (siehe 7.2.1, Abb. 7.9) wurde die Sequenz des Signalpeptids von humanem ADAM10 (entspricht den Aminosäuren 1-19) durch die der Signalsequenz von CD33 (Siglec-3), einem Protein aus der Familie der „Siglecs“ (sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins; Taylor *et al.*, 1999) ersetzt. Durch die Signalsequenz dieses Zellmembranproteins aus der IgG-Superfamilie sollte die Sekretion der löslichen ADAM10-Variante in das Zellkulturmedium verstärkt werden.

Die Sequenz des CD33-Signalpeptids wurde mittels PCR durch den Einsatz eines entsprechenden CD33-forward Primers und des für hADAM10 sequenzspezifischen Primers Protease5rev (siehe 2.1.9) hergestellt. Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter 2.3.7 beschrieben. Das mit XhoI und XbaI geschnittene und mit Hilfe eines PCR-Reinigungs-Kits (Qiagen) gereinigte PCR-Produkt wurde in pFB-hADAM10s-His einkloniert. pFB-hADAM10s-His wurde dafür ebenfalls mit den beiden genannten Restriktionsenzymen behandelt und über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt.

***pFB-hADAM10splice-His***

Ausgangsvektor für diese Klonierung war pIRES-hADAM10splice-His (siehe 2.4.1.2). Durch die Restriktion mit SphI (hinter Poly-Histidin-Epitop), anschließender T4-DNA-Polymerase-Behandlung und erneuter Restriktion mit XhoI (vor der ADAM10-

Signalsequenz) wurde das hADAM10splice-His-Fragment über ein präparatives Agarosegel (siehe 2.3.5) gereinigt und mit pFB ligiert. Der Vektor wurde dafür mit HindIII, der T4-DNA-Polymerase und XhoI behandelt und anschließend wie das Insert über ein präparatives Agarosegel gereinigt (siehe 7.2.1, Abb. 7.10).

Durch Restriktionsanalysen (siehe 2.3.4) und DNA-Sequenzierungen wurden die einzelnen Expressionsplasmide auf ihre Richtigkeit hin überprüft und Mutationen, die z. B. zu einer Verschiebungen im Leserahmen führen könnten, ausgeschlossen.

### **3.2.2 Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA**

Die entsprechenden pFB-ADAM10-Expressionsplasmide wurden für die Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA von löslichem bovinem, löslichem humanem mit eigener bzw. der CD33-Signalsequenz und der humanen Splicevariante von ADAM10 eingesetzt. Nach der Transposition des *E. coli*-Stamms DH10Bac (siehe 2.5.2) mit den jeweiligen DNA-Konstrukten wurde die entsprechende Bacmid-DNA aus den als positiv identifizierten DH10Bac-Klonen isoliert (siehe 2.5.3). Die erfolgreiche Insertion der jeweiligen ADAM10-DNA in die entsprechende Bacmid-DNA wurde mittels PCR-Analyse bestätigt (siehe 2.3.7).

Für die nachfolgende Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit der entsprechenden rekombinanten Bacmid-DNA sowie für die daran anschließende Baculovirus-Vermehrung und Proteinproduktion der einzelnen ADAM10-Varianten wurden Sf9-Monolayerkulturen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser eingesetzt.

### **3.2.3 Transfektion von Sf9-Zellen mit anschließendem Expressionsnachweis der verschiedenen löslichen ADAM10-Proteine**

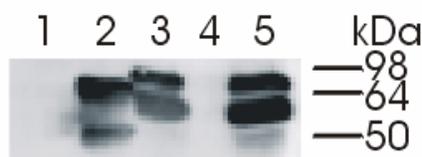
Mit der hergestellten Bacmid-DNA der vier ADAM10-Varianten bADAM10s, hADAM10s, hADAM10s mit CD33-Signalsequenz und hADAM10splice wurden Sf9-Zellen mit Hilfe des CellFECTIN<sup>®</sup>-Reagenz (siehe 2.5.7) transfiziert. Die entsprechenden Sf9-Zellüberstände wurden 72 h nach der Transfektion auf die Expression der einzelnen ADAM10-Proteine hin untersucht. Der Nachweis der exprimierten Proteine durch Western Blot Analyse (siehe 2.2.2) erfolgte mit Hilfe des gegen das Poly-Histidin-Epitop gerichteten monoklonalen anti-Penta-His-Antikörpers der Firma Qiagen.

Für die einzelnen löslichen ADAM10-Proteine wurden folgende Molekulargewichte erwartet:

	Molekulargewicht der prozessierten Form (ohne Prodomäne)	Molekulargewicht der unprozessierten Form
bADAM10s hADAM10s hADAM10s (CD33)	~ 60 kDa	~ 80 kDa
hADAM10splice	~ 50 kDa	~ 70 kDa

**Tabelle 3.1:** Erwartete Molekulargewichte der in Sf9-Zellen exprimierten ADAM10-Proteine

Nach der sich der Transfektion anschließenden 72-stündigen Inkubationszeit konnten jeweils die reife als auch die unreife Form des bovinen (siehe Abb. 3.3, Spur 5) und des humanen löslichen ADAM10 mit CD33-Signalsequenz bei ca. 60 und 80 kDa (siehe Abb. 3.3, Spur 3) bzw. der Splicevariante von humanem ADAM10 bei ca. 50 und 70 kDa (siehe Abb. 3.3, Spur 2) nachgewiesen werden. Somit wurden diese ADAM10-Proteine von den Sf9-Zellen nicht nur erfolgreich exprimiert, sondern auch prozessiert, so dass die exprimierten ADAM10-Proteine durch das Abspalten der jeweiligen Prodomäne in der reifen und damit katalytisch aktiven Enzymform vorliegen sollten. Die lösliche humane ADAM10-Variante konnte nach dieser Transfektion im Western Blot nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3, Spur 4).



**Abb 3.3:** Expressionsnachweis der einzelnen löslichen ADAM10-Varianten

72 h nach der Transfektion  
 Spur 1: nicht-transfizierte Sf9-Zellen  
 Spur 2: hADAM10splice  
 Spur 3: hADAM10s mit CD33-Signalsequenz  
 Spur 4: hADAM10s (keine Expression)  
 Spur 5: bADAM10s

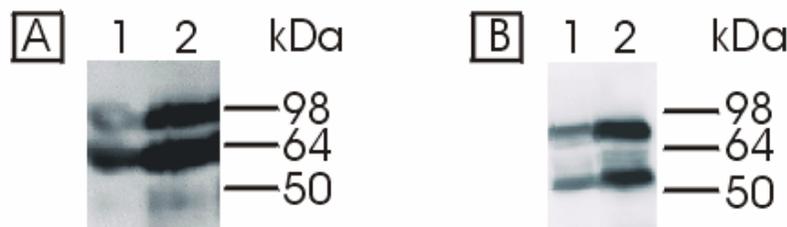
Zur weiteren Expression in Sf9-Zellen wurden die humane ADAM10-Variante mit CD33-Signalsequenz (im Folgenden: hADAM10s) und die humane Splicevariante von ADAM10 ausgewählt. Die Auswahl begründete sich besonders im Hinblick auf die spätere Charakterisierung der beiden Proteine und der Vergleichbarkeit ihrer Eigenschaften

untereinander und mit denen der rekombinanten extrazellulären Domäne von humanen ADAM10 der Firma R&D-Systems, die ebenfalls die CD33-Signalsequenz trägt.

### 3.2.4 Herstellung der Stammlösung von rekombinanten hADAM10s- und hADAM10splice-Baculoviren in Sf9-Insektenzellen

Für eine erfolgreiche Proteinexpression stellt zunächst die Vermehrung des entsprechenden Baculovirus eine wichtige Voraussetzung dar. So wurden der jeweilige Zellüberstand (je 4 ml) der hADAM10s- bzw. hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Zellen nach ihrer sich der Transfektion anschließenden Inkubationszeit von 72 h zweimal für jeweils 48 h zur weiteren Virusvermehrung auf jeweils zwei frische Sf9-Monolayerkulturen verteilt und bei 27°C inkubiert. Der jeweils eingesetzte Virus-haltige Zellüberstand wurde dabei mit dem SF-900 II Medium entsprechend verdünnt, um das nötige Kulturvolumen von 10 ml Medium/Sf9-Monolayerkulturschale (10 cm Durchmesser) zu erhalten. Nach diesen beiden Viruspassagen wurde der jeweilige Zellüberstand durch Zentrifugation (5 min, 110 x g) geerntet. Die somit hergestellte Stammlösung mit den rekombinanten hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Baculoviren wurden bis zu ihrer Verwendung lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt (siehe 2.5.8.1). Die Proteinexpression nach den einzelnen Viruspassagen wurde mittels Western Blot Analyse überprüft, der Nachweis erfolgte über das Poly-Histidin-Epitop.

**Abb. 3.4 A-B:** Proteinexpression von hADAM10s (A) und hADAM10splice (B) während der sich der Transfektion anschließenden Viruspassagen



**Abb. 3.4 A:** Expression von hADAM10s  
 Spur 1: Sf9-Zellüberstand der 1. Viruspassage  
 Spur 2: Sf9-Zellüberstand der 2. Viruspassage

**Abb. 3.4 B:** Expression von hADAM10splice  
 Spur 1: Sf9-Zellüberstand der 1. Viruspassage  
 Spur 2: Sf9-Zellüberstand der 2. Viruspassage

Die beiden Formen von hADAM10s bei ca. 60 und 80 kDa (Abb. 3.4 A) bzw. von hADAM10splice bei ca. 50 und 70 kDa (Abb. 3.4 B) sind nach den einzelnen Virusamplifikationsschritten im Western Blot eindeutig nachzuweisen. Durch die Virusvermehrung werden

demnach nicht nur immer mehr Sf9-Zellen mit den entsprechenden Baculoviren infiziert und zur Virusproduktion angeregt, sondern es kommt parallel auch schon zur Expression der ADAM10-Proteine, die zwischen erster und zweiter Viruspassage auch deutlich zunimmt.

### 3.2.5 Ermittlung der für die Virusamplifikation und Proteinexpression optimalen

#### Verdünnung der hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Baculovirus-Stammlösung

Für die weitere Vermehrung der Baculoviren bietet sich der Einsatz entsprechender Verdünnungen der jeweiligen Baculovirus-Stammlösung, d.h. die Infektion mit einer geringen Virusmenge an, da prinzipiell nicht alle Zellen der Monolayerkultur gleichzeitig sondern nur ein kleiner Teil von ihnen infiziert werden soll. Die nicht-infizierten Zellen durchlaufen noch weitere Zellteilungen, so dass die Menge an gesunden und infizierbaren Zellen in der Kultur weiter erhöht wird (Philipps *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass die primär infizierten Zellen währenddessen den entsprechenden Baculovirus replizieren und hinreichend viele Viruspartikel herstellen, um diese restlichen Zellen in der Kultur zu infizieren (sekundäre Infektion). Die sekundär infizierten Zellen entsprechen dann den Hauptproduzenten der rekombinanten Baculoviren (Bruinzeel *et al.*, 2002).

Zur Virusamplifikation wurde die jeweilige Baculovirus-Stammlösung in unterschiedlichen Verdünnungen auf verschiedene Sf9-Monolayerkulturen gegeben, um ihr infektiöses Potential zu ermitteln. Die in der entsprechenden Verdünnung vorhandene Virusmenge bzw. der Grad der Virusinfektion und damit die Unterschiede von Virus-infizierten Sf9-Insektenzellen gegenüber nicht-infizierten wurde anhand der nach 24 bzw. 48 h auftretenden, im Lichtmikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen beurteilt (siehe 2.5.8.2). Dabei zeichnen sich nicht-infizierte Sf9-Zellen durch eine runde Zellform mit glatter Oberfläche aus. Infizierte Sf9-Zellen weisen dagegen neben dem eingestellten Zellwachstum eine unregelmäßige Zelloberfläche und eine starke Vergrößerung des Zellvolumens auf, wobei das Ausmaß des vergrößerten Zellvolumens als Indikator für die erfolgreiche Infektion der Zellen dient (Rosinski *et al.*, 2002; Kost *et al.*, 2005).

Für die Infektion der bis zu 60 % konfluenten Sf9-Zellen wurde die hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Baculovirus-Stammlösung in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  eingesetzt. Dabei wurde jeweils eine Monolayerkultur mit der entsprechenden Virusverdünnung bei 27°C inkubiert. Da nach 24-stündiger Inkubation lichtmikroskopisch noch keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden konnten und die Zellen keine Anzeichen von eingestelltem Zellwachstum aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass die jeweils eingesetzte Virusmenge gering genug gewählt war, um nicht alle Zellen gleichzeitig

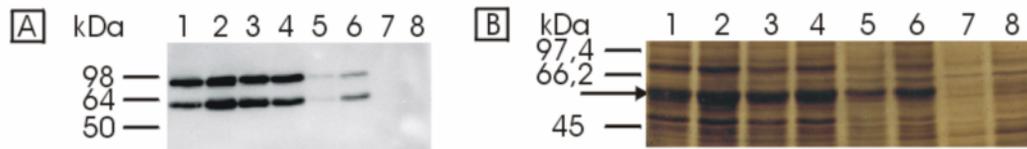
zu infizieren und abzutöten. Die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert. In dieser Phase sollten nun durch die von den primär infizierten Zellen produzierten Viruspartikel die Infektion der restlichen Zellen in der Kultur gewährleistet werden (sekundäre Infektion) und es zu einer weiteren Anreicherung an rekombinanten Baculoviren kommen. Sind alle Zellen infiziert, sollten sie das Zellwachstum einstellen und deutlich aufgeblähte Zellkörper zeigen (Rosinski *et al.*, 2000). Dieser morphologische Zustand war nach der zweiten Inkubationsphase von 24 h deutlich bei den infizierten Sf9-Monolayerkulturen zu beobachten, die mit den  $10^{-3}$  bzw.  $10^{-4}$  Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung inkubiert wurden. In Sf9-Zellen, die mit einer  $10^{-5}$ - bzw.  $10^{-6}$ -Verdünnung der Baculovirus-Stammlösung überschichtet wurden, traten die oben genannten morphologischen Veränderungen schwächer auf. Dennoch wurden alle Zellüberstände mit den vermehrten rekombinanten Baculoviren geerntet (Zentrifugation für 5 min bei 110 x g; siehe 2.5.8.2) und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Für die anschließende Proteinexpression bot sich die Infektion der Sf9-Zellen mit einer höheren Viruskonzentration als die für die Virusvermehrung eingesetzte an, da die synchrone Infektion aller Zellen angestrebt wurde. Dadurch soll gewährleistet werden, dass es zu einem sofortigen Stillstand des Zellwachstums kommt, so dass die Virusproduktion und Zellteilungsprozesse nicht um essentielle Nährstoffe konkurrieren, sondern die zelluläre „Proteinsynthesemaschinerie“ komplett für die Herstellung der durch die Baculoviren eingebrachten Konstrukte zur Verfügung steht (Dee und Shuler, 1997).

Für die Proteinproduktion wurden die jeweiligen Virus-haltigen Zellüberstände, die aus der Inkubation der einzelnen Sf9-Monolayerkulturen mit den entsprechenden Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung resultierten, je auf bis zu 80 % konfluente Sf9-Monolayer gegeben und für 48 bzw. 72 h bei 27°C inkubiert (siehe 2.5.8.3). Dabei wurde darauf geachtet, dass der eingesetzte Virus-haltige Zellüberstand nur 20 % des Zellkulturvolumens ausmachte, da die Virusmenge nicht zu hoch gewählt werden sollte, um ein Abtöten der Zellen zu verhindern. Da nach 24-stündiger Inkubation kein Zellwachstum mehr zu beobachten war, konnte man erfahrungsgemäß von der Infektion aller Zellen der Monolayerkultur ausgehen (Rosinski *et al.*, 2002). Der Nachweis der Proteinexpression von hADAM10s und hADAM10splice erfolgte immunologisch über das Poly-Histidin-Epitop mittels Western Blot Analyse und Visualisierung der Proteinbanden durch Silberfärbung (siehe Abb. 3.5 und 3.6).

**Abb. 3.5 A-B: Auswirkung der aus den verschiedenen eingesetzten Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung resultierenden Virusamplifikate auf die anschließende Expression von hADAM10s in Sf9-Zellen**

Jede Spur im Western Blot bzw. Silbergel entspricht einer Probe des Zellüberstandes einer Sf9-Monolayerkultur. Pro Sf9-Zellkulturschale wurden 20 % des Virus-haltigen Zellüberstands eingesetzt, der aus der Inkubation mit einer entsprechenden Verdünnung der Baculovirus-Stammlösung resultierte. Zur Unterscheidung werden die Proben hier nur nach diesen ursprünglichen Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung genannt.



**Abb. 3.5 A: Western Blot**

Spur 1 + 2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
 Spur 3 + 4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung  
 Spur 5 + 6:  $10^{-5}$ -Virusverdünnung  
 Spur 7 + 8:  $10^{-6}$ -Virusverdünnung

**Abb. 3.5 B: Silberfärbung**

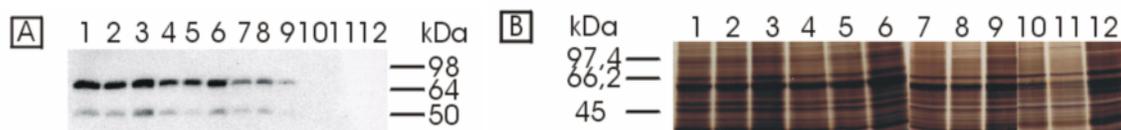
Spur 1 + 2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
 Spur 3 + 4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung  
 Spur 5 + 6:  $10^{-5}$ -Virusverdünnung  
 Spur 7 + 8:  $10^{-6}$ -Virusverdünnung

Durch Western Blot Analyse sind beide Formen von hADAM10s, die reife prozessierte bei ca. 60 kDa, die unprozessierte bei ca. 80 kDa (siehe Abb. 3.5 A) nachweisbar. Man sieht ebenfalls deutlich, dass die aus den eingesetzten  $10^{-5}$ - bzw.  $10^{-6}$ -Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen resultierenden Virusamplifikate für die Proteinproduktion nicht so geeignet erschienen wie die aus den  $10^{-3}$ - bzw.  $10^{-4}$ -Verdünnungen. Im Vergleich zu letztgenannten ging die Expression von hADAM10s im Fall der  $10^{-5}$ -Verdünnung deutlich zurück (siehe Abb. 3.5 A, Spuren 5 und 6) bzw. im Fall der  $10^{-6}$ -Verdünnung erfolgte sie überhaupt nicht (Abb. 3.5 A, Spuren 7 und 8). Die hier ursprünglich eingesetzte Virusmenge der Baculovirus-Stammlösung war demnach für das Erreichen einer optimalen Virusamplifikation nach 48 h und für die durch diese amplifizierten Viren ausgelöste Expression des hADAM10s zu gering gewählt. Bei der Visualisierung durch Silberfärbung konnte gleiches beobachtet werden. Während die prozessierte Form von hADAM10s bei 60 kDa in den ursprünglichen Verdünnungen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  deutlich sichtbar war (siehe Abb. 3.5 B, Spuren 1 bis 4; durch den Pfeil markiert), konnte man sie in den Verdünnungen  $10^{-5}$  nur noch schwach bzw.  $10^{-6}$  gar nicht mehr erkennen (siehe Abb. 3.5 B, Spuren 5 bis 8). Für die weiteren Expressionsversuche wurde die hADAM10s-Baculovirus-Stammlösung zur Virusvermehrung mit anschließender Proteinexpression nur noch in den Verdünnungen  $10^{-3}$  bzw.  $10^{-4}$  eingesetzt.

Im Fall der Expression von hADAM10splice konnten im Western Blot ebenfalls beide Formen des Proteins bei ca. 50 und 70 kDa (siehe Abb. 3.6 A) nachgewiesen werden. Auch hier war die Proteinexpression durch den Einsatz des jeweiligen aus der  $10^{-5}$ - bzw. der  $10^{-6}$ -Baculovirus-Stammlösungsverdünnung resultierenden Virusamplifikat im Vergleich zur entsprechenden Baculovirus-Stammlösungsverdünnung  $10^{-3}$  bzw.  $10^{-4}$  (siehe Abb. 3.6 A, Spuren 1 bis 3 und 4 bis 6) stark reduziert ( $10^{-5}$ , siehe Abb. 3.6 A, Spuren 7 bis 9) bis nicht nachweisbar ( $10^{-6}$ , siehe Abb. 3.6 A, Spuren 10-12). Auffällig war, dass prozessiertes hADAM10splice nach 48-stündiger Inkubation nicht die dominierende Enzymform darstellte, da vor allem die unprozessierte Form bei ca. 70 kDa sichtbar war. Nach der Visualisierung durch Silberfärbung konnte diese Beobachtung bestätigt werden, d.h. die reife Enzymform bei ca. 50 kDa ist im Gegensatz zur nichtprozessierten Form nur sehr schwach zu erkennen (siehe Abb. 3.6 B, Pfeil).

**Abb. 3.6 A-B: Auswirkung der aus den verschiedenen eingesetzten Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung resultierenden Virusamplifikate auf die anschließende Expression von hADAM10splice in Sf9-Zellen**

Jede Spur im Western Blot bzw. Silbergel entspricht einer Probe des Zellüberstands einer Sf9-Monolayerkultur. Pro Sf9-Zellkulturschale wurden 20 % des Virus-haltigen Zellüberstands eingesetzt, der aus der Inkubation mit einer entsprechenden Verdünnung der Baculovirus-Stammlösung resultierte. Zur Unterscheidung werden die Proben hier nur nach diesen ursprünglichen Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung genannt.



**Abb. 3.6 A: Western Blot**

Spur 1-3:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
 Spur 4-6:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung  
 Spur 7-9:  $10^{-5}$ -Virusverdünnung  
 Spur 10-12:  $10^{-6}$ -Virusverdünnung

**Abb. 3.6 B: Silberfärbung**

Spur 1-3:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
 Spur 4-6:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung  
 Spur 7-9:  $10^{-5}$ -Virusverdünnung  
 Spur 10-12:  $10^{-6}$ -Virusverdünnung

Die aus den Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen  $10^{-5}$  bzw.  $10^{-6}$  resultierenden Virus-haltigen Zellüberstände erschienen für die Expression von hADAM10splice als nicht geeignet. Auch hier wurde die Baculovirus-Stammlösung zur Virusvermehrung mit anschließender Proteinexpression nur in den Verdünnungen  $10^{-3}$  bzw.  $10^{-4}$  eingesetzt. Ferner wurde die für die Proteinexpression gewählte Inkubationszeit auf 72 h verlängert, um ein

besseres Verhältnis von prozessierter zu unprozessierter Enzymform zu erreichen (siehe Abb. 3.8).

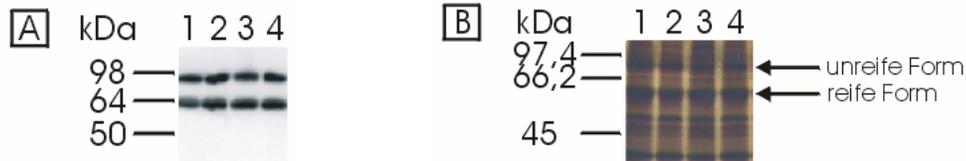
### 3.2.6 Analyse der Proteinexpression von hADAM10s und hADAM10splice

Zur Proteinexpression von hADAM10s und hADAM10splice wurde die Infektion von Sf9-Monolayerkulturen des jeweiligen Virusamplifikats, das aus der vorangegangenen Virusvermehrung in Sf9-Zellen mit der dafür  $10^{-3}$ - bzw.  $10^{-4}$ -verdünnten Baculovirus-Stammlösung resultiert, beibehalten. Bei einem Kulturrendvolumen von 10 ml, machte das Volumen an eingesetzter Virus-haltiger Lösung 20 % aus. Die Expression von hADAM10s wurde nach 48-, die von hADAM10splice nach 48- und 72-stündiger Inkubation der infizierten Sf9-Monolayerkulturen bei 27°C untersucht (siehe 2.5.8.3).

#### **Abb. 3.7 A-B: Proteinexpression von hADAM10s in Sf9-Zellen**

Nach 48 h-stündiger Inkubation der Zellen mit den Baculoviren.

Jede Spur im Western Blot bzw. Silbergel entspricht einer Probe des Zellüberstandes einer Sf9-Monolayerkultur. Zur Unterscheidung werden die Proben hier nur nach den ursprünglichen Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung genannt.



#### **Abb. 3.7 A: Western Blot**

Spur 1-2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
Spur 3-4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung

#### **Abb. 3.7 B: Silberfärbung**

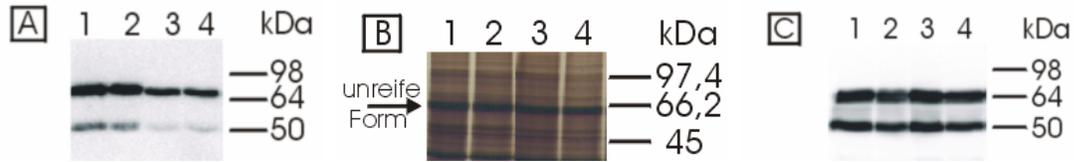
Spur 1-2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
Spur 3-4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung

Wie aus Abbildung 3.7 ersichtlich, wurde hADAM10s nach 48 h erfolgreich exprimiert. Beide Proteinformen, die prozessierte bei 60 kDa und die unprozessierte bei 80 kDa, sind eindeutig durch Silberfärbung visualisierbar (siehe Abb. 3.7 B) bzw. immunologisch nachweisbar (siehe Abb. 3.7 A). Dabei scheint kein sichtbarer Unterschied zwischen den aus den ursprünglich eingesetzten Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen  $10^{-3}$  bzw.  $10^{-4}$  resultierenden Virusamplifikaten vorzuliegen.

Die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3.1) ergab eine Gesamtproteinmenge von ca. 300-500 µg Protein/Sf9-Monolayerkulturüberstand.

**Abb. 3.8 A-C: Proteinexpression von hADAM10splice in Sf9-Zellen**

Nach 48- (A und B) und 72-stündiger (C) Inkubation der Zellen mit den Baculoviren. Jede Spur im Western Blot bzw. Silbergel entspricht einer Probe des Zellüberstandes einer Sf9-Monolayerkultur. Zur Unterscheidung werden die Proben hier nur nach den ursprünglichen Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung genannt.



**3.8 A: Western Blot (48 h)**

Spur 1-2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
Spur 3-4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung

**3.8.B: Silberfärbung (48 h)**

Spur 1-2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
Spur 3-4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung

**3.8 C: Western Blot (72 h)**

Spur 1-2:  $10^{-3}$ -Virusverdünnung  
Spur 3-4:  $10^{-4}$ -Virusverdünnung

Während die Menge an reifem hADAM10splice nach 48-stündiger Inkubation im Vergleich zur unprozessierten Form durch beide eingesetzten Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen noch deutlich geringer war (siehe Abb. 3.8 A und B), konnte diese Beobachtung nach der Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h nicht mehr bestätigt werden. Im Gegenteil, nach dieser 72-stündigen Inkubation war nicht nur eine deutliche Zunahme der Expression von hADAM10splice zu beobachten, wobei es im Vergleich zur Expression nach 48 h keinen sichtbaren Unterschied mehr zwischen den gewählten Baculovirus-Stammlösungsverdünnungen gab. Auch das Verhältnis von prozessierter bei 50 kDa zu unprozessierter Enzymform bei 70 kDa war deutlich ausgeglichener (siehe Abb. 3.8 C).

Durch Silberfärbung konnte nach 48-stündiger Inkubation hauptsächlich die unprozessierte Form bei 70 kDa visualisiert werden (siehe Abb. 3.8 B, durch den Pfeil markiert), die reife bei 50 kDa (kurz oberhalb der 45 kDa Markerbande) war nur schwer zu erkennen. Eine Visualisierung von hADAM10splice nach 72-stündiger Inkubation durch Silberfärbung liegt nicht vor.

Die Expressionszunahme wurde auch durch die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3.1) deutlich, da diese nach 48-stündiger Inkubation eine Proteinmenge von 300-400  $\mu\text{g}$  Protein/Sf9-Monolayerkulturüberstand, nach 72 h eine von 500-700  $\mu\text{g}$  Protein/Sf9-Monolayerkulturüberstand ergab.

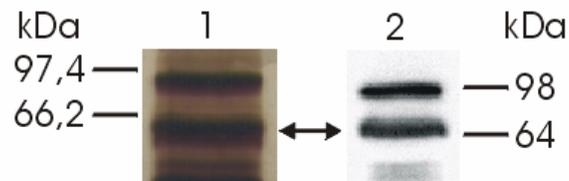
Für die nachfolgende Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice wurden jeweils mehrere Sf9-Monolayerkulturüberstände vereinigt (siehe 3.3).

### 3.3 REINIGUNG DER IN Sf9-ZELLEN EXPRIMIERTEN LÖSLICHEN ADAM10-PROTEINE hADAM10s UND hADAM10splice

#### 3.3.1 Aufkonzentration von hADAM10s und hADAM10splice aus Sf9-Zellüberständen mit anschließender Überprüfung der enzymatischen Aktivität

Vor der eigentlichen Reinigung erfolgte zunächst die Filtration der entsprechenden Überstände von hADAM10s- und hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen mit seriell eingesetzten 100 kDa- und 30 kDa-Amicon Ultra Konzentratoren (siehe 2.6.1.1). Auf diese Weise sollten entsprechende Proteinverunreinigungen und Salze aus dem Zellkulturmedium entfernt und eine erste Aufkonzentration der beiden Zielproteine erreicht werden.

In einem Vorversuch wurden 90 ml Zellüberstand von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen auf 1,8 ml (ca. 358 µg) aufkonzentriert. Für die Visualisierung durch Silberfärbung und den immunologischen Nachweis durch Western Blot Analyse wurden jeweils 20 µg Protein, entsprechend 100 µl des hADAM10s-Konzentrats, eingesetzt.

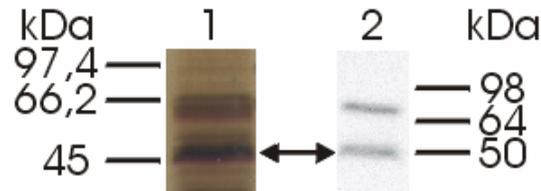


**Abb 3.9:** Nachweis von hADAM10s in der 30-100 kDa Fraktion  
 Spur 1: Nachweis von hADAM10s in der 30-100 kDa-Fraktion nach Silberfärbung  
 Spur 2: Immunologischer Nachweis von hADAM10s in der 30-100 kDa-Fraktion  
 Der Pfeil kennzeichnet die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa.

Im silbergefärbten Proteingel sind beide Formen von hADAM10s deutlich zu erkennen: die prozessierte reife Form bei ca. 60 kDa, die unprozessierte bei ca. 80 kDa (siehe Abb. 3.9, Spur 1).

Dass es sich bei der Proteinbande von ca. 60 kDa Größe tatsächlich um die reife Form von hADAM10s handelt wurde durch den immunologischen Nachweis über das Poly-Histidin-Epitop durch den anti-Penta-His-Antikörper bestätigt (siehe Abbildung 3.9, Spur 2). Die hochmolekulare unreife Form bei ca. 80 kDa konnte dabei ebenfalls nachgewiesen werden.

Zur Vorreinigung von hADAM10splice wurden 64 ml Überstand von den mit den entsprechenden rekombinanten Baculoviren infizierten Sf9-Monolayerkulturen eingesetzt und auf 2,9 ml (ca. 300 µg Protein) aufkonzentriert.



**Abb 3.10:** **Nachweis von hADAM10splice in der 30-100 kDa Fraktion**  
 Spur 1: Nachweis von hADAM10splice in der 30-100 kDa-Fraktion nach Silberfärbung  
 Spur 2: Immunologischer Nachweis von hADAM10splice in der 30-100 kDa-Fraktion  
 Der Pfeil markiert die reife Form von hADAM10splice bei ca. 50 kDa.

Auch die beiden Enzymformen von hADAM10splice sind nach einer Visualisierung durch Silberfärbung nachweisbar (siehe Abb. 3.10, Spur 1).

Durch den immunologischen Nachweis über das Poly-Histidin-Epitop wurde bestätigt, dass es sich bei der 50 kDa-Bande um die prozessierte, reife Form von hADAM10splice handelte, ebenso ist die unreife Form bei ca. 70 kDa nachweisbar (siehe Abb. 3.10, Spur 2).

Zur qualitativen Untersuchung der enzymatischen Aktivität der jeweiligen 30-100 kDa-Fraktion von hADAM10s und hADAM10splice wurde das Peptidsubstrat APP18, das den Aminosäuren 11-28 des A $\beta$ -Peptids (EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK-NH<sub>2</sub>) entspricht und somit die für die  $\alpha$ -Sekretase spezifische Spaltstelle des Amyloid-Vorläufer-Proteins enthält (gekennzeichnet durch den Pfeil in der Peptidsequenz), eingesetzt. Die Spaltung von APP18 durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 resultiert in der Bildung von zwei Peptidspaltfragmenten von 6 und 12 Aminosäuren Länge (APP6 und APP12).

Die jeweilige Enzymreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl bei 37°C. Von den hADAM10s- und hADAM10splice-Konzentraten wurden nach der Zugabe der äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) jeweils 45 µl für einen Enzymtest eingesetzt. Das Substrat APP18 kam in einer Endkonzentration von 30 µM zum Einsatz. Als positive Kontrolle diente die Restriktion von APP18 durch 100 nM hADAM10s der Firma R&D-Systems. Als Negativkontrolle diente die Inkubation des jeweiligen ADAM10-Konzentrats ohne das Substrat APP18 (nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die Hemmung von hADAM10s und hADAM10splice durch den für ADAM10 und ADAM17 spezifischen Inhibitor GW 280264 X (GlaxoSmithKline) untersucht, der pro Ansatz in einer Endkonzentration von 20 nM eingesetzt wurde.

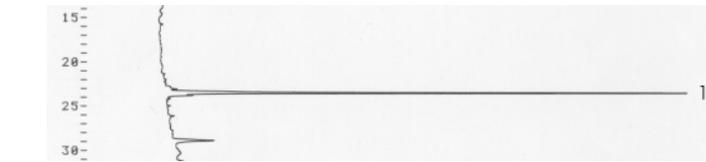
Das Substrat APP18 wurde nach 18 h durch 45 µl des hADAM10s-Konzentrats deutlich gespalten, d.h. neben dem Substrat APP18 mit einer Retentionszeit ( $t_R$ ) von 23,47 min sieht man deutlich das Spaltprodukt APP12 entsprechend dem Signalpeak 2 bei  $t_R = 24,42$  min (siehe Abb. 3.11 B oben). Dieser für die Spaltung von APP18 charakteristische APP 12-Signalpeak ist auch in der gewählten Positivkontrolle, d.h. nach der Spaltung von APP18 durch hADAM10s der Firma R&D-Systems, zu erkennen (siehe Abb. 3.11 A unten).

Durch 45 µl des hADAM10splice-Konzentrats wurde das Substrat APP18 bereits nach 30 min deutlich gespalten (siehe Abb. 3.11 C oben). Auch hier sieht man neben dem Substrat APP18 (Peak 1;  $t_R = 23,36$  min) das spezifische Spaltprodukt APP12, entsprechend dem Signalpeak 2 ( $t_R = 24,34$  min). Nach einer Inkubation von 18 h war das Substrat komplett gespalten (nicht gezeigt).

Aus Abbildung 3.11 geht weiter hervor, dass sowohl hADAM10s (siehe Abb. 3.11 B unten) als auch hADAM10splice (siehe Abb. 3.11 C unten) in seiner enzymatischen Aktivität durch den für ADAM10 und ADAM17 spezifischen Inhibitor GW 280264 X gehemmt wurde, sichtbar anhand des jeweiligen Auftretens des für das ungespaltene APP18 charakteristischen Signalpeaks 1 und dem Fehlen des für APP12 typischen Signals.

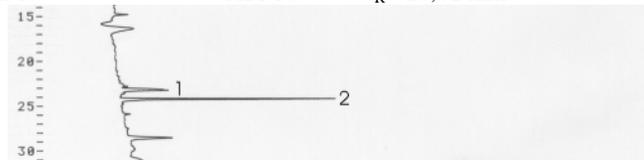
**Abb. 3.11 A–C: Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch hADAM10s (B) und hADAM10splice (C); Positivkontrolle (A): hADAM10s (R&D-Systems)**  
 Für die graphische Darstellung wurde der Retentionszeitraum von 15 bis 30 min gewählt, entsprechend dem Auftreten der typischen Signalpeaks von APP18 und APP12.

**Abb. 3.11 A:**



**30 µM APP18**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,42$  min

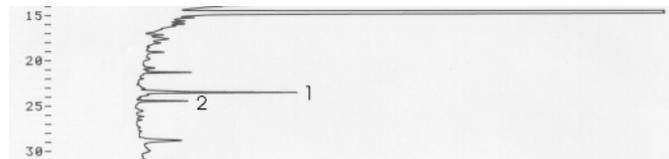


**Positivkontrolle: 100 nM hADAM10s (R&D)**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,23$  min

Peak 2: APP12  $t_R = 24,19$  min

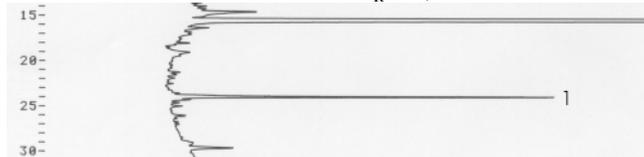
**Abb. 3.11 B:**



**45 µl hADAM10s 30-100 kDa-Fraktion**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,47$  min

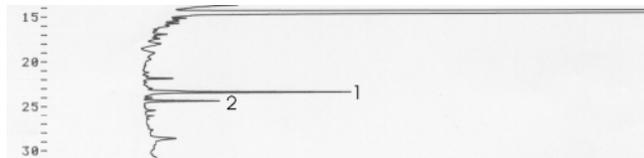
Peak 2: APP12  $t_R = 24,42$  min



**45 µl hADAM10s 30-100 kDa-Fraktion, 20 nM GW 280264 X**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,95$  min

**Abb. 3.11 C:**



**45 µl hADAM10splice 30-100 kDa-Fraktion**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,36$  min

Peak 2: APP12  $t_R = 24,34$  min



**45 µl hADAM10splice 30-100 kDa-Fraktion, 20 nM GW 280264 X**

Peak 1: APP18  $t_R = 22,83$  min

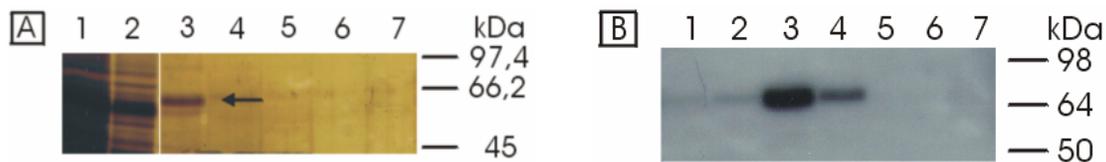
### 3.3.2 Spezifische Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie und Untersuchung ihrer Enzymaktivität

Die spezifische Reinigung der in Sf9-Zellen exprimierten ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte über das Poly-Histidin-Epitop. Durch die an die Säulenmatrix gekoppelten Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die die Imidazolringe der Histidine komplexieren, erfolgte die spezifische Bindung des Zielproteins an die Säulenmatrix. Durch unterschiedliche Konzentrationen an freiem Imidazol wurden die jeweiligen ADAM10-Proteine eluiert (siehe 2.6.1.2).

Für die einzelnen Reinigungsversuche unter unterschiedlichen Pufferbedingungen wurden mehrere Zellüberstände von hADAM10s- bzw. hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen aufkonzentriert (siehe 2.6.1.1). Das jeweilige 30-100 kDa-Konzentrat wurde mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) versetzt und mit der Ni-NTA-Säulenmatrix inkubiert. Die enzymatische Aktivität der jeweiligen 30-100 kDa-Konzentrate und Eluatfraktionen wurden wie unter 2.6.2.2 beschrieben bestimmt.

Das aus 100 ml Zellüberständen hergestellte 3 ml hADAM10s-Konzentrat (ca. 729 µg Protein) wurde nach zweistündiger Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose bei 4°C und nach den entsprechenden Waschschrinen mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert (siehe 2.6.1.2).

**Abb. 3.12 A-B: Reinigung von hADAM10s über Ni-NTA: 500 mM Imidazol**



**Abb. 3.12 A: Silberfärbung**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Eluatfraktion 1  
 Spur 4-7: Eluatfraktion 2-5

Der Pfeil markiert die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa.

**Abb. 3.12 B: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Eluatfraktion 1  
 Spur 4-7: Eluatfraktion 2-5

Wie aus Abbildung 3.12 ersichtlich, ist nach der Reinigung durch die Nickel-Affinitätschromatographie nur die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa in der

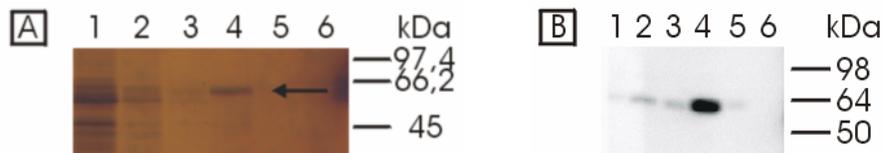
Eluatfraktion 1 durch Silberfärbung (siehe Abb. 3.12 A, Spur 3) als auch durch Western Blot Analyse (siehe Abb. 3.12 B, Spur 3) nachweisbar, die unprozessierte Form von ca. 80 kDa Größe liegt dagegen nicht vor.

Das Entfernen des Imidazols aus den Elutionsfraktionen erfolgte unmittelbar nach der Affinitätschromatographie mittels eines 30 kDa Amicon Konzentrators. Das entsprechend aufkonzentrierte hADAM10s-Eluat von 280 µl wurde mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer versetzt und auf seine Fähigkeit hin, das Peptidsubstrat APP18 zu spalten, untersucht. Da jedoch keine Enzymaktivität festgestellt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass dies möglicherweise durch die hohe Imidazolkonzentration verursacht wurde. Die für die Elution gewählte Imidazolkonzentration wurde daraufhin auf 400 mM reduziert.

In diesem Versuch wurde ein Drittel des aus 96 ml Zellüberständen resultierende 3 ml hADAM10s- (138 µg Protein) bzw. das komplette aus 136 ml resultierenden 5 ml hADAM10splice-Konzentrat (ca. 441 µg Protein) nach Zugabe der äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer für die Ni-NTA-Chromatographie eingesetzt. An die entsprechenden Waschschritte anschließend wurden die Proteine mit dem 400 mM Imidazol enthaltenden Elutionspuffer von der Säule gelöst. Für die Proteinanalyse wurden jeweils 100 µl des hADAM10s- bzw. hADAM10splice-Eluats eingesetzt (siehe 2.2.5).

**Abb. 3.13 A-D: Reinigung von hADAM10s (A-B) und hADAM10splice (C-D) über Ni-NTA: 400 mM Imidazol**

**Reinigung von hADAM10s**



**Abb. 3.13 A: Silberfärbung**

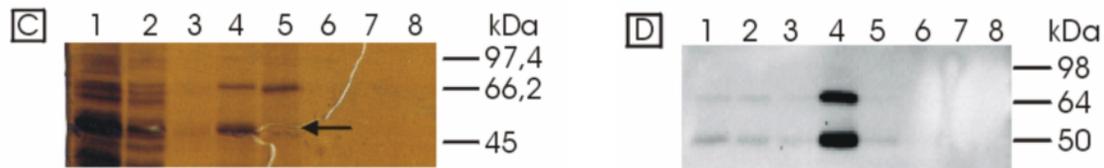
Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5: Eluatfraktion 2  
 Spur 6: Eluatfraktion 3

Der Pfeil kennzeichnet die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa.

**Abb. 3.13 B: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5: Eluatfraktion 2  
 Spur 6: Eluatfraktion 3

**Reinigung von hADAM10splice**



**Abb. 3.13 C: Silberfärbung**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5-8: Eluatfraktion 2-5

Der Pfeil kennzeichnet die reife Form von hADAM10splice bei ca. 50 kDa.

**Abb. 3.13 D: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 1  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5-8: Eluatfraktion 2-5

Nach dieser Reinigung konnte der Hauptanteil der reifen Form von hADAM10s (bei 60 kDa) in der Eluatfraktion 1 sowohl nach der Visualisierung im silbergefärbten Gel (siehe Abb. 3.13 A, Spur 4) als auch immunologisch über das Poly-Histidin-Epitop nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13 B, Spur 4).

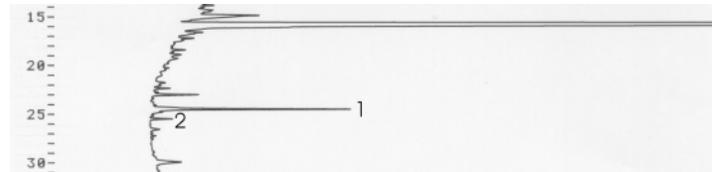
Im Fall von hADAM10splice konnte die reife prozessierte Form nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie immunologisch bei ca. 50 kDa in der Eluatfraktion 1 nachgewiesen werden. Zusätzlich ist jedoch noch die unprozessierte Form des Enzyms bei ca. 70 kDa zu sehen (siehe Abb. 3.13 D, Spur 4), so dass hier im Vergleich zur Reinigung von hADAM10s keine Abtrennung der unreifen Form erfolgte. Auch nach der Silberfärbung ist die durchaus dominierende reife Form von hADAM10splice bei 50 kDa und die unprozessierte Form bei 70 kDa in der Eluatfraktion 1 identifizierbar (siehe Abb. 3.13 C, Spur 4).

In dieser Versuchsanordnung wurde als Alternative zu den 30 kDa Konzentratoren die jeweiligen Eluatfraktionen einer Gelfiltration mit Hilfe von NAP-10 Säulchen nach Angaben des Herstellers unterzogen. Nach dem Einlaufen der jeweiligen Probe erfolgte deren Elution mit einer äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer. Daran anschließend wurden die Eluate auf ihre enzymatische Aktivität hin geprüft (siehe Abb. 3.14 A-B). Dabei stellte es sich heraus, dass beide gereinigten Enzyme nicht in der Lage waren, das Peptidsubstrat APP18 zu spalten, wohingegen die jeweilige 30-100 kDa Fraktion durchaus eine Spaltung bewirkte. In beiden Fällen war hier neben dem eingesetzten Substrat APP18, entsprechend dem Signalpeak 1 das charakteristische Spaltprodukt APP12, entsprechend dem Signalpeak 2 nachzuweisen (siehe Abb. 3.14 A oben und B oben). Bei der Spaltung durch die jeweiligen

Eluatfraktionen trat nur der für APP18 typische Signalpeak 1 auf (siehe Abb. 3.14 A unten und B unten).

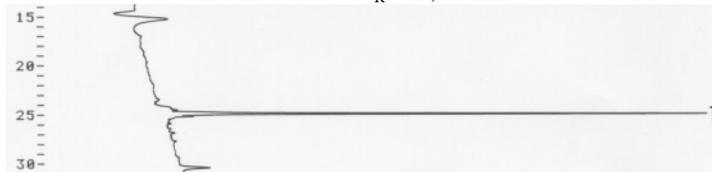
**Abb. 3.14 A-B:** Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch hADAM10s (A) und hADAM10splice (B) nach der Ni-NTA-Chromatographie: 400 mM Imidazol

**Abb. 3.14 A:**



**45 µl hADAM10s 30-100 kDa-Fraktion**

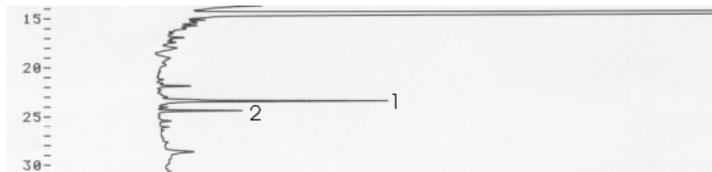
Peak 1: APP18  $t_R = 24,62$  min  
Peak 2: APP12  $t_R = 25,63$  min



**45 µl hADAM10s Elutionsfraktion 1**

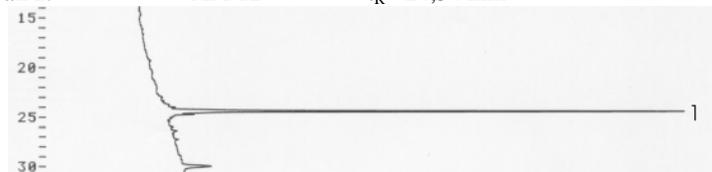
Peak 1: APP18  $t_R = 24,80$  min

**Abb. 3.14 B:**



**45 µl hADAM10splice 30-100 kDa-Fraktion**

Peak 1: APP18  $t_R = 23,36$  min  
Peak 2: APP12  $t_R = 24,34$  min



**45 µl hADAM10splice Elutionsfraktion 1**

Peak 1: APP18  $t_R = 24,35$  min

Trotz der unmittelbaren Entfernung des Imidazols nach den jeweiligen Reinigungen durch den Einsatz der 30 kDa Konzentratoren bzw. der NAP-10 Gelfiltrationssäulen konnte die Enzymfunktion nicht erhalten werden. Offensichtlich erfolgte durch das im Elutionspuffer vorliegende Imidazol innerhalb kürzester Zeit eine irreversible Denaturierung der ADAM10-

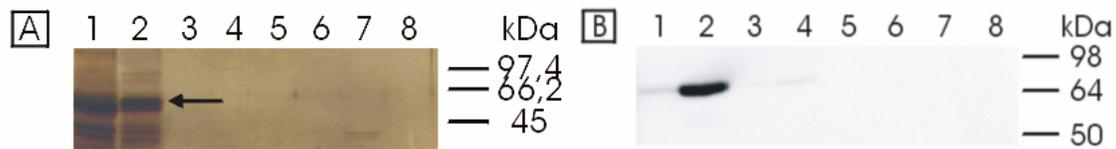
Proteine. Um dies zu verhindern, wurde die Imidazolkonzentration auf bis zu 250 mM reduziert, was zur jedoch zur Folge hatte, dass die Proteine nicht mehr von der Säule eluiert werden konnten.

Da nicht nur Imidazol eine irreversible Denaturierung von hADAM10s und hADAM10splice bewirkt haben könnte, wurde im nächsten analytischen Versuchsansatz die Natriumchloridkonzentration der eingesetzten Puffer von 500 mM auf 100 mM deutlich reduziert.

Dafür wurde das aus 90 ml Zellüberstand von hADAM10s-exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen hergestellte Konzentrat von 1,8 ml (ca. 358 µg Protein) bzw. das aus 64 ml Zellüberstand von hADAM10splice-exprimierenden Zellen resultierende von 2,9 ml (ca. 300 µg Protein) nach der Zugabe der äquivalenten Menge an Enzym-Assaypuffer bei gleicher Versuchsdurchführung für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie eingesetzt.

**Abb. 3.15 A-D: Reinigung von hADAM10s (A-B) und hADAM10splice (C-D) über Ni-NTA: 100 mM NaCl**

**Reinigung von hADAM10s**



**Abb. 3.15 A: Silberfärbung**

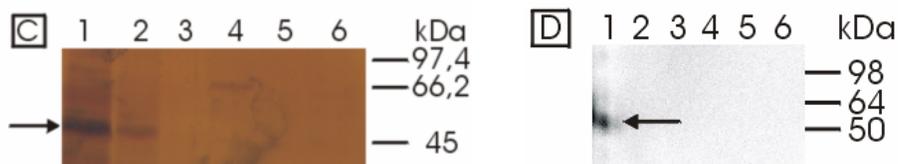
Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5-8: Eluatfraktion 2-5

Der Pfeil kennzeichnet die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa.

**Abb. 3.15 B: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5-8: Eluatfraktion 2-5

**Reinigung von hADAM10splice**



**Abb. 3.15 C: Silberfärbung**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 4: Eluatfraktion 1  
 Spur 5: Eluatfraktion 2  
 Spur 6: Eluatfraktion 3

Die Pfeile kennzeichnen die reife Form von hADAM10splice bei ca. 50 kDa.

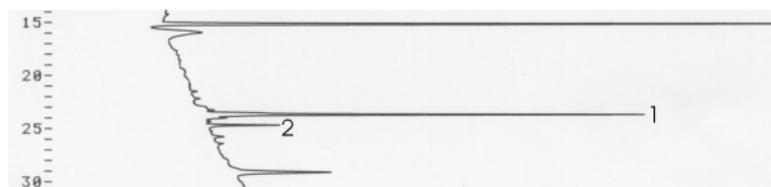
**Abb. 3.15 D: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2: Waschfraktion 1  
 Spur 3: Waschfraktion 2  
 Spur 5: Eluatfraktion 2  
 Spur 6: Eluatfraktion 3

Aus Abbildung 3.15 geht hervor, dass durch die in diesem Versuch gewählten Pufferbedingungen das Bindungsverhalten von hADAM10s und hADAM10splice beeinträchtigt wurde. Während im Fall von hADAM10splice nicht einmal die Bindung an das Säulenmaterial gewährleistet werden konnte (siehe Abb. 3.15 C und D, Spur 1), wurde hADAM10s nach erfolgter Bindung an das Säulenmaterial durch die entsprechenden Waschschriffe direkt wieder von der Säule entfernt (siehe Abb. 3.15 A und B, Spur 2). Allerdings blieb die enzymatische Aktivität der in der Waschfraktion 1 vorliegenden prozessierten Form von hADAM10s erhalten (siehe Abb. 3.16). Unter diesen Bedingungen kam es somit nicht zu einer irreversiblen Denaturierung von hADAM10s, wobei man dies nicht eindeutig der hier vorliegenden niedrigen Natriumchloridkonzentration zuordnen kann, da auch die im Waschpuffer vorhandene Imidazolkonzentration von 20 mM im Vergleich zu den eingesetzten Elutionspuffern sehr gering war.

Eine Aufreinigung von hADAM10s und hADAM10splice war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

**Abb. 3.16:** Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch die hADAM10s-Waschfraktion 1 nach der Ni-NTA-Chromatographie: 100 mM NaCl



**45 µl hADAM10s-Waschfraktion 1**

Peak 1:	APP18	$t_R = 23,68$ min
Peak 2:	APP12	$t_R = 24,68$ min

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Bindung der zu reinigenden löslichen ADAM10-Proteine eine hohe Natriumchloridkonzentration und für ihre anschließende erfolgreiche Elution eine relativ hohe Imidazolkonzentration unerlässlich war. Die vorhandenen Salze bewirkten offensichtlich innerhalb kürzester Zeit eine irreversible Denaturierung von hADAM10s bzw. hADAM10splice, die selbst durch die unmittelbar auf die Reinigung folgende Entfernung dieser Salze durch den Einsatz von 30 kDa Konzentratoren bzw. der NAP-10 Gelfiltrationssäulchen nicht verhindert werden konnte. Eine Reinigung der beiden enzymatisch aktiven ADAM10-Proteine war durch diese Methode nicht möglich.

### **3.3.3 Analytische Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Lektin-Affinitätschromatographie und Nachweis ihrer enzymatischen Aktivität**

Als Alternative zur Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie und unterstützt durch die Tatsache, dass beide Proteine deglykosylierbar waren (siehe 3.4.1), wurde die Aufreinigung mittels Lektin-Affinitätschromatographie über Concanvalin A Sepharose 4B (siehe 2.6.1.3) ausgewählt.

Die meisten für Säugetierproteine charakteristischen post-translationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen können durch Insektenzellen durchgeführt werden (Dee und Shuler, 1997). Allerdings können Insektenzellen in der Regel keine komplexen Oligosaccharide bilden, wie z. B. in Säugetierzellen üblich. Vielmehr zeichnen sie sich durch das Vorhandensein von einfachen Zuckerresten, wie z. B. Mannose, aus (Massotte, 2003), die jedoch für eine Reinigung über Lektine durchaus geeignet sind.

Für die analytische Aufreinigung von hADAM10s und hADAM10splice wurden jeweils 64 ml Zellüberstände von den mit dem entsprechenden rekombinanten Baculovirus infizierten Sf9-Monolayerkulturen auf 3 ml aufkonzentriert (entspricht 282 µg Gesamtprotein im hADAM10s-Konzentrat bzw. 253 µg Gesamtprotein im hADAM10splice-Konzentrat) und mit der gleichen Menge an Enzym-Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9; 2,5 µl ZnCl<sub>2</sub>; 0,005 % (v/v) Brij<sup>®</sup> 35) versetzt. Ein Drittel des jeweiligen Ansatzes (hADAM10s-Konzentrat: ca. 94 µg Protein; hADAM10splice-Konzentrat: ca. 84 µg Protein) wurde mit je 750 µl Concanvalin A Sepharose 4B für 18 h bei 4°C inkubiert. Nach den entsprechenden Waschschritten (siehe 2.6.1.3) erfolgte die Elution des an die jeweilige Säulenmatrix gebundenen Glykoproteins durch 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid. Das hADAM10s-Eluat von 2,5 ml wurde mit Hilfe eines 30 kDa Amicon Konzentrators auf ein Endvolumen von 200 µl eingeeengt, das hADAM10splice-Eluat von 2,1 ml auf 500 µl. Die entsprechenden Eluat-Konzentrate wurden jeweils mit dem gleichen Volumen an Enzym-Assaypuffer versetzt und auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht (siehe Abb. 3.18).

**Abb. 3.17 A-D:** Nachweis von hADAM10s (A-B) und hADAM10splice (C-D) nach der analytischen Reinigung mittels Concanvalin A

**Reinigung von hADAM10s**



**Abb. 3.17 A: Silberfärbung**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10s-Eluat

Die Pfeile kennzeichnen jeweils die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa.



**Abb. 3.17 B: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10s-Eluat

**Reinigung von hADAM10splice**



**Abb. 3.17 C: Silberfärbung**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10splice-Eluat

Der Pfeil kennzeichnet die reife Form von hADAM10splice bei ca. 50 kDa.



**Abb. 3.17 D: Western Blot**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10splice-Eluat

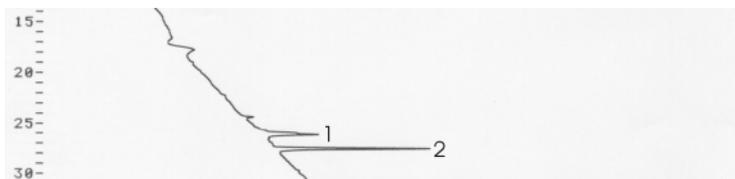
Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>  
 Puffer B: Puffer A ohne Triton X-100  
 Puffer C: Puffer B mit 0,3 % (v/v) CHAPS

Nach einer ersten Visualisierung durch Silberfärbung ist im jeweiligen Eluat allein die reife Form von hADAM10s bei ca. 60 kDa (siehe Abb. 3.17 A Spur 11) bzw. die reife Form von hADAM10splice bei ca. 50 kDa zu erkennen (siehe Abb. 3.17 C, Spur 11).

Dass es sich bei der nach Silberfärbung bei 60 kDa schwach sichtbaren Bande tatsächlich um die prozessierte Form von hADAM10s handelt, konnte durch Western Blot Analyse bestätigt werden (siehe Abb. 3.17 B, Spur 11). Ebenso konnte die prozessierte Form von hADAM10splice bei 50 kDa immunologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.17 D, Spur 11).

Für die Überprüfung der enzymatischen Aktivität der gereinigten Enzyme hADAM10s und hADAM10splice wurden je 25 µl des jeweiligen eingeeengten Eluats für den unter 2.6.2.2 beschriebenen Enzymtest eingesetzt.

**Abb. 3.18 A-B:** Analyse der proteolytischen Spaltung von APP18 durch hADAM10s (A) und hADAM10splice (B) nach der analytischen Reinigung mittels Concanvalin A



**Abb. 3.18 A:** 25 µl hADAM10s-Eluat  
 Peak 1: APP18  $t_R = 26,11$  min  
 Peak 2: APP12  $t_R = 27,50$  min



**Abb. 3.18 B:** 25 µl hADAM10splice-Eluat  
 Peak 1: APP18  $t_R = 27,18$  min  
 Peak 2: APP12  $t_R = 28,36$  min

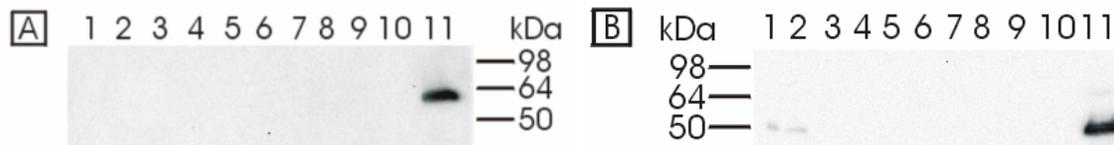
Die durch die Lektin-Affinitätschromatographie gereinigten und in ihrer prozessierten Form vorliegenden Proteine hADAM10s und hADAM10splice waren beide enzymatisch aktiv. Durch beide Enzyme wurde das Substrat APP18 gespalten und weist das charakteristische Spaltprodukt APP12 entsprechend dem Signalpeak 2 auf (siehe Abb. 3.18 A und Abb. 3.18 B).

Die Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Lektin-Affinitätschromatographie als Alternative zur Reinigung über das Poly-Histidin-Epitop erwies sich als erfolgreich. Nach dieser relativ unspezifischen Reinigungsmethode lagen jeweils nur noch die prozessierten enzymatisch aktiven Formen von hADAM10s und hADAM10splice vor.

### 3.3.4 Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice durch Lektin-Affinitätschromatographie im präparativen Maßstab

Für die präparative Reinigung von hADAM10s wurden 248 ml Sf9-Zellüberstände (entsprechen 32 Monolayerkulturschalen), für die von hADAM10splice 376 ml (entsprechen 47 Kulturschalen) aufkonzentriert (siehe 2.6.1.1). Für die Lektin-Affinitätschromatographie wurden 8 ml des hADAM10s (ca. 1 mg Protein) bzw. 7 ml des hADAM10splice 30 kDa-100 kDa-Konzentrat (ca. 1,6 mg Protein) eingesetzt (siehe 2.6.2.2). Nach den entsprechenden Waschschrritten erfolgte die Elution der Zielproteine mit 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid. Die 8 ml hADAM10s-Eluat (ca. 400  $\mu$ g Protein) wurden mit Hilfe eines 30 kDa Amicon Ultra Konzentratoren auf 2,5 ml, die 7 ml hADAM10splice-Eluat (ca. 660  $\mu$ g Protein) auf 3,5 ml aufkonzentriert.

**Abb. 3.19:** Immunologischer Nachweis von hADAM10s (A) und hADAM10splice (B) nach der präparativen Reinigung mittels Concanvalin A



**Abb. 3.19 A: hADAM10s**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10s-Eluat

**Abb. 3.19 B: hADAM10splice**

Spur 1: Säulendurchfluss  
 Spur 2-4: Waschen mit Puffer A  
 Spur 5-7: Waschen mit Puffer B  
 Spur 8-10: Waschen mit Puffer C  
 Spur 11: hADAM10splice-Eluat

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>

Puffer B: Puffer A ohne Triton X-100

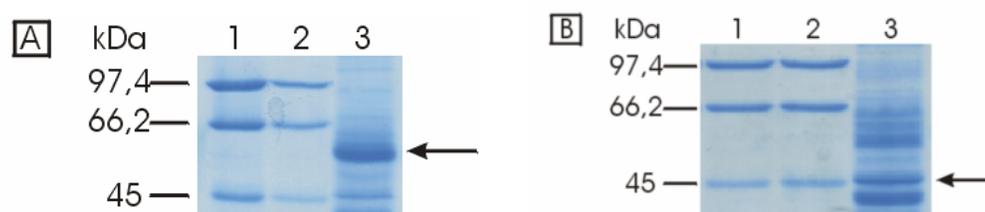
Puffer C: Puffer B mit 0,3 % (v/v) CHAPS

Auch im präparativen Maßstab konnte die reife Form von hADAM10s bzw. hADAM10splice über Lektin-Affinitätschromatographie mittels Concanvalin A gereinigt werden. Die prozessierte Form von hADAM10s ist deutlich bei 60 kDa (siehe Abb. 3.19 A, Spur 11), die von hADAM10splice bei 50 kDa (siehe Abb. 3.19 B, Spur 11) in der jeweiligen Elutionsfraktion zu erkennen, d.h. in beiden Fällen wurde wieder die unreife Enzymform erfolgreich abgetrennt.

Im Gegensatz zur Silberfärbung ist eine Mengenabschätzung im Coomassie-gefärbten Proteingel möglich, da hier die Bindung des Farbstoffs an das Protein stöchiometrisch erfolgt. Der Unterschied der Farbintensitäten der einzelnen Proteinbanden resultiert somit nur aus der jeweiligen in der Probe vorliegenden Proteinmenge.

Für die Mengenabschätzung wurden 100 µl des eingeeengten hADAM10s- bzw. des hADAM10splice-Eluats eingesetzt. Nach der Coomassie-Färbung der Proteinbanden konnte im Vergleich zu bekannten Mengen des aufgetragenen ungefärbten SDS-PAGE Low Range Markers (siehe 2.2.3.2) von einer hADAM10s-Proteinkonzentration von 400 ng/100 µl ausgegangen werden (siehe Abb. 3.20 A, Spur 3), was einer Proteinmenge von ca. 10 µg hADAM10s in 2,5 ml Proteinlösung entspricht. Für hADAM10splice konnte eine Proteinkonzentration von 300 ng/100 µl bestimmt werden (siehe Abb. 3.20 B, Spur 3), demnach lagen in 3,5 ml Lösung ca. 10,5 µg hADAM10splice vor.

**Abb. 3.20 A-B: Mengenabschätzung von präparativ gereinigtem hADAM10s (A) und hADAM10splice (B) nach Coomassie-Färbung**



**Abb. 3.20 A: hADAM10s**

Spur 1: 500 ng Protein/Markerbande  
 Spur 2: 200 ng Protein/Markerbande  
 Spur 3: 100 µl hADAM10s-Eluat

**Abb. 3.20 B: hADAM10splice**

Spur 1: 500 ng Protein/Markerbande  
 Spur 2: 200 ng Protein/Markerbande  
 Spur 3: hADAM10splice-Eluat

Der Pfeile kennzeichnen jeweils die reife Enzymform.

Die die gereinigten Enzyme hADAM10s bzw. hADAM10splice enthaltenden Proteinlösungen wurden aliquotiert, lyophilisiert und bei 4°C gelagert. Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf ihre Enzymaktivität.

Für die Kalkulation der Proteinausbeute wurden die jeweiligen 30-100 kDa-Konzentrate herangezogen. Ausgehend von 1 mg Protein im hADAM10s-Konzentrat aus 248 ml Zellüberständen konnten durch die Reinigung nach Mengenabschätzung im Coomassie-gefärbten Proteingel 10 µg prozessiertes hADAM10s entsprechend einer Proteinausbeute von

1 % erhalten werden. Aus 1,6 mg hADAM10splice-Konzentrat aus 376 ml Zellüberstand wurden 10,5 µg an prozessiertem hADAM10splice entsprechend einer Proteinausbeute von 0,66 % gereinigt. Ausgehend von 400 µg Protein im hADAM10s-Eluat entspricht der Anteil an gereinigtem Enzym 2,5 % bzw. bei 660 µg Protein im hADAM10splice-Eluat 1,6 %.

	hADAM10s		hADAM10splice	
	Proteinmenge	Ausbeute	Proteinmenge	Ausbeute
30-100 kDa-Konzentrat der Zellüberstände	1000 µg (aus 248 ml Zellüberstand von 32 Monolayerkulturen)	100 %	1600 µg (aus 376 ml Zellüberstand von 47 Monolayerkulturen)	100 %
Eluat der Affinitäts-Chromatographie	400 µg		660 µg	
gereinigtes Enzym (nach Behandlung des Eluats mit einem 30 kDa-Konzentrator; Abschätzung nach Coomassie-Färbung)	10 µg hADAM10s (= 2,5 % des Eluat-Gesamtproteins)	1 %	10,5 µg hADAM10splice (= 1,6 % des Eluat-Gesamtproteins)	0,66 %

**Tabelle 3.2:** Proteinausbeute von hADAM10s und hADAM10splice nach deren präparativen Reinigung durch Lektin-Affinitätschromatographie

### 3.4 CHARAKTERISIERUNG DER LÖSLICHEN ADAM10-VARIANTEN

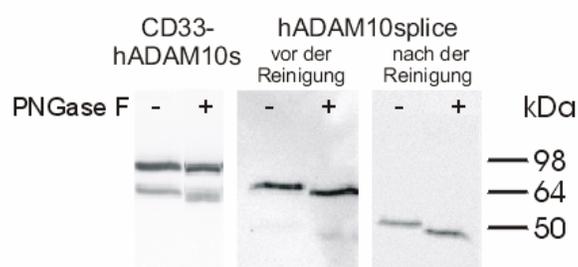
#### 3.4.1 Deglykosylierung der löslichen ADAM10-Varianten

Insektenzellen sind in der Lage, die meisten für Säugetierproteine typischen post-translationalen Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, Fettsäure-Acylierung und auch Glykosylierungen auszuführen. Allerdings können sie bei der Durchführung von N-Glykosylierung keine komplexen Oligosaccharide bilden, so dass sich diese vielmehr durch einen hohen Anteil an Mannose-Resten auszeichnen (Massotte, 2003).

Die Protease ADAM10 enthält vier potentielle Glykosylierungsstellen, drei in der katalytischen und eine in der Cystein-reichen Domäne. Die beiden in Insektenzellen

exprimierten löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice sollten somit deglykosylierbar sein, eine wichtige Voraussetzung für ihre Reinigung mittels Lektin-Chromatographie (siehe 3.3).

Jeweils 500 µl des Zellüberstands von hADAM10s bzw. hADAM10splice exprimierenden Sf9-Monolayerkulturen wurden wie unter 2.6.2.1 beschrieben mit dem Enzym Peptid-N-Glycosidase F (PNGaseF) inkubiert. Das Enzym spaltet Glykoproteine mit komplexen und Mannose-reichen Oligosacchariden zwischen dem innersten N-Acetylglucosaminrest und Asparagin.



**Abb. 3.21: Deglykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice**

Von den entsprechenden Sf9-Überständen wurden jeweils 500 µl eingesetzt. Nach erfolgter TCA-Fällung wurden die Proben für 18 h bei 37°C mit der PNGaseF inkubiert.

Spur 1: hADAM10s ohne PNGaseF

Spur 2: hADAM10s mit PNGaseF

Spur 3: hADAM10splice (vor der Reinigung) ohne PNGaseF

Spur 4: hADAM10splice (vor der Reinigung) mit PNGaseF

Spur 5: hADAM10splice (nach der Reinigung) ohne PNGaseF

Spur 6: hADAM10splice (nach der Reinigung) mit PNGaseF

Nach der PNGase F-Behandlung konnte im Vergleich zu den unbehandelten ADAM10-Proteinen jeweils eine etwas kleinere Bande durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.21), d.h. es war eine Deglykosylierung sowohl der unprozessierten als auch der reifen Form der beiden löslichen ADAM10-Proteine zu erkennen. Da die prozessierte Form von hADAM10splice in den Sf9-Kulturüberstand nur schwach zu erkennen war (siehe Abb. 3.21, Spur 3 und 4), wurde die Deglykosylierung mit gereinigtem und lyophilisierten hADAM10splice wiederholt (siehe Abb. 3.21, Spur 5 und 6).

Die Differenz der Molekulargewichte zwischen glykosylierter und deglykosylierter Enzymform sollte ca. 3-4 kDa ausmachen. Der Unterschied fällt hier jedoch weniger deutlich aus als in ADAM10-überexprimierenden HEK-Zellen (Lammich *et al.*, 1999), was an der

jeweiligen Komplexität der von den entsprechenden Zelllinien angeknüpften Oligosaccharide liegen könnte.

### 3.4.2 Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften von hADAM10s und hADAM10splice

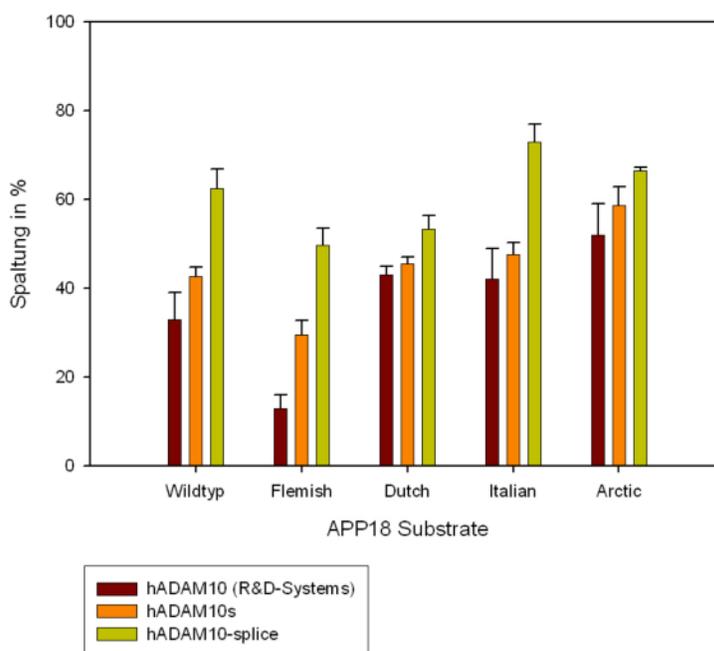
Zur Charakterisierung der mittels Lektinchromatographie gereinigten Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurden für die quantitativen Spaltungsversuche Peptidsubstrate des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) ausgewählt, die die spezifische Spaltstelle der  $\alpha$ -Sekretase beinhalten. Dabei handelte es sich um das schon zur qualitativen Bestimmung der enzymatischen Aktivität von hADAM10s und hADAM10splice eingesetzte Peptidsubstrat APP18, das den Aminosäuren 11-28 der A $\beta$ -Sequenz im Amyloid-Vorläufer-Protein entspricht (EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK-NH<sub>2</sub>). Daneben wurden noch weitere Substrate eingesetzt, die ebenfalls den Aminosäuren 11 bis 28 des A $\beta$ -Peptids entsprachen, an den Positionen 21 und 22 jedoch charakteristische Mutationen aufwiesen. Die Sequenzen der als Flemish, Dutch, Italian und Arctic bezeichneten Mutationen sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Neben diesen kurzen Peptidsubstraten kamen A $\beta$ 40 und die entsprechenden A $\beta$ 40-Peptide zum Einsatz, die analog der APP18-Substrate die genannten Mutationen an den Positionen 21 und 22 aufwiesen (siehe Tabelle 3.3).

SUBSTRAT	AMINOSÄURESEQUENZ
APP18 (11-28)	EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK
APP18-Flemish	EVHHQK↓LVFFGEDVGSNK
APP18-Dutch	EVHHQK↓LVFFAQDVGSNK
APP18-Italian	EVHHQK↓LVFFAKDVGSNK
APP18-Arctic	EVHHQK↓LVFFAGDVGSNK
A $\beta$ 40	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A $\beta$ 40A21G (Flemish)	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFGEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A $\beta$ 40E22Q (Dutch)	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A $\beta$ 40E22K (Italian)	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAKDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A $\beta$ 40E22G (Arctic)	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAGDVGSNKGAIIGLMVGGVV

**Tabelle 3.3:** Aminosäuresequenzen der verschiedenen eingesetzten APP18- und A $\beta$ 40-Substrate, mit den charakteristischen in der Nähe der  $\alpha$ -Sekretasespaltstelle (durch den Pfeil in der Sequenz markiert) lokalisierten Mutationen an Position 21 und 22 innerhalb der A $\beta$ -Sequenz.

Das Auftreten der charakteristischen Spaltfragmente und damit die Bestätigung, dass die Peptide an der  $\alpha$ -Sekretasestelle gespalten wurden, erfolgten für hADAM10s (R&D) durch massenspektroskopische Untersuchungen (siehe 7.1). Aufgrund der bei der Spaltung durch

hADAM10s und hADAM10splice durch HPLC-Analysen auftretenden identischen Spaltfragmente kann man davon ausgehen, dass die Spaltung durch diese ebenfalls spezifisch an der  $\alpha$ -Sekretasestelle erfolgte.



**Abb. 3.22:** Graphische Darstellung der Spaltung der APP18-Substrate (siehe Tab. 3.3) in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice nach 6 h

Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

Aus Abbildung 3.22 ist ersichtlich, dass die sich aus den Aminosäuren 11-28 des A $\beta$ -Peptids ableitenden APP18-Substrate durch die eingesetzten ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice gespalten wurden. Bei allen drei Enzymen konnte bezüglich der Spaltung des jeweiligen APP18-Substrats eine ähnliche Tendenz beobachtet werden. Die enzymatische Aktivität von hADAM10splice scheint im Vergleich zu den beiden anderen ADAM10-Proteinen höher zu sein. Allerdings ist zu beachten, dass die eingesetzten Mengen an hADAM10s und hADAM10splice auf einer Mengenabschätzung im Coomassie-gefärbten Proteingel beruhen. Die durch die einzelnen ADAM10-Proteine erfolgte Spaltung in Prozent ist Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Substrat	hADAM10s (R&D-Systems)*	hADAM10s	hADAM10splice
APP18 (11-28)	33 % ± 6 %	42,7 % ± 2,1 %	62,4 % ± 4,4 %
APP18-Flemish	13 % ± 3 %	29,5 % ± 3,2 %	49,8 % ± 3,8 %
APP18-Dutch	43 % ± 2 %	45,5 % ± 1,5 %	53,3 % ± 3,1 %
APP18-Italian	42 % ± 7 %	47,7 % ± 2,5 %	73,0 % ± 3,9 %
APP18-Arctic	52 % ± 7 %	58,7 % ± 4,2 %	66,5 % ± 0,7 %

**Tabelle 3.4:** Spaltung der verschiedenen APP18-Substrate in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice nach 6 h  
Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

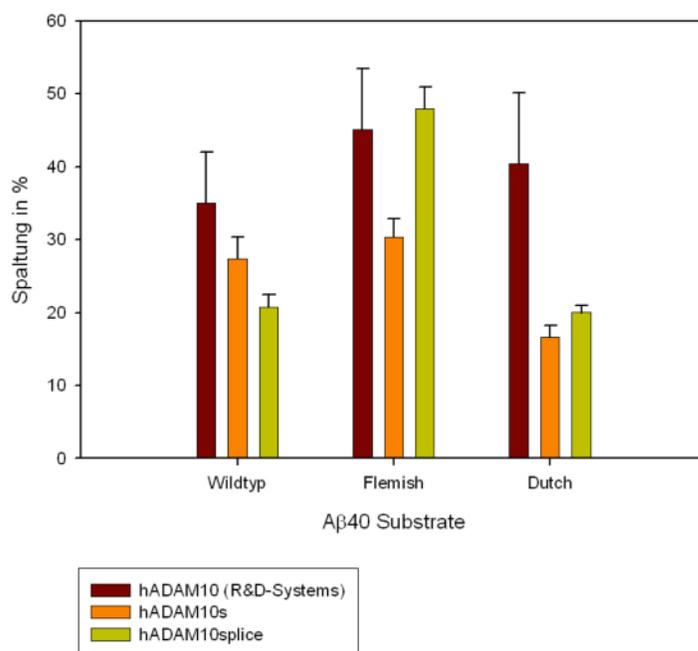
\*Daten zur Verfügung gestellt von K. Wisniewska, E. Kojro und F. Fahrenholz

Anhand der in Tabelle 3.4 zusammengefassten Daten lässt sich erkennen, dass die beiden Enzyme hADAM10s und hADAM10s (R&D-Systems) sich in ihrem Spaltungsverhalten ähneln. Die Peptide APP18-Italian und APP18-Dutch werden durch sie ähnlich stark gespalten wie APP18. Die Spaltung von APP18-Arctic erfolgt durch beide Enzyme am stärksten, die von APP18-Flemish am schwächsten.

Durch hADAM10splice wurde APP18-Italian im Vergleich zu APP18-Dutch, APP18 und APP18-Arctic am deutlichsten gespalten. Das Substrat APP18-Flemish wurde durch hADAM10splice schwächer, jedoch ähnlich APP18-Dutch gespalten.

Die schwächere Spaltung von APP18-Flemish durch die ADAM10-Proteine wurde durchaus erwartet. Durch die hier vorliegende Aminosäuren-Substitution A→G an der Position 21 in der Aβ-Sequenz weist APP18-Flemish im Gegensatz zu den anderen Substraten keine α-helicale Struktur mehr auf, sondern zeichnet sich durch das Vorhandensein einer „random coil“-Konformation aus (siehe 4.3.2, Abb. 4.1; Hendricks *et al.*, 1992). Für die Spaltung durch die α-Sekretase spielt die α-helicale Struktur des Substrats jedoch eine wichtige Rolle, so dass die vermutlich konformationsabhängige Spaltung im Fall der Flemish-Mutation schwächer erfolgt (Sisodia, 1992; Lammich *et al.*, 1999).

Die Spaltung der verschiedenen APP18-Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s lässt auf eine ähnliche Spezifität der Enzyme schließen, wohingegen die von hADAM10splice leichte Abweichungen bezüglich der Substratpräferenzen aufweist.



**Abb. 3.23:** Graphische Darstellung der Spaltung der Substrate Aβ40, Aβ40A21G (Flemish) und Aβ40E22Q (Dutch) in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice nach 6 h  
Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

Auch die Peptide Aβ40, Aβ40A21G (Flemish) und Aβ40E22Q (Dutch) konnten durch die Enzyme hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice gespalten werden. Die genauen Angaben zur Spaltung der einzelnen Aβ40-Peptide durch die verschiedenen ADAM10-Proteine in Prozent sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Substrat	hADAM10s (R&D-Systems)	hADAM10s	hADAM10splice
Aβ40	35,0 % ± 7,0 %	27,3 % ± 3,1 %	20,8 % ± 1,7 %
Aβ40A21G (Flemish)	45,1 % ± 8,3 %	30,3 % ± 2,5 %	48,0 % ± 3,0 %
Aβ40E22Q (Dutch)	40,4 % ± 9,7 %	16,7 % ± 1,5 %	20,0 % ± 1,0 %
Aβ40E22K (Italian)	31,4 % ± 7,1 %	-	-
Aβ40E22G (Arctic)	40,0 % ± 6,2 %	-	-

**Tabelle 3.5:** Spaltung der verschiedenen Aβ40-Substrate in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice nach 6 h  
Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

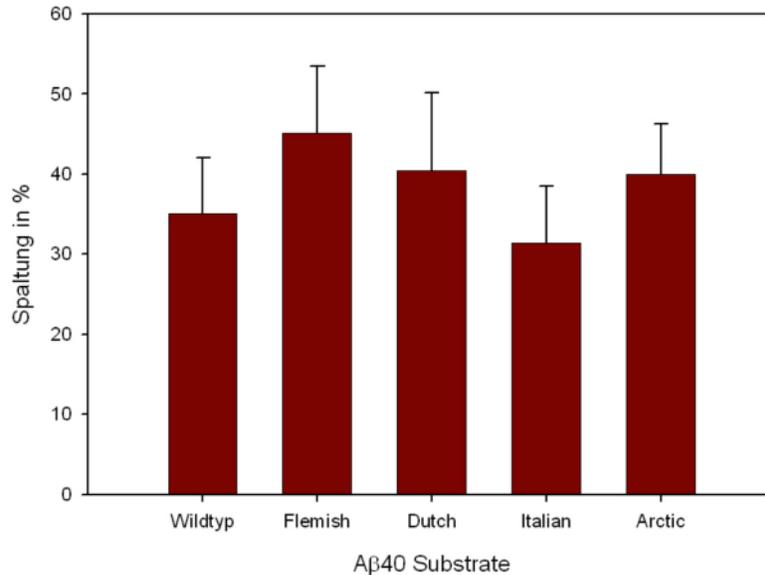
Synthetische A $\beta$ -Peptide können in Lösung entweder als  $\alpha$ -helicale Monomere oder als Oligomere mit  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen. Die  $\alpha$ -helicale Konformation ist sehr löslich und wird in membranähnlichem Milieu mit hohem oder niedrigem pH-Wert favorisiert (Talaouf *et al.*, 1994). Der hier für die Charakterisierung verwendete Enzym-Assaypuffer hat einen pH-Wert von 9, so dass die eingesetzten Peptide in löslicher, d.h. in  $\alpha$ -helicaler Form vorliegen sollten und demnach gut von den löslichen ADAM10-Proteinen gespaltet werden konnten.

Auffällig war hier, dass bei allen drei verwendeten ADAM10-Proteinen keine deutlich schwächere Spaltung von A $\beta$ 40A21G zu beobachten war (siehe Abb. 3.23), obwohl durch die Flemish-Mutation auch hier eine Destabilisierung der  $\alpha$ -helicalen Struktur erfolgen sollte. Demnach wurde wie bei dem entsprechenden APP18-Peptid auch hier eine deutlich schwächere Spaltung erwartet. Doch A $\beta$ 40A21G scheint für hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10splice ein besseres Substrat darzustellen als A $\beta$ 40, wobei seine Spaltung durch hADAM10splice am deutlichsten erfolgte. Durch hADAM10s erfolgte die Spaltung von A $\beta$ 40A21G ähnlich der des Wildtyps.

Dagegen stellte das Peptid A $\beta$ 40E22Q für hADAM10s ein deutlich schlechteres Substrat als A $\beta$ 40 und A $\beta$ 40A21G dar. Die Spaltung durch hADAM10splice war mit der des Wildtyps, die durch hADAM10s (R&D-Systems) mit der von A $\beta$ 40A21G vergleichbar. Während also A $\beta$ 40E22Q für hADAM10s und hADAM10splice das schlechteste Substrat darstellte, war dies im Fall von hADAM10s (R&D-Systems) A $\beta$ 40.

Anhand dieser Ergebnisse scheint es auf den ersten Blick schwierig, auf eine gleiche Spezifität der eingesetzten ADAM10-Proteine zu schließen. Während die Spaltung von A $\beta$ 40 durch alle drei noch relativ ähnlich erfolgte, unterschieden sie sich deutlich bei der der beiden anderen Substrate. Die drei verwendeten ADAM10-Proteine sind nicht identisch, sondern weisen einige Unterschiede in ihrer Struktur auf. Die Enzyme hADAM10s und hADAM10s (R&D-Systems) stimmen darin überein, dass beide die 16 Aminosäuren lange Signalsequenz des Oberflächenmoleküls CD33 enthalten, woran sich die Sequenz des humanen ADAM10 anschließt. Bei hADAM10s (R&D-Systems) endet diese nach der Aminosäure 672, bei hADAM10s nach der Aminosäure 664 und damit einige Aminosäuren vor Ende der Cystein-reichen Domäne (Aminosäure 673). Ferner unterscheiden sich die beiden Enzyme in der Länge des Poly-Histidin-Epitops. Während das von hADAM10s (R&D-Systems) 10 Histidine enthält, sind es bei hADAM10s nur sechs. Die humane Splicevariante umfasst die Aminosäuren 1-565 von ADAM10 und endet am Anfang der Cystein-reichen Domäne (Aminosäuren 549-673). Das Poly-Histidin-Epitop umfasst auch hier sechs Aminosäurereste.

Möglicherweise resultieren schon kleine Veränderungen der Enzymstruktur in einer Veränderung der Substratpräferenz. Allerdings könnten die Unterschiede auch methodisch bedingt sein, sichtbar an den relativ hohen Standardabweichungen.



**Abb. 3.24:** Spaltung verschiedener Aβ40-Substrate in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems) nach 6 h  
 Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

In Abbildung 3.24 sind die Ergebnisse der Spaltungen der verschiedenen Aβ40-Peptide durch hADAM10s (R&D-Systems) zusammengefasst. Dabei wird deutlich, dass alle eingesetzten Aβ40-Substrate erfolgreich gespalten wurden, wobei keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (siehe Tab. 3.5).

**Stabilität der gereinigten Enzyme hADAM10s und hADAM10splice**

Zur Untersuchung, ob die gereinigten, lyophilisierten Enzyme hADAM10s und hADAM10splice bei 4°C gelagert werden können, wurde deren Enzymaktivität nach einem Zeitraum von 4 Wochen erneut durch die Spaltung des Peptidsubstrats APP18 bestimmt.

	<b>hADAM10s</b>	<b>hADAM10splice</b>
Tag 1	42,7 % ± 2,1 %	62,4 % ± 4,4 %
Tag 31	44,5 % ± 0,7 %	66 % ± 1,7 %

**Tabelle 3.6: Spaltung von APP18 in Prozent durch 100 nM hADAM10s bzw. hADAM10splice nach 4-wöchiger Lagerung des jeweiligen Lyophilisats bei 4°C**

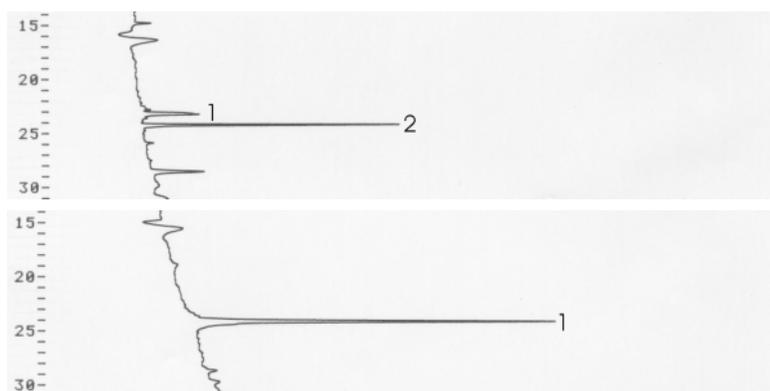
Durch die Lagerung des jeweiligen Lyophilisats der gereinigten Enzyme hADAM10s und hADAM10splice bei 4°C war kein Verlust ihrer enzymatischen Aktivität zu beobachten. Nach einem Zeitraum von vier Wochen konnten das Peptidsubstrat APP18 durch beide Enzyme entsprechend den Werten aus Tabelle 3.6 mit gleicher Aktivität spalten werden. Ferner scheint die fehlende Cystein-reiche Domäne von hADAM10splice keinen negativen Einfluss auf die enzymatische Aktivität zu haben.

**Wirkung des Inhibitors GI 254023 X auf die verschiedenen ADAM10-Proteinvarianten**

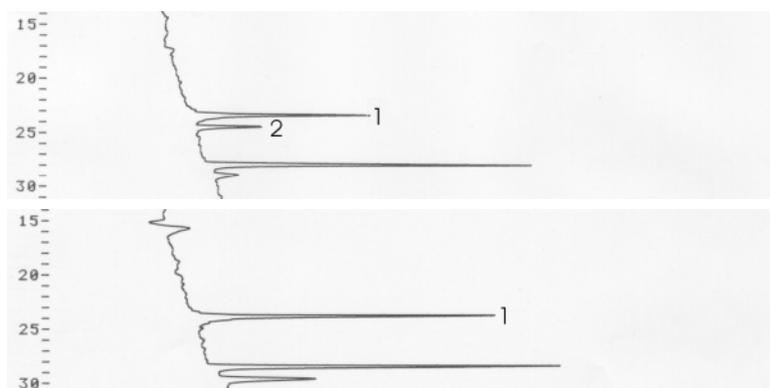
Bei der  $\alpha$ -Sekretase handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das durch Hydroxamatsäure-Derivate (hydroxamic-acid-based zinc metalloproteinase inhibitors), wie zum Beispiel Batimastat, Marimastat und BB2116 inhibiert werden kann (Parvathy *et al.*, 1999). Um diese Eigenschaft bei den beiden gereinigten Proteinen hADAM10s und hADAM10splice zu überprüfen, wurden sie mit dem für die native  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 spezifischen Inhibitor GI 254023 X (GlaxoSmithKline) inkubiert. Dafür wurde dieser in einer Endkonzentration von 10 nM ( $IC_{50}$ = 5,3 nM für ADAM10; Hundhausen *et al.*, 2003) in dem entsprechenden Versuchsansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37°C.

Die Aktivität der löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems; siehe Abb. 3.25 A), hADAM10s (siehe Abb. 3.25 B) und hADAM10splice (nicht gezeigt) wurden durch 10 nM GI 254023 X inhibiert, so dass jeweils nur der für das APP18 typische Signalpeak, nicht aber der für dessen Spaltung charakteristische Signalpeak 2, entsprechend dem Spaltfragment APP12, zu sehen ist. In dieser Eigenschaft sind sie mit der nativen Form von ADAM10 identisch.

**Abb. 3.25 A-B:** Auswirkung des Inhibitors GI 254023 X auf die Spaltung von APP18 durch die ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s



**Abb. 3.25 A:** **100 nM hADAM10s (R&D-Systems) (oben)**  
 Peak 1: APP18  $t_R = 23,23$  min  
 Peak 2: APP12  $t_R = 24,19$  min  
**100 nM hADAM10s (R&D-Systems), 10 nM GI 254023 X (unten)**  
 Peak 1: APP18  $t_R = 23,98$  min



**Abb. 3.25 B:** **100 nM hADAM10s (oben)**  
 Peak 1: APP18  $t_R = 23,32$  min  
 Peak 2: APP12  $t_R = 24,38$  min  
**100 nM hADAM10s, 10 nM GI 254023 X (unten)**  
 Peak 1: APP18  $t_R = 23,80$  min

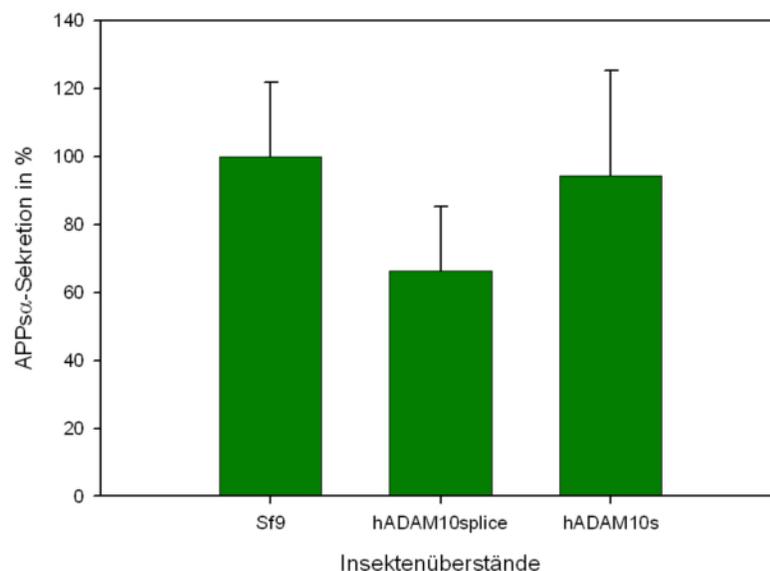
Die *in vitro* Versuche zeigen, dass das Fehlen der Cystein-reichen Domäne im Fall von hADAM10splice keine Auswirkung auf die Substrat- bzw. Inhibitorbindung zu haben scheint. Auch ein möglicher Stabilitätsverlust innerhalb des getesteten Zeitraums von vier Wochen konnte nicht festgestellt werden (siehe Tab. 3.6), obwohl dieser Domäne eine Struktur-stabilisierende Funktion zugesprochen wird.

Bezüglich der Spaltung der APP18-Substrate lässt sich ein ähnliches Spaltungsverhalten von hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s erkennen, während hADAM10splice leichte Abwandlungen in der Substratpräferenz aufzeigte (siehe auch 4.3.2, Tabelle 4.1). Bei der Spaltung der A $\beta$ 40-Peptide findet sich jedoch eine Ähnlichkeit zwischen hADAM10s und

hADAM10splice. Möglicherweise liegt dies in den aufgezeigten unterschiedlichen Enzymstrukturen begründet, die jedoch im Fall der Inhibierung durch GI 254023 X keine Rolle zu spielen scheinen.

### 3.4.3 Einfluss der löslichen ADAM10-Proteine auf die APP $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen

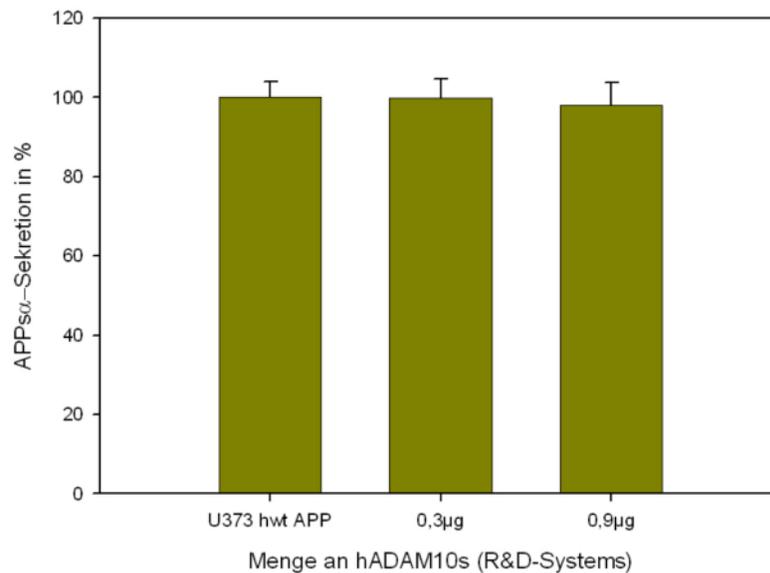
Zur Untersuchung, ob die beiden in den Sf9-Insektenzellen exprimierten löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice auch einen Einfluss auf die APP $\alpha$ -Produktion im Zellsystem durch die Spaltung des exprimierten Membranproteins APP haben, wurden U373 Zellen, die das humane wildtyp APP überexprimieren, mit den entsprechenden Insektenzellüberständen wie unter 2.6.2.3 beschrieben inkubiert.



**Abb. 3.26:** Einfluss der Sf9-Insektenzellüberstände von nicht infizierten sowie von hADAM10s- und hADAM10splice-exprimierenden Sf9-Zellen auf die APP $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen

Die in Abbildung 3.26 zusammengefassten Messergebnisse unterlagen großen Schwankungen. Unter deren Berücksichtigung kann man davon ausgehen, dass die Inkubation der U373 hwt APP-Zellen mit den entsprechenden Sf9-Monolayerkulturüberständen keinen Einfluss auf die APP $\alpha$ -Produktion hatte. Die starke Abweichung der einzelnen Messwerte resultiert aus der Tatsache, dass die jeweils eingesetzte Proteinmenge an reifen und damit

enzymatisch aktiven hADAM10s und hADAM10splice in den eingesetzten Sf9-Monolayerkulturüberständen nicht bekannt war, da lediglich die Bestimmung der Gesamtproteinmenge möglich war. Da jedoch auch die Negativkontrollen, d.h. Überstände von nicht-infizierten Sf9-Monolayerkulturen hohen Schwankungen ausgesetzt waren, kann man davon ausgehen, dass die Zusammensetzung des Insektenmediums ebenfalls einen Einfluss auf die Messung ausübte.



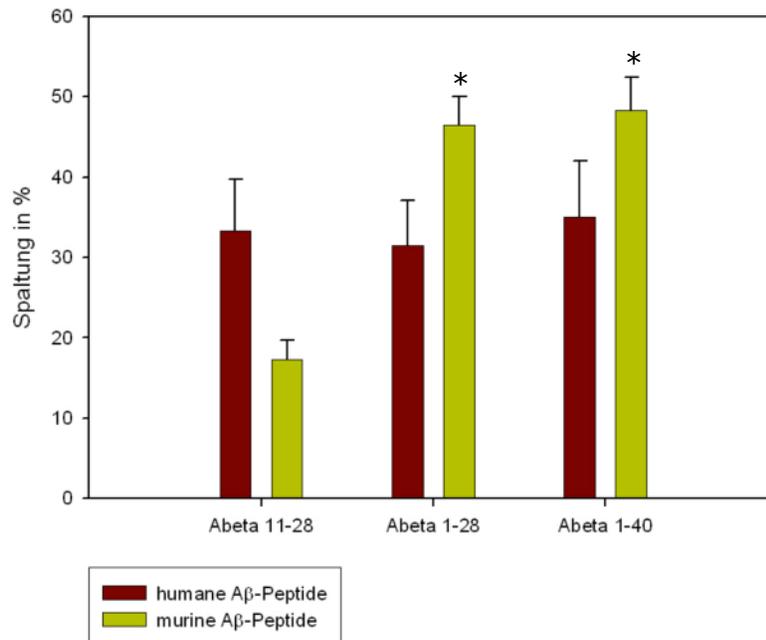
**Abb. 3.27:** Einfluss von rekombinantem hADAM10s (R&D-Systems) auf die APP $\alpha$ -Produktion in U373 hwt APP-Zellen

In Abbildung 3.27 kann man erkennen, dass die extrazelluläre Gabe von gereinigtem hADAM10s (R&D-Systems) in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die APP $\alpha$ -Sekretion hat. Die Membranverankerung des Enzyms scheint eine Voraussetzung für die Spaltung von APP an der  $\alpha$ -Sekretase-Stelle im Zellsystem zu sein, da vermutlich sonst die räumliche Nähe von Enzym und Substrat nicht gewährleistet ist. Für eine eindeutige Überprüfung dieses Ergebnisses müsste das entsprechende ADAM10-Protein jedoch in höheren Konzentrationen eingesetzt werden (Vergleich Enzymtest *in vitro*: 100 nM; in diesem Versuch: 5 nM).

### 3.4.4 Spaltung muriner und humaner A $\beta$ -Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems)

In diesem Versuch wurde die Spaltung von murinen und humanen A $\beta$ -Substraten durch hADAM10s (R&D-Systems) untersucht. Murines und humanes APP<sub>695</sub> unterscheidet sich in 17 Aminosäuren, von denen drei zwischen der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Sekretasestelle innerhalb der A $\beta$ -Sequenz lokalisiert vorliegen. Da Nagetiere keine Amyloid-Plaques bilden, sind vermutlich die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der beiden Spezies für eine veränderte Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase verantwortlich (De Strooper *et al.*, 1995).

Für diese Versuche wurden humane bzw. murine A $\beta$ -Substrate gewählt, die den Aminosäuren 11-28 (entsprechend APP18), 1-28 und 1-40 der jeweiligen A $\beta$ -Peptidsequenz entsprachen. Die entsprechenden veränderten Aminosäuren sind in Tabelle 3.7 dargestellt.



**Abb. 3.28:** Spaltung humaner und muriner A $\beta$ -Substrate in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems) nach 6 h

Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

\* entspricht  $p < 0,05$

Aus Abbildung 3.28 geht hervor, dass hADAM10s (R&D-Systems) bezüglich der Spaltung der beiden A $\beta$ 11-28-Substrate noch keine signifikanten Unterschiede aufweist. Anders verhält es sich bei der Spaltung der Substrate A $\beta$ 1-28 und A $\beta$ 1-40, wo eine deutlich bessere Spaltung der murinen Peptidvariante erfolgte. Die genauen Angaben zur Spaltung der

einzelnen Peptide durch hADAM10s (R&D-Systems) in Prozent sind Tabelle 3.7 zu entnehmen.

<b>Aβ- Peptide</b>	<b>AMINOSÄURESEQUENZ</b>	<b>hADAM10s (R&amp;D-Systems)</b>
<b>11-28H</b>	EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK	33,3 % ± 6,4 % *
<b>11-28M</b>	EVRHQK↓LVFFAEDVGSNK	17,3 % ± 2,8 % *
<b>1-28H</b>	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAEDVGSNK	31,5 % ± 5,6 % *
<b>1-28M</b>	DAEFGHDSGFEVRHQK↓LVFFAEDVGSNK	46,5 % ± 3,5 % *
<b>1-40H</b>	DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	35 % ± 7,0 %
<b>1-40M</b>	DAEFGHDSGFEVRHQK↓LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	48,3 % ± 4,0 %

**Tabelle 3.7: Spaltung der humanen (H) und murinen (M) Aβ-Substrate in Prozent durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems) nach 6 h**

Jedem Messergebnis liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde.

Ferner sind die Aminosäuresequenzen der menschlichen (H) und murinen (M) Aβ-Substrate dargestellt; die unterschiedlichen Aminosäuren sind hervor gehoben. Die α-Sekretasespaltstelle wird durch den Pfeil in der Sequenz markiert.

\*Daten zur Verfügung gestellt von K. Wisniewska, E. Kojro und F. Fahrenholz

Aus den Daten geht hervor, dass für eine bevorzugte Spaltung der murinen Aβ-Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems) die Aminosäurensubstitution an Position 13 allein keinen Einfluss zu haben scheint (siehe Spaltung von Aβ11-28). Anders bei den beiden längeren Peptidvarianten, in deren Sequenz alle drei Aminosäurensubstitutionen vorliegen und eine deutliche Zunahme der Spaltung der murinen Aβ-Substrate durch die α-Sekretase ADAM10 erfolgte (siehe Abb. 3.28).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 EXPRESSION DER LÖSLICHEN ADAM10-PROTEINE

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei lösliche Varianten der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 in Sf9-Insektenzellen exprimiert, daran anschließend gereinigt und charakterisiert. Dabei umfasste eins der hergestellten Expressionsplasmide den extrazellulären Bereich der Protease ohne Transmembran- und cytoplasmatische Domäne, was mit den Aminosäuren 1-664 des 748 Aminosäuren langen Proteins übereinstimmte. Des Weiteren trug dieses Konstrukt statt der eigenen, 19 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz die 16 Aminosäuren lange Signalsequenz des Zelloberflächenmoleküls CD33 (Siglec-3). Durch diese Signalsequenz des aus der Familie der „Siglecs“ (sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins; Taylor *et al.*, 1999) stammenden Proteins sollte die Sekretion des exprimierten löslichen ADAM10-Proteins ins Zellkulturmedium verstärkt werden.

Parallel dazu wurde ein Expressionsplasmid hergestellt, das einer Splicevariante von ADAM10 entsprach, die auf mRNA-Ebene im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden konnte (Yavari *et al.*, 1998). Im Vergleich zum kompletten extrazellulären Teil der Protease zeichnet sich diese Splicevariante durch das zusätzliche Fehlen der Cystein-reichen Domäne aus (entspricht den Aminosäuren 1-565 von ADAM10). Es sollte untersucht werden, ob das Fehlen dieser Domäne die Eigenschaften der entsprechenden löslichen  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 beeinflusst.

#### 4.1.1 Wahl des Expressionssystems

Der wichtigste Schritt für die Überexpression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 stellte die Wahl eines geeigneten Expressionssystems dar. Das Vorhandensein der Cystein-reichen Domäne im extrazellulären Bereich der Protease schloss die Expression in einem prokaryotischen Zellsystem wie *E. coli* aus, da hier die exprimierten Proteine zunächst als Einschlusskörper aus dem Cytoplasma der Bakterien gewonnen und anschließend rückgefaltet werden müssten. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte die katalytische Domäne von ADAM10 im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert und rückgefaltet werden. Die Cystein-reiche Domäne von ADAM10 erlaubt jedoch neben den drei in der katalytischen Domäne vorhandenen Cystein-Resten eine Vielzahl von Disulfidbrücken, die die Rückfaltung des Proteins in seine native Form beeinträchtigt hätte. Zwar wäre es möglich gewesen, die Splicevariante, die diese Domäne fehlt, in diesem Expressionssystem einzusetzen. Da jedoch durch *E. coli* nicht alle post-translationalen Modifikationen erfolgen können, kann man nicht davon ausgehen, dass die

Eigenschaften der exprimierten Proteine tatsächlich der des nativen Proteins entsprechen. So erwies sich die aus *E. coli* gewonnene katalytische Domäne der  $\alpha$ -Sekretase zwar als enzymatisch aktiv, zeigte jedoch eine andere Substratspezifität als das native Protein, d.h. es lag vermutlich nicht in seiner natürlichen Konformation vor.

Für die Expression kam demnach nur ein eukaryotisches Zellsystem in Frage, durch das die für die Funktion des Zielproteins wichtigen post-translationalen Modifikationen gewährleistet waren. Von den hierfür eingesetzten Expressionssystemen erwies sich die Expression von ADAM10 in Insektenzellen im Vergleich zu denjenigen, die auf die Expression in Säugetierzellen basieren, am geeignetsten.

#### **4.1.2 Expression von löslichen ADAM10-Proteinen in Säugetierzellen**

Für die Expression der löslichen ADAM10-Proteine in Säugetierzellen kamen unterschiedliche Expressionssysteme zum Einsatz.

Zunächst wurde der Expressionsvektor pcDNA3 gewählt, da es mit diesem in unserer Arbeitsgruppe gelungen war, komplettes bovines ADAM10 in HEK293-Zellen zu exprimieren. Parallel dazu wurde der sich von diesem Plasmid ableitende Vektor pSecTag2C eingesetzt, der im Unterschied zu pcDNA3 noch die murine IgG<sub>k</sub>-Signalsequenz enthielt, mit deren Hilfe eine Überexpression des im Leserahmen einklonierten Zielgens bewirkt werden sollte (siehe 3.1.2.1). Mit Hilfe dieser beiden Vektoren konnte jedoch in den eingesetzten Zelllinien weder nach deren transienter noch nach stabiler Transfektion die Expression von löslichem ADAM10 nachgewiesen werden. Allerdings war es möglich, stabil transfizierte Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen mit dem jeweiligen Antibiotikum zu selektieren.

Weitere Alternativen bildeten der Expressionsvektor pIRES, das FlpIn<sup>TM</sup>-System und der Expressionsvektor pCEP4.

Im Fall des Expressionsvektors pIRES liegen das Zielgen und der Resistenzmarker in der gleichen Expressionskassette unter der Kontrolle des starken Cytomegalovirus-Promotors (P<sub>CMV</sub>), so dass der durch das Antibiotikum Hygromycin B ausgeübte Selektionsdruck die gleichmäßige Expression beider Gene bewirken sollte. Durch die Namengebende „internal ribosomal entry site“ (IRES) erfolgt die Translation zweier offener Leserahmen von einer die Sequenz des Zielgens und des Resistenzmarkers enthaltenden mRNA.

Im FlpIn<sup>TM</sup>-System wird dagegen die Expression des Resistenzmarkers nach stabiler Transfektion der FlpIn<sup>TM</sup>293-Zellen nur dann gewährleistet, wenn die Expressionskassette im Leserahmen zu einem Initiationscodon und dem entsprechenden Promotor an einer definierten

Position im Genom der Wirtszelle integriert wurde. Dabei stehen der Resistenzmarker ( $P_{SV40}$ ) und das Zielgen ( $P_{CMV}$ ) unter der Kontrolle zweier verschiedener Promotoren.

Doch bei beiden konnten weder im Zelllysate noch im Zellpellet von transient bzw. stabil transfizierten HEK293- bzw. FlpIn<sup>TM</sup>293-Zellen die jeweiligen ADAM10-Proteine nachgewiesen werden, während wiederum die Selektion der transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten durch das entsprechende Antibiotikum möglich war.

Durch den Einsatz des Vektors pCEP4 in HEK-EBNA Zellen sollte durch die Expression des Epstein-Barr-Virus (EBV) EBNA-1 Gens aus dem Genom der Wirtszelle die Expression des Zielgens auf dem pCEP4-Vektor durch den dort vorhandenen EBV-Replikationsursprung gewährleistet werden. Auch hier erfolgte nach stabiler Transfektion der HEK-EBNA-Zellen keine Expression von hADAM10s. Jedoch konnte nach transients Transfektion der Zellen mit pCEP4-hADAM10s-His das Protein hADAM10s durch Western Blot Analyse über das Poly-Histidin-Epitop nachgewiesen werden.

Bei allen eingesetzten Expressionssystemen war es möglich, die jeweils stabil transfizierten Wirtszellen mit dem entsprechenden Antibiotikum zu selektieren, ohne jedoch das Zielprotein nachweisen zu können. Vor der Transfektion wurden die jeweiligen Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums behandelt, um auszuschließen, dass diese im natürlichen Toleranzbereich der einzelnen Zelllinien lagen. Die positive Selektierbarkeit könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Resistenzmarker stärker exprimiert wurde als das jeweilige ADAM10-Protein. Da auf die Expression des Zielgens direkt kein Selektionsdruck ausgeübt wird, sondern das Überleben der Zelle nur durch den Resistenzmarker gewährleistet wird, könnten sich Antibiotikum-resistente Zellen, unabhängig von der Expression des Zielgens, vermehren, so dass die wenigen Zellen, die auch das jeweilige lösliche ADAM10-Protein exprimierten, immer mehr zurückgedrängt wurden. Ein möglicher Hinweis dafür wurde durch die nur nach transients Transfektion von HEK-EBNA-Zellen vorliegende Expression von hADAM10s gegeben.

Des Weiteren könnten die exprimierten löslichen ADAM10-Proteine nach ihrer Abgabe in den jeweiligen Zellkulturüberstand einem verstärkten proteolytischen Abbau durch dort vorhandene Proteasen unterworfen sein. Da bei der stabilen Transfektion von Säugetierzellen der Nachweis erst nach Erreichen der Konfluenz der Zellen nach der entsprechenden Antibiotikum-Behandlung erfolgte (> 48 h nach der Transfektion), wäre es möglich, dass das Zielprotein in dieser Zeit effektiver abgebaut wurde, als es durch die Zellen produziert werden konnte.

Eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Expression der ADAM10-Proteine könnte den Proteinnachweis selbst betreffen. Das im Serum-haltigen Kulturmedium vorhandene Rinderserumalbumin (BSA) liegt mit einem Molekulargewicht von 60 kDa im gleichen Größenbereich wie die zu exprimierenden ADAM10-Proteine. Da BSA Proteine sehr gut binden kann, könnte der spezifische Nachweis der Proteine auf diese Weise gestört werden. Da es nicht möglich war, die eingesetzten Zelllinien an Serum-freies Medium zu adaptieren, waren sie vor der jeweiligen Überprüfung der Proteinexpression mehrstündigen Inkubationsphasen mit dem entsprechenden Serum-freien Kulturmedium ausgesetzt. Durch den Austausch des Kulturmediums durch das entsprechende Serum-freie Inkubationsmedium könnte ein Teil der jeweils exprimierten löslichen ADAM10-Proteine verloren gegangen sein. Ferner könnte die gewählte Inkubationszeit von 4 bis 24 h für die Expression einer immunologisch nachweisbaren Menge des entsprechenden ADAM10-Proteins zu gering gewählt sein, wobei nicht auszuschließen ist, dass aufgrund des fehlenden Serums durch die entsprechende Zelllinie eine reduzierte Expression der Zielproteine erfolgte. Tatsächlich konnte während längerer Inkubationsphasen ein eingeschränktes Zellwachstum bei den eingesetzten Zelllinien beobachtet werden. Für die Expression der einzelnen ADAM10-Konstrukte war es demnach von Nachteil, dass sich die entsprechenden Zelllinien nicht an Serum-freies Medium adaptieren ließen.

Auch die Vereinigung mehrerer Zellüberstände bzw. deren Vorreinigung durch die Inkubation mit einer Ni-NTA-Matrix (Poly-Histidin-Epitop) bzw. Protein A/G-Sepharose (Fc-Reinigungsepitop) konnte keinen ADAM10-Proteinnachweis liefern.

Da die für die Expression in Säugetierzellen hergestellten ADAM10-Konstrukte durch DNA-Sequenzierung überprüft wurden und einige von ihnen auch als Ausgangskonstrukte für die Herstellung der für die Expression in Insektenzellen eingesetzten pFastBac-Konstrukte dienten, konnte die fehlende Proteinexpression durch fehlerhafte ADAM10-DNA-Sequenzen ausgeschlossen werden.

Für die Herstellung von löslichem ADAM10 in Säugetierzellen erwiesen sich die eingesetzten Expressionssysteme als nicht geeignet. Dagegen erlaubte das Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem die Herstellung der extrazellulären Domäne und der Splicevariante von ADAM10 in Sf9-Insektenzellen. Aus diesem Grund wurden die genauen Ursachen der mangelnden Expression in Säugetierzellen nicht weiter untersucht. Zum Beispiel wäre es möglich gewesen, durch Northern Blot Analyse zu überprüfen, ob die jeweilige mRNA tatsächlich in den entsprechenden transfizierten Zellen vorlag. Ferner hätten die parallele Expression der entsprechenden „full-length“ Konstrukte einen Hinweis darauf

geben können, ob sich die fehlenden Domänen negativ auf die Proteinexpression in den Säugetierzellen ausgewirkt haben könnten. Des Weiteren könnten die verkürzten ADAM10-Proteine aufgrund fehlerhafter Proteinfaltungen tatsächlich einem verstärkten proteolytischen Abbau unterworfen sein. Ebenfalls wäre es möglich, dass die mRNA der verkürzten ADAM10-Proteine so gefaltet vorlag, dass der Bereich um das Translations-Startcodon ATG maskiert wurde und somit keine Translation erfolgen konnte.

#### **4.1.3 Expression von hADAM10s und hADAM10splice durch das Bac-To-Bac**

##### **Baculovirus Expressionssystem**

Die Proteine hADAM10s und hADAM10splice konnten mit Hilfe des Bac-To-Bac Baculovirus Expressionssystem exprimiert werden. Ein Vorteil der Expression in Insektenzellen gegenüber der in Säugetierzellen war, dass sich die eingesetzten Sf9-Zellen aus dem Ovar der Gemüseeulenlarve *Spodoptera frugiperda* erfolgreich an Serum-freies Kulturmedium adaptieren ließen, so dass sie ohne das, mit einer Größe von ca. 60 kDa im gleichen Molekulargewicht-Bereich liegende und damit den Proteinnachweis der löslichen ADAM10-Proteine störende, Rinderserumalbumin (BSA) kultiviert werden konnten. Ein möglicher Proteinverlust durch eine für die Proteinanalyse wichtige separate Inkubation mit entsprechenden Serum-freien Medien wie im Falle der Säugetierzellen konnte hier umgangen werden.

Bei der Verwendung des auf die Infektion mit rekombinanten Baculoviren basierenden Expressionssystems ist es wichtig zu wissen, wie infektiös die hergestellte Baculovirus-Stammlösung ist und durch welche Verdünnung eine optimale Infektion der Wirtszellen gewährleistet wird, damit eine Umstellung ihres Zellstoffwechsels zugunsten der Virusvermehrung bzw. Proteinproduktion erreicht werden kann. Diese Abschätzung bzw. Bestimmung der Virusmenge bildet jedoch nicht den einzigen für die Proteinexpression relevanten Faktor. So kann man nicht davon ausgehen, dass auch alle Viruspartikel in der infizierten Zelle den Nukleus erreichen. Vielmehr wird ein Teil von ihnen nach deren Internalisierung in die Zelle über rezeptorvermittelte Endocytose zu den Lysosomen geleitet und dort abgebaut (Dee und Shuler, 1997), so dass man unter Umständen durch den Einsatz einer bestimmten Virusmenge nicht die Proteinexpression erreicht, die theoretisch daraus resultieren sollte. Ferner spielt die Bindungsfähigkeit der Baculoviruspartikel an die Zelloberfläche der entsprechenden Wirtszelle eine wichtige Rolle, welche bei verschiedenen Zelltypen variiert. Es ist bekannt, dass die Bindung von Baculoviren an die Oberfläche von Sf9-Zellen im Vergleich zu anderen Insektenzellen am schwächsten erfolgt. Dieses Problem

kann man mit einer Erhöhung der Zelldichte zum Zeitpunkt der Infektion umgehen (Dee und Shuler, 1997). So kann trotz bekannter Menge an infektiösen Viruspartikeln nicht unmittelbar auf die Stärke der dadurch ausgelösten Proteinexpression geschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde demnach auf eine genaue quantitative Bestimmung der Virusmenge verzichtet. Vielmehr wurde das infektiöse Potential, in Anlehnung an die Endpunktverdünnung nach Reed und Münch (1983), anhand der nach den entsprechend gewählten Inkubationszeiten auftretenden, im Lichtmikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen bewertet. Dabei weisen infizierte Zellen gegenüber einer sonst runden Zellform eine unregelmäßige Zelloberfläche und ein deutlich vergrößertes Zellvolumen auf, ein deutliches Kriterium für ihre Infektion (Rosinski *et al.*, 2000; siehe 2.5.8.2). Die Infektionsherde wurden jedoch nicht wie bei dieser Methode üblich ausgezählt, sondern die Virusmenge qualitativ anhand der relativen Expressionseffizienz charakterisiert und eingesetzt (Sarafanov und Saenko, 2004). Diese Methode erwies sich als effektiv und zeitsparend.

Für die Virusamplifikation wurden zunächst verschiedene Verdünnungen der Baculovirus-Stammlösung, d.h. eine geringe Virusmenge, ausgewählt, da nur ein kleiner Teil der in der Kultur vorhandenen Zellen mit dem Virus infiziert werden sollte (primäre Infektion), während die nicht-infizierten Zellen weitere Zellteilungen durchlaufen können und somit die Kulturdichte weiter erhöht wird (Philipps *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 1996). In den primär infizierten Zellen erfolgte die Replikation der entsprechenden Baculoviren, so dass durch die infizierten Wirtszellen ausreichend Viruspartikel hergestellt und ins Kulturmedium entlassen werden sollten, um die restlichen Zellen in der Kultur zu infizieren. Diese sekundär infizierten Zellen stellten die Hauptproduzenten der rekombinanten Baculoviren dar (Bruinzeel *et al.*, 2002).

Für die anschließende Proteinexpression erfolgte die Infektion der Zellen mit einer im Vergleich zur Virusamplifikation höheren Virusmenge, da die synchrone Infektion aller Zellen der Kultur angestrebt wurde. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass Virusproduktion und Zellteilungsprozesse um essentielle Nährstoffe konkurrieren, und so die Herstellung der durch die entsprechenden Baculoviren eingebrachten Konstrukte gewährleistet werden (Dee und Shuler, 1997). Da die Virusinfektion zu einem sofortigen Stillstand des Zellwachstums führt, wurde zum Zeitpunkt der Infektion eine deutlich höhere Zelldichte gewählt als bei der Virusamplifikation (Wong *et al.*, 1996). Die Konfluenz sollte zum Zeitpunkt der Infektion jedoch nicht erreicht sein, da mit steigender Zelldichte die Produktivität der Insektenzellen durch die nur noch ungenügende Nährstoffbereitstellung

abnimmt. Der Replikationszyklus der Zelle läuft dann deutlich langsamer ab und beeinträchtigt somit die Proteinproduktion (Taticek und Shuler, 1997; Wong *et al.*, 1996). Die Inkubation der infizierten Sf9-Monolayerkulturen erfolgte für die Expression von hADAM10s über einen Zeitraum von 48 Stunden, nach denen das Protein schon deutlich im Silber-gefärbten Gel nachzuweisen war. Die Inkubationszeit im Fall der Expression von hADAM10splice wurde von anfänglich 48 auf 72 Stunden verlängert, wobei ein deutlicher Anstieg der Proteinexpression, vor allem der reifen Enzymform, zu beobachten war. Aus der Literatur ist bekannt, dass in einem Zeitraum von 48 bis 72 Stunden nach der Etablierung des Virus, seiner Replikation und der Übernahme der Biosyntheseprozesse in der Sf9-Wirtszelle die Proteinmenge ihren Maximalwert erreicht (Rosinski *et al.*, 2002; Massotte, 2003). Die Expressionszeit wurde nicht weiter verlängert, da die Baculovirus-Infektion schon ab dem dritten Tag der Virusinfektion zu einer mikroskopisch sichtbare Zelllyse führte und eine dadurch mögliche Degradation der rekombinanten Proteine verhindert werden sollte (Kost *et al.*, 2005).

#### **4.2 REINIGUNG DER ADAM10-PROTEINE hADAM10s UND hADAM10splice**

Für die Reinigung der löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurde die Lektin-Affinitätschromatographie über Concanvalin A ausgewählt. Dies wurde dadurch begründet, dass die beiden ADAM10-Proteine durch die Sf9-Insektenzellen entsprechend glykosyliert vorlagen (siehe 3.4.1) und dass diese Methode sich für die Reinigung der nativen bovinen Form von ADAM10 als erfolgreich erwies (Lammich *et al.*, 1999). Durch diese relativ unspezifische Reinigungsmethode wurde eine Abtrennung der prozessierten enzymatisch aktiven Form von hADAM10s bzw. hADAM10splice von der jeweiligen unprozessierten, unreifen Enzymform gewährleistet, wobei deren Verbleib nicht weiter geklärt werden konnte. Falls durch die Prodomäne die Bindung des Proteins an das Säulenmaterial gestört wurde, sollte die unreife Form im Säulendurchfluss nachweisbar sein. Dies konnte durch die durchgeführten Western Blot Analysen jedoch nicht bestätigt werden, so dass eine irreversible Bindung an das Säulenmaterial als wahrscheinlicher gilt.

Ursprünglich war eine spezifischere Reinigung der exprimierten ADAM10-Proteine über das jeweilige C-terminale Poly-Histidin-Epitop vorgesehen. Allerdings stellte sich bei der Ermittlung der dafür optimalen Pufferbedingungen heraus, dass für eine erfolgreiche Elution eine Imidazolkonzentration von mindestens 300 mM unumgänglich war, da ab einer

Konzentration von 250 mM die Elution nicht mehr gewährleistet werden konnte. Für eine erfolgreiche Elution wird in der Regel eine Imidazolkonzentration von 100 bis 250 mM verwendet. In diesem Fall musste jedoch eine deutlich höhere Imidazolkonzentration gewählt werden, durch die vermutlich die Aktivität der beiden ADAM10-Proteine zerstört wurde. Trotz des schnellen Entfernens des Imidazols durch die unmittelbar nach der Reinigung eingesetzten 30 kDa Amicon Ultra Konzentratoren bzw. NAP10-Gelfiltrationssäulchen zum Entsalzen und Aufkonzentrieren der jeweiligen Eluatfraktion, konnte der Erhalt der enzymatischen Aktivität der ADAM10-Proteine nicht gewährleistet werden. Möglicherweise könnte das vorhandene Imidazol innerhalb kürzester Zeit eine irreversible Denaturierung der Proteine hADAM10s und hADAM10splice bzw. bei mangelnder Entfernung durch die gewählten Methoden eine Aggregation der Proteine bewirkt haben (Hefti *et al.*, 2001).

Die Enzyme hADAM10s und hADAM10splice erwiesen sich somit als sehr empfindlich gegenüber den hohen Salzkonzentrationen. Eine weitere Möglichkeit, die dadurch bedingte Zerstörung der enzymatischen Aktivität der ADAM10-Proteine zu verhindern, war die Reduzierung der Natriumchloridkonzentration von anfangs 500 mM auf 100 mM in den entsprechenden Puffern. Bei dieser Reinigungsmethode ist es üblich, Puffer mit hoher Ionenkonzentration (0,1 bis zu 1 M NaCl) einzusetzen, um nichtspezifische Interaktionen der Proteine mit der Säulenmatrix zu verhindern (Gaberc-Porekar und Menart, 2001). Die reduzierte Salzkonzentration hatte hier ein verändertes Bindungsverhalten der Zielproteine zur Folge. Während im Fall von hADAM10splice keine Bindung an das Säulenmaterial erfolgen konnte, wurde hADAM10s durch die entsprechenden Waschschrte direkt wieder vom Säulenmaterial entfernt, wies im anschließenden Enzymtest jedoch noch enzymatische Aktivität auf. Unter diesen Versuchsbedingungen kam es offensichtlich zu keiner irreversiblen Denaturierung des Proteins, wobei dies in diesem Fall nicht eindeutig der vorliegenden niedrigen Natriumchloridkonzentration zugeordnet werden konnte, da die Imidazolkonzentration in den eingesetzten Waschpuffern ebenfalls reduziert war.

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit Hilfe des auf Virusinfektion basierenden Baculovirus Expressionssystem im Vergleich zu Säugetierzellen ein bis zu 250-fach höherer Expressionslevel erreicht werden kann (Dee und Shuler, 1997), wobei sich die Expressionsniveaus im Milligramm- und Gramm-Bereich pro Liter Zellkultur bewegen und bis zu 5 % des Gesamtproteins ausmachen können (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Bei der Reinigung der löslichen ADAM10-Proteine im präparativen Maßstab konnten aus 1 mg Gesamtprotein im hADAM10s 30-100 kDa-Konzentrat aus 248 ml Sf9-Zellkultur-

überstand 10 µg prozessiertes hADAM10s bzw. aus 1,6 mg Gesamtprotein im hADAM10splice 30-100 kDa-Konzentrat aus 376 ml Sf9-Zellkulturüberstand 10,5 µg hADAM10splice gewonnen werden (siehe 3.3.4). Dies entspricht einer relativ geringen Proteinausbeute von 1 % im Fall von hADAM10s bzw. 0,66 % im Fall von hADAM10splice (siehe Tabelle 3.2).

Hier wird deutlich, dass für eine erfolgreiche Protein-Überexpression die Kultivierung der eingesetzten Sf9-Insektzellen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Für die Experimente in dieser Arbeit wurden Sf9-Zellen in adhärenter Form als Monolayerkulturen eingesetzt, da sich ihre Kultivierung in unbegasteten Flüssigkulturen als zu kontaminationsanfällig erwies. Ferner wurde die Vitabilität der in Flüssigkulturen eingesetzten Sf9-Zellen durch das Anfärben mit Trypanblau überprüft und im Vergleich zu Sf9-Monolayerkulturen als deutlich geringer identifiziert, was durch den zu geringen O<sub>2</sub>-Eintrag und die beim Rühren auftretenden Scherkräfte bedingt sein könnte. Um eine Proteinproduktion im höheren Maßstab zu gewährleisten, ist zum einen auf der Stufe der Virusamplifikation eine weitere Optimierung erforderlich, zum anderen trotz ihrer Kontaminationsanfälligkeit der Einsatz von begasteten Flüssigkulturen unumgänglich, zumal die Sf9-Zellen besonders nach der Infektion einen erhöhten O<sub>2</sub>-Bedarf aufweisen (Cruz *et al.*, 1998).

### **4.3 CHARAKTERISIERUNG DER ADAM10-PROTEINE hADAM10s UND hADAM10splice**

#### **4.3.1 Glykosylierung von hADAM10s und hADAM10splice**

Die beiden in Insektzellen exprimierten Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurden durch die Sf9-Zellen erfolgreich glykosyliert (siehe 3.4.1). Der Unterschied der Molekulargewichte zwischen glykosylierter und durch die PNGaseF deglykosylierter Form fiel dabei geringer aus als in HEK-Zellen, wo die ebenfalls mit diesem Enzym durchgeführte Deglykosylierung von ADAM10 eine Molekulargewichts-Differenz von ca. 3-4 kDa ausmachte (Lammich *et al.*, 1999). Dieser Unterschied zwischen Säugetier- und Insektzellen könnte an der jeweiligen Komplexität der von den entsprechenden Zelllinien angefügten Oligosacchariden liegen. Insektzellen sind zwar in der Lage, die meisten für Säugetierzellen typischen post-translationalen Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Fettsäure-Acylierungen und Glykosylierungen, durchzuführen, allerdings sind die in Insektzellen durchgeführten Prozessierungswege nicht zwingend identisch mit denen in

höheren Eukaryoten. Ein Beispiel dafür bildet die N-Glykosylierung von Proteinen. Dabei werden die auf die entstehenden Polypeptide übertragenen N-Glycan-Vorläufer durch die Insektenzellen so verändert, dass als Endprodukte Paucimannose (Formen mit drei oder weniger Mannose-Resten) oder Oligosaccharide mit einem höheren Mannose-Anteil entstehen (Massotte, 2003; Palomares *et al.*, 2003; Kost *et al.*, 2005). Die Zellen sind jedoch nicht in der Lage, diese Endprodukte zu verlängern, um komplexe Oligosaccharide mit terminalen Galaktose- bzw. Sialinsäure-Resten (N-Acetylneuraminsäure) herzustellen. Für die Produktion von Glykoproteinen, deren Funktion von diesen terminalen Sialinsäure-Resten abhängt, könnte dies ein limitierender Faktor bezüglich des Einsatzes von Insektenzellen zur Proteinexpression darstellen (Kost *et al.*, 2005).

#### **4.3.2 Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften von hADAM10s und hADAM10splice**

Für die Charakterisierung der in Sf9-Insektenzellen exprimierten und über Lektin-Affinitätschromatographie gereinigten löslichen ADAM10-Proteine hADAM10s und hADAM10splice wurden Peptidsubstrate eingesetzt, die der A $\beta$ -Domäne aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) entsprechen und damit die für die  $\alpha$ -Sekretase charakteristische Spaltstelle (Lys<sup>16</sup>↓Leu<sup>17</sup> in der A $\beta$ -Sequenz) aufwiesen. Dabei kam zum einen das komplette A $\beta$ 40 und zum anderen ein Peptidsubstrat von 18 Aminosäuren Länge, entsprechend den Aminosäuren 11-28 der A $\beta$ -Sequenz, zum Einsatz. Mit diesem als APP18 bezeichneten Peptidsubstrat, das die für die Spaltung wichtige Linkerregion zwischen der  $\alpha$ -Sekretase-spaltstelle und der Transmembrandomäne von APP beinhaltet, konnte die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 identifiziert und charakterisiert werden (Lammich *et al.*, 1999). Ferner wurden jeweils Peptide mit den an Position 21 und 22 der A $\beta$ -Sequenz vorkommenden Mutationen Flemish (A21G), Dutch (E22Q), Italian (E22K) und Arctic (E22G) eingesetzt (siehe 1.2.3 und 3.4.2 Tab. 3.3).

Bei den *in vitro* Enzym-Assays zeigte es sich, dass alle diese Peptidsubstrate durch die ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice gespalten wurden (siehe 3.4.2), und dass diese Spaltung, wie durch massenspektroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte, an der  $\alpha$ -Sekretasestelle erfolgte (siehe Anhang 7.1).

ENZYM	SUBSTRATPRÄFERENZ
hADAM10s (R&D-Systems)	Flemish < Wildtyp < Dutch ≤ Italian < Arctic
hADAM10s	Flemish < Wildtyp < Dutch ≤ Italian < Arctic
hADAM10splice	Flemish ≤ Dutch < Wildtyp < Arctic < Italian

**Tabelle 4.1:** Substratpräferenz bezüglich der eingesetzten APP18-Peptide durch die Enzyme hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice

Aus den in Tabelle 4.1 zusammengefassten Substratpräferenzen der einzelnen ADAM10-Proteine für die eingesetzten APP18-Peptide geht hervor, dass APP18-Flemish für alle Enzyme das schlechteste Substrat darstellt. Es ist bekannt, dass für die proteolytische Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase die  $\alpha$ -helicale Konformation der genannten Linkerregion zwischen  $\alpha$ -Sekretasespaltstelle und Transmembrandomäne eine wichtige Rolle spielt (Maruyama *et al.*, 1991; Sisodia, 1992; Arribas *et al.*, 1997). Die bei APP18-Flemish vorliegende Aminosäuresubstitution A→G führt voraussichtlich zu einer Destabilisierung der  $\alpha$ -helicalen Struktur in der Nähe der Spaltstelle und verändert die normale Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase (Sisodia, 1992; Haass und Steiner, 2001). Vermutlich wurde auch bei diesem Substrat, APP18-Flemish, ausgelöst durch den potentiellen  $\alpha$ -Helixbrecher Glycin, die für die Substraterkennung wichtige Sekundärstruktur des Peptids verändert. Tatsächlich liegen bei pH 9 in Gegenwart von SDS die Peptide APP18, APP18-Dutch, APP18-Italian und APP18-Arctic vorwiegend in  $\alpha$ -helicaler Form, APP18-Flemish dagegen in einer eher ungeordneten Peptidstruktur vor (Lammich *et al.*, 1999 und nicht publizierte Daten). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 durchaus von der Konformation des Substrats abhängt. Des Weiteren ist Tabelle 4.1 zu entnehmen, dass sich die Enzyme hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s bezüglich ihrer Substratpräferenz ähnlich verhalten, während hADAM10splice diesbezüglich Unterschiede aufweist. Diese leichten Änderungen könnten auf das Fehlen der Cystein-reichen Domäne bei dieser Variante der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 zurückzuführen sein.

ENZYM	SUBSTRATPRÄFERENZ
hADAM10s (R&D-Systems)	Wildtyp $\leq$ Dutch $\leq$ Flemish
hADAM10s	Dutch $<$ Wildtyp $\leq$ Flemish
hADAM10splice	Dutch $\leq$ Wildtyp $<$ Flemish

**Tabelle 4.2:** Substratpräferenz bezüglich der eingesetzten A $\beta$ 40-Peptide durch die Enzyme hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice

Eine Ursache der Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden während der Alzheimer'schen Erkrankung bildet vermutlich der Funktionsverlust von A $\beta$ -Peptid-abbauenden Proteasen. Dabei unterscheidet sich die Rate des Amyloid-Abbaus in unterschiedlichen Gehirnregionen und ist von der Zusammensetzung der entsprechend vorkommenden Peptidasen und dem Oligomerisationsstadium der A $\beta$ -Peptide abhängig (Carson und Turner, 2002). In den Abbauprozess involvierte Proteine sind zum Beispiel die Zinkmetallopeptidasen Nephrilysin (Selkoe, 2001b; Carson und Turner, 2002) und das Endothelin-Converting-Enzym (Eckman *et al.*, 2003) sowie die Zinkmetalloprotease Insulysin (Insulin-Degrading-Enzym; Farris *et al.*, 2003). Da in den A $\beta$ 40-Peptiden die  $\alpha$ -Sekretasespaltstelle immer noch vorhanden ist, könnte auch die Zinkmetalloprotease ADAM10 ein Kandidat für den enzymatischen Abbau von A $\beta$ -Peptiden sein.

Wie die entsprechenden APP18-Substrate wurden auch die Peptide A $\beta$ 40, A $\beta$ 40A21G und A $\beta$ 40E22Q durch die drei eingesetzten ADAM10-Proteine an der charakteristischen  $\alpha$ -Sekretasesestelle gespalten, d. h. sie sollten unter diesen basischen Versuchsbedingungen in einer löslichen  $\alpha$ -helicalen Form vorliegen (Talafous *et al.*, 1994). Dies gilt auch für die Substrate A $\beta$ 40E22K und A $\beta$ 40E22G, die ebenfalls durch hADAM10s (R&D-Systems) gespalten wurden. Dabei fällt in der Tat auf, dass die Spaltung von A $\beta$ 40A21G im Vergleich zu den anderen Peptiden nicht schlechter erfolgte, vielmehr scheint dieses Peptid für alle ADAM10-Proteine das bevorzugte Substrat zu sein (siehe Tabelle 4.2). Bei der Spaltung aller A $\beta$ 40-Substrate durch hADAM10s (R&D-Systems) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe 3.4.2, Abb. 3.24). Somit ist ADAM10 in der Lage, die eingesetzten löslichen A $\beta$ 40-Substrate in *in vitro* zu spalten, wohingegen durch die Zinkmetallopeptidase Nephrilysin *in vitro* keine Spaltung der entsprechenden A $\beta$ 40-Mutanten erfolgt (Tsubuki *et al.*, 2003).

Der pathologische Effekt der an Position 22 der A $\beta$ -Sequenz mutierten Peptide (Dutch, Italian, Arctic) wird ihren veränderten biochemischen Eigenschaften, d.h. ihrer erhöhten Bindungsfähigkeit an Endothelzellen in den cerebrovasculären Gefäßwänden und ihrer erhöhten Fähigkeit zur Fibrillenbildung (Miravalle *et al.*, 2000; siehe 1.2.3) zugeordnet. Da diese Mutationen nicht zu einer Erhöhung des A $\beta$ -Plasmalevels führen, ist zu vermuten, dass es nicht zu einer reduzierten Fähigkeit der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 kommt, die entsprechenden Substrate, sei es APP oder wie hier *in vitro* die genannten A $\beta$ 40-Peptide, zu spalten.

Dagegen ist aus der Literatur bekannt, dass die Flemish-Mutation durchaus für einen Anstieg des Plasmalevels von A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Peptiden verantwortlich ist (Nilsberth *et al.*, 2001; Van Nostrand *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2005). In den durchgeführten *in vitro*-Versuchen erfolgte die Spaltung von A $\beta$ 40A21G durch hADAM10s (R&D-Systems) jedoch nicht schlechter als die der anderen A $\beta$ 40-Peptide. Da die bei der Flemish-Mutation an Position 21 vorliegende Aminosäure Glycin nicht zwingend zur Destabilisierung von Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern führen muss, wie es zum Beispiel bei der Aminosäure Prolin der Fall ist (Haass *et al.*, 1994), könnte sich die durch die Mutationen induzierte Destabilisierung bei A $\beta$ 40A21G unter diesen Versuchsbedingungen nicht so deutlich auswirken wie bei APP18-Flemish. Morelli *et al.* (2003) konnten zeigen, dass A $\beta$ 40 und alle A $\beta$ 40-Mutanten in wässrigen Lösungen vorwiegend ungeordnete Sekundärstrukturen aufweisen. Allein A $\beta$ 40E22Q zeigt  $\beta$ -Faltblattstruktur. Möglicherweise liegen unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen die eingesetzten Peptide ebenfalls in ähnlichen Strukturen vor, so dass sie durch die verschiedenen löslichen ADAM10-Proteine vergleichbar gespalten werden und die Abhängigkeit der Spaltung von einer  $\alpha$ -helicalen Struktur nicht so deutlich hervor tritt. Des Weiteren wäre es vorstellbar, dass der Kontakt des Enzyms mit dem entsprechenden Substrat die Bildung einer  $\alpha$ -helicalen Struktur erleichtert und somit dessen Spaltung gewährleistet wird.

Die erhöhte Konzentration an entsprechenden A $\beta$ 40A21G-Peptiden lässt sich basierend auf diese *in vitro*-Versuche nicht auf eine gestörte Degradation durch hADAM10s zurückführen. Vielmehr ist zu vermuten, dass APP mit der Flemish-Mutation durch die die  $\alpha$ -helicale Struktur destabilisierende Aminosäuresubstitution A $\rightarrow$ G ein schlechteres Substrat für die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 darstellt (Sisodia, 1992) und dies neben der gestörten Degradation durch entsprechende Peptidasen und Proteasen für den Anstieg der A $\beta$ -Peptidmenge verantwortlich sein könnte.

Auch bezüglich der Substratspezifität der verschiedenen ADAM10-Varianten sind bei der Spaltung der A $\beta$ 40- im Vergleich zu den APP18-Peptiden Änderungen zu beobachten. So ähneln sich nunmehr hADAM10s und hADAM10splice in ihrer Substratpräferenz, während hADAM10s (R&D-Systems) davon abweicht. Wurden für die bei der Spaltung der APP18-Peptidsubstrate im Vergleich zu hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s veränderte Substratspezifität von hADAM10splice noch ein Einfluss der fehlenden Cystein-reichen Domäne vermutet, so scheint dies bei der Spaltung von A $\beta$ 40, A $\beta$ 40A21G und A $\beta$ 40E22Q keine Rolle mehr zu spielen. Wie unter 3.4.2 dargestellt, sind die drei eingesetzten ADAM10-Proteine untereinander nicht identisch, sondern zeichnen sich durch einige Aminosäuren-Veränderungen aus, die ein unterschiedliches Spaltverhalten bewirken könnten. Neben der Cystein-reichen Domäne könnten somit auch die unterschiedlich langen Poly-Histidin-Epitope von hADAM10s und hADAM10s (R&D-Systems) dafür verantwortlich sein. Es ist nicht auszuschließen, dass das um vier Histidin-Reste längere Epitop von hADAM10s (R&D-Systems) bei einer möglichen Wechselwirkung mit den längeren A $\beta$ 40-Peptidsubstraten eine Rolle spielte und, im Vergleich zu hADAM10s, die prozentual stärkere Spaltung von A $\beta$ 40A21G und A $\beta$ 40E22Q bewirkte, während bei A $\beta$ 40 und den kürzeren APP18-Peptidsubstraten diesbezüglich keine Veränderung zu beobachten war (siehe Tab. 3.4 und Tab. 3.5).

Ein durch die Glykosylierung bedingter Einfluss auf die verschiedenen Substratpräferenzen ist zumindest theoretisch auszuschließen, da in allen drei ADAM10-Proteinen die vier potentiellen Glykosylierungsstellen (3 in der katalytischen Domäne an Position 267, 278 und 439; eine in der Cystein-reichen Domäne an Position 551) vorhanden sind. Auch sollte sich die Struktur der potentiell angehängten Oligosaccharide ähneln, da hADAM10s und hADAM10splice in Sf9-, hADAM10s (R&D-Systems) in Sf21-Zellen exprimiert wurden.

Neben strukturellen Eigenschaften der einzelnen ADAM10-Proteine könnten die unterschiedlichen Präferenzen auch methodisch bedingt sein. Anhand der teilweise hohen Standardabweichungen kann man davon ausgehen, dass das Auflösungsvermögen der für die Quantifizierung gewählten Methode begrenzt ist. Als eine empfindlichere Methode für enzymkinetische Studien würde sich der Einsatz von Fluoreszenz-markierten Peptidsubstraten anbieten, allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, einen auf FRET-Messungen basierenden Enzym-Assay zu etablieren.

Bei der Bindung des Hydroxamat-Säurederivats GI 254023 X scheinen Unterschiede in den Enzymstrukturen keine Rolle zu spielen, da alle ADAM10-Varianten durch den in einer

Endkonzentration von 10 nM ( $IC_{50} = 5,3$  nM für ADAM10; Hundhausen *et al.*, 2003) eingesetzten Inhibitor in gleicher Weise gehemmt wurden, so dass auch hier kein besonderer Einfluss der Cystein-reichen Domäne beobachtet werden konnte.

Für ADAM13 konnte eine intramolekulare Kooperation der Cystein-reichen mit der katalytischen Domäne beschrieben werden, wodurch deren Funktion *in vivo* reguliert werden kann. Dabei wird vermutet, dass die Cystein-reiche Domäne auch an das Substrat bindet und dadurch seine Spaltung durch die katalytische Domäne erleichtert bzw. die Spezifität der Spaltung erhöht wird (Smith *et al.*, 2002). In den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen konnte jedoch keine schwächere Spaltung der eingesetzten APP18- und A $\beta$ 40-Peptide durch hADAM10splice beobachtet werden. Eine Funktionsmodulation von ADAM10 durch die Cystein-reiche Domäne kann bezüglich dieser Substrate ausgeschlossen werden.

Auch bezüglich der Stabilität von hADAM10splice scheint die fehlende Domäne keinen Einfluss zu haben. Nach 4-wöchiger Lagerung der entsprechenden Lyophilisate bei 4°C konnten für hADAM10s und hADAM10splice jeweils noch eine unveränderte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (siehe 3.4.2, Tab. 3.6).

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass es sich bei hADAM10s (R&D-Systems) und hADAM10s um die gleichen Enzyme handelt. Die erstmals auf mRNA-Ebene im menschlichen Gehirn nachgewiesene Splicevariante von humanem ADAM10 (Yavari *et al.*, 1998) weist in Bezug auf die Substrat- und Inhibitorbindung ebenfalls keine gravierenden Unterschiede zum kompletten extrazellulären Teil der Protease auf. Da das Protein selbst bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte, gibt es auch keinen Hinweis auf seine mögliche Funktion. Alternatives Splicen bei Proteinen der ADAM-Familie betrifft oft die cytoplasmatische Region des abgeleiteten ADAM-Proteins, was im Auftreten einer löslichen oder sekretierten Isoform und der Beeinflussung deren Funktion und subzellulären Lokalisation resultieren könnte (Huovila *et al.*, 2005; Seals and Courtneidge, 2003). Unter diesem Aspekt wäre der Nachweis von hADAM10splice auf Proteinebene und seine Lokalisation *in vivo* interessant. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Splicevariante einer löslichen, katalytisch aktiven Form der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 *in vivo* entsprechen könnte, deren Substrate ebenfalls löslich sind. Ob lösliche A $\beta$ -Monomere auch *in vivo* ein Substrat für hADAM10splice darstellen könnten, bedarf jedoch der Überprüfung.

In der vorliegenden Arbeit konnte neben den durchgeführten Enzymtests *in vitro* gezeigt werden, dass im Zellsystem unter den gewählten Versuchsbedingungen die externe Gabe der löslichen ADAM10-Enzymformen keine erhöhte Spaltung von APP und damit die Herstellung des neuroprotektiven APPs $\alpha$  in der das humane Wildtyp APP überexprimieren-

den U373-Zelllinie bewirken konnte (siehe 3.4.3). Das membrangebundene Substrat scheint demnach für die löslichen  $\alpha$ -Sekretasen hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s bzw. hADAM10splice nicht optimal zugänglich zu sein, so dass für die Herstellung von APPs $\alpha$  neben der Membranverankerung des Substrats APP ebenfalls die des Enzyms eine wichtige Voraussetzung darstellt, ohne die eine räumliche Nähe der beiden und das dadurch bedingte Erreichen der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle durch ADAM10 nicht gewährleistet ist.

Als mögliche Strategie gegen die Bildung von Amyloid-Plaques in der Alzheimer'schen Erkrankung gilt die Förderung der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP und der damit verbundenen Erhöhung der durch APPs $\alpha$  vermittelten neuroprotektiven Wirkung *in vivo*, wie es zum Beispiel durch die Überexpression von ADAM10 erreicht werden kann (Postina *et al.*, 2004). Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint eine externe Gabe des Enzyms dafür nicht der geeignete Weg zu sein. Die Ergebnisse lassen vielmehr darauf schließen, dass das Auftreten einer löslichen, den kompletten extrazellulären Bereich der  $\alpha$ -Sekretase umfassende Form als eine durch die Spaltung von membrangebundenem ADAM10 entstandene Proteinform darstellt. Möglicherweise könnte diese Spaltung von ADAM10 die Terminierung der APP-Prozessierung bedeuten.

#### **4.3.3 Spaltung muriner und humaner A $\beta$ -Peptide durch hADAM10s (R&D-Systems)**

Im Gegensatz zum Menschen entwickeln Nagetiere im Laufe des Alterungsprozess keine Amyloid-Ablagerungen im Gehirn. Ursache dafür ist die unterschiedliche Metabolisierung von murinem und humanem APP (De Strooper *et al.*, 1995). Die Überexpression von murinem APP in hippocampalen Neuronen der Ratte führt zu einem verstärkten Auftreten des für den nicht-amyloidogenen Weg charakteristischen Spaltprodukts p3, während die Überexpression von humanem APP vorwiegend zu einem Anstieg des für den amyloidogenen Weg charakteristischen A $\beta$ 40-Peptids führt (De Strooper *et al.*, 1995). Somit erfolgt die Prozessierung der murinen Form im Vergleich zur humanen Form von APP bevorzugt durch die  $\alpha$ -Sekretase. Der Schlüssel dazu scheint in der Aminosäuresequenz der jeweiligen APP-Varianten zu liegen. Das Protein APP<sub>695</sub> der beiden Spezies unterscheidet sich in 17 Aminosäuren, von denen drei wiederum zwischen der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Sekretasestelle innerhalb der A $\beta$ -Sequenz lokalisiert vorliegen. Diese drei Aminosäuren sind in allen Spezies identisch, für die bekannt ist, dass sie im Laufe ihres individuellen Alterungsprozesses Amyloid-Plaques bilden können (Johnstone *et al.*, 1991). De Strooper *et al.* (1995) konnten zeigen, dass allein die Rücksubstitution der innerhalb der murinen A $\beta$ -Sequenz an Position 5 vorliegenden Aminosäure Glycin zu Arginin, entsprechend der im humanen APP vorliegenden

Aminosäure, eine schwächere Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase bewirkt. Eine vollständige „Humanisierung“ der drei innerhalb der murinen A $\beta$ -Sequenz liegenden Aminosäuren führte dazu, dass die Menge des amyloidogenen Spaltprodukts A $\beta$ 40 im gleichen Maße zunahm wie bei der Prozessierung von humanem APP, während gleichzeitig die Menge des nicht-amyloidogenen Spaltprodukts p3 zurück ging (De Strooper *et al.*, 1995). Dies bestätigte, dass die drei in Nagetieren innerhalb der A $\beta$ -Sequenz des APP lokalisierten Mutationen für die verstärkte Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die murinen A $\beta$ -Substrate A $\beta$ 1-28 und A $\beta$ 1-40 durch hADAM10s (R&D-Systems) im Vergleich zu den humanen Peptidvarianten *in vitro* deutlich besser gespalten wurden. Bei der Spaltung der kürzeren Substrate A $\beta$ 11-28 hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spezies beobachtet werden (siehe 3.4.4, Abb. 3.28). Diese Versuche bestätigen, dass die in der murinen A $\beta$ -Sequenz vorliegenden Aminosäuresubstitutionen für eine verstärkte Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 und damit für eine geringere A $\beta$ -Bildung in Nagetieren verantwortlich sind.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwei enzymatisch aktive lösliche Proteinvarianten der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 in Sf9-Insektenzellen exprimiert, gereinigt und charakterisiert.

Da beide ADAM10-Proteine durch die Sf9-Insektenzellen im glykosylierten Zustand vorlagen, wurde als Reinigungsmethode die Lektin-Affinitätschromatographie über Concanvalin A gewählt, mit deren Hilfe jeweils die prozessierte und damit reife Enzymform der beiden exprimierten ADAM10-Proteine erfolgreich, d.h. ohne die Beeinträchtigung ihrer enzymatischen Aktivität, gereinigt werden konnten. Dabei kam diese Methode alternativ zur spezifischen Reinigung von hADAM10s und hADAM10splice über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie zum Einsatz. Die Bindung der Zielproteine an die Säulenmatrix und ihre anschließende Elution konnte nur durch die Verwendung hoher Natriumchlorid- und Imidazolkonzentrationen gewährleistet werden. Diese führten jedoch innerhalb kürzester Zeit zu einer irreversiblen Denaturierung der Zielproteine, die auch durch veränderte Pufferbedingungen nicht verhindert werden konnte. Aus diesem Grund konnte mit dieser Methode keine Reinigung erzielt werden.

Durch einen auf HPLC-Analyse basierenden Enzymtest erfolgte die Charakterisierung der beiden Proteine hADAM10s und hADAM10splice. Dabei wurden verschiedene sich von der  $\beta$ -Amyloid-Sequenz ableitenden Peptidsubstrate eingesetzt, die zum einen den Aminosäuren 11-28 der A $\beta$ -Sequenz, zum anderen dem kompletten A $\beta$ 40-Peptid entsprachen und damit die charakteristische  $\alpha$ -Sekretasespaltstelle enthielten. Des Weiteren kamen jeweils entsprechende Peptidsubstrate zum Einsatz, die die an den Positionen 21 (Flemish) und 22 (Dutch, Italian, Arctic) der A $\beta$ -Peptidsequenz vorkommenden Mutationen trugen.

Alle eingesetzten Substrate wurden durch die ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice an der  $\alpha$ -Sekretasestelle gespalten. Durch die hier eingesetzte Methode war zu beobachten, dass sie sich untereinander sowohl bezüglich der Spaltung der APP18- als auch der A $\beta$ 40-Substrate ähnlich verhielten. Bei der Spaltung der APP18-Peptide konnte deutlich eine von der  $\alpha$ -helicalen Struktur des Substrats abhängige Spaltung durch die ADAM10-Proteine beobachtet werden, während bei der Spaltung der längeren A $\beta$ 40-Peptide diesbezüglich kein Zusammenhang hergestellt werden konnte. Zur weiteren Analyse des Spaltverhaltens sind enzymkinetische Studien nötig. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, eine empfindlichere Methode, d.h. einen auf die Spaltung entsprechender Fluoreszenz-markierter Substrate basierenden Enzym-Assay, zu etablieren.

Des Weiteren konnte unter Verwendung entsprechender muriner und humaner A $\beta$ -Peptide eine verstärkte Spaltung der murinen Substrate A $\beta$ 1-28 und A $\beta$ 1-40 durch hADAM10s (R&D-Systems) *in vitro* gezeigt werden. Dieser Versuch bestätigt die Annahme, dass es bei Nagetieren durch die Bevorzugung der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 zu keiner Bildung von Amyloid-Plaques kommt.

Neben der Substratspaltung konnte gezeigt werden, dass die ADAM10-Proteine hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice durch 10 nM des für die Inhibierung von ADAM10 spezifischen Hydroxamat-Derivats GI 254023 X in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt wurden. Anhand dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass es sich bei den exprimierten Proteinen tatsächlich um ADAM10-Varianten handelt, wobei im Fall von hADAM10splice gezeigt werden konnte, dass das Fehlen der Cystein-reichen Domäne keinen Einfluss auf die Fähigkeit der katalytischen Domäne zur Substrat- und Inhibitorbindung hatte. Auch die Stabilität des Enzyms scheint durch das Fehlen der Domäne nicht negativ beeinträchtigt zu werden, da das entsprechende Lyophilisat nach 4-wöchiger Lagerung bei 4°C noch die gleiche Aktivität aufwies. Aktuell konnte ein Nachweis der Splicevariante im menschlichen Gehirn nur auf mRNA-Ebene erfolgen (Yavari *et al.*, 1998). In dieser Hinsicht wäre es interessant, die verschiedenen ADAM10-Spezies auf Proteinebene und ihre mögliche Lokalisation *in vivo* zu untersuchen. Es ist nicht auszuschließen, dass hADAM10splice eine Funktion als lösliche Enzymvariante zugeordnet werden könnte, die entsprechend für die Spaltung löslicher Substrate verantwortlich wäre. Ob es sich dabei auch um die hier *in vitro* gespaltenen A $\beta$ -Monomere handelt, bedarf einer entsprechenden Überprüfung *in vivo*.

Auf die Spaltung von membrangebundenem APP und damit der Bildung von neuroprotektivem APPs $\alpha$  im Zellsystem scheinen die löslichen Proteine hADAM10s (R&D-Systems), hADAM10s und hADAM10splice unter den in dieser Arbeit vorliegenden Versuchsbedingungen keinen Einfluss zu haben. Für die Spaltung von APP scheint vielmehr die Membranverankerung von Enzym und Substrat eine wichtige Voraussetzung zu bilden. Es wäre jedoch vorstellbar, dass das Auftreten des extrazellulären Teils von ADAM10 *in vivo* aus der Terminierung des APP-„Sheddings“ resultiert.

Eine wichtige Aufgabe stellt demnach der Nachweis der löslichen ADAM10-Proteine sowie die Identifizierung ihrer potentiellen Substrate und deren Lokalisation *in vivo* dar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Almeida, E.A.C., Huovila, A.-P.J., Sutherland, A.E., Stephens, L.E., Calarco, P.G., Shaw, L.M., Mercurio, L.M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D.G., und White, J.M. (1995): „Mouse egg integrin  $\alpha 6\beta 1$  functions as a sperm receptor“, *Cell*, 81, 1095-1104
- Allison, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J. und Hooper, N.M. (2003): „ADAM family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases“, *J. Neurosci. Res.*, 74, 342-352
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. und Fahrenholz, F. (2001): „Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases“, *FASEB J.*, 15, 1837-1839
- Andersson, S., Davis, D.L., Dahlback, H., Jornvall, H., und Russell, D.W. (1989): „Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme“, *J. Biol. Chem.*, 264, 8222-8229
- Arribas, J., López-Casillas, F., und Massagué, J. (1997): „Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding“, *J. Biol. Chem.*, 272, 17160-17165
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. und Lake, R.J. (1999): „Notch signaling: cell fate control and signal integration in development“, *Science*, 284, 770-776
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. und Yednock, T. (2000): „Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease.“ *Nat. Med.*, 6, 916-919
- Beak, S.H., Ohig, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (2002): „Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -amyloid precursor protein“, *Cell*, 110, 55-67
- Bigler, D., Chen, M., Waters, S., und White, J.M. (1997): „A model for sperm-egg binding and ADAMs and integrins“, *Trends Cell Biol.*, 7, 220-225
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., und Cerretti, D.P. (1997): „A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells“, *Nature*, 385, 729-733
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X., und Stöcker, W. (1993): „Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins“, *FEBS Lett.*, 331, 134-140
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W. (1985): „A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus“, *Cell*, 41, 521-530
- Bradford, M.M. (1976): „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Brakebusch, C., Varfolomeev, E.E., Batkin, M., und Wallach, D. (1994): „Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor“, *J. Biol. Chem.*, 269, 32488-32496
- Bridges, L.C., Sheppard, D. und Bowditch, R.D. (2004): „ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$ “, *Biochem. J.*, 387, 101-108
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A. und Israel, A. (2000): „A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE“, *Mol. Cell.*, 5, 207-216
- Bruinzeel, W., Yon, J., Giovannelli, S., und Masure, S. (2002): „Recombinant insect cell expression and purification of human  $\beta$ -secretase (BACE-1) for X-ray crystallography“, *Prot. Expr. Purif.*, 26, 139-148
- Buxbaum, J.D., Koo, E.H., und Greengard, P. (1993): „Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid  $\beta$ /A4 peptide“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9195-9198

- 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., und Black, R.A. (1998): „Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -Secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor“, *J. Biol. Chem.*, 273, 27765-27767
- Cao, X. und Sudhof, T.C. (2001): „A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60“, *Science*, 293, 115-120
- Carson, J.A. und Turner, A.J. (2002): „ $\beta$ -Amyloid catabolism: roles for neprilysin and other metalloproteinases?“, *Journal of Neurochemistry*, 81, 1-8
- Chantry, A., Gregson, N.A., und Glynn, P. (1989): „A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization“, *J. Biol. Chem.*, 264, 21603-21607
- Cheng, H.I., Parlop, J.J., Esposito, L.A., Bien-Ly, N., Yan, F., und Mucke, L. (2004): „Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation“, *Nat. Med.*, 10, 1190-1192
- Citron, M., Teplow, D.B., und Selkoe, D.J. (1995): „Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific“, *Neuron*, 14, 661-670
- Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A. und Di Luca, M. (2002): „ $\alpha$ -Secretase ADAM10 as well as  $\alpha$ APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients“ *Mol. Med.*, 8, 67-74
- Coloma, M.J., Hastings, A., Wims, L.A., und Morrison, S.L. (1992): „Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction“, *J. Imm. Methods*, 152, 89-104
- Cruz, P.E., Cunha, A., Peixoto, C.C., Clement, J., Moreira, J.L., und Carrondo, J.T. (1998): „Optimization of the production of virus-like particles in insect cells“, *Biotechnol. Prog.*, 60, 408-418
- Davies, A.H. (1994): „Current methods for manipulating baculoviruses“, *Bio/Technology*, 12, 47-50
- Dee, K.U. und Shuler, M.L. (1997): „Optimization of an assay for baculovirus titer and design of regimens for the synchronous infection of insect cells“, *Biotechnol. Prog.*, 13, 14-24
- Demeester, N., Mertens, C., Caster, H., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., und Labeur, C. (2001): „Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of wild-type, Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides“, *Eur. J. Neurosci.*, 13, 2015-2024
- De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., und Dotti, C.G. (1995): „Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitution in the rodent sequence“, *EMBO J.*, 14, 4932-4938
- De Strooper, B. (2003): „Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active  $\gamma$ -secretase complex“, *Neuron*, 38, 9-12
- Eckman, E.A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K. und Eckman, C.B. (2003): „Alzheimer’s disease  $\beta$ -amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme“, *J. Biol. Chem.*, 278, 2081-2084
- Ehlers, M.R.W., und Riordan, J.F. (1991): “Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins“, *Biochemistry*, 30, 10065-10074
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., und Ward, P.J. (1990): “Cleavage of amyloid  $\beta$  peptide during constitutive processing of its precursor“, *Science*, 248, 1122-1124
- Esler, W.P. und Wolfe, M.S. (2001): “A portrait of Alzheimer secretases – New features and familiar faces“, *Science*, 293, 1449-1454
- Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G.M., und Goodman, C.S. (1996): „The cell surface metalloprotease / disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*“, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 13233-13238
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J. und Guénette, S. (2003): „Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid  $\beta$ -protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4162-4167
- Fox, J.W., und Bjarnason, J.B. (1996): „The repolysins: a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases“, in *Zinc Metalloproteinases in Health and Disease* (Hooper, N.M., Hrsg.), 47-81, Taylor & Francis, London
- Gaberc-Porekar, V., und Menart, V. (2001): „Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography“, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 335-360

- Gandy, S. (2005): „The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease“, *J. Clin. Invest.*, 115, 1121-1129
- Ghiso, J. und Wisniewski, T. (2004): „An animal model of vascular amyloidosis“, *Nat. Neurosci.*, 7, 902-904
- Goddard, D.R., Bunning, R.A.D., und Woodproofe, M.N. (2001): „Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM17 (TACE) in adult human CNS“, *Glia*, 34, 267-271
- Goedert, M. und Spillantini, M.G. (2000): „Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease“, *Biochim Biophys Acta.*, 1502, 110-121
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., und Selkoe, D.J. (1992): „Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism“, *Nature*, 359, 322-325
- Haass, C., und Selkoe, D.J. (1993): „Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide“, *Cell*, 75, 1039-1042
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., und Teplow, D.B. (1994): „Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid  $\beta$ -protein precursor“, *J. Biol. Chem.*, 269, 17741-17748
- Haass, C. (1996): „Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset of Alzheimer's disease“, *Curr. Opin. Neurol.*, 9, 254-259
- Haass, C., und Mandelkow, E. (1999): „Proteolysis by presenilins and the renaissance of tau“, *Trends Cell Biol.*, 9, 241-244
- Haass, C., und Steiner, H. (2001): „Protofibrils, the unifying toxic molecule of neurodegenerative disorders?“, *Nat. Neurosci.*, 4, 859-860
- Haass, C., und Steiner, H. (2002): „Alzheimer disease  $\gamma$ -secretase: a complex story of GxGD-type presenilin protease“, *Trends Cell Biol.*, 12, 556-562
- Haass, C. (2004): „Take five – BACE and the  $\gamma$ -Secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation“, *EMBO J.*, 23, 483-488
- Hardy, J., und Selkoe, D.J. (2002): „The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease:  $\gamma$ -secretase: progress and problems on the road to therapeutics“, *Science*, 297, 353-356
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Illert, A.L., von Figura, K. und Saftig, P. (2002): „The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for  $\alpha$ -secretase activity in fibroblasts“, *Hum. Mol. Gen.*, 11, 2615-2624
- Hattori, M., Osterfield, M., und Flanagan, J.G. (2000): „Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent“, *Science*, 289, 1360-1365
- Hefti, M.H., Van Vugt-Van der Toorn, C.J.G., Dixon, R., und Vervoort, J. (2001): „A novel purification method for histidine-tagged proteins containing thrombin cleavage site“, *Analyt. Biochem.*, 295, 180-185
- Helmuth, L. (2002): „New Alzheimer's treatments that may ease the mind“, *Science*, 297, 1260-1262
- Hendricks, L., Duijn, C.M., Cras, P., Cruts, M., van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M., Antonarakis, S., Martin, J.J., Hofman, A., und van Broeckhoven, C. (1992): „Preseniline dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of  $\beta$ -amyloid precursor protein gene“, *Nat. Genet.*, 1, 218-221
- Herzig, M.C., Winkler, D.T., Burgermeister, P., Pfeifer, M., Kohler, E., Schmidt, S.D., Danner, S., Abramowski, D., Strüchler-Pierrat, C., Brükis, K., van Duinen, S.G., Maat-Schieman, M.L.C., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., und Jucker, M. (2004): „A $\beta$  is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis“, *Nat. Neurosci.*, 7, 954-960
- Ho, A. und Südhof, T.C. (2004): „Binding of F-spondin to amyloid- $\beta$  precursor protein: A candidate amyloid- $\beta$  precursor protein ligand that modulates amyloid- $\beta$  precursor protein cleavage“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2548-2553
- Hock, C., Konietzko, U. Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbricht, D., de Quervain, D.J.F., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. und Nitsch, R.M. (2003): „Antibodies against  $\beta$ -Amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease“, *Neuron*, 38, 547-554
- Hooper, N.M., Karran, E.H., und Turner, A.J. (1997): „Membrane protein secretases“, *Biochem. J.*, 321, 265-279
- Howard, L., und Glynn, P. (1995): „Membrane-associated metalloproteinase recognized by characteristic cleavage of myelin basic protein: Assay and isolation“, *Methods Enzymol.*, 248, 388-395

- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.J., Rose-John, S. und Ludwig, A. (2003): „The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion“, *Blood*, 102, 1186-1195
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qio, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., und Selkoe, D.J. (1993): „Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid  $\beta$ -protein“, *J. Biol. Chem.*, 268, 22959-22962
- Huovila, A.-P.J., Almeida, E.A.C., und White, J.M. (1996): „ADAMs and cell fusion“, *Curr. Opinion Cell Biol.*, 8, 692-699
- Huovila, A.-P.J., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., und Ortiz, R.M. (2005): „Shedding light on ADAM metalloproteinases“, *Trends Biochem Sci.*, 30, 413-422
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., et al. (1999): „Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase“, *Mol. Cell Neurosci.*, 14, 419-427
- Iba K., Albrechtsen R., Gilpin B., Frohlich C., Loechel F., Zolkiewska A., Ishiguro K., Kojima T., Liu W., Langford J.K., Sanderson R.D., Brakebusch C., Fassler R., und Wewer U.M. (2000): „The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading“, *J. Cell Biol.*, 149, 1143-56
- Inzumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., und Mekada E. (1998): „A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\gamma$ /ADAM 9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor“, *EMBO J.*, 17, 7260-7272
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., und Shirasawa, T. (2005): „Structure of  $\beta$ -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease“, *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 437-447
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. und Westaway, D. (2000): „A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.“, *Nature*, 408, 979-982
- John, V., Beck, J.P., Bienkowski, M.J. Sinha, S. und Heinrichson, R.L. (2003): „Human  $\beta$ -secretase (BACE) and BACE inhibitors“, *J. Med. Chem.*, 46, 4625-4630
- Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, P., und Little, S.P. (1991): „Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear an five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis“, *Mol. Brain Res.*, 10, 299-305
- Kahn, J., Ingraham, R.H., Shirley, F., Migaki, G.I., und Kishimoto, T.K. (1994): „Membrane proximal cleavage of L-selectin: Identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin“, *J. Cell Biol.*, 125, 461-470
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Müller-Hill, B. (1987): „The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor“, *Nature*, 325, 733-736
- Kärkkäinen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., und Huovila A.P. (2000): „Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS“, *Moll. Cell. Neurosci.*, 15, 547-560
- Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guenette, S.Y. und Selkoe, D.J. (2001): „The intracellular domain of the  $\beta$ -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner “, *J. Biol. Chem.*, 276, 40288-40292
- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S. und Selkoe, D.J. (2003): „ $\gamma$ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6382-6387
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., und Ishiura, S. (1999): „Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible für processing the amyloid precursor protein“, *Biochem. J.*, 343, 371-375
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., März, W., und Fahrenholz, F. (2001): „Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the  $\alpha$ -secretase ADAM 10“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5815-5820

- Koo, E.H., Lansbury Jr., P.T., und Kelly, J.W. (1999): „Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9989-9990
- Kopan, R. und Ilagan, M.X.G. (2004): „ $\gamma$ -Secretase: proteasome of the membrane“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 499-504
- Kost, T.A., Condreay, J.P., und Jarvis, D.L. (2005): „Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells“, *Nat. Biotechnol.*, 23, 567-575
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., und Lu, S.D. (1988): „A Novel Form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF“, *Cell*, 53, 45-53
- Laemmli, U.K. (1970): „Cleavage of structural proteins during the 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., und Fahrenholz, F. (1999): „Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin and metalloprotease“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3922-3927
- Leonard, J.D., Li, F. und Milla, M.E. (2005): „Chaperon-like properties of the prodomain of TACE and the functional role of its cysteine switch“, *Biochem. J.*, 387, 797-805
- Leptich, A.: „Überexpression und Analyse verschiedener Konstrukte der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10“ Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2000
- Lin, L., Georgievska, B., Mattsson, A. und Isacson, O. (1999): „Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12108-12113
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., DeStrooper, B. und Seed, B. (2003): „The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1“, *J. Biol. Chem.*, 278, 48713-48719
- Lichtenthaler, S.F. und Haass, C. (2004): „Amyloid at the cutting edge: activation of  $\alpha$ -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model“, *J. Clin. Invest.*, 113, 1384-1387
- Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., und Wewer, U.M. (1998): „Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) is an active metalloprotease“, *J. Biol. Chem.*, 273, 16993-16997
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., und Wewer, U. (1999): „Regulation of Human ADAM 12 protease by the prodomain. evidence for a functional cysteine switch“, *J. Biol. Chem.*, 274, 13427-13433
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.: „Bioanalytik“, Spektrum-Verlag, 1998
- Luckow, V.A. (1993): „Baculovirus systems for the expression of human gene products“, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4, 564-572
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., und Olins, P.O. (1993): „Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*“, *J. Virol.*, 67, 4566-4579
- Lum, L., Reid, M.S., und Blobel, C.P. (1998): „Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15“, *J. Biol. Chem.*, 273, 26236-26247
- Lunn, C.A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P.J., Narula, S.K., und Lundell, D. (1997): „Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF $\alpha$  convertase“, *FEBS Lett.*, 400, 333-335
- Lynn, D.E. (2002): „Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses“, *Methods Cell Sci.*, 23, 221-225
- Maecker, H.T., Todd, S.C. und Levy, S. (1997): „The tetraspanin superfamily: molecular facilitators“, *FASEB J.*, 11, 428-442
- Marcinkiewicz, M. und Seidah, N.G. (2000): „Coordinate expression of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the putative  $\beta$ -secretase BACE and  $\alpha$ -secretase ADAM10 in mouse and human brain“, *J. Neurochem.*, 75, 2133-2143
- Maruyama, K., Kematani, F., Usami, M., Yamao-Hargaya, W., und Tanaka, K. (1991): „Secretase,“ Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequence-specific“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1670-1676
- Massagué, J., und Pandiella, A. (1993): „Membrane-Anchored Growth Factors“, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 515-541
- Massotte, D. (2003): „G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies“, *Biochim Biophys Acta*, 1610, 77-89

- McFarlane, S. (2003): „Metalloproteases: carving out a role in axon guidance“, *Neuron*, 37, 559-562
- Melchor, J.P., McVoy, L., und Van Nostrand, W.E. (2000): „Charge alterations of E22 enhance the pathogenic properties of the amyloid  $\beta$ -protein“, *J. Neurochem.*, 74, 2209-2212
- Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M. und Ungerer, A. (1998): „Memory-enhancing effects of secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12683-12688
- Milla, M.E., Leesnitzer, M.A., Moss, M.L., Clay, W.C., Carter, H.L., Miller, A.B., Su, J.-L., Lambert, M.H., Willard, D.H., Sheeley, D.M., Kost, T.A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R.K., Pahel, G.L., Mitchell, J.L., Hoffman, C.R., und Becherer J.D. (1999): „Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE)“, *J. Biol. Chem.*, 274, 30563-30570
- Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K., und Masters, C.L. (1992): „The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth“, *Neuron*, 9, 129-137
- Miravalle, L., Tokuda, T., Chiarle, R., Giaccone, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., Frangione, B., und Ghiso, J. (2000): „Substitutions at codon 22 of Alzheimer's  $A\beta$  peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells“, *J. Biol. Chem.*, 275, 27110-27116
- Mohler, K.M., Sleath, P.R., Fitzner, J.N., Cerretti, D.P., Alderson, M., Kerwar, S.S., Torrance, D.S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S.R., Petersen, M., Gerhardt, M., Kozlosky, C.J., March, C.J., und Black, R.A. (1994): „Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing“, *Nature*, 370, 218-220
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. und Arendash, G.W. (2000): „A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease.“, *Nature*, 408, 982-985
- Morelli, L., Llovera, R., Gonzales, S.A., Affranchino, J.L., Prelli, F., Frangione, B., Ghiso, J. und Castano, E.M. (2003): „Differential degradation of amyloid  $\beta$  genetic variants associated with hereditary dementia or stroke by insulin-degrading enzyme“, *J. Biol. Chem.*, 278, 23221-23226
- Morimoto, A., Irie, K., Murakami, K., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., und Shirasawa, T. (2002): „Aggregation and neurotoxicity of mutant amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) peptides with proline replacement: importance of turn formation at positions 22 and 23“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 306-311
- Moss, M.L., Jin, S.-L.C., Milla, M.E., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.-J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.-L., Warner, J., Willard, D., und Becherer, J.D. (1997): „Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ “ *Nature*, 385, 733-736 und *Nature*, 386, 738
- Moss, M.L. und Lambert, M.H. (2002): „Shedding of membrane proteins by ADAM family protease“, aus: „*Essays in Biochemistry*“, 38, 141-153
- Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., und Shirasawa, T. (2002): „Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various Ab1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 5-10
- Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., und Shirasawa, T. (2003): „Neurotoxicity and physicochemical properties of  $A\beta$  mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy“, *J. Biol. Chem.*, 278, 46179-46187
- Nelson, J.A., Reynolds-Kohler, C., und Smith, B.A. (1987): „Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene“, *Mol. Cell Biol.*, 7, 4125-4129
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forselli, C., Stenhl, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Näslund, J., und Lannfelt, L. (2001): „The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced  $A\beta$  protofibril formation“, *Nat. Neurosci.*, 4, 887-983
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H. und LaFerla, F.M. (2004): „ $A\beta$  immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome“, *Neuron*, 43, 321-332
- Päiviö, A., Jarvet, J., Gräslund, A., Lannfelt, L., und Westlind-Danielsson, A. (2004): „Unique physicochemical profile of  $\beta$ -amyloid peptide variant  $A\beta$ 1-40E22G protofibrils: conceivable neuropathogen in arctic mutant carriers“, *J. Mol. Biol.*, 339, 145-159

- Palomares, L.A., Joosten, C.E., Hughes, P.R., Granados, R.R., und Shuler, M.L. (2003): „Novel insect cell line capable of complex *N*-glycosylation and sialylation of recombinant proteins“, *Biotechnol. Prog.*, 19, 185-192
- Pan, D., und Rubin, G.M. (1997): „Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis“, *Cell*, 90, 271-280
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A. und Hooper, N.M. (1999): „Cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by  $\alpha$ -secretase occurs at the surface of neuronal cells“, *Biochemistry*, 38, 9728-9734
- Pawson, P. (1995): „Protein modules and signalling networks“, *Nature*, 373, 573-580
- Philipps, B., Rotmann, D., Wicki, M., Mayr, L.M., und Forstner, M. (2005): „Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells“, *Prot. Expr. Purif.*, 42, 211-218
- Primakoff, P. und Myles, D.G. (2000): „The ADAM gene family – surface proteins with adhesion and protease activity“, *Trends in Genetics*, 16, 83-87
- Postina, R., Schoeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F. und Fahrenholz, F. (2004): „A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model“, *J. Clin. Invest.*, 113, 1456-1464
- Rawlings, N.D., und Barrett, A.J. (1995): „Evolutionary families of metalloproteinases“, *Meth. Enzymol.*, 248, 183-228
- Reed, K.C., und Münch, H. (1983): „A simple method of estimating fifty per cent endpoints“, *Amer. J. Hygiene*, 24, 493-497
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K.E., Kawabe, T.T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N.F., Power, M., Robertson, D.W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G.M., Shuck, M.E., Sinha, S., Swensson, K.A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S. und McConlogue, L. (2001): „BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary  $\beta$ -secretase activity in brain: implication for Alzheimer’s disease therapeutics “, *Hum. Mol. Genet.*, 10, 1317-1324
- Roberts, S.B., Ripellino, J.A., Ingalls, K.M., Robakis, N.K., und Felsenstein, K.M. (1994): „Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase“, *J. Biol. Chem.*, 269, 3111-3116
- Roch, J.M., Shapiro, I.P., Sundsmo, M.P., Otero, D.A.C., Refolo, L.M., Robakis, N.K., und Saitoh, T. (1992): „Bacterial expression, purification and functional mapping of the amyloid  $\beta$ /A4 protein precursor“, *J. Biol. Chem.*, 267, 2214-2221
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., und Blobel, C.P. (1999): „Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity“, *J. Biol. Chem.*, 274, 3531-3540
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., und Rubin, G.M. (1996): „KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis“, *Science*, 273, 1227-1231
- Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., Kohno, T., Lyons, D., und Lichenstein, H.S. (1997): „Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- $\alpha$ -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases“, *J. Biol. Chem.*, 272, 24588-24593
- Rosinski, M., Reid, S., und Nielsen, L.K. (2000): „Osmolarity effects on observed insect cell size after baculovirus infection are avoided using growth medium for sample dilution“, *Biotechnol. Prog.*, 16, 782-785
- Rosinski, M., Reid, S., und Nielsen, L.K. (2002): „Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction“, *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 476-480
- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J.-M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T., und Schenk, D.B. (1989): „Secreted form of amyloid  $\beta$  protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts“, *Cell*, 58, 615-622
- Sarafanov, A. und Saenko, E. (2004): „High-throughput optimization of protein expression in the baculovirus system based on determination of relative expression efficiency of viral stocks“, *Anal. Biochem.*, 328, 98–100
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M. et al., (2001): „Presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch“, *EMBO reports*, 2, 835-841

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Liederburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeyert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., und Seubert, P. (1999): „Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse“, *Nature*, 400, 173-177
- Schubert, D., La Corbiere, Saitoh, T., und Cole G. (1989): „Characterization of an amyloid  $\beta$  precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2066-2069
- Seals, D.F. und Courtneidge, S.A. (2003): „The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions“, *Genes & Dev.*, 17, 7-30
- Selkoe, D.J (1999): „Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer’s disease“, *Nature*, 399, Supp., A23-A31
- Selkoe, D.J (2001a): „Alzheimer’s disease: genes, proteins and therapy“, *Physiol. Rev.*, 81, 741-766
- Selkoe, D.J (2001b): „Clearing the brain’s amyloid cowebs“, *Neuron*, 32, 177-180
- Selkoe, D.J (2004): „Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies“, *Ann. Intern Med.*, 140, 627-638
- Serpell, L.C. (2000): „Alzheimer’s amyloid fibrils: structure and assembly“, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1502, 16-30
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., et al. (1992): „Isolation and quantification of soluble Alzheimer’s beta-peptide from biological fluids“, *Nature*, 359, 325-327
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., et al. (1992): „Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing“, *Science*, 258, 126-129
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccabello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., et al. (1999): „Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain“, *Nature*, 402, 537-540
- Sisodia, S.S. (1992): „ $\beta$ -Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6075-6079
- Smith, K.M., Gaultier, A., Cousin, H., Alfandari, D., White, J.M., und DeSimone, D.W. (2002): „The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo“, *J. Cell Biol.*, 159, 893-902
- Snell, W.S., und White, J.M. (1996): „The molecules of mammalian fertilization“, *Cell*, 85, 629-637
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., und Greengard, P. (2005): „Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ “, *Nat. Neurosci.*, 8, 1051-1058
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H., und Van Wart, H.E. (1990): „Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys<sup>73</sup> active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 364-368
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F.-X., McKay, D.B., und Bode, W. (1995): „The metzincins: Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins and matrixins (collagenases) define the superfamily of zinc-peptidases“, *Protein Sci.*, 4, 823-840
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., et al., (1993): „Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1977-1981
- Talafous, J., Marciniowski, K.J., Klopman, G., und Zagorski, M.G. (1994): „Solution structure of residues 1-28 of the amyloid  $\beta$ -peptide“, *Biochemistry*, 33, 7788-7796
- Tanzi, R.E. (2005): „The synaptic A $\beta$  hypothesis of Alzheimer disease“, *Nat. Neurosci.*, 8, 977-979
- Taticek, R.A. und Shuler, M.L. (1997): „Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system“, *Biotechnol. Bioeng.*, 54, 142-152
- Taylor, V.C., Buckley, C.D., Douglas, M., Cody, A.J., Simmons, D.L. und Freeman, S.D. (1999): „The myeloid-specific sialic acid-binding Receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2“, *J. Biol. Chem.*, 274, 11505-11512
- Tsubuki, S., Takaki, Y., und Saido, T.C. (2003): „Dutch, Flemish, Italian and Arctic mutations of APP an resistance of A $\beta$  to physiologically relevant proteolytic degradation“, *Lancet*, 361, 1957-1958

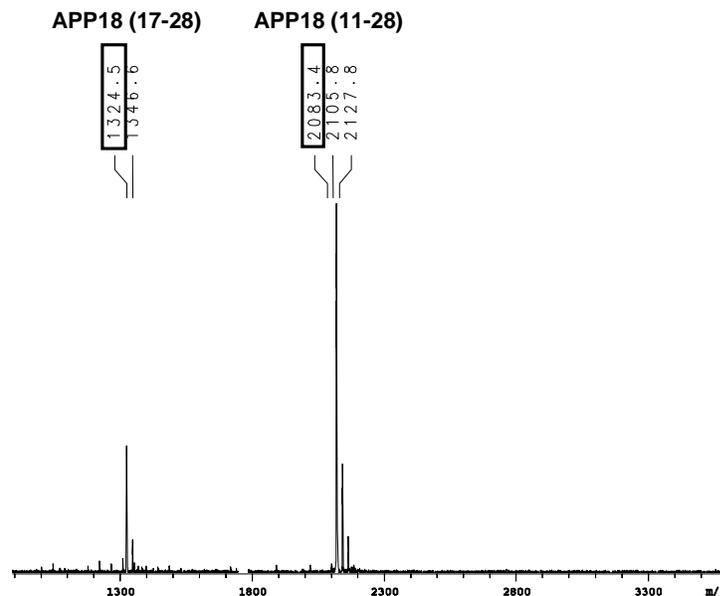
- Van Nostrand, W.E., Melchor, J.P., Cho, H.S., Greenberg, S.M., und Rebeck, G.W. (2001): „Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid  $\beta$ -protein“, *J. Biol. Chem.*, 276, 32860-32866
- Van Wart, H.E., und Birkedal-Hansen, H. (1990): „The cystein switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5578-5582
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Kahn, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff R., et al. (1999): „Beta-secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE“, *Science*, 286, 735-741
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Condrón, M.M., Selkoe, D.H., und Teplow, D.B. (2001): „*In vitro* studies of amyloid  $\beta$ -protein fibril assembly and toxicity provides clues to the aetiology of Flemish variant (Ala<sup>692</sup>→Gly) Alzheimer’s disease“, *Biochem. J.*, 355, 869-877
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Pritma, D., Sagi, S.A., Wang, R. Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., Kang, D.E., Marquez-Sterling, N., Golde, T.E. und Koo, E.H. (2001): „A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A $\beta$ 42 independently of cyclooxygenase activity“, *Nature*, 414, 212-216
- Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., und Lee, V.M.-Y. (1993): „Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular  $\beta$ -amyloid or A4 peptides“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9513-9517
- Wessel, P.J., und Flügge, U.I. (1984): „A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids“, *Anal. Biochem.* 138: 141-143
- Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T.A., Higashiyama, S., Manova, K., Ludwig, T. und Blobel, C.P. (2002): „Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life“, *Mol. Cell. Biol.*, 22, 1537-1544
- White, J.M. (2003): „ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 598-606
- Wolfe, M.S., Xia, W., Sotaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., und Selkoe, D.J. (1999): „Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity“, *Nature*, 398, 513-517
- Wolfsberg, T.G., Bazan, J.F., Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., und White, J.M. (1993): „The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloproteinase and a disintegrin domain: Structural, functional and evolutionary implications“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10783-10787
- Wolfsberg, T.G., Straight, P.D., Gerena, R.L., Huovila, A.-P.J., Primakoff, P., Myles, D.G., und White, J.M. (1995): „ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloproteinase domain“, *Dev. Biol.*, 169, 378-383
- Wolfsberg, T.G., und White, J.M. (1996): „ADAMs in fertilization and development“, *Dev. Biol.*, 180, 389-401
- Wong, K.T.K., Peter, C.H., Greenfield, P.F., Reid, S., und Nielsen, L.K. (1996): „Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept“, *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 659-666
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., und Hancock, R. (1981): „Silver staining of proteins in polyacrylamide gels“, *Anal. Biochem.*, 118, 197-203
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., und Fujisawa-Sehara, A. (1995): „A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion“, *Nature*, 377, 625-656
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E. et al. (1999): „Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer’s disease  $\beta$ -secretase activity“, *Nature*, 402, 533-537
- Yankner, B.A. (1996): „Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer’s Disease“, *Neuron*, 16, 921-932
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M. und Xu, T. (1998): „Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia“, *Human Molecular Genetics*, 7, 1161-1167
- Younkin, S.G. (2001): „Amyloid beta vaccination: reduced plaques and improved cognition“, *Nat. Med.*, 1, 18-19



## 7 ANHANG

### 7.1 MASSENSPEKTROSKOPIE

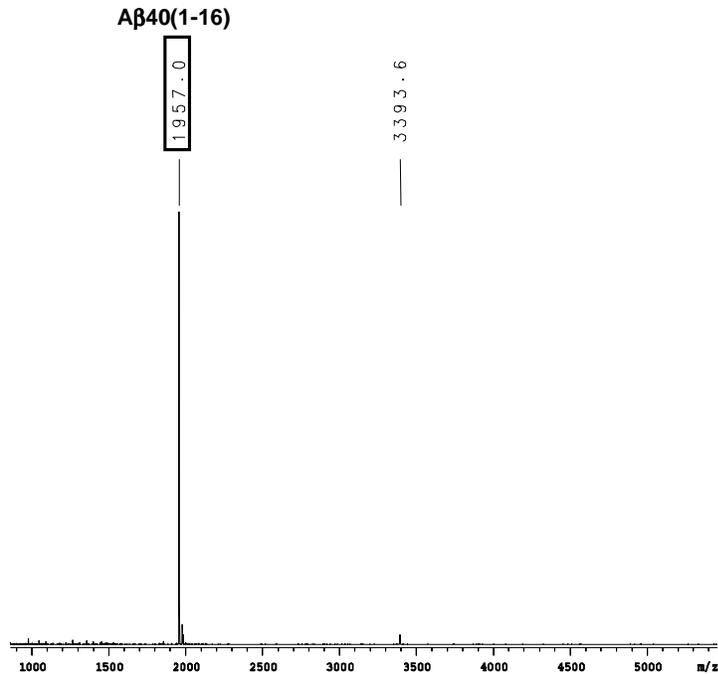
Durch massenspektroskopische Untersuchungen wurde bestätigt, dass die Spaltung der eingesetzten APP18- und A $\beta$ 40-Substrate (siehe 3.4.2) durch hADAM10s (R&D-Systems) an der  $\alpha$ -Sekretasestelle erfolgte (siehe Abb. 7.1 bis 7.6). In den durchgeführten HPLC-Analysen traten nach der Spaltung der genannten Peptide durch die Enzyme hADAM10s, hADAM10splice und hADAM10s (R&D-Systems) die entsprechenden Spaltfragmente mit identischen Retentionszeiten auf. Somit ist davon auszugehen, dass die Spaltung der jeweiligen Peptidsubstrate durch alle drei ADAM10-Proteine an der  $\alpha$ -Sekretasestelle erfolgte.



**Abb. 7.1:** Spaltung von 30  $\mu$ M APP18 durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)

**EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK**

Sichtbar ist das Ausgangssubstrat APP18 mit einem Molekulargewicht von 2083,4 kDa sowie das C-terminale  $\alpha$ -Sekretase-Spaltfragment APP17-28 mit einem Molekulargewicht von 1324,5 kDa.

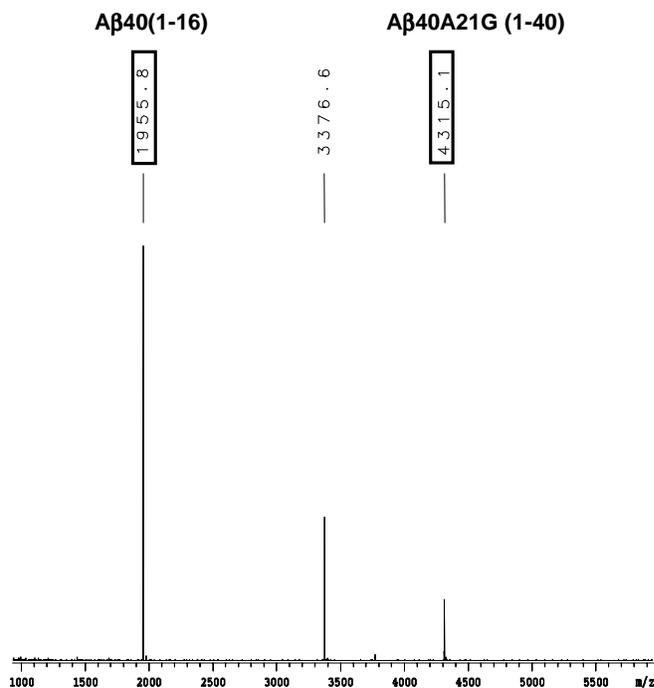


**Abb. 7.2:**

**Spaltung von 30 μM Aβ40 durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)**

**DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV**

Das Ausgangssubstrat Aβ40 (Bachem) mit einem Molekulargewicht von 4329,86 kDa ist nach dieser Spaltreaktion nicht mehr sichtbar. Sichtbar ist das N-terminale α-Sekretase-Spaltfragment Aβ40 1-16 mit einem Molekulargewicht von 1957,0 kDa.

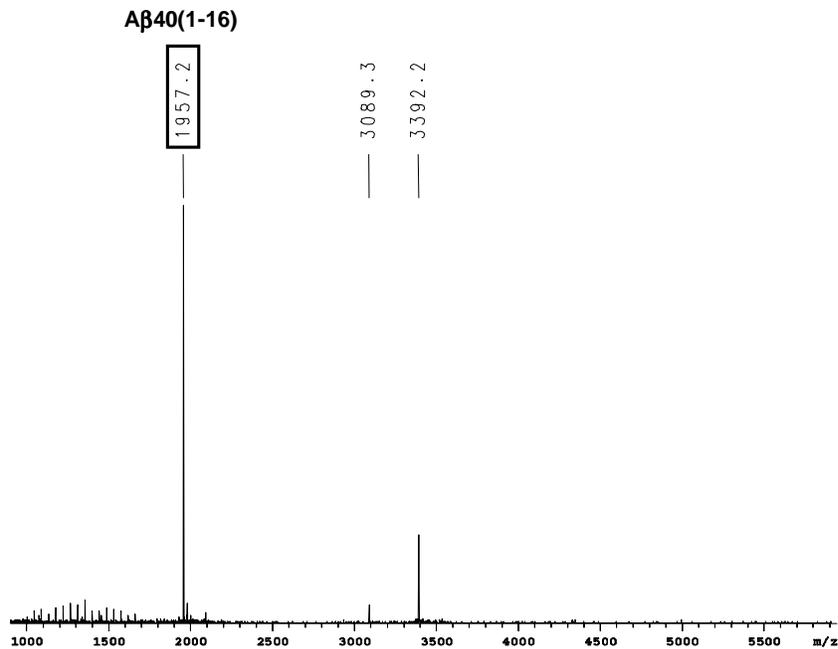


**Abb. 7.3:**

**Spaltung von 30 μM Aβ40A21G durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)**

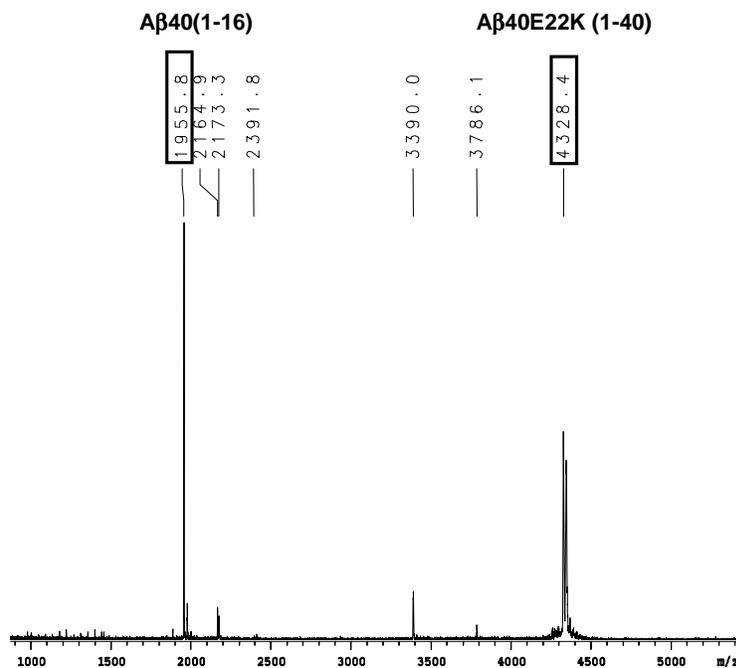
**DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFGEDVGSNKGAIIGLMVGGVV**

Das Molekulargewicht des Ausgangssubstrat Aβ40A21G (Merck Biosciences) beträgt 4315,13 Da. Sichtbar ist das N-terminale α-Sekretase-Spaltfragment Aβ40A21G 1-16 mit einem Molekulargewicht von 1955,8 Da.

**Abb. 7.4:**

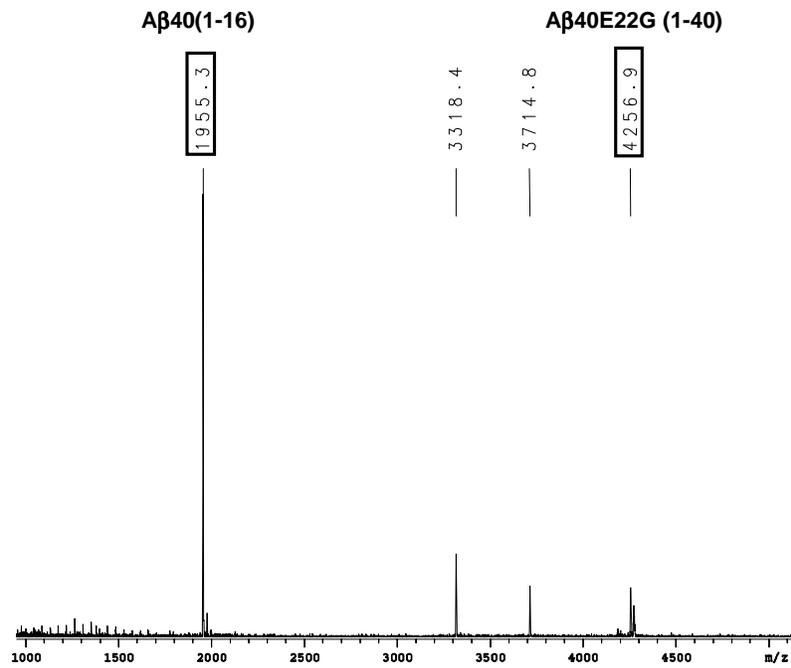
**Spaltung von 30  $\mu$ M A $\beta$ 40E22Q durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)**  
**DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV**

Das Ausgangssubstrat A $\beta$ 40E22Q (Merck Biosciences) ist mit einem Molekulargewicht von 4328,88 Da nach dieser Spaltung nicht mehr nachzuweisen. Das N-terminale  $\alpha$ -Sekretase-Spaltfragment A $\beta$ 40E22Q 1-16 ist mit einem Signalpeak entsprechend einem Molekulargewicht von 1957,2 Da zu erkennen.

**Abb. 7.5:**

**Spaltung von 30  $\mu$ M A $\beta$ 40E22K durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)**  
**DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAKDVGSNKGAIIGLMVGGVV**

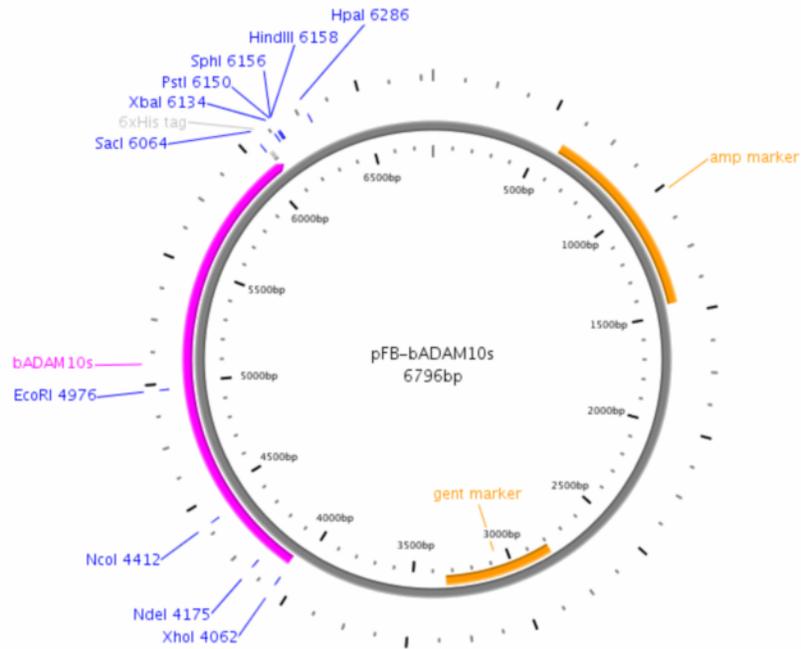
Das Ausgangssubstrat A $\beta$ 40E22K kann dem Signal entsprechend dem Molekulargewicht von 4328,4 Da zugeordnet werden. Das N-terminale  $\alpha$ -Sekretase-Spaltfragment A $\beta$ 40E22K 1-16 entspricht einem Molekulargewicht von 1955,8 Da.



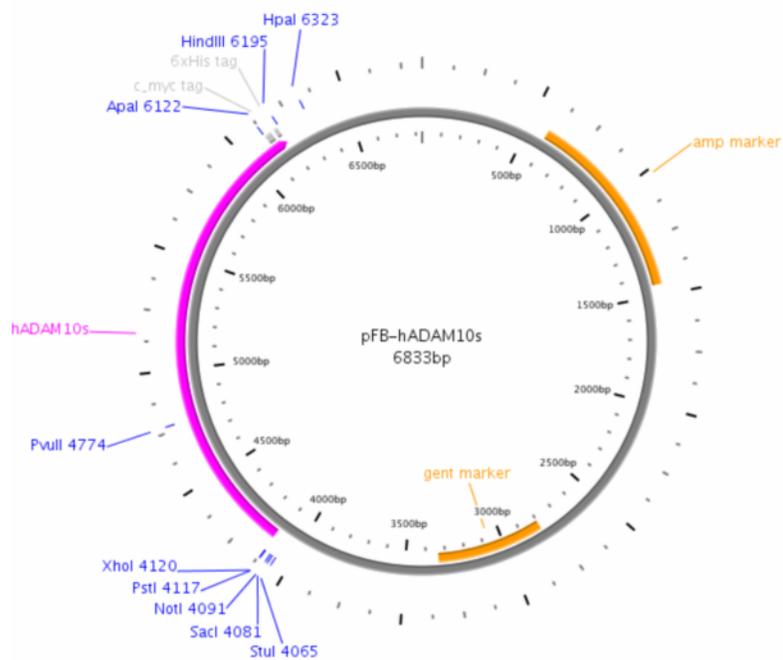
**Abb. 7.6:** Spaltung von 30  $\mu$ M Aβ40E22G durch 100 nM hADAM10s (R&D-Systems)  
**DAEFRHDSGYEVHHQK↓LVFFAGDVGSNKGAIIGLMVGGVV**  
Das Substrat Aβ40E22G kann dem Signal entsprechend einem Molekulargewicht von 4256,9 Da zugeordnet werden. Das N-terminale  $\alpha$ -Sekretase-Spaltfragment Aβ40E22G 1-16 entspricht einem Molekulargewicht von 1955,3 Da.

## 7.2 VEKTORKARTEN

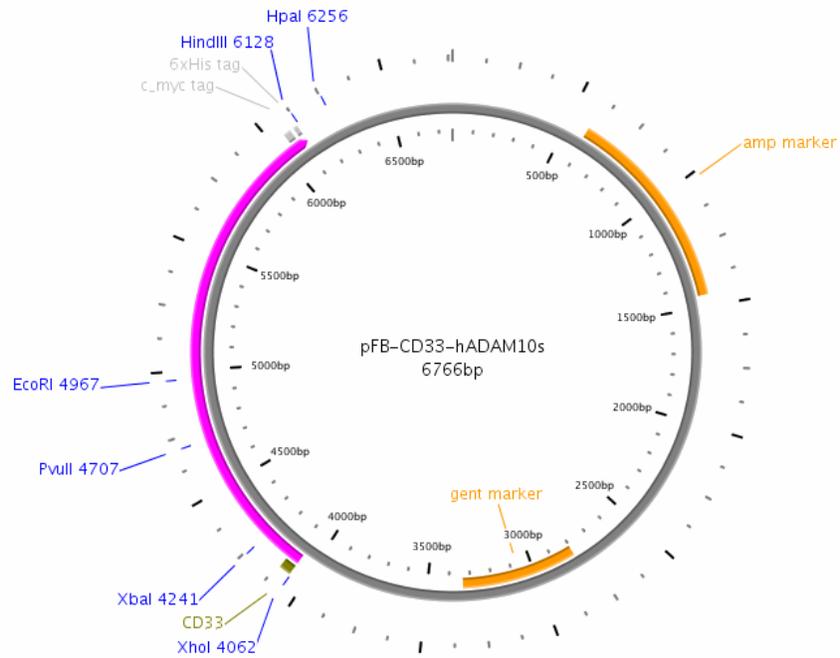
### 7.2.1 Plasmide für die Expression in Insektzellen



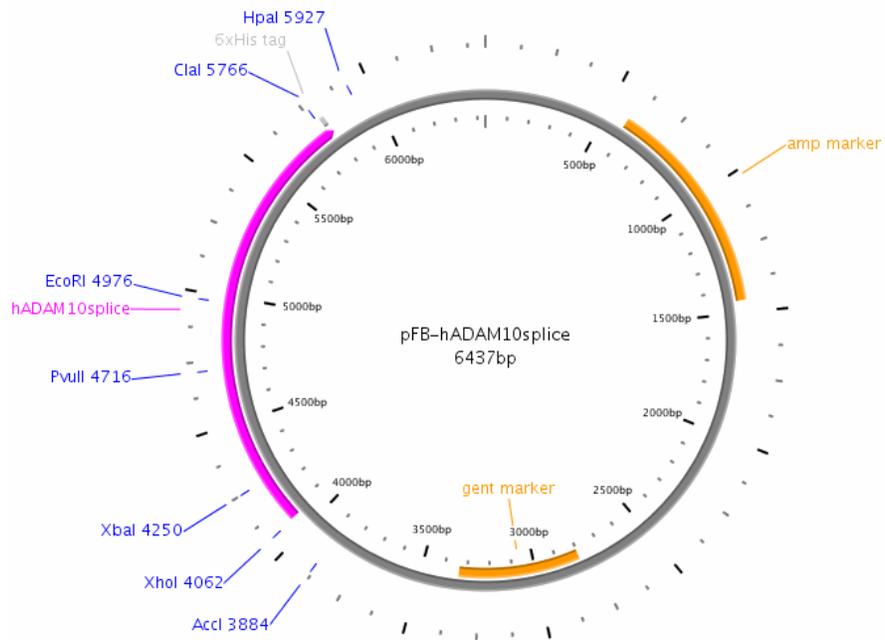
**Abb. 7.7:** pFB-bADAM10s-His (siehe 3.2.1)



**Abb. 7.8:** pFB-hADAM10s-His (siehe 3.2.1)

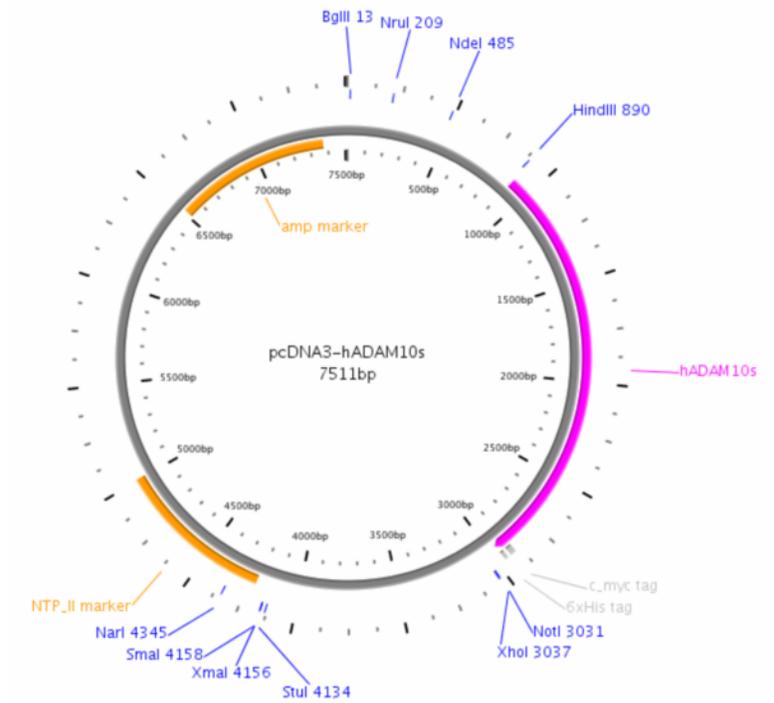


**Abb. 7.9:** pFB-CD33-hADAM10s-His (siehe 3.2.1)

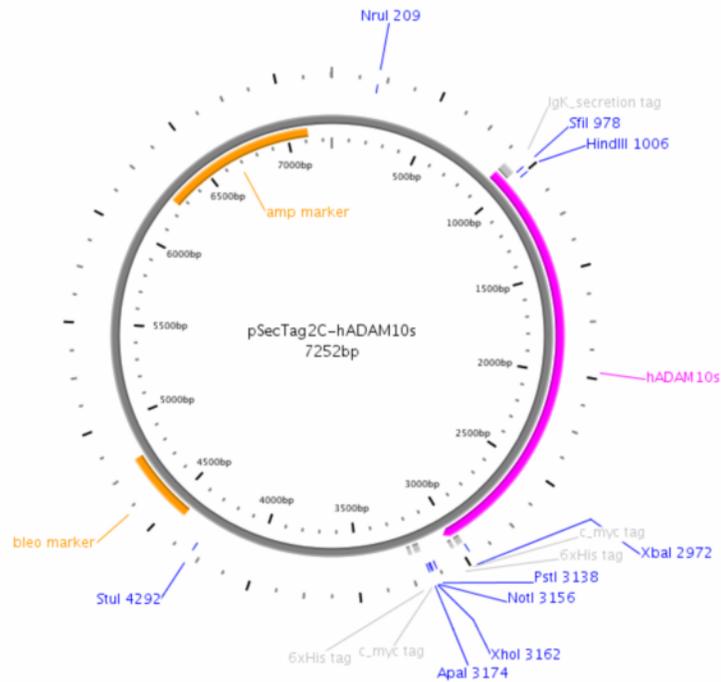


**Abb. 7.10:** pFB-hADAM10splice-His (siehe 3.2.1)

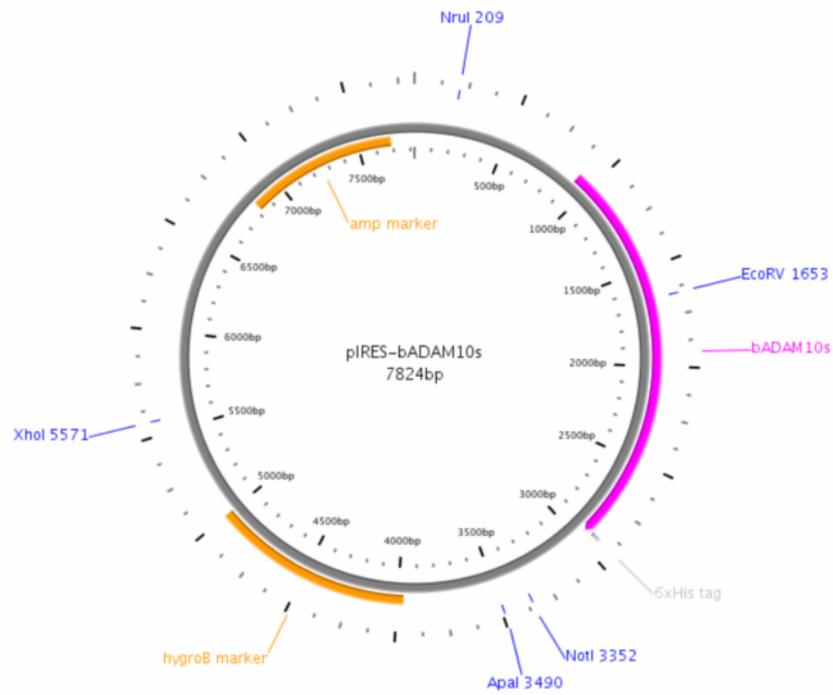
7.2.2 Plasmide für die Expression in Säugetierzellen



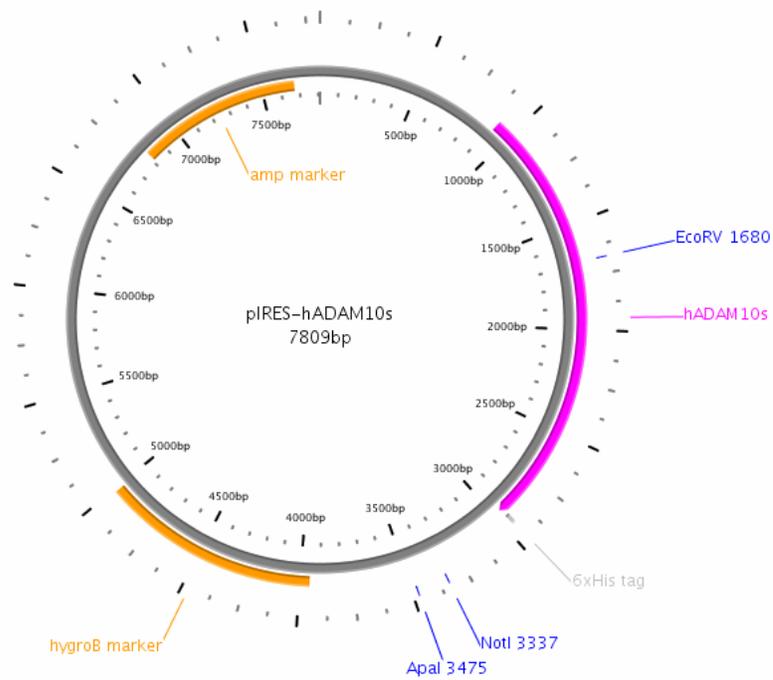
**Abb. 7.11:** pcDNA3-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.1)



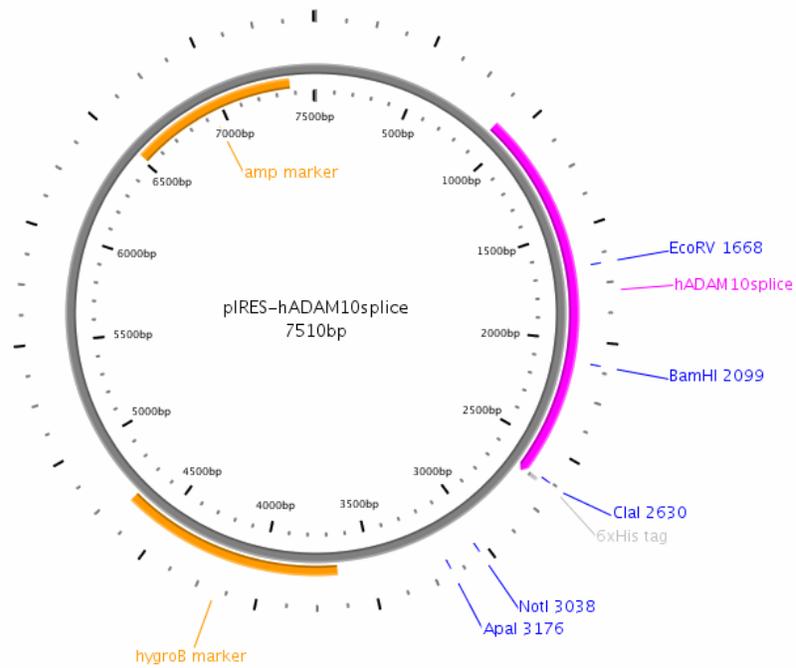
**Abb. 7.12:** pSecTag2C-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.1)



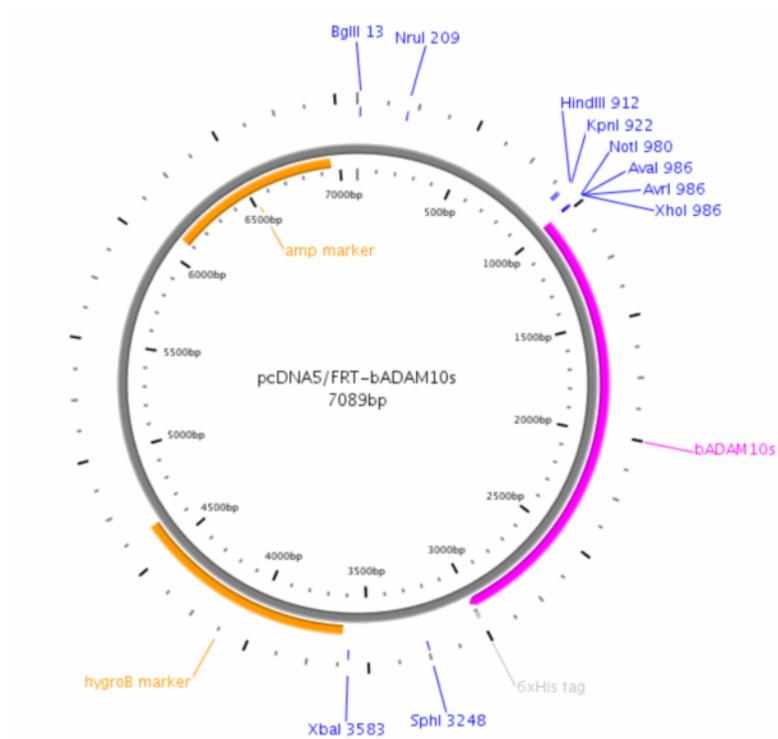
**Abb. 7.13:** pIRES-bADAM10s-His (siehe 2.4.1.2)



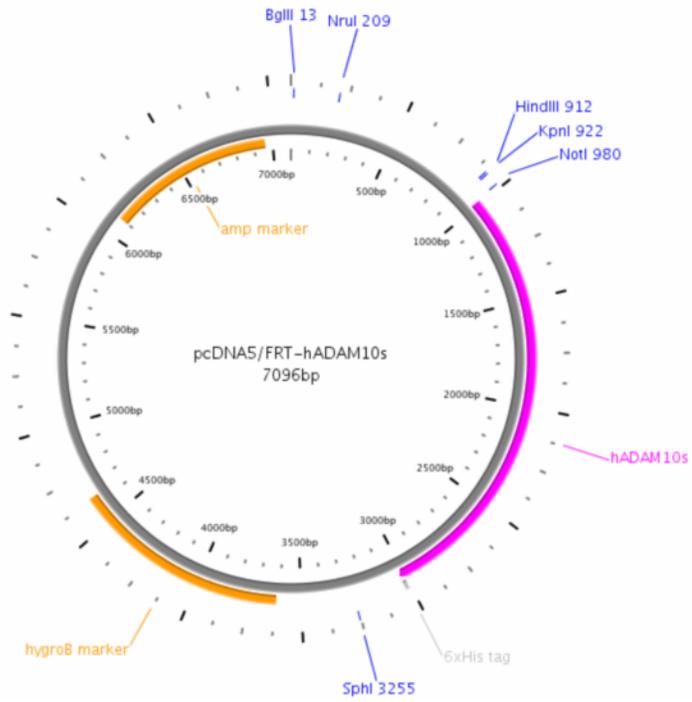
**Abb. 7.14:** pIRES-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.2)



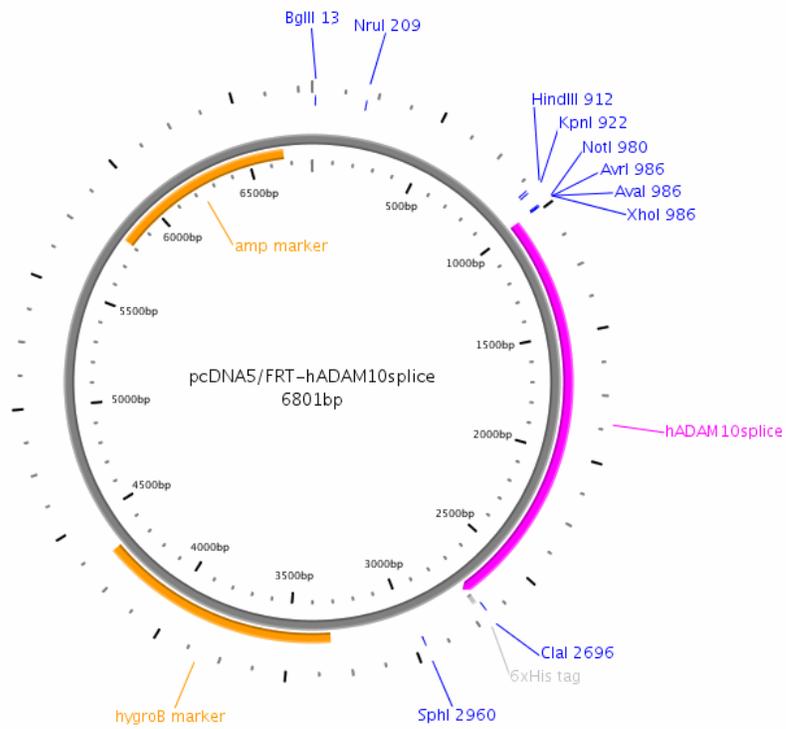
**Abb. 7.15:** pIRES-hADAM10splice-His (siehe 2.4.1.2)



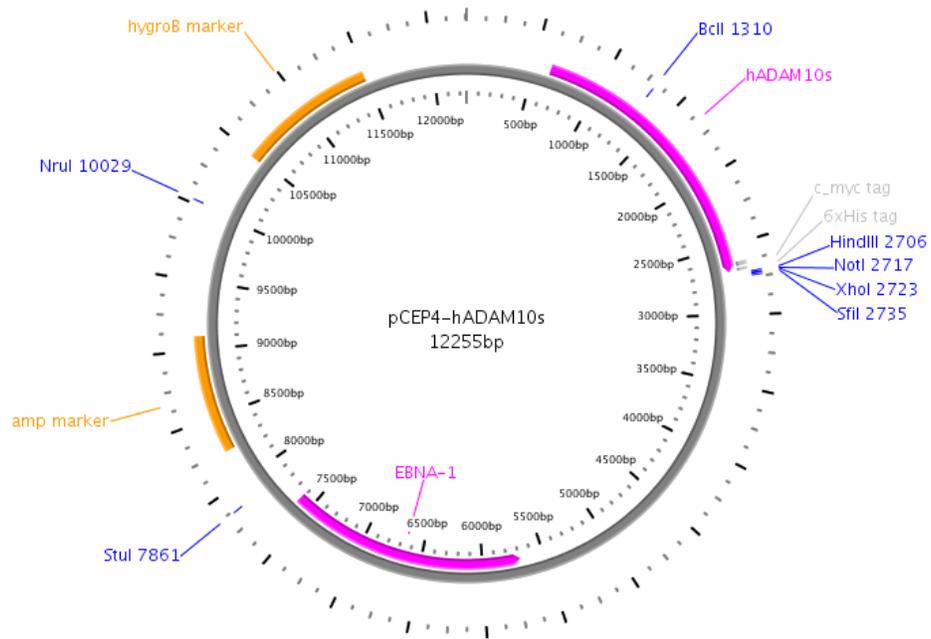
**Abb. 7.16:** pcDNA5/FRT-bADAM10s-His (siehe 2.4.1.3)



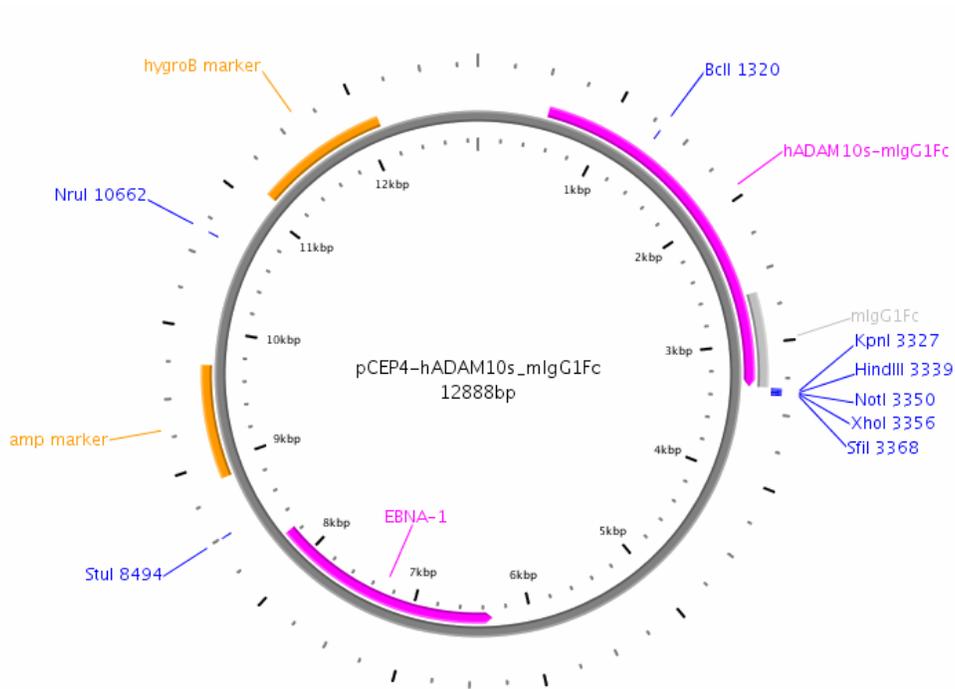
**Abb. 7.17:** pcDNA5/FRT-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.3)



**Abb. 7.18:** pcDNA5/FRT-hADAM10splice-His (siehe 2.4.1.3)



**Abb. 7.19:** pCEP4-hADAM10s-His (siehe 2.4.1.4)



**Abb. 7.20:** pCEP4-hADAM10s-IgG1mFc (siehe 2.4.1.4)



## **EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation nur unter Verwendung der in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel selbständig angefertigt wurde und dass ich noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen habe.

Mainz,

Alexandra Leptich