

A 3D ribbon diagram of the EGF-like domain of ADAM17. The protein backbone is shown as a blue ribbon, with several alpha-helices highlighted in orange and one beta-strand in green. The side chains are represented by yellow sticks. The overall structure is a complex, multi-domain fold.

**Aufklärung der
dreidimensionalen Struktur
der EGF-like Domäne von ADAM17
mittels
mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

vorgelegt von

**Diplom Biochemikerin
Verena Pawlak**

Kiel 2010

Referent: Prof. Dr. Joachim Grötzing
Korreferent: Prof. Dr. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2010
Zum Druck genehmigt: 07.12.2010
gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Zusammenfassung

ADAM17 gehört zu den membrangebundenen zinkabhängigen Metalloproteasen, auch ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) genannt. Die Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie sind an vielfältigen Prozessen im Körper beteiligt. Dazu gehören physiologische Prozesse, wie das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Wundheilung, aber auch pathologische Prozesse, wie die Entstehung von Krebs oder Autoimmunerkrankungen.

Eine Funktion der ADAM-Proteasen ist die Prozessierung membrangebundener Proteine zur löslichen Form. Dieser Prozeß wird auch als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet.

Die Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie zeichnen sich durch eine ähnliche Domänenstruktur aus, die aus einer Pro-, Protease-, Disintegrin-, cysteinreichen-, EGF-like-, Transmembran- und einer cytoplasmatischen Domäne aufgebaut ist. Während bei den meisten Mitgliedern der ADAM-Proteasefamilie alle diese Domänen vorhanden sind, fehlt bei ADAM17 und ADAM10 die cysteinreiche- oder die EGF-like Domäne.

Da bis heute experimentell nicht geklärt wurde welche der Domänen nicht vorhanden ist, ist die Bezeichnung der Domäne, die sich C-terminal zur Disintegrin-Domäne befindet, innerhalb der Literatur nicht einheitlich

Um die Domäne von ADAM17 der Familie EGF-like Domänen zuordnen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit diese Domäne rekombinant exprimiert und gereinigt. Mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie konnte die Tertiärstruktur der Domäne bestimmt werden.

Die Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 enthält die Sekundärstrukturelemente eine α -Helix, ein dreisträngiges und zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Die zwei β -Faltblätter zeigen eine analoge Anordnung zu den β -Faltblättern, die in der Struktur des murinen epidermalen Wachstumsfaktor (mEGF) enthalten sind. Innerhalb der N-terminalen Region wird durch die Verbindung der α -Helix mit dem zweiten Strang des β -Faltblattes das für die Knottin-Faltungstopologie der EGF-like Domänen charakteristische Disulfid-stabilisierte α/β -Motiv ausgebildet. Das dreisträngige antiparallele β -Faltblatt in dem Bereich stellt ein weiteres Kennzeichen für die Faltungstopologie dar. Die C-terminale Regi-

Zusammenfassung

on der EGF-like Domäne enthält ein kleines zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Das α/β -Motiv sowie die Struktur des C-terminalen Bereichs ist vergleichbar in der EGF-like Domäne von ADAM22 zu identifizieren. Aufgrund der Anordnung der Sekundärstrukturelemente konnte die Domäne von ADAM17 den EGF-like Domänen zugeordnet werden.

In der Ausbildung der Disulfidbrücken zeigt die EGF-like Domäne von ADAM17 und ADAM10 Unterschiede zu allen anderen EGF-like Domänen. Die Disulfidbrücken der EGF-like Domänen sind nach dem EGF-Motiv ($CX_7 CX_{4,5} CX_{10-13} CXCX_8 C$) angeordnet. Dabei sind die Cysteinreste 1 und 3, 2 und 4, sowie 5 und 6 miteinander verbunden. Die EGF-like Domäne von ADAM17 wird durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert, die das EGF-Motiv nicht aufweisen. Dadurch bilden die EGF-like Domänen von ADAM17 zusammen mit ADAM10 innerhalb der Superfamilie der EGF/ Laminin-Proteine eine eigene Familie aus. Diese sollte den Namen ADAMs EGF-like Domäne tragen.

Summary

Summary

ADAM17 belongs to the membrane-bound zinc-dependent metalloproteases known as ADAMs (a disintegrin and metalloprotease). The members of the ADAM-protease family are involved in different physiological processes, such as cell proliferation, cell differentiation and wound healing, as well as in pathological processes, e.g. cancer genesis and autoimmune diseases. ADAM-Proteases play a role in the processing of membrane bound proteins into their soluble forms, thus known as *ectodomain shedding*.

The members of this proteasefamily share a similar domain structure, containing a pro-, protease-, disintegrin, cysteine rich-, EGF-like-, transmembrane-, and a cytoplasmatic domain. Most of these proteases contain all of the mentioned domains. ADAM17 and ADAM10 lack the cysteinrich- or the EGF-like domain. So far, it is not experimentally solved which domain is missing, so that in literature this domain is also called cysteine rich- and EGF-like domain.

In the present work, this domain of ADAM17 was recombinantly expressed and purified in order to compare it to other EGF-like domains. The tertiary structure of the domain was analysed using multidimensional NMR-spectroscopy.

The structure of the EGF-like domain of ADAM17 consists of one α -helix, one triple stranded and one double stranded anti-parallel β -sheet. According to the murine epidermal growth factor (mEGF) the β -sheets are analogously arranged. The α -helix is connected via a disulfide bridge to the second strand of the triple stranded anti-parallel β -sheet. This structure motif is called disulfide bridge stabilized α/β -motif, a typical feature of the knottin-protein fold. The triple stranded anti-parallel β -sheet in the N-terminal region of the structure is another characteristic feature of this protein fold. The C-terminal region of the EGF-like domain contains one short double stranded anti-parallel β -sheet. In comparison to the EGF-like domain of ADAM22 the domain of ADAM17 shows a similar α/β -motif and a similar c-terminal region.

According to the arrangement of the secondary structure, the domain of ADAM17 could be assigned to the family of the EGF-like domains.

There are some differences in the arrangements of the disulfide bridges between the EGF-

Summary

like domain of ADAM17 and other EGF-like domains. The disulfide bridges of other EGF-like domains are arranged according to the typical EGF-motif ($CX_7 CX_{4-5} CX_{10-13} CXCX_8 C$). Typically the bridges are between cysteine 1 and 3, 2 and 4 and 5 and 6. The EGF-like domain of ADAM17 is stabilized by five disulfide bridges, which do not show the typical EGF-motif. Therefore the EGF-like domain of ADAM17 and ADAM10 form a new family in the superfamily of the EGF/Laminin proteins. This family should be named ADAMs EGF-like domain.

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	11
1.1 Metalloproteasen	11
1.2 Strukturmerkmale der Mitglieder der ADAM-Familie	12
1.2.1 Synthese, Transport und Aktivierung der ADAMs	13
1.2.2 Die Pro-Domäne	14
1.2.3 Die Protease-Domäne	15
1.3 Strukturelle Anordnung der extrazellulären Domänen der ADAMs	16
1.4 Substrate und Funktion der ADAMs	17
1.4.1 Vermittlung der Zelladhäsion	17
1.4.2 <i>Shedding</i> der Membranproteine	18
1.4.3 Substraterkennung	21
1.4.4 Modell der <i>Shedding-Reaktion</i>	23
1.5 Regulierung der Aktivität der ADAM-Proteasen	24
1.5.1 Aktivierung von ADAM17	24
1.5.2 Inhibierung von ADAM17 und ADAM10	26
1.6 EGF-like Domänen	27
1.7 NMR-Spektroskopie	30
1.7.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	30
1.7.2 Die eindimensionale NMR-Spektroskopie	34
1.7.3 Die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	35
2. Zielsetzung der Arbeit	38
3. Materialien und Methoden	39
3.1 Material	39
3.1.1 Chemikalien	39
3.1.2 Organismen	39
3.1.3 Vektoren, Oligonukleotide	39
3.1.4 Enzyme	39
3.1.5 Antiseren	40
3.1.6 Medien	40
3.1.6.1 LB-Medium	40
3.1.6.2 Minimal-Medium	40
3.2 Methoden	41
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA	42
3.2.1.2.1 Präparativer Restriktionsverdau	42
3.2.1.2.2 Analytischer Restriktionsverdau	43
3.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.2.1.4 Transformation der Vektoren in <i>E. coli</i>	44
3.2.1.5 Erstellung von Dauerkulturen	44
3.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>DH5α</i> -Zellen	44
3.2.1.7 Agarosegelelektrophorese	45

Inhaltsverzeichnis

3.2.1.8	Reinigung von DNA-Fragmenten	45
3.2.1.9	Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration	45
3.2.2	Proteinanalytische Methoden	45
3.2.2.1	Expression der EGF-like Domäne in <i>E. coli</i>	45
3.2.2.1.1	Expression in LB-Medium	45
3.2.2.1.2	Expression in Minimalmedium	46
3.2.2.2	Zellaufschluss zur Gewinnung von Zelllysaten	46
3.2.2.3	Reinigung des rekombinanten Proteins	47
3.2.2.3.1	Ni-Affinitätschromatographie	47
3.2.2.3.2	Größenausschlusschromatographie	47
3.2.2.3.3	Gradienten-RP-HPLC	47
3.2.2.4	Dialyse zur Renaturierung der rekombinanten EGF-like Domäne	48
3.2.2.5	Ellman-Test	49
3.2.2.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	49
3.2.2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
3.2.2.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.2.2.9	Coomassiefärbung	50
3.2.2.10	Silberfärbung	51
3.2.2.11	Westernblotting und Immunodetektion	51
3.2.2.12	„Colony“-Blot	52
3.2.3	NMR-Spektroskopie	53
3.2.3.1	Durchgeführte NMR-Experimente	53
3.2.3.2	Probenvorbereitung	54
3.2.3.3	Zuordnung der sequenzspezifischen Signale	54
3.2.3.4	Zuordnung der intermolekularen Signale	54
3.2.3.5	Strukturberechnung	55
4.	Ergebnisse	56
4.1	Klonierung der EGF-like Domäne	56
4.2	Expression des rekombinanten Proteins	58
4.3	Reinigung der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne	59
4.3.1	Ni-Affinitätschromatographie	59
4.3.2	Größenausschlusschromatographie	60
4.3.2.1	Reinigung der EGF-like Domäne mittels Größenausschlusschromatographie	60
4.3.2.2	2D- ¹ H ¹⁵ N-HSQC-Experiment der monomeren Fraktion der Größenausschlusschromatographie	62
4.3.3	Gradienten-RP-HPLC	63
4.3.3.1	Reinigung der EGF-like Domäne mittels Gradienten-RP-HPLC	63
4.3.3.2	2D- ¹ H ¹⁵ N-HSQC-Experimente der Fraktionen der Gradienten-RP-HPLC	64
4.3.3.3	Renaturierung der Isomeren der Fraktionen nach Gradienten-RP-HPLC	65
4.4	Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie	67
4.4.1	Sequenzspezifische Zuordnung der Signale	67
4.4.1.1	Analyse des 2D- ¹ H ¹⁵ N-HSQC-Experimentes	67
4.4.1.2	Bestimmung des sequenziellen Assignments	69
4.4.1.3	Zuordnung der Aminosäurereste	72

Inhaltsverzeichnis

4.4.2 Auswertung der NOESY-Experimente	75
4.4.2.1 Auswertung des 3D- ¹ H ¹⁵ N-NOESY-Experimentes	75
4.4.2.2 Auswertung des 3D- ¹ H ¹³ C-NOESY-Experimentes	79
4.4.3 Bestimmung der Disulfidbrücken und der Diederwinkel des Proteinrückgrats	81
4.4.4 Strukturberechnung	82
4.4.5 Das Ramachandran-Diagramm der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne	83
4.5 Struktur der EGF-like Domäne	84
4.6 Vergleich der Struktur der EGF-like Domänen von ADAM17 und ADAM10	87
4.7 Vergleich der Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 mit dem murinen Epidermalen Wachstumsfaktor (mEGF)	89
4.8 Vergleich der EGF-like Domäne von ADAM17 mit der cysteinreichen- und EGF-like Domäne von ADAM22	91
5. Diskussion	93
5.1 Einordnung der EGF-like Domäne von ADAM17	93
5.2 Substraterkennung	95
5.3 Anordnung der extrazellulären Domänen von ADAM17	97
5.4 Beeinflussung der Aktivität von ADAM17	98
5.4.1 Ablösung der Pro-Domäne von der Protease-Domäne	98
5.4.2 Regulierung der Aktivität durch Proteindisulfidisomerasen	99
5.4.3 Beeinflussung der TIMP-3 Inhibierung von ADAM17 durch die EGF-like Domäne	100
6. Ausblick	101
7. Literaturverzeichnis	103
8. Abkürzungsverzeichnis	107
9. Anhang	111
9.1 Vektorkarten	111
9.2 Lebenslauf	112
9.3 Danksagung	113
9.4 Erklärung	114

1. Einleitung

1.1 Metalloproteasen

Proteolytische Enzyme, auch Proteasen genannt, sind eine Gruppe von Proteinen mit verschiedenen Strukturen und Funktionsweisen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Hydrolyse des Peptidrückgrats anderer Proteine katalysieren. Die Proteasen lassen sich aufgrund ihres katalytischen Zentrums in fünf Klassen einteilen: die Aspartat-, Metallo-, Cystein-, Serin- und Threoninproteasen.

Die Metalloproteasen spielen im Organismus eine große Rolle; ein Drittel der gefundenen Proteasen sind Mitglieder dieser Familie. So sind 186 der 561 gefundenen Proteasen im menschlichen Körper dieser Familie zugehörig (Puente und Lopez-Otin 2004).

Der Name stammt von dem im aktiven Zentrum befindlichen Metallion. Die meisten Enzyme enthalten in ihrem aktiven Zentrum als Cofaktor ein Zinkion (Gomis-Ruth 2003). Aufgrund des Zinkions wird die Familie auch als Zink-Proteasen bezeichnet. Innerhalb der Familie kommt es durch die Unterschiede in ihren Zinkbindungs-Konsensussequenzen zu einer Unterteilung in die Familien der Glut zincine, Metzincine, Inuzincine, Carboxypeptidasen und DD Carboxypeptidasen (Hooper 1994).

Diese Familien werden ihrerseits weiter unterteilt. So spaltet sich die Familie der Metzincine in die Gruppen der Serralysine, Astakine, Matrixine und Adamalysine auf.

Innerhalb dieser Einheiten befinden sich verschiedene Typen von Proteasen. So wird die Untereinheit der Adamalysine durch die ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*), ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif*) und die Schlangengift-Metalloproteasen (SVMPs = *snake venom metalloprotease*) gebildet (Seals und Courtneidge 2003).

Die Gruppe der ADAMs ist in vielen Organismen, von Pilzen bis zu Vertebraten, vertreten. In den Säugetiergenomen sind bis heute 40 Gene für die Mitglieder der ADAM-Familie identifiziert worden, wobei beim Menschen nur 22 Gene vorhanden sind. Nicht alle Mitglieder der ADAM-Familie besitzen in ihrem aktiven Zentrum das typische Zinkbindungsmotiv und sind somit aktive Proteasen. Von den 22 im Menschen gefundenen ADAMs besitzen nur 12 dieses Motiv (Reiss und Saftig 2009). Zu diesen katalytisch aktiven ADAMs gehören ADAM17 und ADAM10.

1. Einleitung

1.2 Strukturmerkmale der Mitglieder der ADAM-Familie

Die Mitglieder der ADAM-Familie gehören zu den Typ I Transmembran Glykoproteasen. Sie zeichnen sich durch eine ähnliche Domänenstruktur aus. Die verschiedenen ADAMs sind aus den folgenden Domänen aufgebaut: Pro-, Protease-, Disintegrin-, cysteinreiche-, EGF-like-, Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (Seals und Courtneidge 2003).

Während bei den meisten Mitgliedern der ADAM-Proteasefamilie alle diese Domänen vorhanden sind, fehlt bei ADAM17 und ADAM10 die cysteinreiche- oder die EGF-like Domäne.

Da bis heute experimentell nicht geklärt wurde welche der Domänen nicht vorhanden ist, ist die Bezeichnung der Domäne, die sich C-terminal zur Disintegrin-Domäne befindet, innerhalb der Literatur nicht einheitlich. So behauptet Takeda durch Untersuchungen der Sequenz, dass bei ADAM10 und ADAM17 keine EGF-like Domäne zu finden ist (Takeda 2009). Die Autoren, die die Struktur der Disintegrin und EGF-like Domäne von ADAM10 aufgeklärt haben, benennen diese als cysteinreiche Domäne (Janes, Saha et al. 2005). Andere Autoren bezeichnen die Region, die sich C-terminal zur Protease-Domäne befindet, als cysteinreichen Bereich, der sich in die Disintegrin- und EGF-like Domäne aufteilt (Reddy, Slack et al. 2000).

Da diese verschiedenen Bezeichnungen innerhalb der Literatur zu Missverständnissen führen, wird in dieser Arbeit die Domäne von ADAM10 und ADAM17 als EGF-like Domäne bezeichnet (Abbildung 1.1).

1. Einleitung

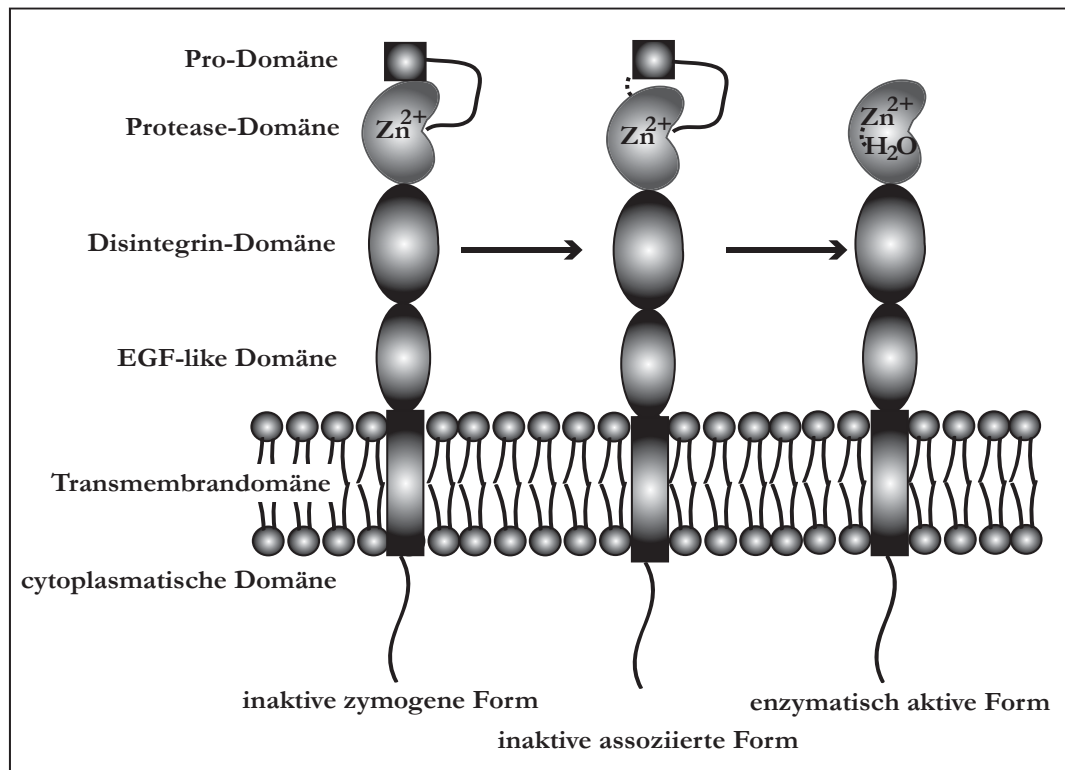


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM17 und ADAM10

ADAMs werden in das Endoplasmatische Reticulum in einer zymogenen inaktiven Form synthetisiert. Dort besteht das Enzym aus der Pro-, einer Metalloprotease-, einer Disintegrin-, einer EGF-like-, einer Transmembran- und einer cytoplasmatischen Domäne. Während des Transportes zum Golgi Apparat wird die Pro-Domäne abgespalten. Sie ist weiterhin mit der Metalloprotease-Domäne assoziiert und wird erst im Anschluss unter Mitwirkung der EGF-like Domäne abgelöst. Dadurch wird das Zymogen in eine aktive Form überführt.

1.2.1 Synthese, Transport und Aktivierung der ADAMs

Die ADAMs werden in das Endoplasmatische Reticulum in einer inaktiven Form (Zymogen) synthetisiert (Reiss und Saftig 2009) (Abbildung 1.1).

Für die Inaktivierung der Protease ist die Pro-Domäne verantwortlich (Moss, Bomar et al. 2007). Die Protease-Domäne wird durch die Bindung in einer offenen, inaktiven Konformation gehalten (Leonard, Lin et al. 2005).

Nach der Synthese wird das Enzym über den sekretorischen Transportweg zum trans-Golgi-Apparat und zur Zelloberfläche transportiert (Seals und Courtneidge 2003). Während des Transportes zum trans-Golgi-Apparat wird das Zymogen in eine inaktive, assoziierte Form überführt. Dazu wird die Pro-Domäne durch Furin-Prodomänen-Konvertasen an ihrer konservierten Erkennungssequenz (RVKR) proteolytisch gespalten (Tellier, Canault et al. 2006). Die Pro-Domäne bleibt während des Transportes und der Sekretion mit der

1. Einleitung

katalytischen Domäne assoziiert (Smith, Gaultier et al. 2002; Wewer, Morgelin et al. 2006). Diese Assoziation findet durch nicht-kovalente Bindungen und nicht durch Bildung von Disulfidbrücken statt (Wewer, Morgelin et al. 2006). Durch die Assoziation verbleibt die Protease-Domäne in einer inaktiven offenen Konformation (Leonard, Lin et al. 2005). Erst durch die spätere Ablösung der Pro-Domäne wird die Protease-Domäne in eine enzymatisch aktive Form überführt (Abbildung 1.1).

1.2.2 Die Pro-Domäne

Für die Inaktivierung der Protease-Domäne durch die Pro-Domäne sind verschiedene Mechanismen diskutiert worden. Eine Möglichkeit ist die Inaktivierung der Protease-Domäne durch einen konservierten Bereich innerhalb der Pro-Domäne, dem sog. *Cystein-switch* (PKVCGY). Der Cysteinrest komplexiert dabei das Zinkion im aktiven Zentrum der Protease-Domäne und verhindert somit die enzymatische Reaktion der Protease (Milla, Leesnitzer et al. 1999; Wewer, Morgelin et al. 2006).

Da für ADAM17 gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung ohne den *Cysteinswitch* statt findet (Gonzales, Solomon et al. 2004; Milla, Gonzales et al. 2006), erfolgt die Inaktivierung durch die Pro-Domäne hier über einen anderen Mechanismus.

Eine Erklärung für die Inaktivierung des Enzyms bietet die experimentell identifizierte Funktion der Pro-Domäne als intramolekularer Chaperon. Als Chaperon unterstützt sie, wie andere intramolekulare Chaperone, die Faltung, den Transport und die Sekretion der Protease (Liu, Shim et al. 2009). Dabei werden von Chaperonen während der Faltung Intermediate stabilisiert, die ohne diese Reaktion zu Aggregation und Degradation des Proteins führen würden (Alberts, Johnson et al. 2004).

Die Pro-Domäne ist nach der proteolytischen Spaltung über nicht-kovalente Bindungen an die katalytische Domäne assoziiert (Smith, Gaultier et al. 2002; Wewer, Morgelin et al. 2006). Dadurch wird die katalytische Domäne in einem Faltungsintermediat gehalten; auch als offene Konformation bezeichnet (Leonard, Lin et al. 2005). Diese Konformation ist enzymatisch inaktiv.

Für eine vollständige Faltung und somit Aktivierung der Protease-Domäne muss die

1. Einleitung

Pro-Domäne von der katalytischen Domäne abgelöst werden. Für die Ablösung der Pro-Domäne ist bei ADAM17 der cysteinreiche Bereich, bestehend aus der Disintegrin- und EGF-like Domäne, identifiziert worden. Dabei wird vermutet, dass diese Domänen über eine Kontaktfläche in der Nähe des aktiven Zentrums mit der Metalloprotease-Domäne interagieren. Durch diese Interaktion wird die Bindungsaffinität der Pro-Domäne zur katalytischen Domäne vermindert und es kommt zu einer Ablösung der Pro-Domäne (Milla, Leesnitzer et al. 1999; Gonzales, Solomon et al. 2004).

Eine weitere Arbeit zeigt, dass die EGF-like Domäne von ADAM17 eine Rolle bei der Ablösung der Pro-Domäne spielt (Li and Fan 2004). Dabei wurde eine Punktmutation des C600 zu Tyrosin (C600Y) innerhalb der EGF-like Domäne identifiziert. Diese Mutation verminderte die Expression und den Transport zur Zelloberfläche im Vergleich zu Wildtyp-ADAM17 nicht. In den Zellen, die ADAM17 (C600Y) exprimierten, konnte jedoch durch Western-Blot-Analysen kein matures ADAM17 detektiert werden, sondern nur die assoziierte Form. Dadurch ist anzunehmen, dass die Mutation (C600Y) die Aktivierung von ADAM17 beeinflusst. Somit ist die EGF-like Domäne an der Ablösung der Pro-Domäne von der Protease-Domäne beteiligt.

1.2.3 Die Protease-Domäne

Für die Proteaseaktivität der enzymatisch aktiven Mitglieder der ADAM-Familie ist die Metalloprotease-Domäne verantwortlich. Im aktiven Zentrum der Domäne befindet sich ein Zinkbindungs-Konsensusmotiv (HEXXHXXGXXHD).

Über die Histidine der Konsensussequenz wird ein Zinkion in der Domäne komplexiert. Nicht nur die Histidine komplexieren das Zinkion im aktiven Zentrum, sondern auch die Seitenketten der Aminosäuren, die sich in dem sog. *Met-turn* befinden. Die Aminosäure, die auf den konservierten Methioninrest folgt, ist in der Regel ein Tyrosin oder ein Prolin. Die Seitenketten des Methionins und der darauf folgenden Aminosäure, fungieren während der proteolytischen Reaktion als hydrophober Anker des Substrates. Das für die Reaktion notwendige Wassermolekül wird durch den Glutamaterest der Konsensussequenz im aktiven Zentrum gehalten. Während der enzymatischen Reaktion dient die Seitenkette des

1. Einleitung

Glutamats als katalytische Base (Bode, Gomis-Ruth et al. 1993; Gomis-Ruth 2003; Takeda 2009).

Proteolytisch inaktive Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie zeichnen sich durch das Fehlen eines oder beider für die Aktivität wichtiger Motive aus. So besitzt zum Beispiel die katalytisch inaktive Protease ADAM22 kein Zinkbindungsmotiv in ihrer Metalloprotease-Domäne. Deshalb wird die Domäne bei ADAM22 als „*Metalloprotease-like*“ bezeichnet (Liu, Shim et al. 2009).

1.3 Strukturelle Anordnung der extrazellulären Domänen der ADAMs

Bis heute ist wenig über die strukturelle Anordnung der extrazellulären Domänen der Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie bekannt. Aufgeklärt wurden die Kristallstrukturen der katalytischen Domäne von ADAM17 (Maskos, Fernandez-Catalan et al. 1998) und ADAM33 (Orth, Reichert et al. 2004), die Struktur der Disintegrin- und EGF-like-Domäne von ADAM10 (Janes, Saha et al. 2005) und die Struktur der extrazellulären Domänen von ADAM22 (Liu, Shim et al. 2009).

Einen ersten Hinweis auf die Anordnung der extrazellulären Domänen der ADAMs gab eine elektronenmikroskopische Untersuchung der löslichen Form von ADAM12-S (Abbildung 1.2 A). Die Domänen von ADAM12-S ordnen sich im extrazellulären Bereich in einer vierblättrigen Kleeblattstruktur an. Dabei bilden die Pro-, Metalloprotease-, die Disintegrin- und cysteinreiche Domäne die Kleeblattstruktur aus (Wewer, Morgelin et al. 2006). Bei einem weiteren Mitglied der ADAM-Familie konnte für die extrazellulären Domänen diese Anordnung nachgewiesen werden. Die Kristallstruktur von ADAM22 zeigt an der Zelloberfläche die Struktur eines vierblättrigen Kleeblatts (Abbildung 1.2 B). Dabei wird diese Anordnung aus der *Metalloprotease-like*-, der Disintegrin-, der cysteinreichen- und der EGF-like Domäne dieser Protease gebildet (Liu, Shim et al. 2009).

1. Einleitung

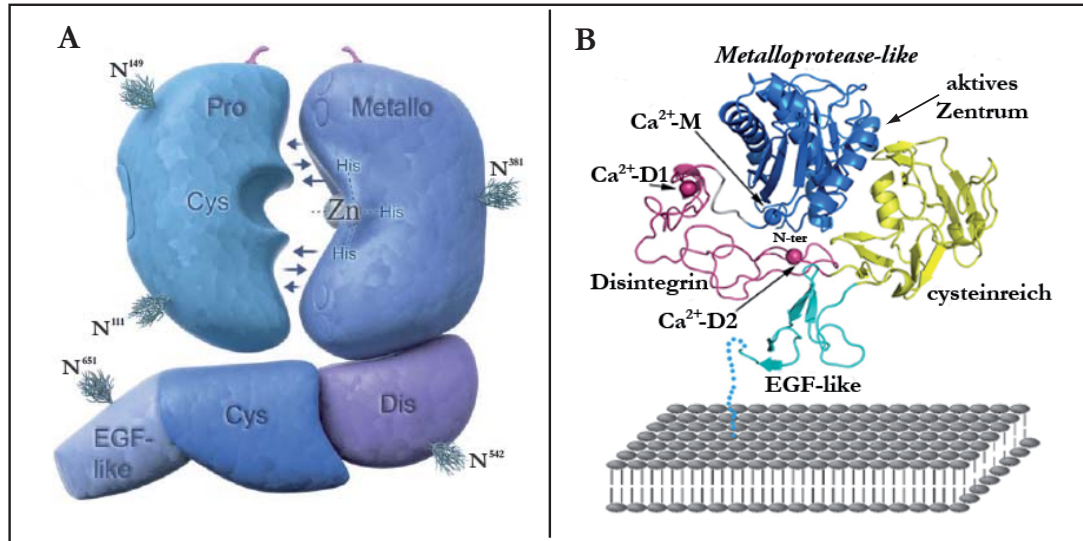


Abbildung 1.2: Modelle der Anordnung der extrazellulären Domänen von ADAM12-S und ADAM22

A: Modell der Anordnung der extrazellulären Domänen der löslichen Form von ADAM12-S nach elektronenmikroskopischer Untersuchung (modifiziert nach Wewer, Morgelin et al. 2006). Die extrazellulären Domänen bilden eine sog. kompakte Kleeblattstruktur aus. Diese Struktur wird aus der Pro- (Pro), der Protease- (Metallo), der Disintegrin- (Dis) und der cysteinreichen Domäne (Cys) gebildet. Dargestellt sind die fünf putativen N-Glykosylierungsstellen (N¹¹¹, N¹⁴⁹, N³⁸¹, N⁵⁴² und N⁶⁵¹) in ADAM12-S.

B: Kristallstruktur der Anordnung der extrazellulären Domänen von ADAM22 (modifiziert nach Liu, Shim et al. 2009). Die Kleeblattstruktur wird von den *Metalloprotease-like*- (blau), der Disintegrin- (rot), der cysteinreichen- (gelb) und der EGF-like Domäne (hell blau) gebildet. Dargestellt sind die Calcium-Ionen-Bindungsstellen (Ca²⁺-M, Ca²⁺-D1 und Ca²⁺-D2) und das aktive Zentrum von ADAM22.

1.4 Substrate und Funktion der ADAMs

Die Mitglieder der ADAM-Familie der Proteasen sind an vielfältigen Prozessen des Organismus beteiligt. Zu diesen Prozessen gehören die Vermittlung der Zelladhäsion und die Prozessierung von Transmembranproteinen.

1.4.1 Vermittlung der Zelladhäsion

Die Vermittlung der Zelladhäsion wird vorrangig von nicht katalytisch aktiven ADAMs durchgeführt. Dabei fungieren diese Mitglieder der ADAM-Familie als Rezeptor für extrazelluläre Matrixproteine (ECM = *extracellular matrix proteins*) wie den Integrinen oder Syndecanen (White 2003).

Eine der ersten ADAMs wurde als Mediator der Befruchtung zwischen Eizelle und Spermium identifiziert (Almeida, Huovila et al. 1995). ADAM2, auch Fertilin β genannt, befindet sich an der Zelloberfläche des Spermiums und vermittelt den Kontakt zu $\alpha_6\beta_1$ -Integrinen auf der Zelloberfläche der Eizelle (Iba, Albrechtsen et al. 2000).

1. Einleitung

Aufgrund einer homologen Struktur der Disintegrin-Domäne im Vergleich zu den Schlangengiftproteasen wurde vermutet, dass diese Domäne die Bindung an Integrine vermittelt. Als Bindungssequenz wurde bei den Schlangengiftproteasen eine konservierte RGD-Sequenz identifiziert. Diese Sequenz ist in den meisten Mitgliedern der ADAM-Proteasefamilie nicht enthalten. Experimentell konnte in der Disintegrin-Domäne ein sog. Disintegrin-Loop für die Interaktion mit Integrinen identifiziert werden (White 2003; Takeda 2009).

Außer der Disintegrin-Domäne kann auch die cysteinreiche Domäne der ADAMs eine Bindung zu ECM-Proteinen vermitteln. So konnte gezeigt werden, dass die cysteinreiche Domäne von ADAM12 an Syndecane der Zelloberfläche von Mesenchymalzellen bindet und das integrinabhängige Wachstum dieser Zellen induziert (Iba, Albrechtsen et al. 2000).

Die Interaktion mit ECM-Proteinen wurde nicht nur für katalytisch inaktive Mitglieder der ADAM-Familie, sondern auch für enzymatisch aktive Proteasen, gezeigt. So wurde für die katalytisch aktive Protease ADAM17 *in vitro* und *in vivo* eine Interaktion zu $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen über den cysteinreichen Bereich, der aus der Disintegrin- und EGF-like Domäne besteht, gezeigt (Bax, Messent et al. 2004).

1.4.2 *Shedding* der Membranproteine

Eine Funktion der proteolytisch aktiven ADAMs ist die Freisetzung der extrazellulären Domänen vieler Zelloberflächenproteine. Dieser Prozess wird auch als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet (Reiss und Saftig 2009). Substrate sind z.B. Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Reiss, Ludwig et al. 2006). Das „*ectodomain shedding*“ der Transmembranproteine wird sowohl bei physiologischen Prozessen des Körpers, wie der Zellwanderung und der Entwicklung des Herzens, als auch bei pathogenen Prozessen, z.B. der Entstehung von Krebs und Rheumatoider Arthritis, beobachtet (Reiss, Ludwig et al. 2006; Reiss und Saftig 2009).

ADAM17 wurde 1997 (Black, Rauch et al. 1997; Moss, Jin et al. 1997) als die Protease beschrieben, die die pro-Form des Zytokins TNF- α (*tumor necrosis factor α*) durch

1. Einleitung

proteolytische Spaltung in die lösliche mature Form überführen kann. Für ADAM17 sind mit der Zeit außer TNF- α weitere Substrate identifiziert worden. Dazu gehört z.B. der EGF-Rezeptor-Ligand TGF- α (*transforming growth factor α*) (Abbildung 1.3) und der IL-6-Rezeptor (Interleukin-6-Rezeptor) (Abbildung 1.4).

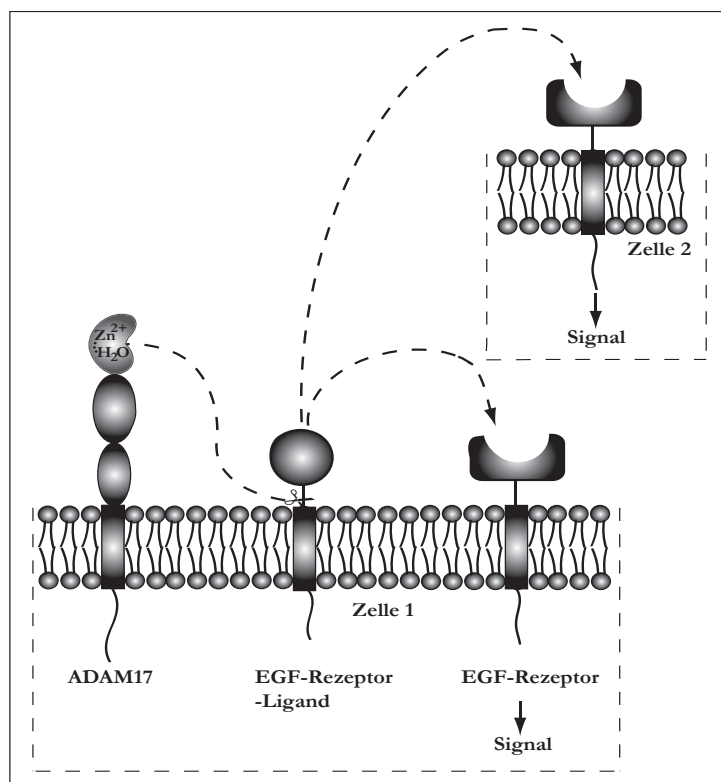


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des *Sheddings* eines EGF-Rezeptor-Liganden durch ADAM17

Die pro-Form des Liganden des EGF-Rezeptors wird durch die Protease ADAM17 von der Zellmembran proteolytisch geschnitten. Durch das *Shedding* wird die Precursorform in die lösliche mature Form überführt. Diese bindet an den EGF-Rezeptor und aktiviert dadurch in der Zelle den EGF-Rezeptor-Signalweg.

Der EGF-Rezeptor Ligand wird als membrangebundene pro-Form synthetisiert (Abbildung 1.3). Das *Shedding* durch ADAM17 überführt den membrangebundenen Liganden in seine lösliche Form. Diese bindet an den Rezeptor, der sich an der eigenen Zellmembran (*autocrine*) oder an einer benachbarten Zelle (*paracrine*) befindet. Die Bindung des löslichen TGF- α an den Rezeptor aktiviert in der Zelle den EGF-Rezeptor-Signalweg (Edwards, Handsley et al. 2008).

Durch das *Shedding* des IL-6-Rezeptors wird das *Trans-signalling* des Zytokins IL-6 (Interleukin-6) ermöglicht (Abbildung 1.4). Die Lokalisation des IL-6-Rezeptors an der Zelloberfläche unterscheidet sich von einem weiteren für das *Signalling* wichtigen Molekül dem

1. Einleitung

gp130 (Glycoprotein 130). Der IL-6-Rezeptor ist spezifisch an der Zelloberfläche der Makrophagen, Hepatozyten, Neutrophilen und anderen Leukozyten lokalisiert, während das gp130 auf fast allen Zelloberflächen lokalisiert ist.

Bei dem klassischen Signalweg bindet an den membrangebundene IL-6-Rezeptor das lösliche Zytokin Interleukin-6 (IL-6), dies führt zu einer Rekrutierung zweier gp130-Moleküle. Dadurch werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert.

Shedding des IL-6-Rezeptors führt zur Bildung seiner löslichen Form (sIL-6-R). Der sIL-6-R bildet mit IL-6 einen Komplex aus. Dieser bindet auch an zwei gp130-Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche der Zellen befinden, die keinen IL-6-Rezeptor exprimieren. Somit erhöht sich das Wirkspektrum von IL-6. Dieser Vorgang wird als *Trans-signalling* bezeichnet (Rose-John, Waetzig et al. 2007).

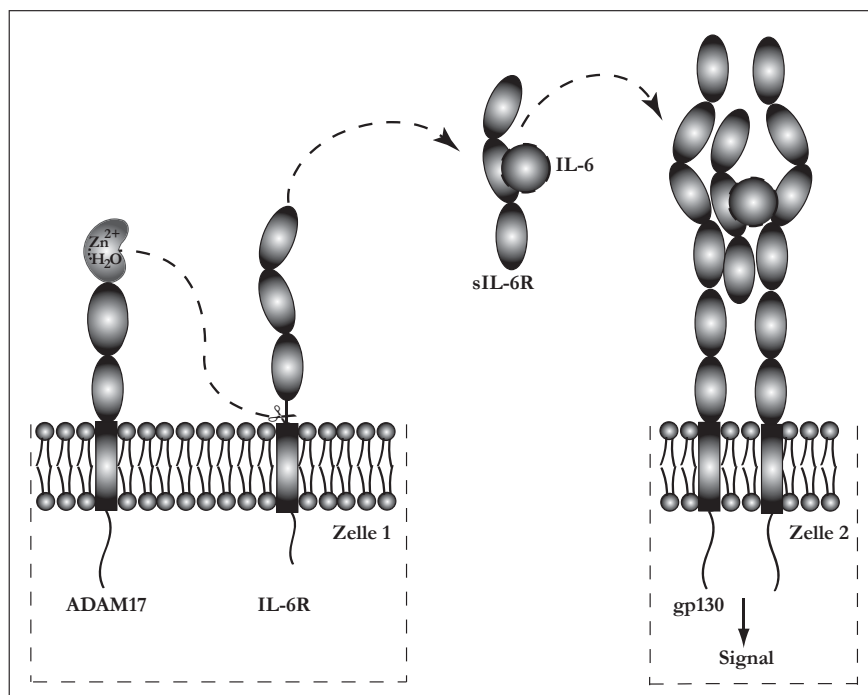


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des *Trans-signallings* des Zytokins Interleukin-6 (IL-6)
ADAM17 generiert durch *Shedding* des membrangebundenen Interleukin-6-Rezeptors (IL-6-R) eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors (sIL-6-R). Dieser bildet mit dem Zytokin Interleukin-6 (IL-6) einen Komplex aus. Der Komplex bindet an zwei Moleküle Glykoprotein 130 (gp130), die sich auf der Zelloberfläche von Zellen befinden, die keinen IL-6-Rezeptor exprimieren. Dadurch kommt es zu einer Stimulierung der Zellen.

1. Einleitung

1.4.3 Substraterkennung

Manche Substrate werden spezifisch von ADAM17 prozessiert. Andere Substrate werden zusätzlich von der zu ihr homologen Protease ADAM10 erkannt. In Tabelle 1.1 sind einige Beispiele für Substrate der beiden Enzyme zu sehen (Reiss und Saftig 2009).

Tabelle 1.1: Substrate von ADAM17 und ADAM10

Die Tabelle wurde erstellt unter Verwendung der Veröffentlichung von Reiss und Saftig 2009.

Abkürzungen: APP = *amyloid precursor protein*, CD = *cluster of differentiation*, CXCL = *Chemokine (C-X-C motif) ligand*, EGF = *epidermal growth factor*, FASL = *FAS Ligand*, ICAM-1 = *intercellular adhesion molecule 1*, IL = *Interleukin*, MUC1 = *Mucin1*, MICA = *MHC class I polypeptide-related sequence A*, TGF- α = *transforming growth factor α* , TNF- α = *tumor necrosis factor α* , VCAM1 = *vascular cell adhesion molecule-1*

Protease	Substrat
ADAM17	TNF- α , TNF-Rezeptor-I und II, Amphiregulin, Epiregulin, CD40, HB-EGF, EGF-Rezeptor, ICAM-1, VCAM1, IL1-Rezeptor-II, IL15-Rezeptor, L-selectin, MUC1, TGF- α
ADAM10	CD23, Collagen IV, E-cadherin, N-cadherin, EGF, Ephrin A2 und Ephrin A5, FasL
ADAM17 und ADAM10	Notch-1, APP, CD30, CD44, Collagen XVII, CXCL16, CX3CL1, IL6-Rezeptor, Klotho, MICA

Wie die Substraterkennung und Spezifität der ADAMs erfolgt, ist nicht genau geklärt. Bei den Mitgliedern der ADAM-Proteasenfamilie ist keine typische Sequenz für das *Shedding* identifiziert worden. So scheint die Substratspezifität nicht nur von der Metalloprotease-Domäne abzuhängen, sondern auch von der C-terminal befindlichen Disintegrin-, cysteinreichen- und/ oder der EGF-like Domäne (Reddy, Slack et al. 2000; Smith, Gaultier et al. 2002; White 2003).

Ein Unterschied in der Spezifität für die Substrate, innerhalb der Protease-Domäne, der Disintegrin- und EGF-like Domäne, konnte durch Chimärenbildung zwischen den homologen Proteasen ADAM17 und ADAM10 gezeigt werden (Reddy, Slack et al. 2000).

Bei einer Chimäre, bestehend aus der Protease-Domäne von ADAM10 und der Disintegrin-, EGF-like- und Transmembran Domäne von ADAM17 (Abbildung 1.5 A II), konnte ein *Shedding* von ADAM17-Substraten nicht detektiert werden. Eine Chimäre, die die

1. Einleitung

katalytische Domäne von ADAM17 und die Disintegrin-, die EGF-like und die Transmembran Domäne von ADAM10 enthielt, (Abbildung 1.5 A III) zeigte im Vergleich zu ADAM17 ohne cytoplasmatische Domäne (Abbildung 1.5 I) eine vergleichbare *Sheddingaktivität* für den p75TNF-Rezeptor und eine höhere Aktivität für das TNF- α . Allerdings konnte bei Verwendung dieses Fusionskonstruktes nur eine geringe Aktivität für den IL-1-R-II (Interleukin-1-Rezeptor-II) detektiert werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für eine Chimäre bestehend aus der Protease- und Disintegrin-Domäne von ADAM17 und der EGF-like- und Transmembran Domäne von ADAM10 (Abbildung 1.5 A IV) beschrieben. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die katalytische Domäne von ADAM17 für eine Erkennung und die *Sheddingaktivität* der membrangebundenen Substrate des p75TNF-Rezeptors und des TNF- α ausreicht. Für eine Aktivität gegen den membrangebundenen IL-1R-II ist die EGF-like Domäne essentiell. Ohne die EGF-like Domäne von ADAM17 findet ein *Shedding* dieses Substrates nicht statt.

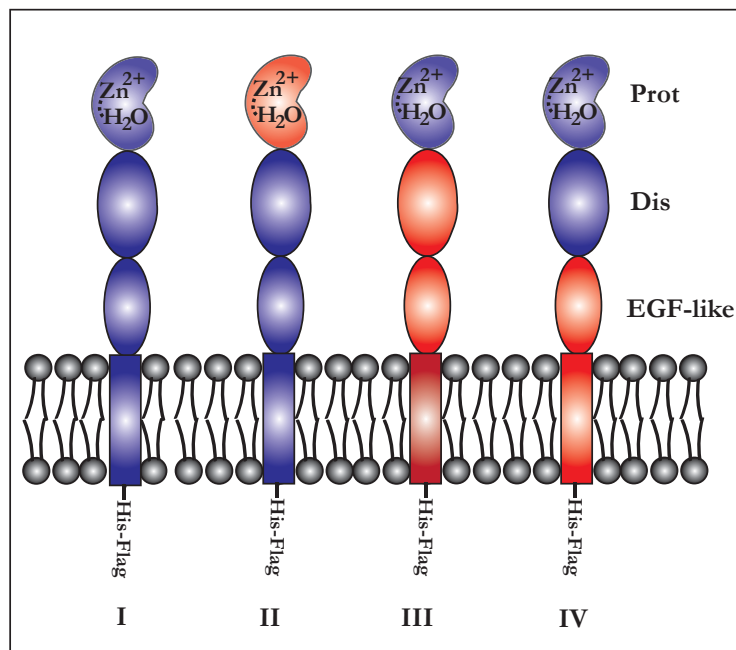


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Chimären von ADAM17

Schematische Darstellung der verwendeten Chimären von ADAM17 in der Veröffentlichung von Reddy, Slack et al. 2000. Blau sind die Domänen von ADAM17 und rot die von ADAM10 dargestellt. Unter Verwendung der Chimäre von ADAM17 ohne die cytoplasmatische Domäne (I) konnte kein Unterschied in der *Sheddingaktivität* im Vergleich zu ADAM17 mit dieser Domäne detektiert werden. Die Chimäre, die die Protease-Domäne von ADAM10 enthielt (II), zeigte keine proteolytische Aktivität zu ADAM17 Substraten. Bei einer Verwendung der Chimären III und IV konnte im Vergleich zu Variante I ein vergleichbares *Shedding* des p75-TNF-Rezeptors, eine höhere Aktivität für TNF- α und eine geringere für den IL-1R-II detektiert werden. (Prot = Protease-Domäne, Dis = Disintegrin-Domäne, EGF-like = EGF-like Domäne)

1. Einleitung

Für die Substratbindung, innerhalb der cysteinreichen Domäne der ADAMs, sind zwei Bereiche favorisiert worden, das variable Segment und die Hypervariable Region (HVR). Die HVR der verschiedenen ADAMs ist sehr variabel in ihrer Sequenz und Länge (11-55 Aminosäuren). Diese Regionen sind auch in der EGF-like Domäne von ADAM17 und ADAM10 enthalten (Takeda 2009).

Bei der EGF-like Domäne von ADAM10 liegt die Hypervariable Region innerhalb einer negativ geladenen Tasche, die von hydrophoben Aminosäureresten eingerahmt wird. Durch Immunpräzipitationen und Punktmutationen wurde deutlich, dass diese Tasche und somit die EGF-like Domäne für die Erkennung und Bindung des Substrates, dem Ephrin-A5/EphA3-Komplexes, verantwortlich ist (Janes, Saha et al. 2005).

1.4.4 Modell der *Shedding*-Reaktion

Die in Abschnitt 1.4.3 dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass die C-terminal zur Disintegrin-Domäne befindliche Domäne, die cysteinreiche Domäne oder bei ADAM17 die EGF-like Domäne, an dem Schritt der Substraterkennung der Mitglieder der ADAM-Familie beteiligt ist. Wie die Proteasen das *Shedding* durchführen, ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit diskutieren Liu et al mit ihrem „*closed-to-open*“-Modell (Abbildung 1.6) (Liu, Shim et al. 2009).

Das Modell basiert auf der Anordnung der extrazellulären Domänen von ADAM22 in einer geschlossenen Kleeblattstruktur (Abbildung 1.2) und auf der Domänenstruktur eines Mitglieds der enzymatisch aktiven ADAMs, die eine Protease-, Disintegrin-, cysteinreiche- und EGF-like Domäne enthält.

Dabei bilden die Disintegrin-, cysteinreiche- und EGF-like Domäne eine zusammenhängende Einheit, das sog. DCE Modul. Auf diesem Modul ist die Metalloprotease-Domäne angelagert, bezeichnet als Domäne M. Das Substrat bindet an der Substraterkennungsregion der cysteinreichen Domäne der Hypervariablen Region. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, in dessen Zuge sich die cysteinreiche Domäne von dem katalytischen Zentrum entfernt. Das Substrat kann im Anschluss in das katalytische Zentrum gelangen und somit proteolytisch gespalten werden.

1. Einleitung

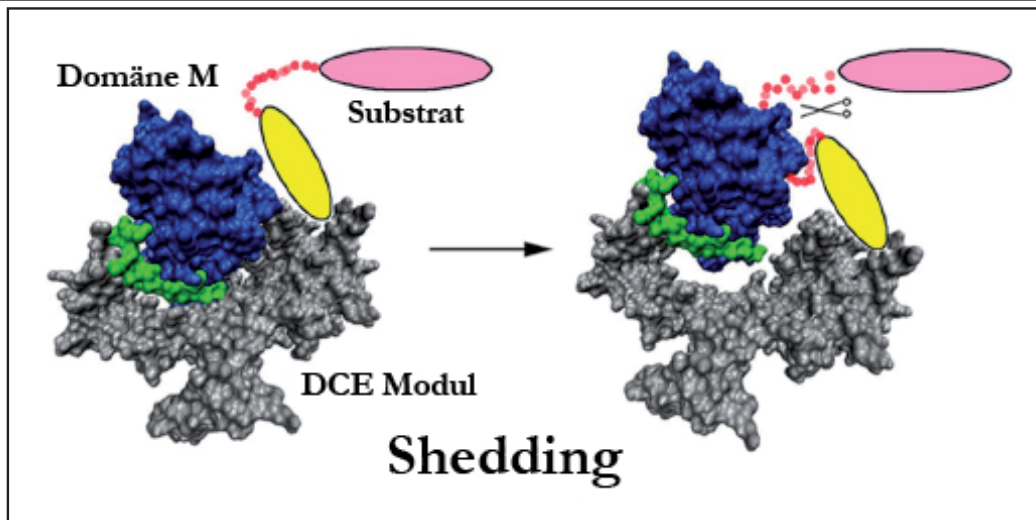


Abbildung 1.6: „Closed-to-open“ Modell des *Sheddings* der Mitglieder der ADAM-Familie (modifiziert nach Liu, Shim et al. 2009)

Das „closed-to-open“ Modell bietet eine Möglichkeit für die Durchführung des *Sheddings* membrangebundener Proteine. Der erste Schritt ist die Bindung des Substrates an die Substraterkennungstelle der cysteinreichen Domäne, der Hypervariablen Region. Diese Bindung löst eine Konformationsänderung aus, die zur Entfernung der cysteinreichen Domäne von der Metalloprotease Domäne (Domäne M) führt. Dadurch wird das aktive Zentrum für das Substrat erreichbar und es wird proteolytisch gespalten. (Das DCE Modul besteht aus der Disintegrin-, der cysteinreichen- und der EGF-like Domäne. Die Orientierung der Domänen entspricht der Orientierung in Abbildung 1.2.)

1.5 Regulierung der Aktivität der ADAM-Proteasen

1.5.1 Aktivierung von ADAM17

Für ADAM17 konnte eine geringe konstitutive Aktivität gezeigt werden. Die Aktivität der Protease lässt sich durch den Phorbol ester PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) induzieren (Horiuchi, Le Gall et al. 2007). Die Erhöhung des *Sheddings* durch PMA wurde auf eine Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) (Murphy 2009) und einer Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne durch die p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) zurückgeführt. Die Phosphorylierung führt zu einer Verstärkung des Transportes des muren ADAM17 zur Membran und somit zu einer Erhöhung der *Sheddungaktivität* (Killock und Ivetic 2010).

Eine Aktivierung durch PMA konnte auch ohne die cytoplasmatische Domäne von ADAM17 detektiert werden. So ist ein weiterer Mechanismus für die PMA-Aktivierung wahrscheinlich. Dabei wird vermutet, dass die Disintegrin- oder die EGF-like Domäne von ADAM17 an der Aktivierung beteiligt ist (Murphy 2009).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität und die Aktivierung von ADAM17 mit der Isomerisierung der Disulfidbrücken durch Thiolisomerasen oder Proteindisulfidisomerasen (PDI) zusammenhängt (Willems, Tape et al. 2010).

1. Einleitung

In der Disintegrin- und EGF-like Domäne von ADAM17 ist jeweils ein Thioredoxinmotiv (CxxC) identifiziert worden. Über die Thioredoxinmotive sind Proteindisulfidisomerasen in der Lage die Disulfidbrücken eines Proteins zu modifizieren. Die Cysteinreste des Proteins befinden sich in einem Gleichgewicht mit den freien Thiolgruppen der PDI. Innerhalb dieses Gleichgewichts liegen die Cysteinreste zum Teil in einer geschlossenen Form, in den Disulfidbrücken, und zum geringen Teil in einem offenen Zustand, den freien Thiolen, vor. Durch dieses Gleichgewicht wird eine Konformationsänderung innerhalb des cysteinreichen Bereiches, bestehend aus der Disintegrin- und EGF-like Domäne von ADAM17, vermutet. Die katalytische Domäne scheint von den Isomerasen nicht verändert zu werden, da die PDI auf die Aktivität der katalytischen Domäne von ADAM17 keinen Effekt hatte.

Die Konformationsänderung läuft vergleichbar zu dem „*closed-to-open*“ Model des *Sheddings* (Liu, Shim et al. 2009) in Abbildung 1.6 ab. Die PDI sorgt durch Isomerisierung der Disulfidbrücken innerhalb des cysteinreichen Bereichs dafür, dass die Protease von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht. Die cysteinreiche Domäne ist dabei in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Dadurch entsteht eine sterische Hinderung für die Reaktion von ADAM17 mit dem Substrat, die die Aktivität der Protease verringert.

Es konnte gezeigt werden, dass der inhibierende Effekt der PDI auf ADAM17 durch die Zugabe von PMA vermindert werden kann (Willems, Tape et al. 2010). Bei einer Aktivierung von ADAM17 durch PMA werden reaktive, oxidierend wirkende Substanzen aus den Mitochondrien ausgeschüttet. An der Zelloberfläche sorgen diese Substanzen dafür, dass die äußere reduzierende Umgebung zu einer oxidierenden wird. Die freien Thiolgruppen der PDI werden dadurch oxidiert und die Aktivität der Isomerase nimmt ab. So wird das Gleichgewicht der Konformation der Protease ADAM17 von der geschlossenen zu einer offenen Konformation verschoben. Die *Sheddingaktivität* von ADAM17 nimmt zu.

Somit kann die Aktivierung von ADAM17 durch PMA nicht nur durch die Proteinkinase C sondern auch über aktive oxidierend wirkende Substanzen, die zu einer Deaktivierung der Proteinisomerase führt, erfolgen.

1. Einleitung

1.5.2 Inhibierung von ADAM17 und ADAM10

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der ADAM-Proteasen zu beeinflussen, ist die Zugabe von Inhibitoren.

Die synthetisierten Hydroxamatinhibitoren können die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 vermindern (Amour, Knight et al. 2000).

Als natürliche Inhibitoren wurden an der Zelloberfläche spezifische Inhibitoren identifiziert. Dabei handelt es sich um die TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteases*). Von den vier bis heute gefundenen TIMPs können TIMP-1 ADAM10 und TIMP-3 ADAM10 und ADAM17 inhibieren (Amour, Knight et al. 2000; Murphy 2009).

Aufgrund der unterschiedlichen Inhibierung der beiden ADAMs durch die TIMPs ist eine Identifizierung der für das *Shedding* verantwortliche Protease möglich. Wird das *Shedding* eines Substrates nur durch TIMP-3 und nicht durch TIMP-1 inhibiert, ist das ein Hinweis dafür, dass ADAM17 die für das *Shedding* verantwortliche Protease ist.

Für die Reaktion von TIMP-3 mit ADAM17 wurden Bindungsuntersuchungen durchgeführt. TIMP-3 ist ein Protein, das aus 187 Aminosäuren besteht. Es lässt sich in eine N-terminale und eine C-terminale Domäne unterteilen. Für die Inhibierung von ADAM17 ist experimentell die N-terminale Domäne von TIMP-3 identifiziert worden. Die C-terminale Domäne von TIMP-3 enthält an der Oberfläche eine positiv geladene Region, die eine Bindung an ECM-Proteine (*extracellular matrix proteins*) vermittelt (Lee, Verma et al. 2002; Lee, Dodds et al. 2003).

Inhibierungsversuche von ADAM17-Varianten durch TIMP-3 ergaben, dass der cysteinreiche Bereich, bestehend aus der Disintegrin- und EGF-like Domäne, die inhibierende Wirkung vermindern kann (Lee, Verma et al. 2002).

Dabei wird vermutet, dass durch diesen Bereich eine sterische Hinderung hervorgerufen wird. Diese vermindert die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen der katalytischen Domäne von ADAM17 und der N-terminalen Domäne von TIMP-3. Dadurch wird die Bindung von TIMP-3 an die Protease-Domäne vermindert und die Inhibierung der *Sheddingaktivität* von ADAM17 ist geringer. Es wird vermutet, dass die C-terminale, positiv geladene Region, von TIMP-3 mit dem cysteinreichen Bereich von ADAM17 interagiert (Lee, Dodds et al. 2003).

1. Einleitung

1.6 EGF-like Domänen

Das namensgebende Molekül der EGF-like Domänen ist der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF = *epidermal growth factor*). Die ersten Strukturen des murinen EGF (mEGF) und des humanen EGF (hEGF) wurden im Jahre 1986 aufgeklärt (Carver, Cooke et al. 1986; Montelione, Wüthrich et al. 1986).

Die Struktur des mEGF läßt sich in zwei Bereiche unterteilen. Die N-terminale Region (Aminosäure 1 bis 32) besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt. (Abbildung 1.7). Im C-terminalen Bereich des mEGF (Aminosäure 33 – 53) befindet sich ein kleines zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Alewood, Nielsen et al. 2005).

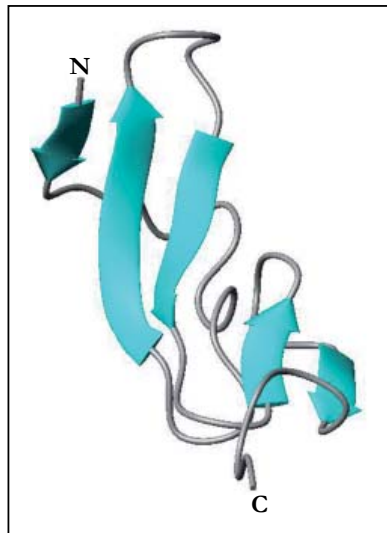


Abbildung 1.7: Tertiärstruktur des murinen Wachstumsfaktors (mEGF)

Bandmodell des murinen Wachstumsfaktors (mEGF) (Carver, Cooke et al. 1986; Montelione, Wüthrich et al. 1986). Die Sekundärstruktur des mEGF besteht aus einem dreisträngigen und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (blau). N und C markieren den N- und C-Terminus des Proteins.

Die EGF-like Domäne ist eine evolutionär konservierte Domäne bestehend aus 30 bis 60 Aminosäuren. Sie wurde im Jahre 1972 erstmalig charakterisiert und sequenziert (Savage, Inagami et al. 1972).

Nach der Klassifizierung durch die Proteindatenbank SCOP (*structural classification of proteins*) (Tung und Yang 2007; Andreeva, Howorth et al. 2008) gehören die EGF-like Domänen zu der Klasse der kleinen Proteine, zu der Knottin-Faltungstopologie und zu der Superfamilie der EGF/ Laminin-Proteine.

Diese beinhaltet ein Disulfidbrücken-stabilisiertes α/β -Motiv, das durch eine α -Helix und

1. Einleitung

ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt gebildet wird. Die α -Helix ist durch eine Disulfidbrücke mit dem β -Faltblatt verbunden und somit stabilisiert (Bulet, Hetru et al. 1999). Als weiteres Sekundärstrukturelement enthält die Knottin-Faltungstopologie ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Hwang, Lee et al. 2010). Die Mitglieder der Superfamilie der EGF/ Laminin-Proteine besitzen ein EGF-Motiv ($CX_7 CX_{4,5} CX_{10-13} CXCX_8 C$). Die Cysteinreste des Motivs bilden Disulfidbrücken zwischen Rest 1 und 3, 2 und 4 sowie 5 und 6 aus (Harris, Chung et al. 2003).

Das Strukturmotiv der EGF-like Domäne wurde in einigen Zelloberflächenproteinen und extrazellulären Proteinen identifiziert (Alewood, Nielsen et al. 2005). Zu diesen Proteinen gehören unter anderem der LDL-Rezeptor (*Low Density Lipoprotein*) (Saha, Boyd et al. 2001), der humane Factor IX (Baron, Norman et al. 1992), ADAM22 (Liu, Shim et al. 2009) und ADAM17 (Janes, Saha et al. 2005). Die Strukturen sind in Abbildung 1.8 zu sehen.

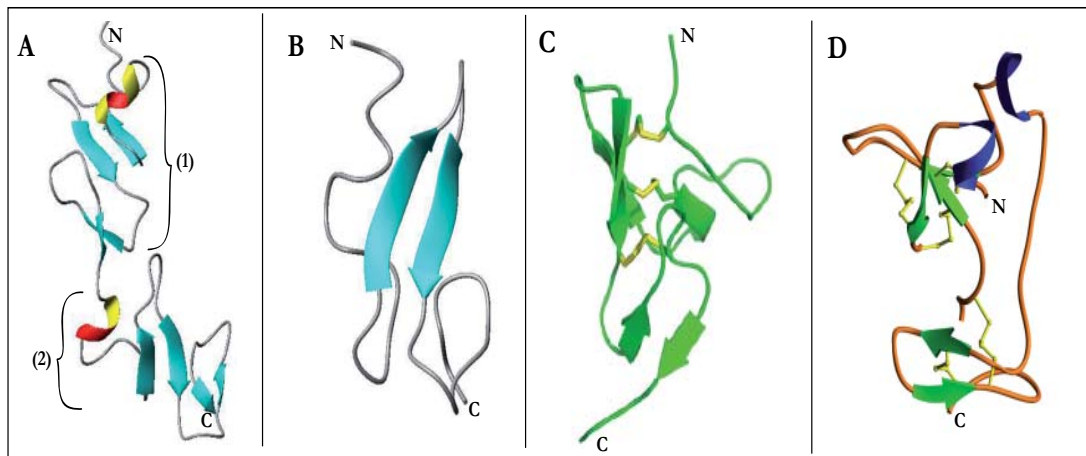


Abbildung 1.8: Tertiärstrukturen verschiedener EGF-like Domänen

A: Bandmodell der EGF-like Domänen des LDL-Rezeptors (Saha, Boyd et al. 2001). Zu sehen sind zwei aufeinander folgende EGF-like Domänen des LDL-Rezeptors. Die einzelnen Domänen sind durch die Zahlen (1) und (2) markiert. Die Sekundärstruktur einer EGF-like Domäne besteht aus zwei zweisträngigen antiparallelen β -Faltblättern (blau) und einer α -Helix (rot/ gelb). N und C markieren den N- und C-Terminus des Proteins.

B: Bandmodell der EGF-like Domäne des humanen Factors IX (Baron, Norman et al. 1992). Die Sekundärstruktur wird durch ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt gebildet.

C: Bandmodell der EGF-like Domäne von ADAM22 (modifiziert nach Liu, Shim et al. 2009). Die Sekundärstruktur besteht aus einer α -Helix und zwei zweisträngigen antiparallelen β -Faltblättern. Die drei Disulfidbrücken sind gelb dargestellt.

D: Bandmodell der EGF-like Domäne von ADAM10 (Janes, Saha et al. 2005). Die Sekundärstruktur wird durch zwei α -Helices (blau), einem dreisträngigen und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (grün) gebildet. In gelb sind die fünf Disulfidbrücken dargestellt.

1. Einleitung

Die EGF-like Domänen unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente. Die meisten EGF-like Domänen beinhalten, vergleichbar zu mEGF, antiparallele β -Faltblätter (Abbildung 1.8 B). Einige besitzen zusätzlich zu den β -Faltblättern noch α -Helices (Abbildung 1.8 A, C und D).

Die EGF-like Domäne von ADAM22 lässt sich, vergleichbar zu mEGF, in eine N-terminale und C-terminale Region unterteilen (Abbildung 1.8 C). Die Sekundärstrukturelemente im N-terminalen Bereich bestehen aus einer α -Helix und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (Liu, Shim et al. 2009). Die α -Helix und das β -Faltblatt bilden das α/β -Motiv aus und die drei Disulfidbrücken sind nach dem charakteristischen EGF-Motiv angeordnet. Die C-terminale Region enthält ein kleines zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Liu, Shim et al. 2009). Die zwei β -Faltblätter zeigen im Vergleich zu dem namensgebenden mEGF eine analoge Anordnung (Abbildung 1.7).

Die EGF-like Domäne von ADAM10 zeigt eine neue α/β -Faltung (Janes, Saha et al. 2005), die aus fünf kurzen β -Faltsträngen und zwei α -Helices gebildet wird (Abbildung 1.8 D). Diese Domäne lässt sich in eine N-terminale und eine C-terminale Region unterteilen. In dem N-terminalen Bereich bilden die erste α -Helix und zwei Stränge des dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattes das charakteristische α/β -Motiv aus. Das zweite Strukturelement der Knottin-Faltungstopologie ist durch das dreisträngige antiparallele β -Faltblatt gegeben. Im C-terminalen Bereich befindet sich ein kleines zweisträngiges β -Faltblatt. Bei einem Vergleich mit mEGF und der EGF-like Domäne von ADAM22 wird deutlich, dass die Anordnung der β -Faltblätter analog ist. Die N-terminale α -Helix zeigt in der Anordnung eine Analogie zu der EGF-like Domäne von ADAM22. Die EGF-like Domäne von ADAM10 wird durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert. Diese zeigen das charakteristische EGF-Motiv, das durch drei Disulfidbrücken gebildet wird, nicht.

1. Einleitung

1.7 NMR-Spektroskopie

Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR = *nuclear magnetic resonance*) ist neben der Röntgenstrukturanalyse eine Methode zur Analyse der Tertiärstruktur von Proteinen und Nukleinsäuren (Lottspeich und Engels 2006). Im Jahre 1946 wurde die NMR-Spektroskopie von Bloch (Bloch 1946; Bloch, Hansen et al. 1946) und Purcell (Purcell, Torrey et al. 1946) entdeckt. Durch Einführung der gepulsten Fourier-Transformationsspektroskopie im Jahre 1966 wurde die Empfindlichkeit der NMR-Messungen gesteigert (Ernst und Anderson 1966). Dadurch wurde die Grundlage für die Entwicklung der multidimensionalen NMR-Spektroskopie gelegt. Diese wurde 1970 von Jeener und Ernst eingeführt (Aue, Bartholdi et al. 1976). Die erste Proteinstruktur mittels NMR-Spektroskopie wurde 1985 von Wüthrich vorgestellt (Williamson, Havel et al. 1985). Seit diesem Zeitpunkt wurde diese Methode zur Ermittlung der Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren in Lösung etabliert. Heute ist es möglich, die Struktur von Proteinen mit einer Größe von 30 bis 40 kD und die Struktur von Proteinkomplexen bis zu 900 kD aufzuklären (Fiaux, Bertelsen et al. 2002). Des Weiteren werden kinetische Prozesse, wie die Beobachtung von Enzymreaktionen oder Proteinfaltung, durch die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie in Echtzeit detektiert (Baldwin und Kay 2009).

1.7.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Jeder Atomkern besitzt ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$, das durch den quantenmechanischen Spin (\vec{I}) des Atomkerns und seiner Eigenrotation (\vec{J}) entsteht. Dabei setzt sich der Gesamtspin (\vec{I}) des Atomkerns aus den Spins der Protonen und Neutronen (jeweils Spin $\vec{m} = \pm 1/2$) zusammen. Diese Spins sind in Atomkernen entgegengesetzt angeordnet ($\vec{m} = \pm 1/2$). Die Spins der Protonen und Neutronen addieren sich zu dem Gesamtspin des Kerns (Lottspeich und Engels 2006).

Für die hochauflösenden NMR-Messungen werden Kerne mit einem Gesamtspin von $\vec{I} = 1/2$ verwendet (^1H , ^{15}N und ^{13}C). Diese natürlichen Isotope kommen in unterschiedlicher Häufigkeit vor (Tabelle 1.2). Um diese Kerne für eine NMR-Messung nutzbar zu machen, wurden Techniken zur Anreicherung der ^{15}N - und ^{13}C -Isotope in Proteinen entwickelt.

1. Einleitung

Dadurch konnten die 1D-Experimente in weitere Dimensionen (2D, 3D,...) erweitert und Überlagerungen der Signale vermindert werden. Daraus resultierte eine Vereinfachung der Spektren und es konnten Parameter z.B. für die Messung von Proteininteraktionen bestimmt werden (Baldwin und Kay 2009).

Das magnetische Moment eines Atomkerns und sein Eigendrehimpuls stehen in einem proportionalen Verhältnis zueinander. Das magnetische Moment wird durch die folgende Formel dargestellt:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{J}$$

Die Proportionalitätskonstante γ wird als gyromagnetisches Verhältnis bezeichnet. Das gyromagnetische Verhältnis ist für jedes Isotop charakteristisch und gibt dessen Empfindlichkeit an. Ein hohes gyromagnetisches Verhältnis steht für eine hohe Empfindlichkeit. Die gyromagnetischen Verhältnisse verschiedener Atomkerne sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Kernspin, natürliche Häufigkeit und gyromagnetisches Verhältnis einiger für die NMR-Spektroskopie wichtiger Kerne

Kernisotop	Spin I	natürliche Häufigkeit [%]	gyromagnetisches Verhältnis γ [$10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
^1H	$1/2$	99,98	26,7519
^2H	1	0,016	4,1066
^{12}C	0	98,9	-----
^{13}C	$1/2$	1,108	6,7283
^{14}N	1	99,63	1,9338
^{15}N	$1/2$	0,37	-2,712

Wird an die Atomkerne mit einem Spin (\vec{m}) von $1/2$ ein äußeres Magnetfeld \vec{B}_0 aus der z-Richtung angelegt, so führt dieses zu einer Aufspaltung der Energieniveaus (Abbildung 1.9 A). Die Energiedifferenz der Energieniveaus wird dabei durch die folgende Formel gegeben:

$$\Delta E = \gamma \hbar \vec{B}_0$$

($\hbar = h / 2\pi$; reduziertes Plancksches Wirkungsquantum)

1. Einleitung

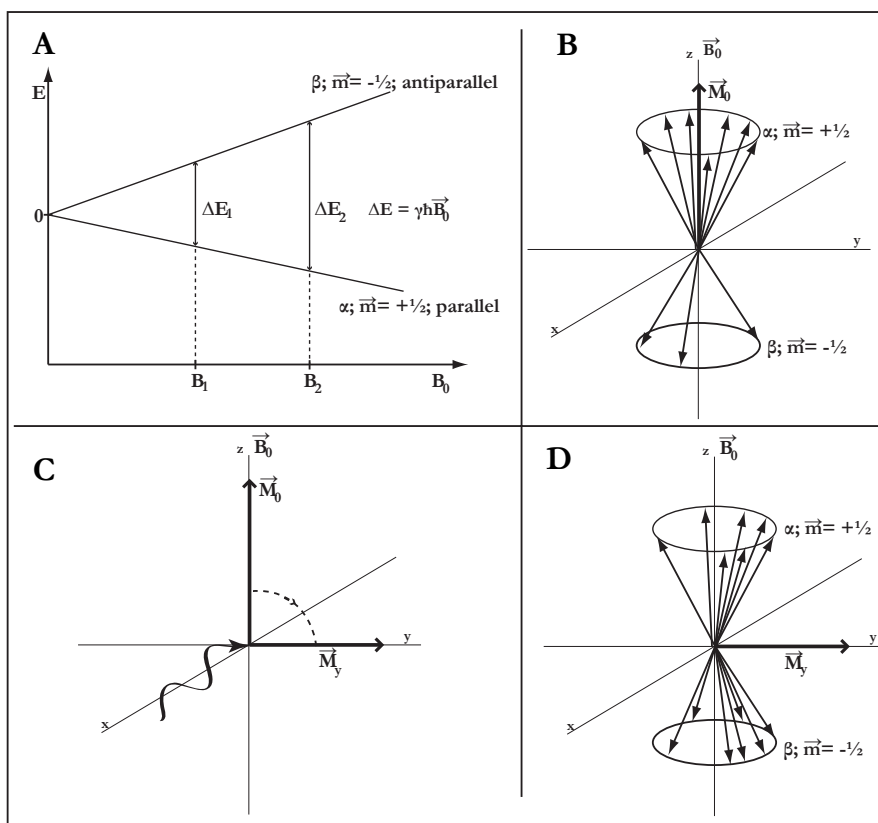


Abbildung 1.9: Grundlagen der NMR-Spektroskopie

- A: Energieunterschied ΔE der Energieniveaus in Abhängigkeit vom Magnetfeld \vec{B}_0 .
- B: Darstellung der makroskopischen z-Magnetisierung im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Spins der einzelnen Kerne rotieren mit ihrer Larmor-Frequenz um die z-Achse. Dabei ist das Energieniveau der α -Position bevorzugt gegenüber der β -Position. Ihre magnetischen Momente addieren sich zu dem makroskopischen z-Magnetisierungsvektor \vec{M}_0 .
- C: Wirkung eines 90° -Pulses auf die z-Magnetisierung. Aus x-Richtung wird ein Puls mittels einer Radiowelle auf das System eingestrahlt. Dadurch kommt es zu einer Neuverteilung der Energieniveaus der Spins der Kerne. Die z-Magnetisierung wird dadurch zu einer y-Magnetisierung.
- D: Veranschaulichung der y-Magnetisierung. Die Energieniveaus sind durch die Spins der Kerne gleich besetzt. Die magnetischen Momente der Spins addieren sich zu der y-Magnetisierung.

Innerhalb dieser Energieniveaus richten sich die Spins der Kerne parallel (α -Position; $\vec{m} = +1/2$) oder antiparallel (β -Position $\vec{m} = -1/2$) zum äußeren Magnetfeld aus. Dabei werden die beiden Energieniveaus der Kerne nach der Boltzmannverteilung besetzt.

$$N_\alpha / N_\beta = e^{-(\Delta E/kT)} = e^{-(\gamma \hbar B_0/kT)}$$

Die α -Position ist gegenüber der β -Position energetisch bevorzugt. Das magnetische Moment der Kerne rotiert um die Richtung des äußeren Magnetfeldes \vec{B}_0 (z-Richtung) (Abbildung 1.9 B). Die Frequenz dieser Rotation wird als Larmor-Frequenz bezeichnet.

$$\omega_0 = \gamma \vec{B}_0$$

1. Einleitung

Die magnetischen Momente der einzelnen Kerne addieren sich zu einer makroskopischen Gesamtmagnetisierung \vec{M}_0 .

$$\vec{M}_0 = N \cdot (\gamma^2 \hbar^2 \vec{B}_0 / 4kT)$$

Die Gesamtmagnetisierung hängt von der Feldstärke des äußeren Magnetfeldes, der Anzahl der Spins N und der Temperatur der Probe ab. Diese Magnetisierung richtet sich nach dem äußeren Magnetfeld in z -Richtung aus und wird auch als z -Magnetisierung oder longitudinale Magnetisierung bezeichnet.

Wird senkrecht zur z -Magnetisierung (aus x -Richtung) ein kurzer Impuls in Form einer Radiowelle mit der Larmor-Frequenz der Kerne eingestrahlt, so kommt es zu einer Neuverteilung der Energieniveaus der Kerne. Die Energieniveaus der Kerne sind nun gleich besetzt ($\vec{M}_z = 0$) und die z -Magnetisierung wird zu einer y -Magnetisierung (\vec{M}_y) (Abbildung 1.9 C und D). Da die Gleichbesetzung der Energieniveaus nicht dem Gleichgewichtszustand entspricht, kehrt die Magnetisierung nach kurzer Zeit in den Gleichgewichtszustand zurück. Dieser Vorgang wird von Bloch als Relaxationsprozess bezeichnet, der nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung abläuft. Der Relaxationsprozess wird in die longitudinale (T_1) und die transversale Relaxationszeit (T_2) der Magnetisierung unterteilt. Die longitudinale Relaxationszeit (T_1) kommt durch eine Wechselwirkung der Spins mit ihrer Umgebung zustande. Deshalb wird diese auch als Spin-Gitter-Relaxationszeit bezeichnet. Die transversale Relaxationszeit (T_2) kommt durch eine Wechselwirkung der Spins untereinander zustande. Insofern wird diese auch als Spin-Spin-Relaxationszeit bezeichnet. Die Relaxationszeiten sind abhängig von der molekularen Beweglichkeit des Moleküls in Lösung. Die Rotationskorrelationszeit des Moleküls τ_c charakterisiert diese Beweglichkeit.

1. Einleitung

1.7.2 Die eindimensionale NMR-Spektroskopie

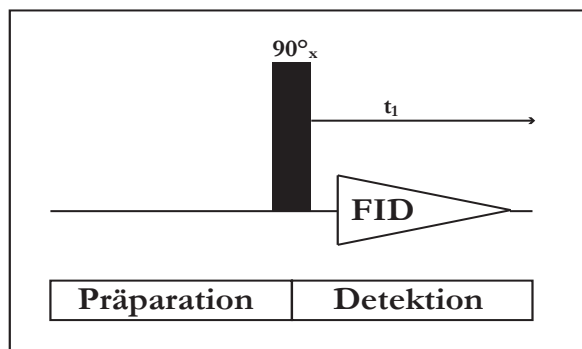


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der 1D-NMR-Experimente

Die 1D-NMR-Experimente bestehen aus einer Phase der Präparation und der Detektion. Der 90° -Puls wird durch den schwarzen Balken dargestellt.

Die einfachste Form der NMR-Spektroskopie stellt die eindimensionale NMR-Spektroskopie da. Das Experiment besteht aus zwei Phasen: der Präparation und der Detektion (Abbildung 1.10).

Bei der Präparation wird die z-Magnetisierung der Kerne durch einen kurzen Impuls durch eine Radiowelle aus x-Richtung in eine y-Magnetisierung überführt. Die y-Magnetisierung der Kerne bewirkt, dass die Spins mit ihrer Larmor-Frequenz um die y-Achse rotieren und dabei an einer Empfängerspule eine Spannung induzieren. Diese wird bei der NMR-Spektroskopie in der zweiten Phase der Detektion gemessen. Die Spannung nimmt durch den T2 Relaxationsprozess ab, wodurch die aufgenommenen Daten auch als FID (*free induction decay* = freier Induktionszerfall) bezeichnet werden.

Die verschiedenen Larmor-Frequenzen der Kerne entstehen durch ihre unterschiedliche chemische Umgebung. Die Elektronen erzeugen ein schwaches magnetisches Feld. Dadurch schirmen sie die Kerne von dem umgebenden Magnetfeld ab.

Die Elektronendichte in der Umgebung der Kerne wird durch Bindungspartner beeinflusst. Befindet sich der Kern in einer Bindung mit einem Partner, der eine höhere Elektronegativität (EN) besitzt, so zieht dieser Elektronendichte von dem anderen Kern. Dadurch wird die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Bereich des ersten Kerns verringert, d.h. der Kern wird entschirmt. Dieser Effekt wird als negativer induktiver Effekt bezeichnet (-I) und ist z.B. bei Carbonylgruppen zu beobachten. Das gebundene Sauerstoffatom besitzt eine höhere EN im Vergleich zum Kohlenstoffatom. Dadurch übt das Sauerstoffatom

1. Einleitung

auf das Kohlenstoffatom einen negativen induktiven Effekt aus und zieht die Elektronen des Kohlenstoffkerns an.

Als positiver induktiver Effekt (+I) wird ein Prozess bezeichnet, bei dem Kerne Elektronen zu ihren Bindungspartnern schieben und somit die Elektronendichte im Bereich der Kerne erhöhen. Als Beispiel ist die Methylgruppe zu sehen, die auf das benachbarte Kohlenstoffatom einen positiven induktiven Effekt ausübt.

Die Messsignale werden in Bezug auf einen Standard ausgewertet. Das Ergebnis wird als chemische Verschiebung δ bezeichnet und in ppm angegeben. Die chemische Verschiebung ist wie folgt definiert: $\delta = ((\omega_{\text{Signal}} - \omega_{\text{Referenz}}) / \omega_{\text{Referenz}}) \cdot 10^6 \text{ ppm}$

Als Referenzen dienen für die ^1H und ^{13}C -Spektroskopie das Tetramethylsilan (TMS) und die wasserlöslichen Analoga Natriumtrimethylsilylpropionat (TSP) und 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure (DSS).

1.7.3 Die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Da sich bei größeren Molekülen die Signale überlagern, ist die Auswertung eines 1D-NMR-Spektrums unmöglich. Diese Überlagerung wird durch die Einführung weiterer spektraler Dimensionen aufgehoben.

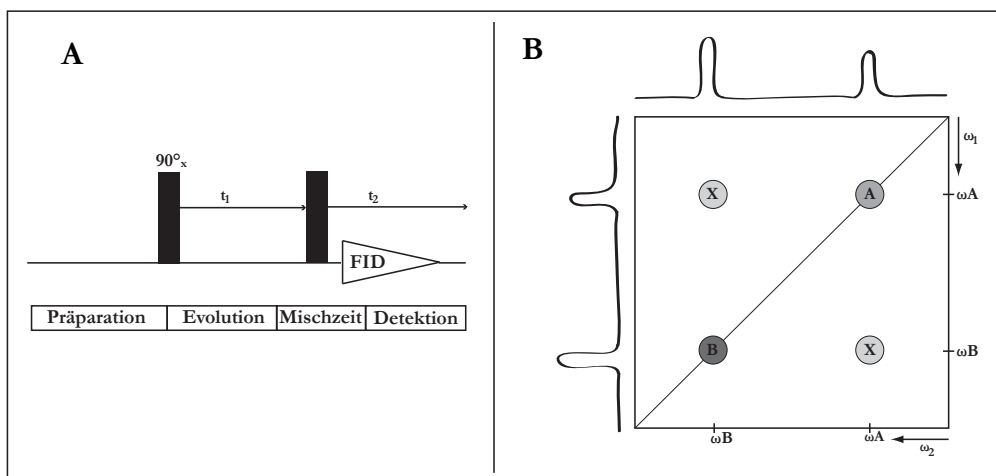


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der 2D-NMR-Experimente

A: Schematische Darstellung eines 2D-NMR-Experimentes. Zu der Präparation und Detektion kommen die Phasen der Evolution und der Mischzeit hinzu.

B: Schematische Darstellung eines homonuklearen 2D-NMR-Spektrums. In diesem Experiment entsteht eine Wechselwirkung zwischen den Kernen A und B, welche in den Kreuzsignalen X deutlich wird.

1. Einleitung

Bei den 2D-Experimenten werden zwischen der Präparation und der Detektion eine Evolutions- (t_1) und eine Mischzeit eingeführt (Abbildung 1.11 A).

Während der Evolutionszeit rotieren die Spins der Kerne frei in der xy-Ebene. Die Mischzeit besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl von Pulsen und Wartezeiten, die je nach Programm variieren kann. Während der Mischzeit wird zum einen der Zustand der Magnetisierung zum Ende der Evolutionszeit gemessen und zum anderen wird die Magnetisierung von einem Kern auf den anderen übertragen. Diese Übertragung geschieht durch die skalare Kopplung und die dipolaren Wechselwirkungen der Kerne. Bei der skalaren Kopplung wird die Magnetisierung über die Atombindung innerhalb des Moleküls übertragen. Die Kerne sind dabei über maximal drei Bindungen miteinander verbunden.

Die dipolaren Wechselwirkungen kommen durch den *Nuclear-Overhauser-Effekt* (NOE) zustande. Dabei wird die Magnetisierung im Raum zwischen zwei Kernen übertragen, die sich in einem Abstand von maximal 5 Å voneinander befinden. Die Stärke des NOE ist zu $1/r^6$ (r = Abstand der Kerne zueinander) proportional.

Im Anschluss wird in der Detektionszeit (t_2) die Spannung gemessen. Erfolgt die Messung verschiedener Experimente, bei denen nur die Evolutionszeit (t_1) variiert wird, so kann die zeitliche Entwicklung des Spinsystems während dieser Zeit bestimmt werden.

Durch Fouriertransformation entlang der t_2 -Richtung wird zunächst ein eindimensionales Spektrum erstellt. Erst durch eine zweite Fouriertransformation entlang der t_1 -Richtung der Experimente entsteht ein zweidimensionales Spektrum. Die 1D-Spektren der t_1 - und t_2 -Richtung werden entlang der x- bzw. y-Achse eines Quadrates aufgetragen (Abbildung 1.11 B). Die Kreuzsignale X stammen von den Magnetisierungstransfers zwischen zwei Spinsystemen der Kerne A und B während der Mischzeit des entsprechenden Experimentes. Resonanzen der Kreuzsignale und der Kerne A und B erscheinen als Höhenlinien in Kreisform und werden als „Peaks“ bezeichnet.

Die Spektren können von zwei gleichen Kernen wie einem ^1H aufgenommen werden. In diesem Fall werden sie als homonukleare Spektren bezeichnet. Werden die Spektren von zwei verschiedenen Kernen wie ^1H und ^{15}N aufgenommen, werden sie als heteronukleare Spektren bezeichnet.

1. Einleitung

Für eine weitere Entzerrung der Überlagerung der Signale werden auch dreidimensionale Spektren verwendet. Die 3D-NMR-Spektren entstehen durch die Einführung einer weiteren Evolutions- und Mischzeit während des Experimentes (Abbildung 1.12 A). Bei 3D-Experimenten werden so genannte Tripelresonanzexperimente durchgeführt, bei denen drei verschiedene (z.B. ^{15}N , ^{13}C und ^1H), aber auch drei gleiche Kerne angeregt werden können. Durch Fouriertransformationen entlang der Evolutionszeiten (t_1 und t_2) und der Detektionszeit (t_3) entstehen drei 1D-Spektren. Diese werden entlang der x-, y- und z-Achse eines Quaders aufgetragen (Abbildung 1.12 B)

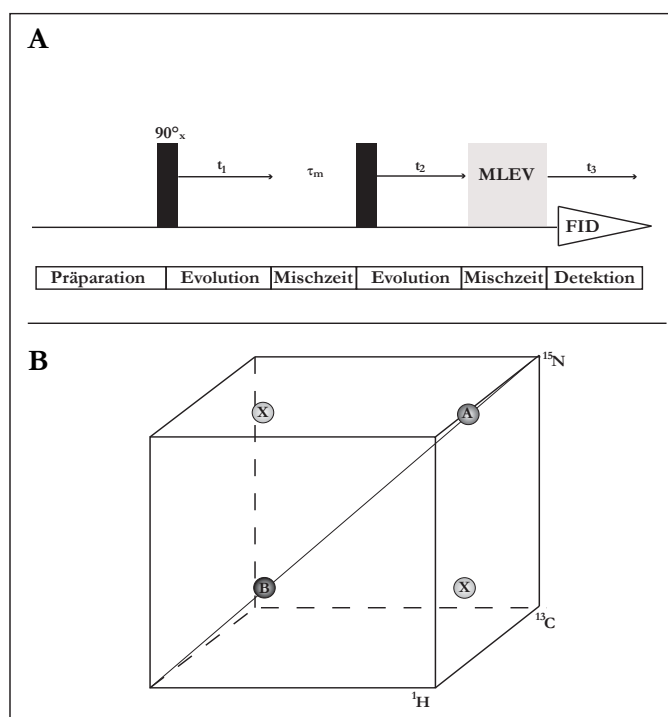


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der 3D-NMR-Experimente

A: Schematische Darstellung eines 3D-NMR-Experimentes am Beispiel des NOESY-TOCSY-Experimentes. Im Vergleich zu 2D-Experimenten (Abbildung 1.11) kommt eine weitere Evolutions- und Mischzeit dazu. Die Mischperiode des NOESY-Transferschritts besteht aus zwei Pulsen mit einer Wartezeit (τ_m) dazwischen; die des TOCSY-Transferschritts aus einer komplexen Abfolge von kurzen Pulsen (MLEV-Mischsequenz).

B: Schematische Darstellung eines Tripelresonanzspektrums. In diesem Experiment entsteht eine Wechselwirkung zwischen den Kernen A und B, welche in den Kreuzsignalen X deutlich wird.

2. Zielsetzung der Arbeit

Eine Funktion der enzymatisch aktiven Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie ist es, Membranproteine durch proteolytische Spaltung in eine lösliche mature Form zu überführen. Dieser Prozess wird als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet (Reiss und Saftig 2009). Die Substrate dieser Enzyme sind z.B. Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Reiss, Ludwig et al. 2006).

Für das *Shedding* ist die Protease-Domäne der Mitglieder der ADAM-Familie zuständig. Im extrazellulären Bereich der meisten ADAMs befinden sich C-terminal von der katalytischen Domäne die Disintegrin-, die cysteinreiche- und die EGF-like Domäne. Bei einigen Mitgliedern der ADAM-Proteasefamilie, wie ADAM17 und ADAM10, ist die cysteinreiche- oder die EGF-like Domäne nicht vorhanden. Die C-terminal zur Disintegrin-Domäne befindliche Domäne von ADAM17 oder ADAM10 besitzt in der Literatur verschiedene Bezeichnungen. Diese Domäne von ADAM10 wird in der Veröffentlichung der Struktur als cysteinreiche Domäne bezeichnet (Janes, Saha et al. 2005). In einer weiteren Veröffentlichung wird diese Domäne als EGF-like Domäne bezeichnet (Reddy, Slack et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne zur Disintegrin-Domäne von ADAM17 mittels heteronuklearer, mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Diese Struktur soll laut der Klassifizierung der Proteindatenbank (SCOP) (Tung and Yang 2007; Andreeva, Howorth et al. 2008) den cysteinreichen- oder den EGF-like Domänen zugeordnet werden. Aufgrund der Tertiärstruktur sollen im Anschluss Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion der Domäne gezogen werden.

3. Materialien und Methoden

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders bezeichnet, von den folgenden Firmen bezogen: Merck KG (Darmstadt), Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München).

3.1.2 Organismen

Für die Klonierung des Vektors adam17-e und die Vermehrung der Vektoren wurde der *E. coli*-Stamm *DH5 α* (Novagen/ Merck KG, Darmstadt) verwendet. Zur Expression der EGF-like Domäne kam der *E. coli*-Expressionsstamm *BL21pLys* (Novagen, Darmstadt) zum Einsatz.

3.1.3 Vektoren und Oligonukleotide

Tabelle 3.1: Vektoren

Die Vektorkarten befinden sich im Anhang.

Bezeichnung	Quelle
adam17-dis	GeneArt AG (Regensburg)
pET-28a	Novagen/ Merck KG (Darmstadt)
adam17-e	wurde während dieser Arbeit erstellt

Tabelle 3.2: Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Name	Bezeichnung	Sequenz
OVP5	rew cystrich (EGF-like)	5'-ctc-gag-tta-tta-ttc-gca-ttt-gcc-3'
OVP6	forw cystrich II (EGF-like)	5'-cat-atg-gat-gat-gat-gat-aaa-ttt-tgc-gaa-c-3'
OVP9	forw cystrich III (EGF-like)	5'-agc-tac-cat-atg-gat-gat-gat-gat-aaa-ttt-tgc-gaa-c-3'
OVP10	rew cystrich II (EGF-like)	5'-agc-tgc-ctc-gag-tta-tta-ttc-gca-ttt-gcc-3'

3.1.4 Enzyme

Tabelle 3.3: Enzyme

Bezeichnung	Quelle
Pfu-Polymerase (2,5 u/ μ l)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Nde I (10 u/ μ l)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Xho I (10 u/ μ l)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase (1 u/ μ l)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Benzonase (25 u/ μ l)	Novagen/ Merck KG (Darmstadt)

3. Materialien und Methoden

3.1.5 Antiseren

Tabelle 3.4: Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
His-Taq (Monoclonal/ Mouse)	1 : 2000, 4 °C, über Nacht	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
Anti-mouse-IgG Peroxidase	1 : 10 000, RT, 1 Stunde	ThermoFisher/ Fisher Scientific GmbH (Bonn)

3.1.6 Medien

3.1.6.1 LB-Medium

Das LB-Medium wurde unter Verwendung der Kapseln der Firma MP Biomedicals, LLC (Illkirch, Frankreich) angesetzt.

25 Kapseln: 10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
Add 1 l dest. Wasser

Für LB-Agar Platten wurde dem Medium 1 % Agar (w/v) zugesetzt. Nach dem autoklavieren wurde dem Medium zur Selektion entweder Ampicillin (50 µg/ ml) oder Kanamycin (30 µg/ ml) zugegeben.

3.1.6.2 Minimal-Medium

10x M9-Medium

80 g Na₂HPO₄*2 H₂O
20 g KH₂PO₄
5 g NaCl
ad 1 l Millipore Wasser
pH 7,2 – 7,3
autoklaviert

2x M9-Medium

200 ml 10x M9-Medium
1 ml MgSO₄ (1 M) (autoklaviert)
1,5 ml Thiamin HCl (1 mg/ ml)
(steril filtriert)
15 ml Biotin (0,1 mg/ ml) (steril filtriert)
2 g ¹³C-Glucose
2 g ¹⁵NH₄Cl

Die ¹³C-Glucose und das ¹⁵NH₄Cl (Campro Scientific GmbH, Berlin) wurden in 40 ml Millipore Wasser aufgenommen und steril filtriert zugegeben. Anschließend wurde das Medium mit sterilem Millipore Wasser auf 1 l aufgefüllt. Zur Selektion wurde dem Medium Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben.

Kanamycin

30 mg/ml (w/v)
in dest. Wasser
steril filtriert
gelagert bei -20 °C

Ampicillin

50 mg/ml (w/v)
in 50 % Ethanol,
steril filtriert
gelagert bei -20 °C

3. Materialien und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der EGF-like Domäne aus dem Vektor adam17-dis (Tabelle 3.1) wurden zwei PCR-Schritte durchgeführt. Zuerst wurde die DNA der EGF-like Domäne aus dem Vektor adam17-dis amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Produkt diente als Template um in einer zweiten PCR die XhoI- und die Enterokinase-Schnittstellen einzufügen. Das Volumen der PCR-Ansätze betrug 50 µl und wurde unter Verwendung der Pfu-Polymerase (3.1.4) mit den dazugehörigen Puffern durchgeführt. Die Primer (Tabelle 3.2) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler TPersonal der Firma Biometra GmbH (Göttingen) durchgeführt.

Tabelle 3.5: PCR-Ansätze (50 µl)

PCR-Ansatz 1	
Substanzen	Volumen (µl)
dNTP-Mix (2 mM)	5
10x Pfu-Polymerase Puffer + MgSO ₄	5
Primer I OVP5 (10 µM)	2
Primer II OVP6 (10 µM)	2
Template adam17-dis (200 ng/µl)	1
Pfu-Polymerase (2,5 u/µl)	0,5
dest. Wasser (steril)	34,5
PCR-Ansatz 2	
Substanzen	Volumen (µl)
dNTP-Mix (2 mM)	5
10x Pfu-Polymerase Puffer + MgSO ₄	5
Primer I OVP5 (10 µM)	2
Primer II OVP6 (10 µM)	2
Template PCR-Produkt 1 (4,5 ng/ml)	5,6
Pfu-Polymerase (2,5 u/µl)	1
dest. Wasser (steril)	26,4

3. Materialien und Methoden

Tabelle 3.6: Programme der durchgeführten PCRs

PCR 1			
Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Denaturierung	94	120	29x
	94	30	
<i>Annealing</i>	60	30	
<i>Elongation</i>	72	60	
	72	120	
Pause	4	∞	
PCR 2			
Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Denaturierung	94	120	29x
	94	30	
<i>Annealing</i>	66	30	
<i>Elongation</i>	72	60	
	72	120	
Pause	4	∞	

3.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

3.2.1.2.1 Präoperativer Restriktionsverdau

Zur Klonierung des Vektors adam17-e wurde der Vektor adam17-dis (Tabelle 3.1) und das PCR-Produkt nach der 2. PCR-Reaktion (3.2.2.1.1) verwendet. Geschnitten wurden die beiden Nucleinsäuren mit den Enzymen Nde I und Xho I (3.1.4) in einem Volumen von 50 µl. Der Verdau wurde zur Erhöhung der Restriktionseffizienz in zwei Schritten in den optimalen Puffern der Enzyme über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Reinigung der Nucleinsäurefragmente zwischen den Schritten erfolgte wie unter 3.2.1.6 beschrieben.

Tabelle 3.7: Präoperativer Restriktionsansatz 1 (50µl)

Substanzen	PCR-Produkt	Vektor
	Volumen (µl)	
PCR-Produkt 2 (67,1 ng/µl)	30	-----
adam17-dis (1,87 µg/µl)	-----	1,6 + 28,4 Elutionspuffer
Nde I (10 u/µl)	2	2
10x Puffer Orange	5	5
dest. Wasser (steril)	13	13

3. Materialien und Methoden

Tabelle 3.8: Präperativer Restriktionsansatz 2 (50µl)

	PCR-Produkt	Vektor
Substanzen	Volumen (µl)	
PCR-Produkt 2 (nach Restriktion 1)	30	-----
adam17-dis (nach Restriktion 1)	-----	30
Xho I (10 u/µl)	2	2
10x Puffer Rot	5	5
dest. Wasser (steril)	13	13

3.2.1.2.2 Analytischer Restriktionsverdau

Um die DNA der Klone zu überprüfen, wurde ein Verdau der Plasmid-DNA mit den Enzymen Nde I und Xho I (3.1.4) in einem Volumen von 10 µl bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte wie unter 3.2.1.6 beschrieben.

Tabelle 3.9: Analytischer Restriktionsansatz (10 µl)

Substanzen	Volumen (µl)
Plasmid-DNA	3
Nde I (10 u/µl)	0,2
Xho I (10 u/µl)	0,2
Puffer 2x Tango	2
dest. Wasser (steril)	4,6

3.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die unter 3.2.1.2.1 geschnittenen DNA-Fragmente wurden zur Ligation in einem molaren Verhältnis von 1 : 5 (Vektor zu Insert) eingesetzt. Die Berechnung des einzusetzenden Inserts erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel:

$$m_{\text{Insert}} = 5 \cdot m_{\text{Vektor}} \cdot \frac{\text{Größe}_{\text{Insert}} \text{ (bp)}}{\text{Größe}_{\text{Vektor}} \text{ (bp)}}$$

Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl und bei Raumtemperatur über Nacht.

Tabelle 3.10: Ligationsansatz

Substanzen	Volumen (µl)
Restringiertes PCR-Produkt (32,1 ng/µl)	1
Restringierter Vektor (83,4 ng/µl)	1,8
10x Ligasepuffer	1
T4-DNA-Ligase (1 u/µl)	1
dest. Wasser (steril)	5,2

3. Materialien und Methoden

3.2.1.4 Transformation der Vektoren in *E. coli*

Die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (3.1.2) wurden für die Transformation auf Eis von -80°C aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl Zellen mit 1 µl Vektor-DNA bzw. mit 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (3.1.6) wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension auf eine LB-Kanamycin Platte (3.1.6) ausgestrichen. Die Zellsuspension wurde in der Sprout® Mini-Zentrifuge (Heathrow Scientific LLC, Nottingham, UK) zentrifugiert und 400 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in dem restlichen Medium resuspendiert und auf eine LB-Kanamycin Platte (3.1.6) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.5 Erstellung von Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung wurden 800 µl einer *E. coli* Flüssigkultur mit 200 µl 75 prozentigem Glycerin (autoklaviert) versetzt. Die Kultur wurde anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *DH5α*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Maxi-Prep Kits der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co KG (Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den analytischen Restriktionsverdau wurde die Plasmid-DNA der Klone, wie im folgenden Protokoll beschrieben, isoliert. Dabei wurden die Puffer des Maxi-Prep Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. 3 ml einer Bakterienkultur wurden bei 7000 rpm bei 4 °C für 15 min in der Tischzentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer S1 resuspendiert und unter vorsichtigem Mischen mit Puffer S2 versetzt. Es folgte eine Inkubation für 2 bis 3 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 300 µl Puffer S3 dazugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417 R) bei 14 000 rpm und 4 °C für 15 min. Die Überstände wurden mit 600 µl Isopropanol versetzt und für 30 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend mit 200 µl 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417 R) bei 14 000 rpm, 4 °C für 10 Minuten. Die Pellets wurden anschließend für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA

in dest. Wasser

3. Materialien und Methoden

3.2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren nach PCR (3.2.1.1) und Restriktionsverdau (3.2.1.2) erfolgte durch eine Horizontal-Elektrophorese. Es fanden 1 bis 2 prozentige (w/v) Agarosegele im TBE-Puffer Verwendung. Die Proben wurden mit dem 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 90 Volt im TBE-Puffer für 90 Minuten in der Mini-Sub Cell GT der Firma Biorad Laboratories GmbH (München). Um die doppelsträngigen Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Als Größenstandard wurde der DNA *Molecular Weight* Marker X und XIII der Firma Roche GmbH (Mannheim) verwendet.

TBE-Puffer

90 mM Tris
90 mM Borsäure
2,5 mM EDTA pH 8,5

5x DNA-Probenpuffer

50 % Glycerin (w/v)
0,1 % Bromphenolblau (w/v)

3.2.1.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Gel-Extraktionskits QI-Aquick® (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit demselben Kit wurde die Reinigung des präparativen Restriktionsverdaus nach dem Protokoll für die Reinigung von PCR-Produkten nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.9 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration

Die Nucleinsäurekonzentration wurde unter Verwendung des Nanodrop Spectrophotometers der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) bestimmt.

3.2.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.2.1 Expression der EGF-like Domäne in *E.coli*

3.2.2.1.1 Expression in LB-Medium

Die Expression des rekombinanten Proteins in LB-Medium (3.1.6.1) wurde in dem Expressionsstamm *BL21 pLys* Klon 5 durchgeführt. Zur Selektion wurde dem Medium Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben. Für die erste Vorkultur wurden 3 ml LB-Medium aus einer Dauerkultur (3.2.1.5) angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm für 8 Stunden inkubiert. Die erste Vorkultur wurde in 150 ml LB-Medium (300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) überimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurde 1 l LB-Medium (2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen) 1:50 (OD = 0,1) mit der zweiten Vorkultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 0,7 – 0,8 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins mit 1 mM IPTG induziert und für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

3. Materialien und Methoden

3.2.2.1.2 Expression in Minimalmedium

Für die Expression der EGF-like Domäne in Minimalmedium (3.1.6.2) wurde der Expressionsstamm *BL21pLys* Klon 5 verwendet. Dem Medium wurde zur Selektion Kanamycin (30 µg/ml) zugeben. Für die erste Vorkultur wurden 8 ml Medium aus einer Dauerkultur (3.2.1.5) angeimpft und bei 37°C, 180 rpm für 8 Stunden inkubiert. Diese wurden in 100 ml Minimalmedium (300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) überimpft und über Nacht bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 500 ml Hauptkultur (2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen) mit der zweiten Vorkultur 1:15 (OD = 0,07 - 0,09) angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zur einer OD von 0,3 -0,4 wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG und die Expression bei 25 °C für 21 Stunden.

IPTG-Lösung

1M IPTG

in dest. Wasser

gelagert bei -20 °C

3.2.2.2 Zellaufschluss zur Gewinnung von Zellysaten

Die Ernte der unter 3.2.2.1.1 und 3.2.2.1.2 erhaltenen Bakterien erfolgte in der Zentrifuge Sorvall RC-5B (Thermo Electron GmbH, Dreieich) bei 8 000 rpm für 20 min. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml 1x PBS mit 10 µl Benzonase (25 u/µl) und 800 µl Proteaseinhibitoren Complete (1 ml Inhibitoren/ 50 ml Lysat) (Roche GmbH, Mannheim) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Sonopuls GM 200, UV 2200, Bandelin electronic GmbH & Co, Berlin) für 3x 1 Minute bei einer Intensität von 35 % unter Verwendung des TT13-Aufsatzes. Das Zellysate wurde anschließend bei 20 000 rpm, 4 °C für 60 Minuten in der Zentrifuge Avanti J-20 (Rotor JA-2550) (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) zentrifugiert. Zur weiteren Entfernung von nicht gelösten Bestandteilen wurde der Überstand durch einen Sterilfilter (ø 0,2 µm) gegeben.

10x PBS-Puffer

80 g NaCl

2 g KCl

2,02 g KH_2PO_4

14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l dest. Wasser

pH 7,4

3. Materialien und Methoden

3.2.2.3 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte in drei Schritten:

- der Ni-Affinitätschromatographie,
- der Größenausschlusschromatographie
- und der Gradienten-RP-HPLC.

3.2.2.3.1 Ni-Affinitätschromatographie

Die Trennung des rekombinanten Proteins von anderen Zellbestandteilen erfolgte mittels der Ni-Affinitätschromatographie. Dabei wurden die *His-Trap* HP Säule mit 1 ml Säulenvolumen und die Äkta Purifier Anlage der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Das Lysat wurde durch eine Flussrate von 0,8 ml/ min über die Säule gegeben. Durch Waschen mit 1x PBS (3.2.2.2) wurde die Säule von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt (Fluss: 1 ml/ min). Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine unter Verwendung eines Imidazol Stufengradienten (Fluss: 1 ml/ min). Die Absorption wurde bei 280 und 260 nm detektiert. Das Programm für die jeweiligen Schritte wird im Folgenden dargestellt:

Lösung A: 1x PBS (3.2.2.2)

Lösung B: 1x PBS + 500 mM Imidazol

Auftrag des Lysates: 40 ml, Fluss: 0,8 ml/ min, Lösung A, Fraktionen: 4 ml

Waschen der Säule: 16 ml, Fluss: 1 ml/ min, Lösung A, Fraktionen: 4 ml

Imidazolstufengradienten: je Stufe 20 ml, Fluß: 1 ml/ min, Fraktionen: 2 ml

1% B = 5 mM Imidazol	14% B = 70 mM Imidazol
2% B = 10 mM Imidazol	20% B = 100 mM Imidazol
4% B = 20 mM Imidazol	40% B = 200 mM Imidazol
6% B = 30 mM Imidazol	60% B = 300 mM Imidazol
8% B = 40 mM Imidazol	80% B = 400 mM Imidazol
10% B = 50 mM Imidazol	100% B = 500 mM Imidazol

3.2.2.3.2 Größenausschlusschromatographie

Die Proteinfraktionen aus der Ni-Affinitätsreinigung wurden wie unter 3.2.2.5 beschrieben konzentriert und die Proteinkonzentration wie unter 3.2.2.6 bestimmt. Anschließend wurde zur Trennung möglicher Aggregate, Dimere und Monomere des rekombinanten Proteins eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Zur Verwendung kamen dabei eine Superdex G75 16/60 Säule und die Äkta Purifier Anlage der Firma GE Healthcare (München). Zur Kalibrierung der Säule wurde das LMW Kalibrierungs Kit der Firma GE Healthcare (München) nach Herstellerangaben verwendet. Als Laufpuffer der Gelfiltration am 1x PBS (3.2.2.2) zur Anwendung. Die Absorption wurde bei 280 und 260 nm detektiert.

3.2.2.3.3 Gradienten-RP-HPLC

Nach der Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen des Monomers der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne wie unter 3.2.2.5 beschrieben konzentriert und die Proteinkonzentration wie unter 3.2.2.6 bestimmt. Zur Trennung der Disulfid-isomere des rekombinanten Proteins wurde im Anschluss eine Gradienten RP-HPLC (*Reversed-phase high performance liquid chromatography*) durchgeführt. Dazu wurde eine analytische C₁₈-Säule (218TP Vydac, Worms) und die Gradienten-RP-HPLC-Anlage 880-PU (Jasco, Gross-Umstadt) verwendet. Als Lösungsmittel wurde bei diesem Verfahren ein Acetonitril-Wasser-Gemisch mit 0,1 % TFA verwendet. Die Probe (100 µl) wurde vor dem Auftragen mit 0,2 µl 100 prozentiger TFA angesäuert und bei 14 000 rpm für 10 min in der

3. Materialien und Methoden

Tischzentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Nach der Equilibrierung der Säule und dem Probenauftrag wurde der Acetonitrilgradient in zwei Schritten kontinuierlich um 9,6 % pro min und im Anschluss um 0,64 % pro min erhöht. Anschließend wurde innerhalb von 3 Minuten die Acetonitrilkonzentration bis auf 98 % gesteigert, um die Säule von noch gebundenen Probenbestandteilen zu reinigen. Die Absorption wurde bei 214 nm detektiert. Die Fraktionen wurden nach Signalen getrennt gesammelt. Das Programm wird im Folgenden kurz dargestellt:

Lösung A: 2 % Acetonitril (v/v)

Lösung B: 95 % Acetonitril (v/v)

Start 100 % A

Schritt 1:	2 min	80 % A
Schritt 2:	26 min	64 % A
Schritt 3:	29 min	0 % A
Schritt 4:	31 min	0 % A
Schritt 5:	36 min	100 % A

Die eluierte EGF-like Domäne wurde anschließend in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) gefriergetrocknet, um das Lösungsmittel zu entfernen.

3.2.2.4 Dialyse zur Renaturierung der rekombinanten EGF-like Domäne

Von den gesammelten Fraktionen Gradienten-RP-HPLC des $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ markierten Proteins wurde ein 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass nur einer der vier Fraktionen für die NMR-Spektroskopie zu verwenden war. Um das weitere Material für die NMR-Spektroskopie nutzbar zumachen, wurde eine Dialyse des rekombinanten Proteins durchgeführt. Dabei wurde das lösliche Protein durch die Zugabe von 6 M GuHCl denaturiert und durch die Zugabe eines Redoxsystems bestehend aus 4 mM red- und 0,4 mM ox-Glutathion renaturiert. Die Dialyse erfolgte wie in dem folgenden Ablaufschema dargestellt:

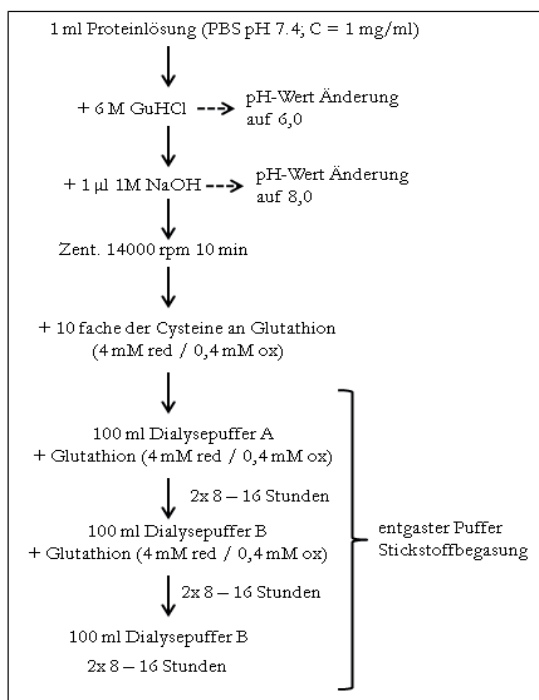


Abbildung 3.1: Ablaufschema Dialyse des $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ markierten Proteins

Nach der Trennung der Disulfidomere über die Gradienten-RP-HPLC wurden die nicht für die NMR-Spektroskopie geeigneten Isomere der Fraktionen über eine Dialyse für die NMR-Analyse nutzbar gemacht. Dazu wurde das gefriergetrocknete Protein in 1 ml 1x PBS pH 7,4 (3.1.9) aufgenommen. Nach Denaturierung des Proteins durch Zugabe von 6 M GuHCl, erfolgte die Renaturierung durch die Zugabe eines Redoxsystems bestehend aus 4 mM red- und 0,4 mM ox-Glutathion und anschließender Dialyse-schritte.

3. Materialien und Methoden

Anschließend wurde das erhaltene rekombinante Protein wie in 3.2.2.3 beschrieben über Gradienten-RP-HPLC gereinigt und gefriergetrocknet.

Dialysepuffer A

1 M GuHCl
50 mM Na₂HPO₄
50 mM NaH₂PO₄
pH 8,0

Dialysepuffer B

50 mM Na₂HPO₄
50 mM NaH₂PO₄
pH 8,0

3.2.2.5 Ellman-Test

Der Ellman-Test (Ellman 1959) stellt eine Methode zur Detektion von freien Thiolgruppen dar. Dabei reagiert DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) mit einer freien Thiolgruppe zu dem gelben Anion TNB- (5-Thio-2-nitrobenzoat). Die Absorption wird anschließend bei 412 nm gemessen. Der Ellman-Test ermöglicht dadurch die Detektion offener Cysteinbrücken in Proteinen. Zur Überprüfung der rekombinant exprimierten und gereinigten EGF-like Domäne auf offene Cysteinbrücken wurden 10 µl DTNB-Lösung, 20 µl 1 M Tris HCl pH 8,0 und 168 µl dest. Wasser gemischt und mit 2 µl Proteinlösung versetzt. Zur Kalibrierung dienten die folgenden Konzentrationen an β-Mercaptoethanol: 10 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,06 mM, 0,02 mM. Die Reaktionsansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in einem Zweistrahlphotometer „Spectrophotometer U-2001“ (Hitachi-High Technologies Europe GmbH, Krefeld) wurde die Absorption bei 412 nm gegen den Nullwert (2µl 1x PBS pH 7,4 (3.2.2.2)) gemessen.

DTNB-Lösung

50 mM Natriumacetat x 3 H₂O
2 mM DTNB
in dest. Wasser

3.2.2.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden die Konzentratoren „Vivaspin 20“ und „Vivaspin 2“ der Firma Sartorius AG (Göttingen) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3 kD nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des Lambert-Beer-Gesetzes. Dabei wurde Absorption der Proteinlösung in einem Zweistrahlphotometer „Spectrophotometer U-2001“ (Hitachi-High Technologies Europe GmbH, Krefeld) bei 280 nm gegen den jeweiligen Puffer als Referenz gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit der folgenden Formel:

$$C_m = \frac{E_{280} \cdot M_r}{d \cdot \epsilon_{280}}$$

C_m	=	Massenkonzentration
E_{280}	=	Absorption bei 280 nm
M_r	=	molekulare Masse in g/mol
d	=	Schichtdicke der Küvette
ϵ_{280}	=	molarer Extinktionskoeffizient

Die molekulare Masse der EGF-like Domäne beträgt 9887 g/mol und der molare Extinktionskoeffizient 1880 M⁻¹/cm.

3. Materialien und Methoden

3.2.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli 1970) verwendet. Aufgrund der Größe der zu trennenden Proteine fanden ausschließlich 15 prozentige SDS-Polyacrylamidgele Verwendung. Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit dem 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Als Größenstandards wurde der Proteinmarker Mark 12 (Invitrogen GmbH, Darmstadt) und der *unstained* Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Anschließend wurde die Elektrophorese unter Verwendung der Mini-Protean-Zellen (Biorad Laboratories GmbH, München) bei 200 Volt für 55 Minuten durchgeführt.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Substanzen	Sammelgel 7,5 % ig	Trenngel 15 % ig
Acrylamid	1,25 ml	6 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-----
1,5 M Tris pH 8,8	-----	3 ml
10 % iges SDS (w/v)	50 µl	120 µl
dest. Wasser	2,45 ml	2,75 ml
10 % iges APS (w/v)	50 µl	120 µl
TEMED	5 µl	6 µl

10x SDS-Gelelektrophoresepuffer

100 ml 10 % iges SDS (w/v)
144 g Glycin
30 g Tris
ad dest. 1 l Wasser

2x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend)

100 mM Tris/HCl pH 6,8
4 % SDS
0,4 % Bromphenolblau (w/v)
20 % Glycerin (v/v)
Der reduzierende 2x SDS-Probenpuffer
enthält 200 mM β -Mercaptoethanol.

3.2.2.9 Coomassiefärbung

Das unter Abschnitt 3.2.4.4 erhaltene SDS-Polyacrylamidgel wurde 30 Minuten mit dem Coomassiefärber gefärbt. Entfärbt wurde das Gel mit der Entfärbelösung der Coomassiefärbung.

Coomassiefärbelösung

25 % Methanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)
0,1 % Coomassie Brilliant Blau (w/v)

Entfärbelösung

10 % Methanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

3. Materialien und Methoden

3.2.2.10 Silberfärbung

Das unter Abschnitt 3.2.4.4 erhaltene SDS-Polyacrylamidgel wurde 1 Stunde in der Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Gel 1 Minute mit dest. Wasser gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in Lösung A. Das Gel wurde 2x je 1 Minute und 2x je 10 Minuten mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Silberfärbung für 30 Minuten mit Lösung B. Nach 2-maligem Waschen mit dest. Wasser wurde überschüssiges Silber durch Waschen mit dem halben Volumen der Lösung C entfernt. Anschließend wurde das Gel durch Zugabe der restlichen Lösung C entwickelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Lösung D gestoppt. Anschließend wurde das Gel in dest. Wasser gelagert.

Fixierlösung

30 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Lösung A (100 ml)

6,8 g Natriumacetat x 3 H₂O
0,314 g Natriumthiosulfat x 5 H₂O
30 ml Ethanol
2 ml 50 % Glutardialdehyd

Lösung B (100ml)

0,1 g Silbernitrat
70 µl Formaldehyd

Lösung C (100 ml)

2,5 g Natriumcarbonat
pH 11,3 bis 11,8
50 µl Formaldehyd

Lösung D (100 ml)

1,68 g EDTA
pH 8,0

3.2.2.11 Westernblotting und Immunodetektion

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli 1970 erfolgte auf PVDF Transfermembran (\varnothing 0,45 μ m) (GE Healthcare, Freiburg) unter Verwendung einer Semi dry Blot Anlage Transblot SD der Firma Biorad Laboratories GmbH (München). Der Transfer erfolgte 60-90 Minuten bei 20 V. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Freie Bindestellen auf der Membran wurden mit 5 - 6 % iger Milchpulverlösung (w/v) in Blotwaschpuffer 2 blockiert, bevor die Membran mit einem His-Antikörper (1 : 2000) behandelt wurde. Die Inkubation erfolgte dabei über Nacht bei 4 °C. Zum Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe auf der Nitrozellulosemembran wurden Zweitantikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (1 : 10 000) verwendet. Die Inkubationszeit betrug dabei eine Stunde. Zwischen den Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern wurde die Membran mehrmals für 5 Minuten mit Waschpuffer 1 und nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die Membranen wurden 1 Minute mit dem ECL-System der Firma GE Healthcare (Freiburg) inkubiert. Die durch das enthaltende Luminol entstehenden Lichtsignale wurden unter Verwendung des Image Readers LAS-1000 der Firma Fuji Film (Kleve) detektiert.

3. Materialien und Methoden

10x Transferpuffer

30 g Tris
144 g Glycin
20 % Methanol (v/v)

Waschpuffer 1

100 ml 2 M NaCl
50 ml 1 M Tris HCl pH 8
Ad 1 l Millipore Wasser
+ 0,1 % Tween

Waschpuffer 2

100 ml 2 M NaCl
50 ml 1 M Tris HCl pH 8
Ad 1 l Millipore Wasser

Ponceau S

2 % Ponceau S (w/v)
10 % Essigsäure

3.2.2.12 „Colony“-Blot

Die Methode des „Colony“-Blotes diente dazu die verschiedenen Klone des Expressionsstammes *BL21 pLys* auf die Effizienz der Expression der rekombinanten EGF-like Domäne zu überprüfen. Dazu wurden die Klone auf eine LB-Kanamycin Platte (3.1.8) transferiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Platte wurde anschließend bei Raumtemperatur für 15 bis 30 Minuten getrocknet und die Bakterienkolonien wurden auf eine trockene Nitrocellulosefolie (\varnothing 0,45 μ m) (GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Anschließend wurde die Nitrocellulose auf eine LB-Kanamycin-Platte (3.1.8), die 250 μ M IPTG enthielt, aufgelegt. Danach wurde die Platte für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend mit verschiedenen Lösungen behandelt. Der Ablauf sah wie folgt aus: 10 min SDS-Lösung, 5 min Denaturierungslösung, 2x 5 min Denaturierungslösung und 15 min SSC-Lösung. Anschließend wurde die Membran 2x mit Waschpuffer 2 (3.2.2.10) gewaschen. Die Blockierung der Membran, die Antikörperbehandlung, sowie die Detektion erfolgte wie in 3.2.2.10 beschrieben.

SDS-Lösung

10 % SDS (w/v)

Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M Tris HCl pH 7,4

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

20x SSC-Lösung

3 M NaCl
0,3 M Trinatriumcitrat

3. Materialien und Methoden

3.2.3 NMR-Spektroskopie

3.2.3.1 Durchgeführte NMR-Experimente

Alle durchgeführten NMR-Experimente wurden von Prof. Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie, CAU zu Kiel) auf einem Bruker Avance 600 MHz, ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten ZGradient *triple resonance cryoprobe* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen), aufgenommen. Die einzelnen NMR-Experimente, sowie deren komplexe Datenpunkte, die spektrale Breite, die bei den Messungen verwendeten Temperaturen und die Mischzeiten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.12: Durchgeführte NMR-Experimente

Experimente	komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)			spektrale Breite (Hz)			Temperatur (K)	Mischzeit (msec)
	t1	t2	t3	f1	f2	f3		
2D- ¹ H ¹⁵ N-HSQC	1024 (¹ H)	256 (¹⁵ N)	----	7211	1946	----	298	
3D- ¹ H ¹⁵ N-HNCACB	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	128 (¹³ C)	7211	3892	11325	298	
3D- ¹ H ¹⁵ N-HN(CO) CACB	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	128 (¹³ C)	7211	1946	11312	298	
3D- ¹ H ¹⁵ N-HNHAHB	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	128 (¹³ C)	7211	1946	4200	303	
3D- ¹ H ¹⁵ N-HN(CO) HAHB	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	128 (¹³ C)	7211	1946	7201	298	
3D- ¹ H ¹⁵ N-HC(CO)NH- ¹ H-editiert	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	256 (¹ H)	7211	1824	3720	300	12
3D- ¹ H ¹⁵ N-HC(CO)NH- ¹³ C-editiert	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	110 (¹³ C)	7211	1824	9813	300	12
3D- ¹ H ¹⁵ N-TOCSY	1024 (¹ H)	64 (¹⁵ N)	256 (¹ H)	7211	1824	6002	300	63
3D- ¹ H ¹⁵ N-NOESY	1024 (¹ H)	64 (¹⁵ N)	228 (¹ H)	7211	1824	7201	300	120
3D- ¹ H ¹³ C-NOESY	1024 (¹ H)	64 (¹³ C)	256 (¹ H)	7211	9505	6002	300	150
3D- ¹ H ¹⁵ N-HNCO	1024 (¹ H)	40 (¹⁵ N)	512 (¹³ C)	8417	1824	2113	300	

3. Materialien und Methoden

3.2.3.2 Probenvorbereitung

Die Probe der monomeren Fraktion nach Gelfiltration wurde auf 300 μ l eingeeengt und mit 7 % D₂O (v/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) und Proteaseinhibitor-Cocktail Complete (1 ml Inhibitoren/ 50ml Proteinlösung) (Roche GmbH, Mannheim) versetzt. Nachdem die 0,8 mM Proteinlösung in ein Shigemi-Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, USA) überführt worden war, wurde ein 2D-¹H¹⁵N-HSQC-Experiment durchgeführt. Die nach der Gradienten-RP-HPLC (3.2.3.3) gefriergetrockneten Fraktionen der rekombinanten ¹⁵N¹³C markierten EGF-like Domäne wurde in 1x PBS pH 7,4 (3.2.2.2) aufgenommen, auf 300 μ l eingeeengt (3.2.2.6) und mit D₂O (v/v), Natriumazid (w/v) und Proteaseinhibitor-Cocktail Complete versetzt. Die Proteinlösungen mit Konzentrationen von 0,1; 0,3; 1,2 und 0,7 mM, wurden jeweils in ein Shigemi-Röhrchen gefüllt. Anschließend wurden 2D-¹H¹⁵N-HSQC-Experimente durchgeführt. Mit der Proteinlösung aus Fraktion 2, die eine Konzentration von 0,3 mM besaß, wurde im Anschluss die folgenden NMR-Spektren aufgenommen: 3D-¹H¹⁵N-HNCACB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)CACB, 3D-¹H¹⁵N-HNHAHB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)HAHB, 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹H-editiert und 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹³C-editiert. Die dialysierten Fraktionen 3 und 4 wurden bis auf 300 μ l eingeeengt und mit 7 % D₂O (v/v), 0,02 % Natriumazid (w/v) und Proteaseinhibitor-Cocktail Complete versetzt. Nachdem die Proteinlösungen, die eine Konzentration von 0,1 mM besaßen, in ein Shigemi-Röhrchen gefüllt worden waren, wurden 2D-¹H¹⁵N-HSQC-Experimente durchgeführt. Da die weiteren NMR-Experimente eine höhere Proteinkonzentration benötigten, wurde die NMR-Probe der Fraktion 2 mit den dialysierten Proteinlösungen aus Fraktion 3 und 4 vereinigt. Nach Konzentrierung wurde die Probe wie vorher beschrieben mit D₂O, Natriumazid und Proteaseinhibitor-Cocktail Complete versetzt und in ein Shigemi-Röhrchen gefüllt. Mit dieser Probe, die nun eine Proteinkonzentration von 0,7 mM enthielt, wurden die folgenden NMR-Experimente durchgeführt: 3D-¹H¹⁵N-TOCSY, 3D-¹H¹⁵N-NOESY, 3D-¹H¹³C-NOESY, 3D-HNCO. Die aufgenommenen NMR-Daten wurden mit dem Programm NMR-Pipe (Delaglio, Grzesiek et al. 1995) prozessiert und mit NMR-View (Johnson 2004) ausgewertet.

3.2.3.3 Zuordnung der sequenzspezifischen Signale

Die Zuordnung der sequenzspezifischen Signale erfolgte unter Verwendung der folgenden NMR-Experimente: 2D-¹H¹⁵N-HSQC, 3D-¹H¹⁵N-HNCACB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)CACB, 3D-¹H¹⁵N-HNHAHB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)HAHB, 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹H-editiert und 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹³C-editiert. Die Zuordnung der Carbonylkohlenstoffverschiebung erfolgte unter Verwendung des 3D-HNCO-Experimentes.

3.2.3.4 Zuordnung der intramolekularen Signale

Auf Grundlage der sequenzspezifischen Zuordnung der Signale wurden die intramolekularen Signale unter Verwendung der folgenden Spektren zugeordnet: 3D-¹H¹⁵N-TOCSY, 3D-¹H¹⁵N-NOESY, 3D-¹H¹³C-NOESY.

3. Materialien und Methoden

3.2.3.5 Strukturberechnung

Die Strukturberechnung erfolgte mit dem Programm Cyana (Guntert 2004). Für die Berechnung der Struktur wurden 1820 NOE (*nuclear overhauser effect*) Abstände verwendet, die aus den 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY- und 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Experimenten gewonnen wurden. Dabei wurde die mittlere NOE-Intensität auf einen Abstand von 2,7 Å mit einer Toleranz vom 0,125 fachen des mittleren Abstands zum Quadrat kalibriert. Die Intensitäten der Signale der Methylgruppen wurden halbiert. Für die unteren bzw. oberen Abstandsbegrenzungen wurden 1,8 bzw. 5 Å definiert. Die fünf Disulfidbrücken wurden mit 2,0 - 2,1 Å, 3,0 - 3,1 Å und 3,0 - 3,1 Å für die Abstände zwischen $\text{S}\gamma/\text{S}\gamma$; $\text{S}\gamma/\text{S}\beta$ und $\text{S}\beta/\text{S}\gamma$ festgelegt und in die Berechnung mit einbezogen. Zur Vorhersage der Torsionswinkel ϕ und ψ des Proteinrückgrats und somit der Sekundärstruktur der EGF-like Domäne wurde das Programm TALOS (Cornilescu, Delaglio et al. 1999; Shen, Delaglio et al. 2009) verwendet. Die Torsionswinkel wurden in die Berechnung der Strukturen mit einbezogen. Aus 400 Strukturen wurden unter Berücksichtigung der Targetfunktion die besten 20 Strukturen ausgewählt. Aus diesen wurde unter Verwendung des Programmes WHATIF (Vriend 1990) eine mittlere Struktur berechnet, die mit dem Programm GROMOS (van Gunsteren 1996) energieminiert wurde. Die weitere graphische Darstellung der Strukturen erfolgte mit den Programmen Ribbons (Carson 1991), GRASP (Nicholls, Sharp et al. 1991) und MOLMOL (Koradi, Billeter et al. 1996).

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es die EGF-like Domäne von ADAM17 in *E. coli* zu exprimieren, zu reinigen und die Struktur zu bestimmen. Dazu wurde ein Fusionskonstrukt der Domäne erstellt, das N-terminal einen His-tag, eine Thrombinschnittstelle und eine Enterokinaseschnittstelle enthielt (Abbildung 4.1). Das exprimierte rekombinante Protein bestand aus 88 Aminosäuren und besaß eine Masse von 9,8 kD.

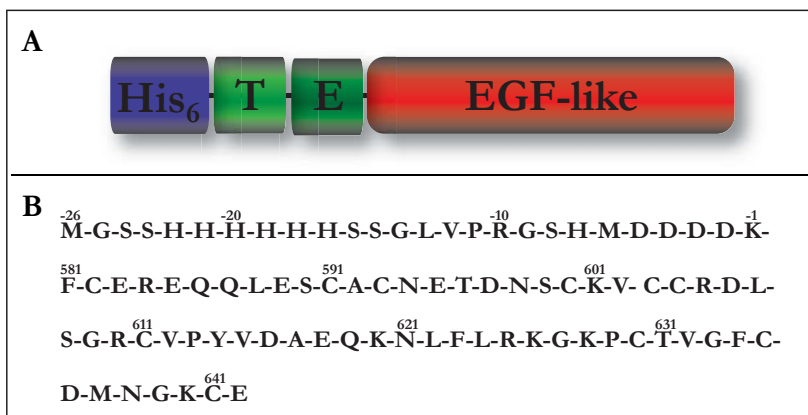


Abbildung 4.1: Darstellung des Fusionskonstruktes der EGF-like Domäne von ADAM17

- A: Schematische Darstellung des Fusionskonstruktes. N-terminal von der EGF-like Domäne (EGF-like) befindet sich ein His-tag (His₆), gefolgt von einer Thrombinschnittstelle (T) und eine Enterokinaseschnittstelle (E).
- B: Darstellung der Sequenz der EGF-like Domäne von ADAM17 im Einbuchstabencode. Die Aminosäuren des His-tags sind mit negativen Zahlen versehen und die Aminosäuren der EGF-like Domäne sind nach der natürlich vorkommenden Sequenz von ADAM17 nummeriert.

4.1 Klonierung der EGF-like Domäne

Um die EGF-like Domäne von ADAM17 zu exprimieren wurde zunächst der Vektor adam17-e (3.1.3) erstellt. Da die Expression unter Kontrolle des T7-Promotors stattfinden sollte, bestand das Rückgrat des Vektors aus dem Vektor pET-28a, der einen T7-Promotor, sowie den His-tag und die Thrombinschnittstelle enthielt. In diesen Vektor wurde die DNA-Sequenz der EGF-like Domäne und die Enterokinaseschnittstelle mittels Verdau der Restriktionsendonukleasen Nde I und Xho I kloniert. Die DNA-Sequenz der EGF-like Domäne befand sich zunächst in dem Vektor adam17-dis ohne Nde I, Xho I und Enterokinaseschnittstelle. In zwei PCR-Schritten wurde die EGF-like Domäne amplifiziert und anschließend die Schnittstellen eingefügt. Das dabei erhaltene PCR-Produkt ergab eine Bande, die bei 250 bp lag (Abbildung 4.2 A). Im Anschluss wurden das PCR-Produkt und der Vektor pET-28a mit den Enzymen Xho I und Nde I verdaut. Nach der Ligation wurde die DNA in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Die DNA der erhaltenen Klone wurde mittels Restriktionverdau analysiert. Als positiv-Kontrolle des Verdau wurde der Vektor

4. Ergebnisse

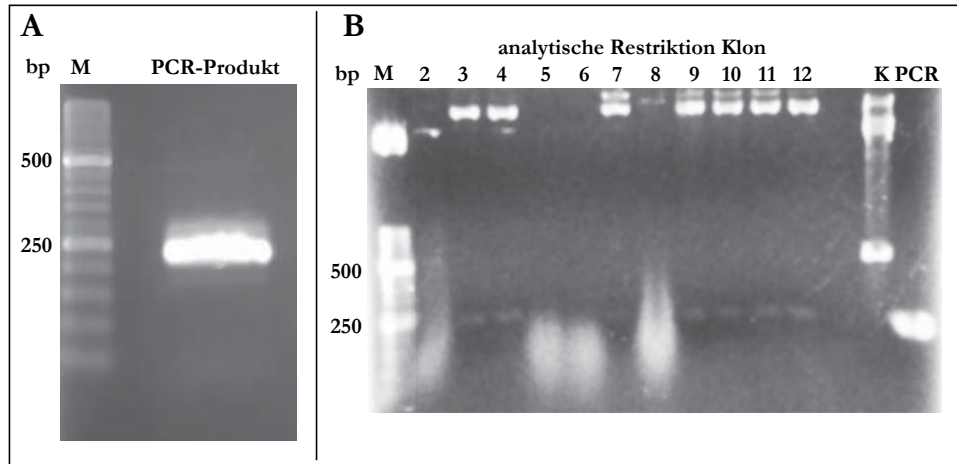


Abbildung 4.2: Klonierung des Vektors adam17-e

A: Analyse des erhaltenen PCR-Produktes durch agarosegelelektrophoretische Trennung. Als Größenstandard wurde in allen Analysen der DNA-Marker XIII (M) verwendet.

B: Analytischer Restriktionsendonucleaseverdau der erhaltenen Klone. Zur Laufstreckenkontrolle des Inserts wurde das PCR-Produkt, dessen Bande bei 250 bp auftrat, aufgetragen. Zur positiv-Kontrolle des Verdau wurde der Vektor adam17-dis, bei dem ein Fragment bei 517 bp zu sehen war, verdaut.

adam17-dis verwendet, bei dem eine Bande bei 517 bp zu sehen war (Abbildung 4.2 B). Die Klone 3, 4 und 9 bis 12 zeigten das erwartete Fragment bei 250 bp. Für Klon 3 wurde die korrekte Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bestätigt. Der Vektor wurde anschließend in den *E. coli*-Expressionsstamm *BL21pLys* transformiert. Zur Optimierung der Proteinexpression, wurde ein „Colony-Blot“ durchgeführt (3.2.2.2.12). Dabei exprimierten von 12 getesteten Klonen Nummer 5 und 7 die rekombinante EGF-like Domäne. Für die weiteren Expressionen wurde der Klon 5 verwendet, da dieser eine hohe Expressionsrate aufwies (Abbildung 4.3).

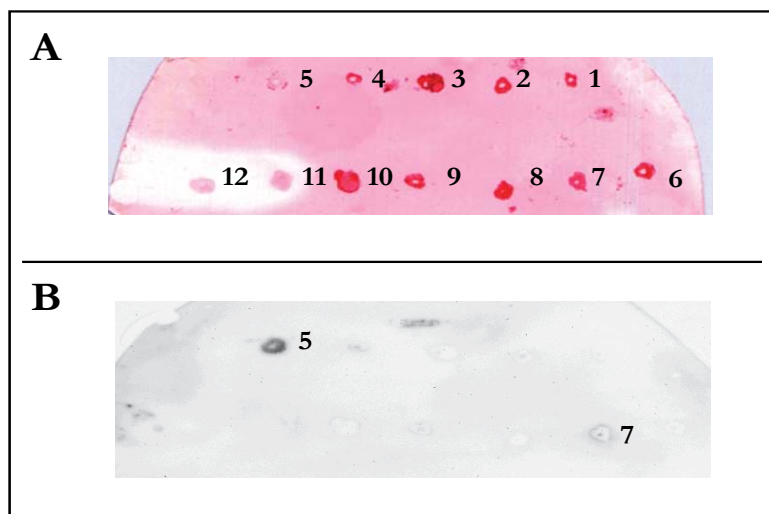


Abbildung 4.3: „Colony-Blot“ zur Expressionskontrolle der EGF-like Domäne von ADAM17

A: Ponceau-S-Färbung des „Colony“-Blots zur Kontrolle des Membrantransfers. Angefärbt sind die Proteine der 12 analysierten Bakterienkolonien.

B: Immunodetektion der Expression der Klone des *E. coli*-Stammes *BL21pLys*. Detektiert werden konnte eine Expression bei zweien der analysierten Klone.

4. Ergebnisse

4.2 Expression des rekombinanten Proteins

Die Expression der EGF-like Domäne erfolgte in LB-Medium durch Induktion mit 1 mM IPTG für 3 Stunden. In einer SDS-PAGE-Analyse der Expression war ein induziertes Protein bei 14,4 kD zu sehen (Abbildung 4.4 A). Das Protein wurde löslich exprimiert, da es sich nach Ultraschallaufschluss und Zentrifugation der Bakterien im Überstand befand (Abbildung 4.4 B). Um die Expression der EGF-like Domäne zu verifizieren, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Auch hier wurde ein Protein bei 14,4 kD detektiert, welches mit den Proteinbanden der SDS-PAGE übereinstimmte (Abbildung 4.4 C).

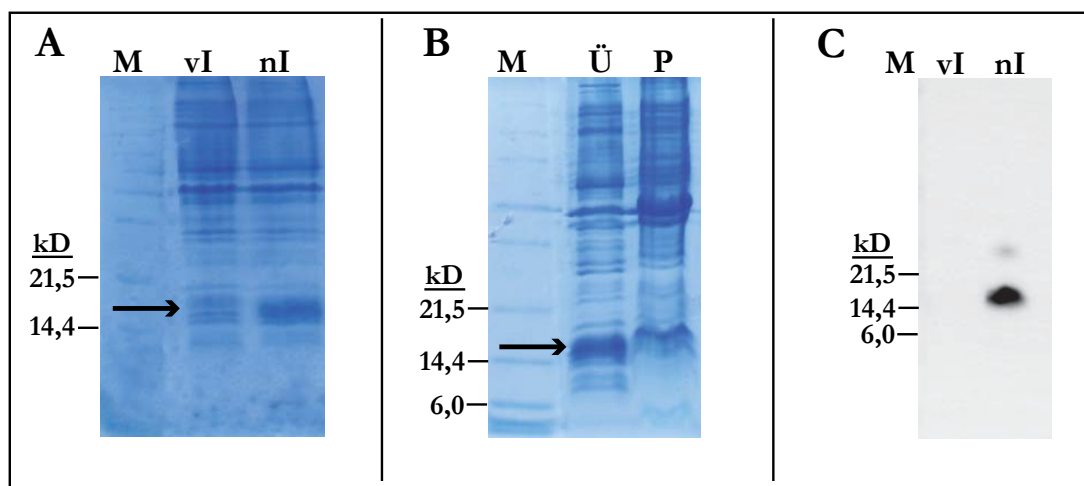


Abbildung 4.4: Expression der EGF-like Domäne in LB-Medium

- A: SDS-PAGE-Analyse der Expression der EGF-like Domäne. Der Pfeil zeigt das exprimierte Protein. Aufgetragen wurden die Proben vor Induktion (vI) und nach dreistündiger Induktion (nI). Als Größenstandard wurde in allen Analysen der Proteinmarker Mark 12 verwendet.
- B: SDS-PAGE-Analyse der durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossenen Bakterien. Dabei wurden als Proben der Überstand (Ü) und das Pellet (P) nach Zentrifugation aufgetragen.
- C: Nachweis der EGF-like Domäne über Westernblot-Analyse. Zur Detektion wurde ein anti-His Antikörper und das ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-System verwendet.

Um das rekombinant exprimierte Protein für die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie nutzbar zu machen, wurde die Expression der EGF-like Domäne in Minimalmedium durchgeführt (3.1.6.1). Die in dem Medium enthaltene Glucose war ^{13}C und das NH_4Cl ^{15}N markiert, wodurch ^{15}N und ^{13}C markiertes Protein erhalten wurde. Die Expression in Minimalmedium wurde bei 25 °C für 21 Stunden durchgeführt. Dabei war bis 21 Stunden eine induzierte Proteinbande bei 14,4 kD auftrat (Abbildung 4.5 A). Die EGF-like Domäne wurde auch im Minimalmedium in löslicher Form exprimiert, da diese nach Ultraschallaufschluss und Zentrifugation der Bakterien im Überstand zu sehen war (Abbildung 4.5 B).

4. Ergebnisse

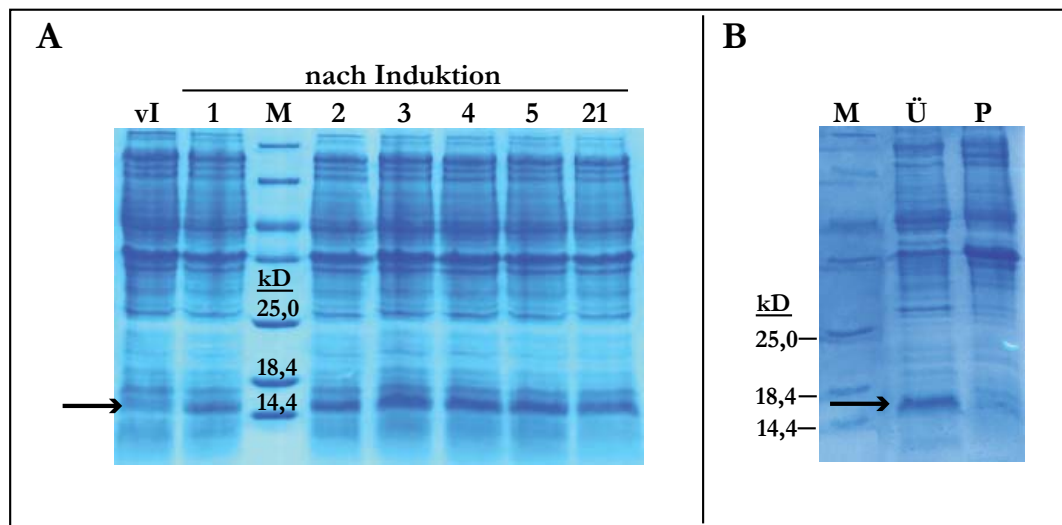


Abbildung 4.5: Expression in Minimalmedium

- A: SDS-PAGE-Analyse der Expression des rekombinanten Proteins. Der Pfeil zeigt das exprimierte Protein. Aufgetragen wurden die Proben vor Induktion (vI) und nach verschiedenen Zeitpunkten der Induktion (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 21 h). Als Größenstandard wurde in allen Analysen der unstained Proteinmarker verwendet.
- B: SDS-PAGE-Analyse der durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossenen Bakterien. Dabei wurden als Proben der Überstand (Ü) und das Pellet (P) nach Zentrifugation aufgetragen.

4.3 Reinigung der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne

Zur Reinigung der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne wurden die Ni-Affinitätschromatographie, die Größenausschlusschromatographie und die Gradienten-RP-HPLC verwendet.

4.3.1 Ni-Affinitätschromatographie

Nach Ultraschallaufschluss der Bakterien wurde das Lysat einer Ni-Affinitätschromatographie unterzogen (3.2.2.3.1). Die Ni-Affinitätsreinigung des rekombinant exprimierten Proteins zeigte, dass das lösliche Protein vollständig an die Säule gebunden wurde, da im Durchlauf (DL) keine Bande bei 14,4 kD zu sehen war. Im Anschluss konnte die rekombinant exprimierte EGF-like Domäne durch den Imidazolstufengradienten von Verunreinigungen getrennt werden. Das Protein wurde bei einer Imidazolkonzentration von 50 bis 200 mM eluiert (Abbildung 4.6 B).

4. Ergebnisse

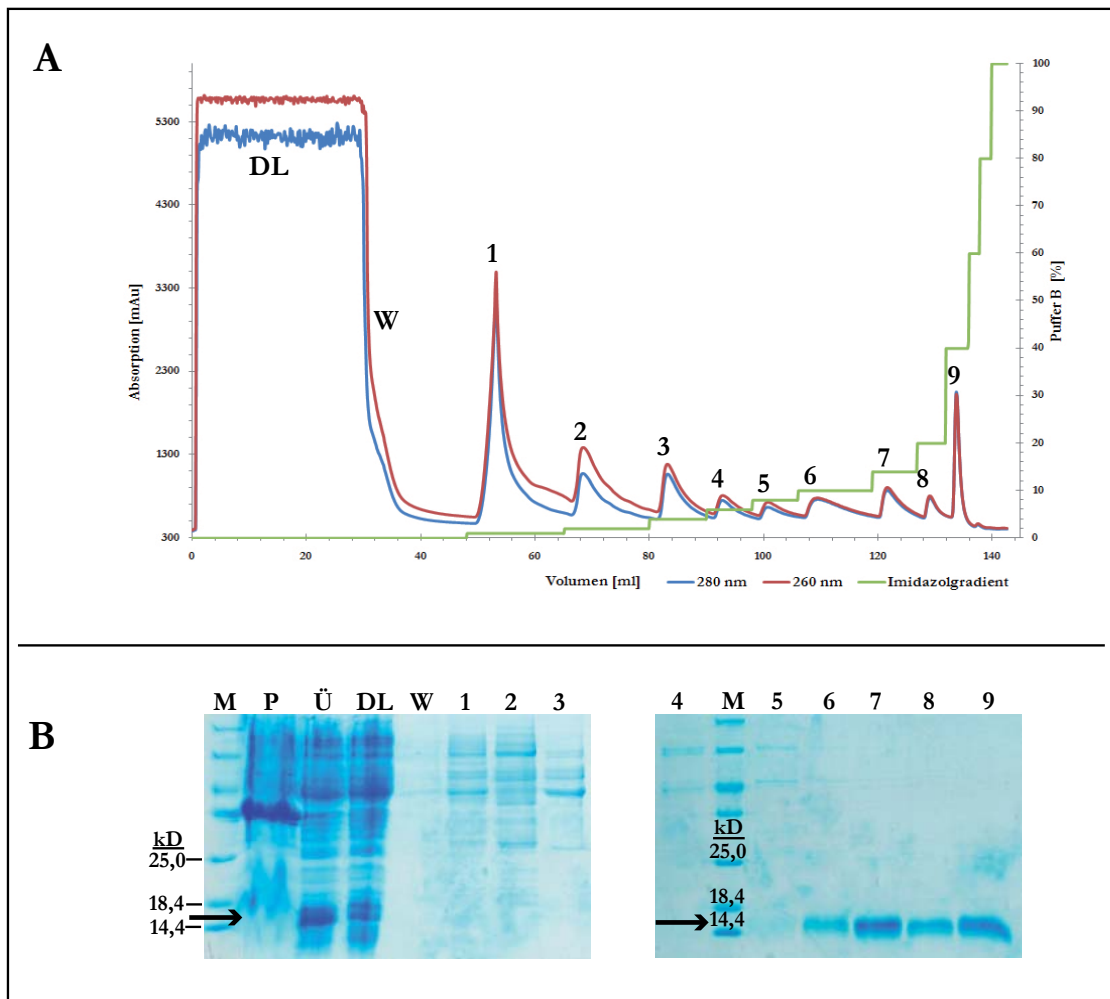


Abbildung 4.6: Reinigung der EGF-like Domäne über Ni-Affinitätschromatographie

A: Elutionsdiagramm der Ni-Affinitätschromatographie der EGF-like Domäne. Die Absorption in mAu ist auf der primären y-Achse, das Volumen in ml auf der x-Achse und der Imidazolstufengradient auf der sekundären y-Achse abgetragen. Der blaue Graph zeigt die detektierte Absorption bei 280 nm, der rote Graph die Absorption bei 260 nm und der grüne Graph den Imidazolstufengradienten.

B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung über Ni-Affinitätschromatographie. Als Größenstandard wurde der unstained Proteinmarker verwendet. Aufgetragen wurden Proben des Pellets (P) und des Überstandes (Ü) nach Ultraschallaufschluss der Bakterien, des Durchlaufs (DL), des Waschschrittes (W), sowie der Fraktionen des Imidazolstufengradienten ((1) 5 mM; (2) 10 mM; (3) 20 mM; (4) 30 mM; (5) 40 mM; (6) 50 mM; (7) 70 mM; (8) 100 mM und (9) 200 mM Imidazol).

4.3.2 Größenausschlusschromatographie

4.3.2.1 Reinigung der EGF-like Domäne mittels Größenausschlusschromatographie

Die aus 4.3.1 erhaltenen Proteinfractionen wurden bis auf das 1,6-fache des Ausgangsvolumens konzentriert. Durch eine anschließende Größenausschlusschromatographie (3.2.2.3.2) sollten mögliche Aggregate, Dimere und Monomere getrennt werden. In Abbildung 4.7 ist das Elutionsdiagramm der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne zu sehen.

4. Ergebnisse

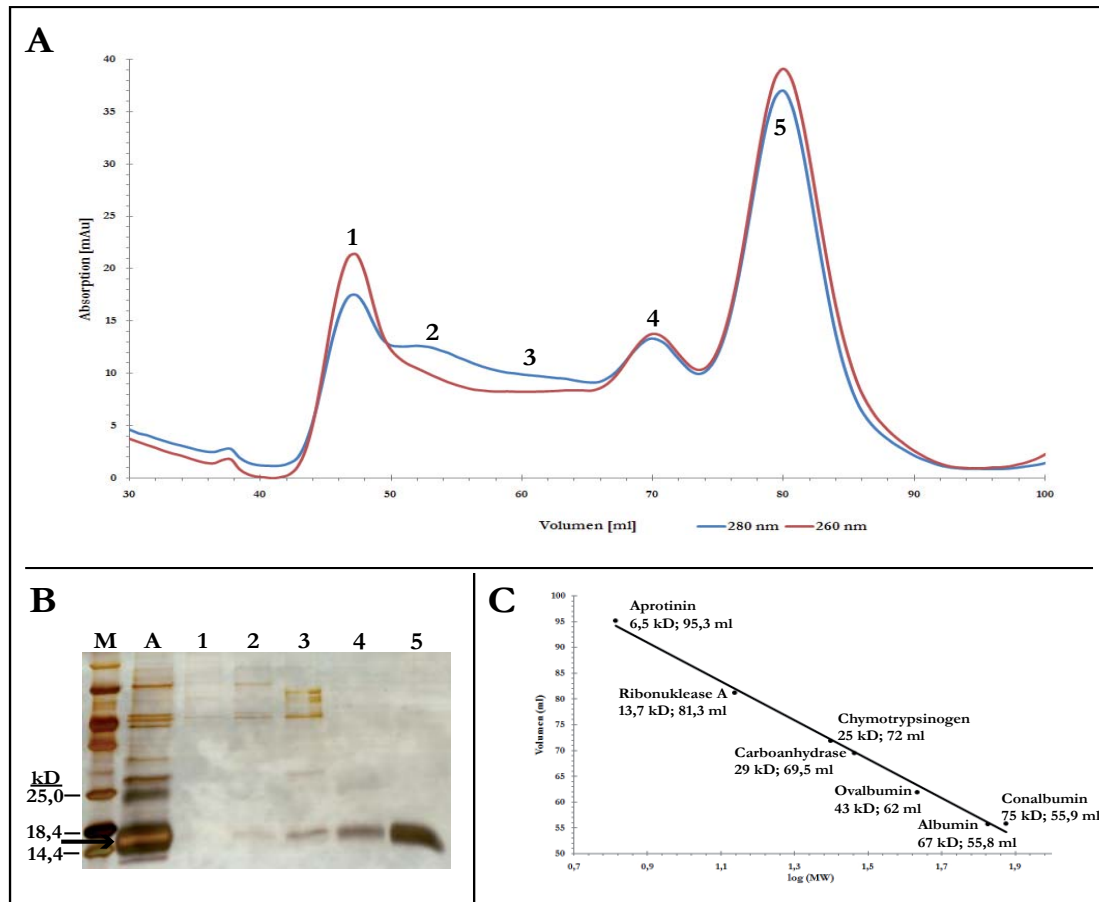


Abbildung 4.7: Reinigung der rekombinanten EGF-like Domäne über Größenausschlusschromatographie

- A: Elutionsdiagramm der Größenausschlusschromatographie der EGF-like Domäne. Auf der y-Achse ist die Absorption in mAu und auf der x-Achse das Retentionsvolumen in ml aufgetragen. Der blaue Graph repräsentiert die detektiert Absorption bei 280 nm und der rote Graph die Absorption bei 260 nm.
- B: SDS-Page-Analyse der Proben der Größenausschlusschromatographie. Dabei wurden als Proben die Proteinlösung (A) sowie die Fraktionen (1 - 5) verwendet. Als Größenstandard kam der unstained Proteinmarker zum Einsatz.
- C: Kalibrierungskurve der Superdex G75 16-60. Die Kalibrierungskurve wurde unter Verwendung des LMW-Kalibrierungskits erhalten. Aufgetragen ist das Retentionsvolumen (y-Achse) gegen den dekadischen Logarithmus der Molmasse der Proteine (x-Achse). Durch lineare Regression wurde eine Ausgleichsgerade mit der Gleichung $f(x) = -37,719x + 124,91$ erhalten. Dabei bezeichnet $f(x)$ das Retentionsvolumen und x den dekadischen Logarithmus der Molmasse.

Nach der Größenausschlusschromatographie wurde mit den fünf Fraktionen eine SDS-PAGE durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den Fraktionen 1 bis 3 Verunreinigungen und in den Fraktionen 4 und 5 die rekombinant exprimierte EGF-like Domäne vorlag (Abbildung 4.7 B). Durch Vergleich mit dem theoretischen Retentionsvolumen des Proteins - berechnet aus der Kalibrierungskurve der Superdex G75 16-60 (Abbildung 4.7 C) - konnte festgestellt werden, dass es sich bei Fraktion 4 um das Dimer und bei 5 um das Monomer des Proteins handelte.

4. Ergebnisse

4.3.2.2 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment der monomeren Fraktion der Größenausschlusschromatographie

Die Fraktion der monomeren Form der EGF-like Domäne wurde im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie für ein 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment verwendet. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich das gewonnene Protein für die folgenden NMR-Experimente eignete. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 4.8 zu sehen. In dem erhaltenen Spektrum war keine Dispersion der Signale zu sehen. Das bedeutet, dass sich in der Proteinlösung Disulfidisomeren und/ oder ungefaltetes Protein befand. Durch diese Mischung kommt es zu einer Überlagerung der Signale der einzelnen Aminosäuren und die Resonanzen der Aminosäuren sind dadurch nicht zu identifizieren. Deshalb war es mit der Probe nach Größenausschlusschromatographie nicht möglich, NMR-Experimente durchzuführen. Um eine weitere Trennung der Disulfidisomeren zu erreichen, wurde eine Gradienten-RP-HPLC durchgeführt.

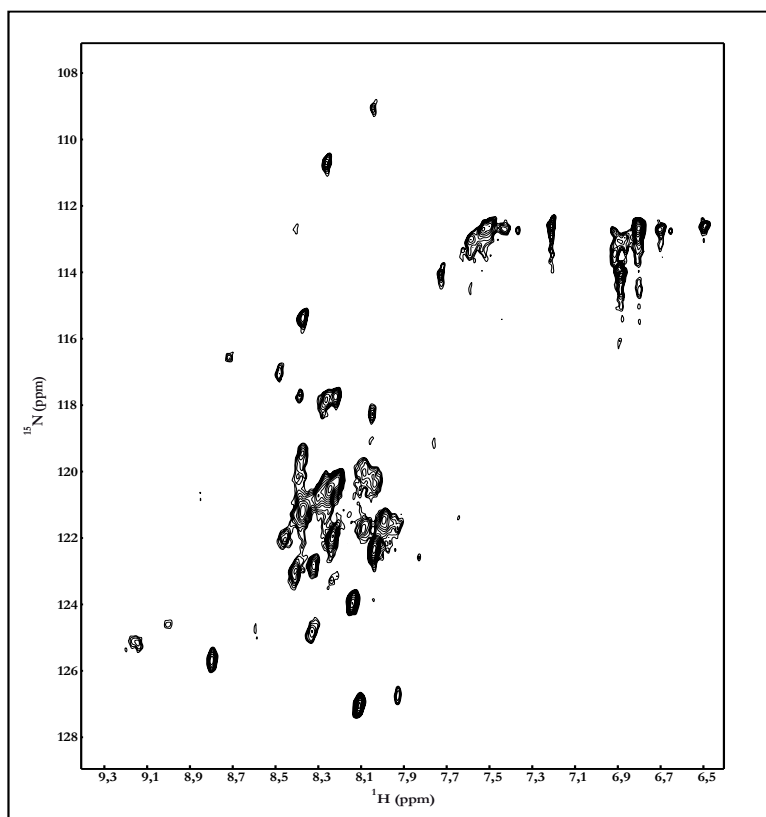


Abbildung 4.8: 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC- Experiment der monomeren Fraktion der EGF-like Domäne nach Größenausschlusschromatographie

Die Signale des Spektrum weisen keine gute Dispersion auf, deshalb war die Probe für NMR-Experimente nicht verwendbar.

4. Ergebnisse

4.3.3 Gradienten-RP-HPLC

4.3.3.1 Reinigung der EGF-like Domäne mittels Gradienten-RP-HPLC

Die Gradienten-RP-HPLC (*Reversed-phase high performance liquid chromatography*) wurde wie unter 3.2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Abbildung 4.9 A zeigt das Elutionsdiagramm der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne. Durch SDS-PAGE-Analyse der vier Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass in allen Fraktionen das rekombinant exprimierte Protein vorhanden war. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde deutlich, dass in den unterschiedlichen Fraktionen verschiedene Isomerenformen des Proteins enthalten waren (Abbildung 4.9 B).

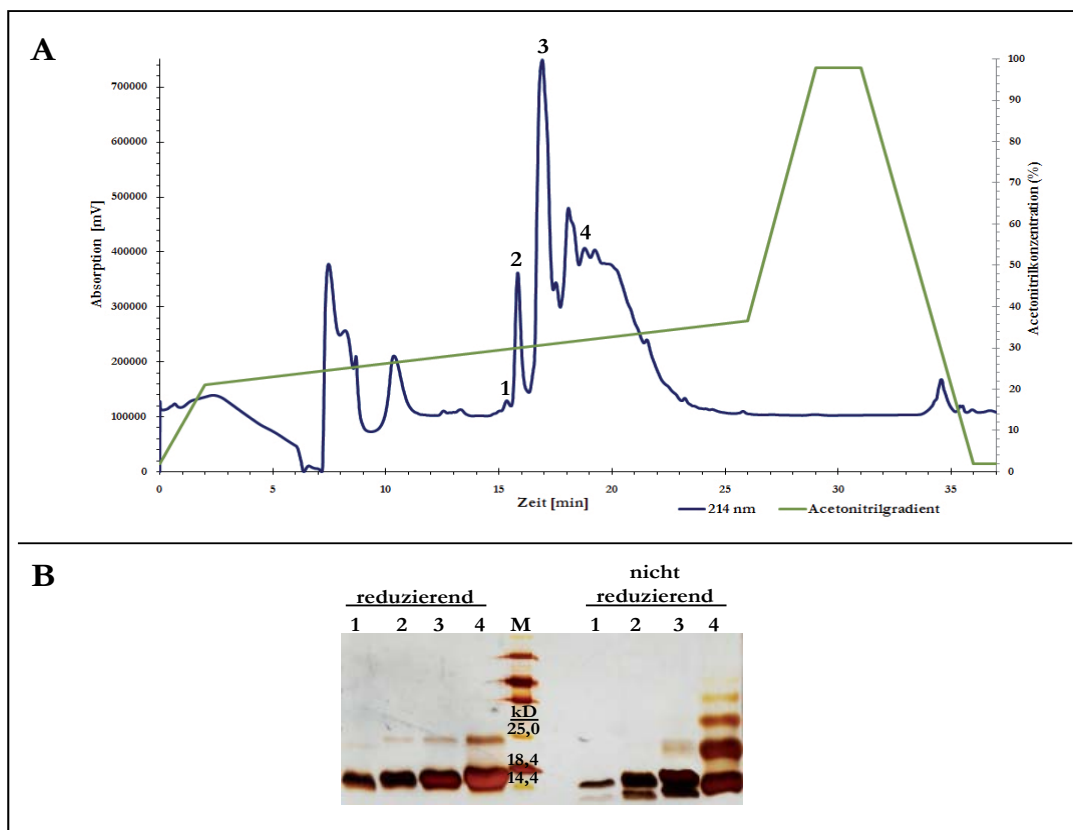


Abbildung 4.9: Reinigung der rekombinanten EGF-like Domäne über Gradienten-RP-HPLC

A: Elutionsdiagramm der Gradienten-RP-HPLC des Proteins. Auf der primären y-Achse ist die Absorption in mV, auf der x-Achse die Zeit in min und auf der sekundären y-Achse der Acetonitrilgradient in % abgetragen. Der blaue Graph zeigt die gemessene Absorption bei 214 nm und der Grüne den Acetonitrilgradienten während der Reinigung.

B: SDS-PAGE-Analyse der Proben der Gradienten-RP-HPLC. Die Proben der Fraktionen (1 – 4) wurden unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Als Größenstandard wurde der unstained Proteinmarker verwendet.

4. Ergebnisse

4.3.3.2 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente der Fraktionen der Gradienten-RP-HPLC

Die erhaltenen Fraktionen der Gradienten-RP-HPLC wurden im Anschluss durch 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente auf ihre Verwendbarkeit für die folgenden NMR-Experimente untersucht. Die Spektren sind in Abbildung 4.10 zu sehen. Dabei zeigte nur Fraktion 2 eine gute Dispersion der erhaltenen Signale, d.h. die Resonanzen der einzelnen Aminosäuren waren voneinander zu trennen. Des Weiteren wurde deutlich, dass sich in der Lösung nur eine Form der EGF-like Domäne befunden hat. Da es sich bei den Isomerenformen der rekombinanten EGF-like Domäne um Disulfidbrückenisomere handeln konnte, wurde ein Ellmann-Test der Isomerenformen von Fraktion 2 durchgeführt. Dieser zeigte, dass in dieser Proteinlösung keine freien Thiolgruppen vorhanden waren. Das bedeutete, dass die fünf möglichen Disulfidbrücken des Proteins geschlossen waren.

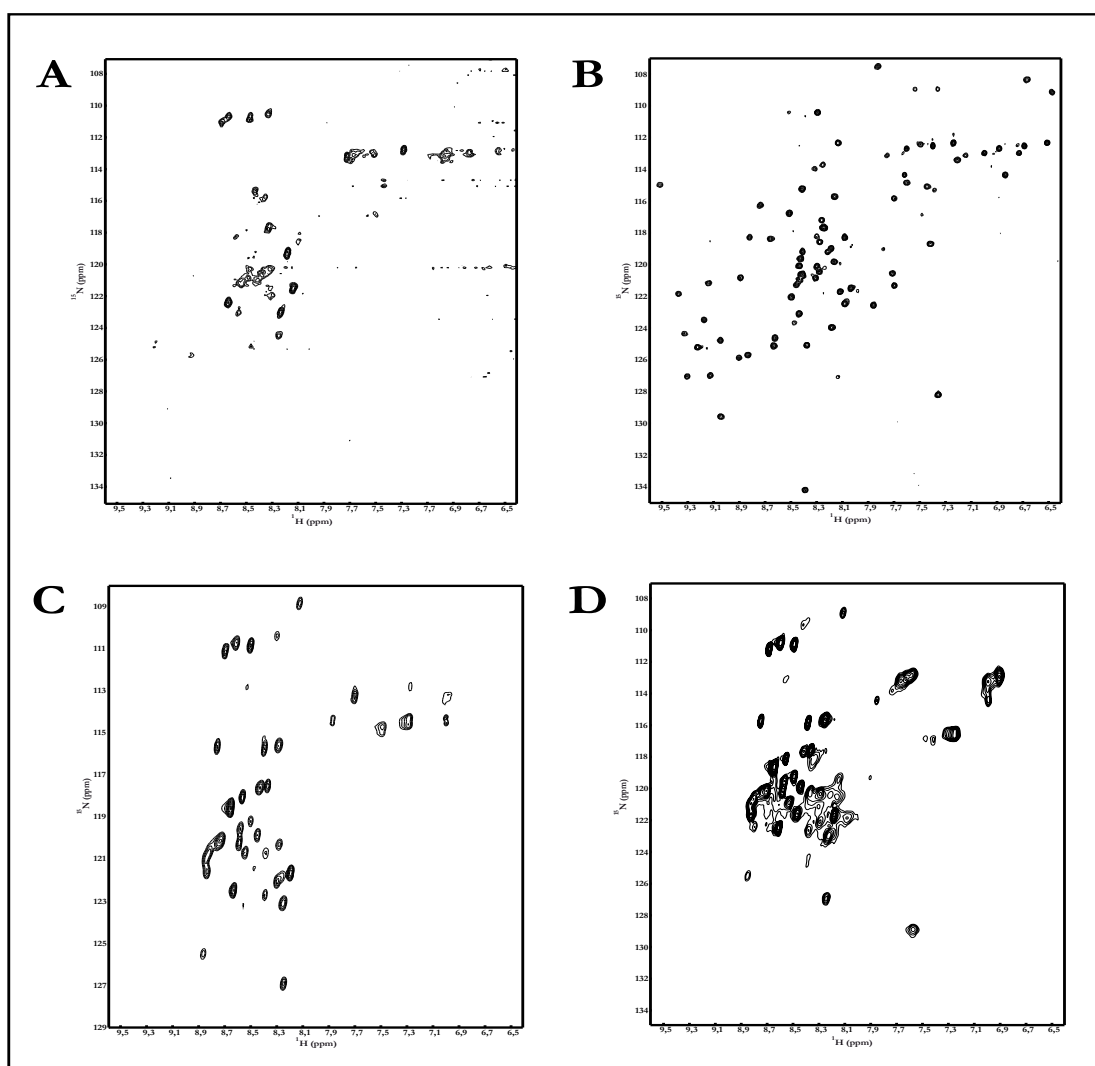


Abbildung 4.10: 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente der Fraktionen der Gradienten-RP-HPLC

Zu sehen sind die Spektren der Fraktionen 1 (A), 2 (B), 3 (C) und 4 (D).

4. Ergebnisse

4.3.3.3 Renaturierung der Isomeren der Fraktionen nach Gradienten-RP-HPLC

Um das rekombinante Protein, welches in den Fraktionen 3 und 4 enthalten war, für die NMR-Experimente nutzbar zu machen, wurde eine Dialyse dieser Proteinfractionen durchgeführt. Durch die Zugabe von 6 M GuHCl wurde das Protein denaturiert. Die Renaturierung erfolgte durch die Zugabe eines Redoxsystems bestehend aus 4 mM red- und 0,4 mM ox-Glutathion. Die Proteinlösungen der Dialysen wurden anschließend über eine Gradienten-RP-HPLC, wie unter 3.2.2.3.3 beschrieben, gereinigt.

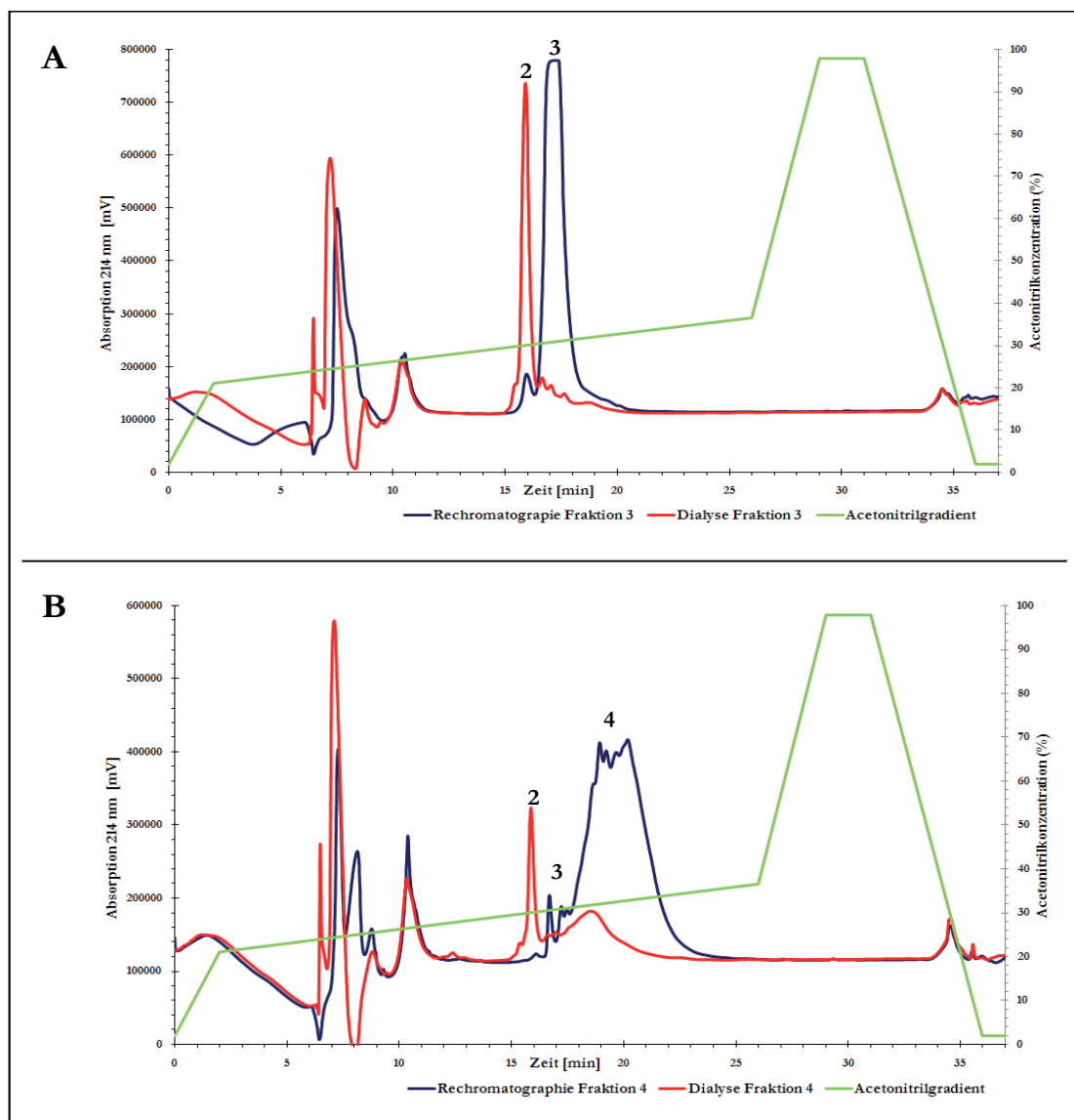


Abbildung 4.11: Gradienten-RP-HPLC der Dialysen der Fraktionen 3 und 4

A: Elutionsdiagramm der Gradienten-RP-HPLC der Dialyse von Fraktion 3. Auf der primären y-Achse ist die Absorption in mV, auf der x-Achse die Zeit in min und auf der sekundären y-Achse der Acetonitrilgradient in % abgetragen. Der blaue Graph zeigt die gemessene Absorption bei 214 nm der Rechromatographie der Fraktion 3, der Rote die Absorption bei 214 nm der Fraktion nach Dialyse und der Grüne den Acetonitrilgradienten während der Reinigung. Die Zahlen geben die Fraktionsnummern der Gradienten-RP-HPLC der rekombinanten EGF-like Domäne (Abbildung 4.9) an.

B: Elutionsdiagramm der Gradienten-RP-HPLC der Dialyse von Fraktion 4.

4. Ergebnisse

In Abbildung 4.11 sind die Elutionsdiagramme der dialysierten Formen der Proteinfractionen, sowie die der Rechromatographien zu sehen. In beiden Fällen zeigten die Rechromatographien der Fraktionen 3 und 4 keine Aufspaltung in die anderen Isomerenformen. Das bedeutet, dass die Trennung der Isomerenformen erfolgreich war und keine Umwandlung in die jeweils andere Form stattfand. Die Elutionsdiagramme der Dialysen zeigten, dass auf diese Weise ca. 90 % der Isomerenformen der Fraktionen 3 und 4 zu der Form der Fraktion 2 umgewandelt werden konnten.

Das erhaltene Protein, nach Dialyse und Gradienten-RP-HPLC, wurde zur Überprüfung der Nutzbarkeit für NMR-Experimente einer Analyse durch 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente unterzogen. Dabei wurden Spektren erhalten, die in ihren Signalen eine vergleichbare Dispersion zu denen im 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der Fraktion 2 in Abbildung 4.10 aufwiesen (Abbildung 4.12). Dadurch wurde gezeigt, dass die Umwandlung der Isomerenformen aus Fraktion 3 und 4 in die in Fraktion 2 befindliche Form erfolgreich war.

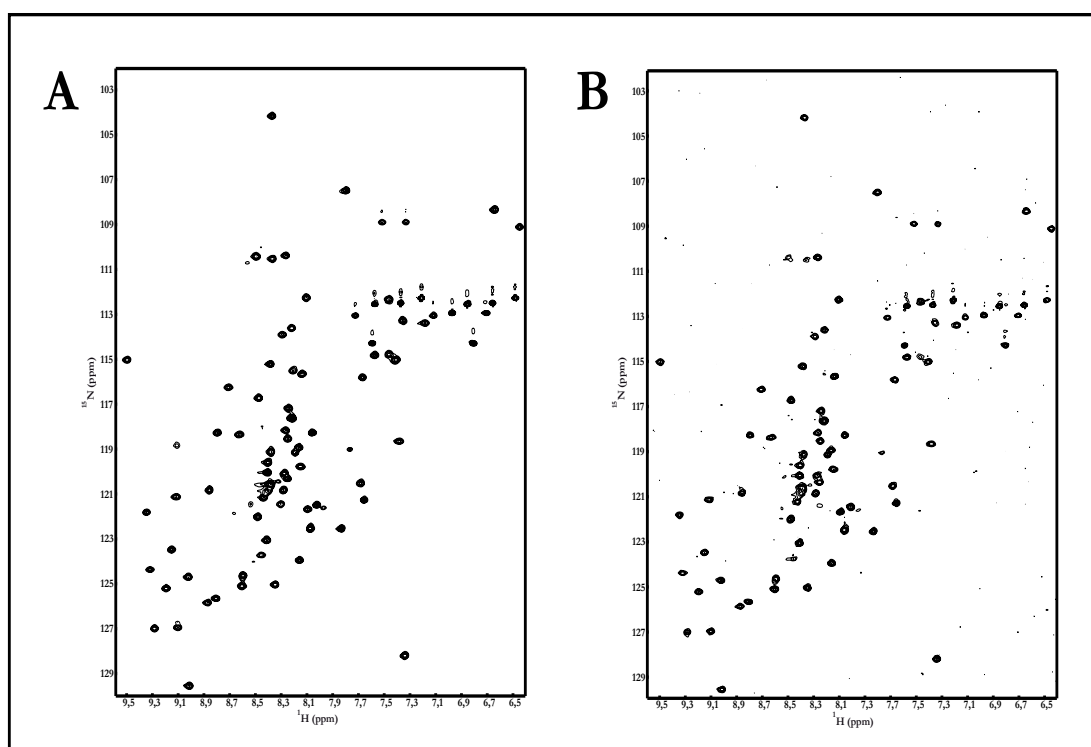


Abbildung 4.12: 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente der dialysierten Fraktionen der RP-HPLC
Zu sehen sind die Spektren der dialysierten Fraktionen 3 (A) und 4 (B).

4. Ergebnisse

4.4 Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Nach der Expression und Reinigung der $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ markierten EGF-like Domäne folgten die NMR-Experimente. Aus den erhaltenen Spektren wurde zunächst mit Hilfe der intraresidualen Signale die sequenzspezifische Zuordnung der Kerne durchgeführt. Im Anschluss wurden die interresidualen Signale für die Aufklärung der Tertiärstruktur des Proteins verwendet.

Das zu untersuchende Protein, bestehend aus 88 Aminosäuren, besaß einen N-terminalen *tag*, der 26 Aminosäuren groß war. Dieser *tag* war aufgrund seiner hohen Flexibilität in den ^{15}N -editierten Spektren nicht bzw. kaum zu detektieren. Daher wurde dieser in die Strukturaufklärung nicht mit einbezogen. Damit bestand die zu analysierende EGF-like Domäne aus 62 Aminosäuren. Diese Aminosäuren wurden nach der Sequenz von ADAM17 von 581 bis 642 benannt. Waren im 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum einzelne Aminosäuren des *tags* sichtbar, bekamen diese negative Zahlen.

4.4.1 Sequenzspezifische Zuordnung der Signale

4.4.1.1 Analyse des 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimentes

Das erste Spektrum, das aus der Fraktion 2 der Gradienten-RP-HPLC gemessen wurde, war das 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Dabei zeigten die Spektren eine gute Dispersion, d.h. die Resonanzen zeigten keine Überlagerungen. Das bedeutete, dass in der Proteinlösung eine Disulfidisomerenform enthalten und das Protein gefaltet war.

Die Signale dieses Spektrums repräsentieren dabei die Resonanzen der Amidgruppe einer jeden Aminosäure. Diese entstehen durch eine Kopplung der Resonanzfrequenzen des Amidstickstoffs (^{15}N) mit der des gebundenen Amidprotons ($^1\text{H}_{\text{N}}$). In diesem Spektrum treten von allen Aminosäuren Signale auf, mit Ausnahme der Proline, da diese keine Amidprotonen besitzen. Zusätzlich können Resonanzen der Asparagin-, Glutamin- sowie der Tryptophanreste auftreten.

In Abbildung 4.13 ist das 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der EGF-like Domäne von ADAM17 dargestellt. Die Zusammenfassung der sequenzspezifischen Zuordnung, die unter

4. Ergebnisse

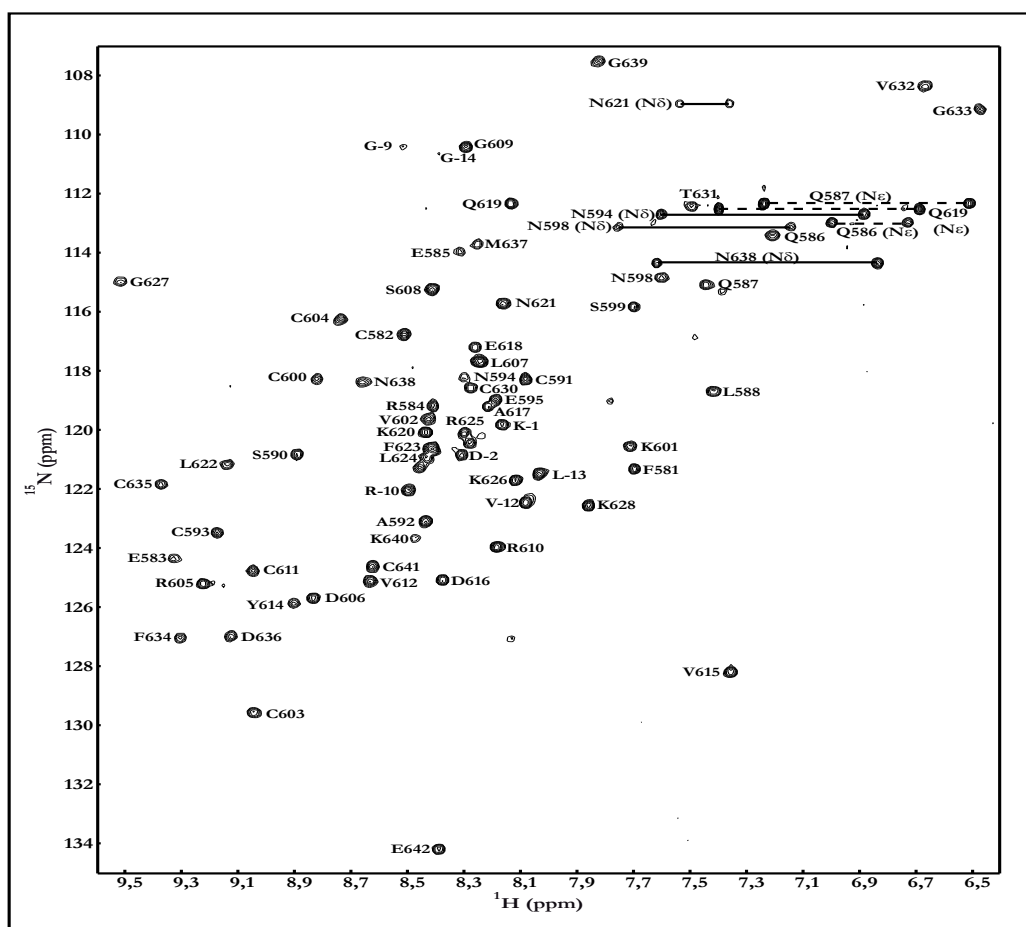


Abbildung 4.13: 2D-¹H¹⁵N-HSQC der EGF-like Domäne

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Dabei sind sie nach ihrer natürlich vorkommenden Sequenz nummeriert. Aminosäuren des *tags* sind mit negativen Zahlen versehen. Die Signale der Asparaginereste sind mit durchgezogenen und die der Glutaminreste mit gestrichelten Linien dargestellt.

Verwendung der folgenden Spektren gewonnen wurde, ist dort zu sehen: 3D-¹H¹⁵N-HN-CACB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)CACB, 3D-¹H¹⁵N-HNHAHB, 3D-¹H¹⁵N-HN(CO)HAHB, 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹H editiert und 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹³C editiert. Es konnten im 2D-¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum insgesamt 91 Signale den Aminosäuren des Fusionskonstruktes der EGF-like Domäne zugeordnet werden. Unter diesen zugeordneten Resonanzen befanden sich sechs, die aus dem *tag* des Fusionskonstruktes stammten. Die vier Asparaginereste und drei Glutaminreste ergaben jeweils zwei zusätzliche Signale auf gleicher ¹⁵N-Ver-schiebung. Diese wurden im Spektrum mit durchgezogenen Linien für Asparaginereste und gestrichelten Linien für Glutaminreste verbunden. In der Sequenz der EGF-like Domäne konnten die folgenden Aminosäuren nicht zugeordnet werden: E589, T596 und D597.

4. Ergebnisse

4.4.1.2 Bestimmung des sequenziellen Assignments

Die im 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Abbildung 4.13) dargestellte Zusammenfassung der sequenzspezifischen Zuordnung wird im Folgenden für die Aminosäureabfolge -L607-S608-G609-R610-C611- erläutert. Für die Zuordnung der Signale und der Identifizierung der dazugehörigen Aminosäurereste, wurden zunächst die Spektren 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB verwendet. In diesen Spektren waren die Signale der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atome der Seitenketten der Aminosäuren der EGF-like Domäne, außer der Proline, zu sehen. Dabei wies das 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB-Spektrum sowohl Signale der Aminosäure (i) auf, die im 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum auf dieser HN-Frequenz identifiziert wurde, als auch die der Aminosäure (i-1), die sich N-terminal zu dieser befand. Diese Aminosäure wurde als Vorläuferaminosäure (i-1) bezeichnet.

Die Identifizierung der Resonanzen der Vorläuferaminosäure erfolgte über das 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB-Spektrum. In diesem Spektrum waren nur die Signale der Vorläuferaminosäure sichtbar. Diese befanden sich im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB-Spektrum auf der Amid-Stickstofffrequenz und der Amidprotonenfrequenz der Aminosäure (i), die aus dem 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB-Spektrum erhalten worden waren.

Die Identifizierung der Resonanzen der Vorläuferaminosäure ist in Abbildung 4.14 am Beispiel des S608 dargestellt. Der Ausschnitt des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB-Spektrums wies vier Signale auf. Dabei repräsentierten die schwarzen Resonanzen die $\text{C}\alpha$ - und die roten die $\text{C}\beta$ -Atome der Aminosäurereste. Im Vergleich der vier Signale fällt auf, dass zwei davon eine deutlich geringere Intensität aufwiesen. Diese Resonanzen konnten durch Analyse des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB-Spektrums der Vorläuferaminosäure (i-1) zugeordnet werden. Die Signale der Aminosäure (i) wiesen charakteristische Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atome auf. Dabei lag das des $\text{C}\beta$ -Atoms oberhalb des $\text{C}\alpha$ -Atoms, was typisch für Serin- oder Threoninreste ist.

4. Ergebnisse

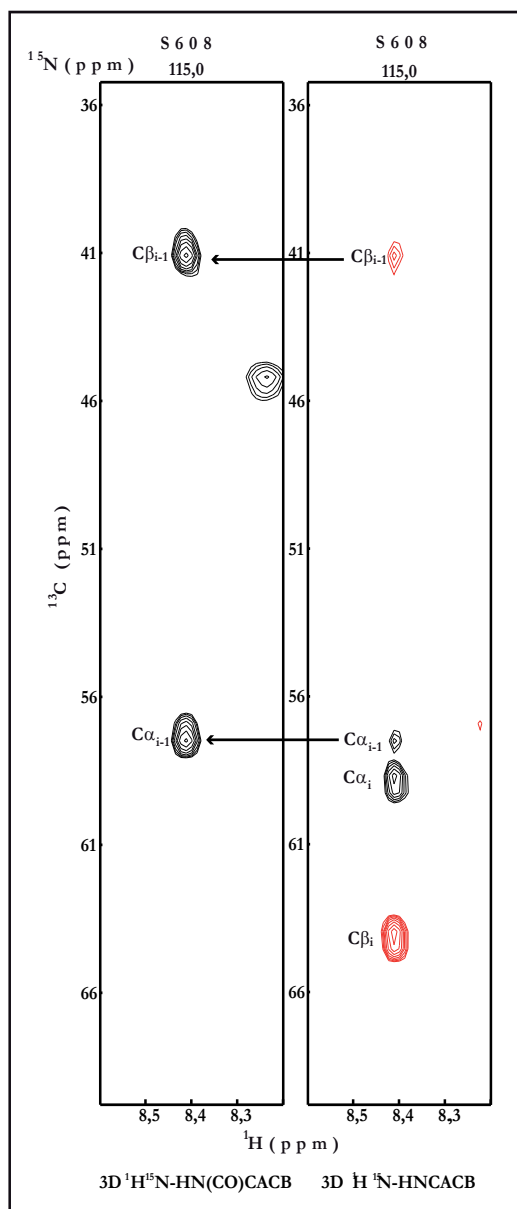


Abbildung 4.14: Identifizierung der Vorläuferamino-säure im $3\text{D-}^1\text{H}^{15}\text{N-HNCACB}$ -Spektrum

In dem linken Rechteck ist ein Ausschnitt des $3\text{D-}^1\text{H}^{15}\text{N-HN(CO)CACB}$ - und im Rechten einer des $3\text{D-}^1\text{H}^{15}\text{N-HNCACB}$ -Spektrums dargestellt. Der dargestellte Ausschnitt wird durch die Amid-Stickstofffrequenz, die sich oberhalb der Rechtecke befindet, definiert. Die Signale der $\text{C}\alpha$ -Atome sind schwarz und die der $\text{C}\beta$ rot dargestellt. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der beiden Spektren.

Um die Aminosäure zu identifizieren, die auf das Serin/ Threonin folgte, wurden nun die Signale dieser Aminosäure (i) in dem $3\text{D-}^1\text{H}^{15}\text{N-HNCACB}$ -Spektrum gesucht. Die Resonanzen der vorher identifizierten Aminosäure wurden in diesem Spektrum bei einer Amid-Stickstofffrequenz von 110,5 ppm identifiziert (Abbildung 4.15, zweiter Ausschnitt). Dabei fiel auf, dass die darauf folgende Aminosäure ($i+1$) nur ein $\text{C}\alpha$ -Signal aufwies. Dies ist charakteristisch für ein Glycinrest. Durch den Vergleich mit der Aminosäuresequenz der EGF-like Domäne wurde deutlich, dass es sich bei der vorher bestimmten Aminosäure um ein Serin handeln musste, da die Sequenz nur eine Abfolge eines Glycins nach einem Serin und nicht nach einem Threonin aufweist.

4. Ergebnisse

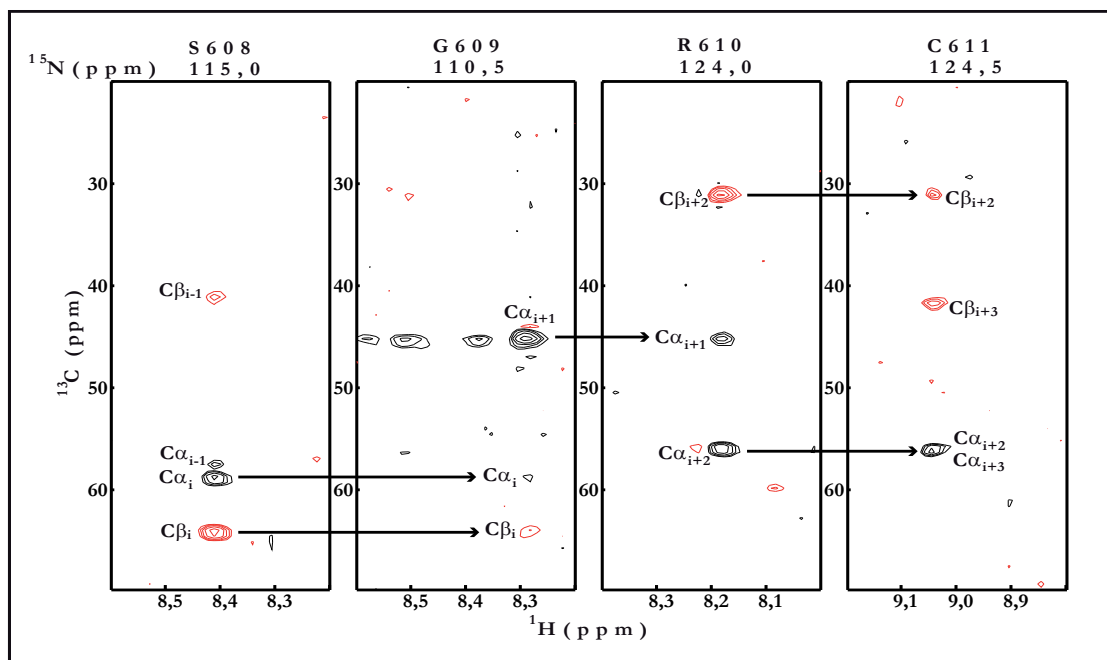


Abbildung 4.15: Identifizierung der Signale der benachbarten Aminosäuren im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN-CACB-Spektrum

Die Rechtecke repräsentieren Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB-Spektrums. Der dargestellte Ausschnitt wird durch die Amid-Stickstofffrequenz, die sich oberhalb der Rechtecke befindet, definiert. Die Signale der C β -Atome sind rot und die C α -Signale schwarz dargestellt. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der vier benachbarten Aminosäuren.

Im Anschluss wurden die auf das Glycin folgenden Aminosäuren, ein Argenin und ein Cystein, identifiziert. Im letzten Ausschnitt des Cysteins (124,5 ppm) konnten die Signale der Vorläuferaminosäure, dem Argenin, und die des Cysteins selbst im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN-CACB-Spektrum nur unter Vergleich mit dem 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB-Spektrum eindeutig bestimmt werden, da die Signale der C α -Atome übereinander lagen. Auf die gleiche Art und Weise wurde die sequenzielle Zuordnung für die EGF-like Domäne von ADAM17 durchgeführt.

Zur Verifizierung der sequenziellen Zuordnung wurden die 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB- und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)HAHB-Spektren verwendet. Diese Spektren wiesen Signale der H α - und H β -Atome der Seitenketten der Aminosäuren auf. Das 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)HAHB-Spektrum zeigte Resonanzen der Vorläuferaminosäure (i-1) und das 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB-Spektrum Signale der Vorläuferaminosäure (i-1) und der Aminosäure (i). Durch Vergleich der beiden Spektren konnten die Resonanzen der Vorläuferaminosäure (i-1) in dem 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB-Spektrum identifiziert werden.

4. Ergebnisse

Das Vorgehen ist in Abbildung 4.16 für die Aminosäure G609 zu sehen. Die Resonanzen des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB-Spektrums wurden für die $\text{H}\alpha$ -Atome schwarz und für die $\text{H}\beta$ -Atome rot dargestellt. Die Resonanzen der Aminosäure (i) wurden in diesem Ausschnitt rot dargestellt. Dieses Muster ist charakteristisch für die $\text{H}\alpha_1$ und $\text{H}\alpha_2$ -Atome eines Glycinrestes. Dadurch konnte diese Aminosäure als G609 identifiziert werden.

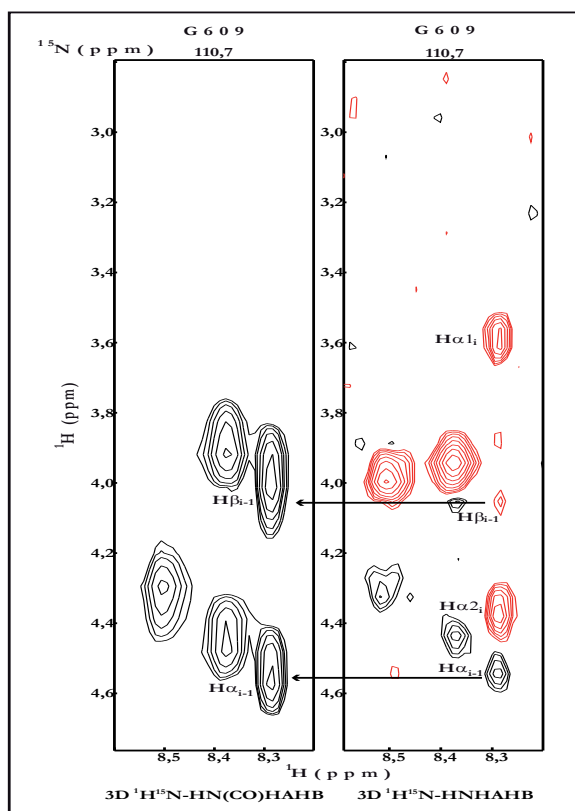


Abbildung 4.16: Identifizierung der Vorläufer-aminosäure im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB-Spektrum

In dem linken Rechteck ist ein Ausschnitt des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)HAHB- und im rechten Rechteck einer des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB-Spektrums dargestellt. Der gezeigte Ausschnitt wird durch die Amid-Stickstofffrequenz, die sich oberhalb der Rechtecke befindet, definiert. Die Signale der $\text{H}\alpha$ -Atome sind schwarz und die der $\text{H}\beta$ -Atome rot dargestellt. Dabei bilden nur die $\text{H}\alpha$ -Resonanzen der Glycinreste eine Ausnahme, da die Resonanzen rot dargestellt sind ($\text{H}\alpha_1$ und $\text{H}\alpha_2$). Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der beiden Spektren.

4.4.1.3 Zuordnung der Aminosäurereste

Um die Zuordnung der Signale der 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNCACB-, 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB, 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HNHAHB- und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)HAHB-Spektren zu den jeweiligen Aminosäuren eindeutig treffen zu können, wurden die 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^{13}C -editierten- und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H -editierten-Spektren verwendet. In diesen Spektren wurden bei langkettigen Aminosäuren die Resonanzen der $\text{C}\alpha$ bis $\text{C}\delta$ -Atome (3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^{13}C editiert) und $\text{H}\alpha$ bis $\text{H}\epsilon$ -Atome (3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H editiert) der Seitenketten sichtbar.

In Abbildung 4.17 sind die Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^{13}C -editierten Spektrens und in Abbildung 4.18 die des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H -editierten-Spektrums zu sehen. Die ersten Rechtecke zeigen die Signale für das S608. Die Kohlenstofffrequenzen

4. Ergebnisse

wiesen vergleichbar zu dem $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HC(CO)CACB}$ -Spektrum die charakteristische Verschiebung eines Serinrestes auf. Da im $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HC(CO)NH-}^1\text{H}$ -editierten-Spektrum das Signal des $\text{H}\alpha$ -Atoms nicht zu sehen war, konnten nur die $\text{H}\beta$ -Atome für den Vergleich mit einbezogen werden. Die Verschiebungen der $\text{H}\beta$ -Atome lagen im Bereich von 3,6 und 3,7 ppm. Diese Signale sind spezifisch für einen Serinrest und somit konnte die Zuordnung der Aminosäure auch in diesem Spektrum verifiziert werden. Die beiden danach folgenden Ausschnitte der Spektren zeigen die Signale des G609. Da in Abbildung 4.17 nur ein $\text{C}\alpha$ -Signal im Bereich von 45 ppm zu sehen war, konnte in diesem Spektrum das Glycin durch diese typische Verschiebung identifiziert werden. In Abbildung 4.18 waren zwei Resonanzen bei 3,6 und 4,3 ppm zu sehen. Die Signale waren charakteristisch für die $\text{H}\alpha_1$ - und $\text{H}\alpha_2$ -Atome eines Glycins. In den danach folgenden Ausschnitten waren in beiden Abbildungen Resonanzen zu sehen, die in den $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HN(CO)CACB}$ - und $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HN(CO)HAHB}$ -Spektren nicht auftraten. Diese zusätzlichen Signale deuteten auf eine Aminosäure mit einer längeren Seitenkette hin.

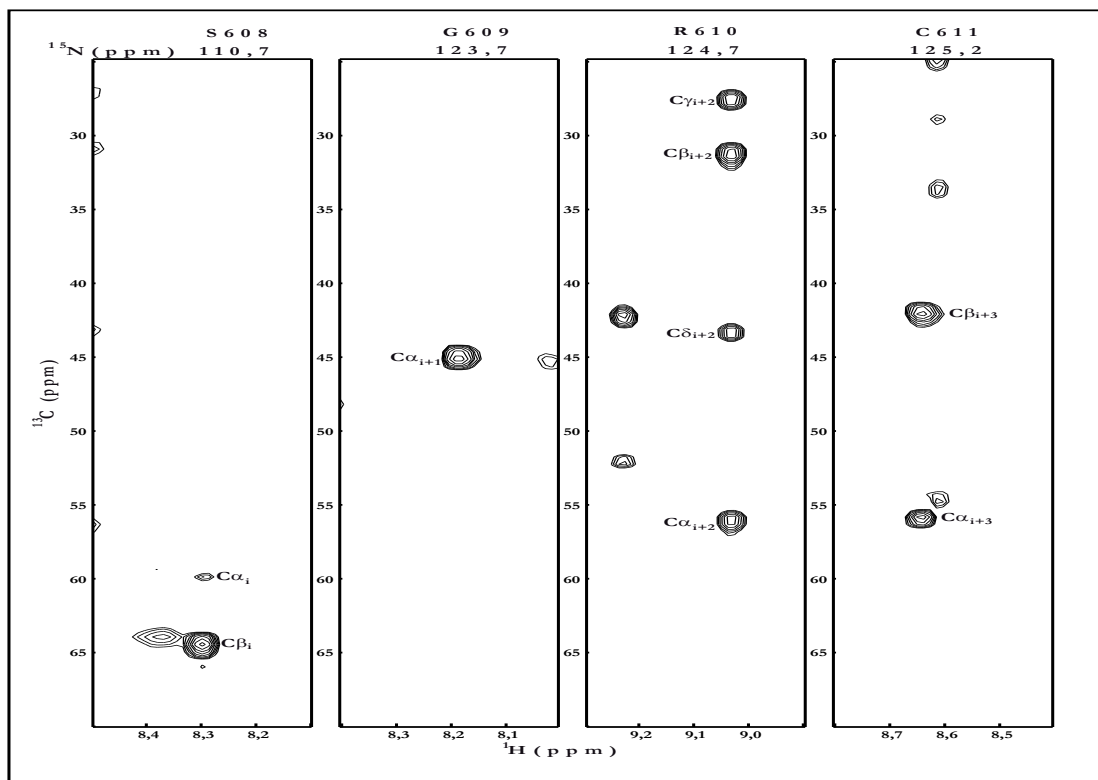


Abbildung 4.17: Zuordnung der Signale der Aminosäuren der Abfolge S608 bis C611 der EGF-like Domäne im $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HC(CO)NH-}^{13}\text{C}$ -editierten-Spektrum

Dargestellt sind Ausschnitte des $3D\text{-}^1\text{H}^{15}\text{N}\text{-HC(CO)NH-}^{13}\text{C}$ -editierten-Spektrens, die die Signale der Seitenketten der Aminosäuren der $\text{C}\alpha$ bis $\text{C}\delta$ -Atome zeigen. Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist.

4. Ergebnisse

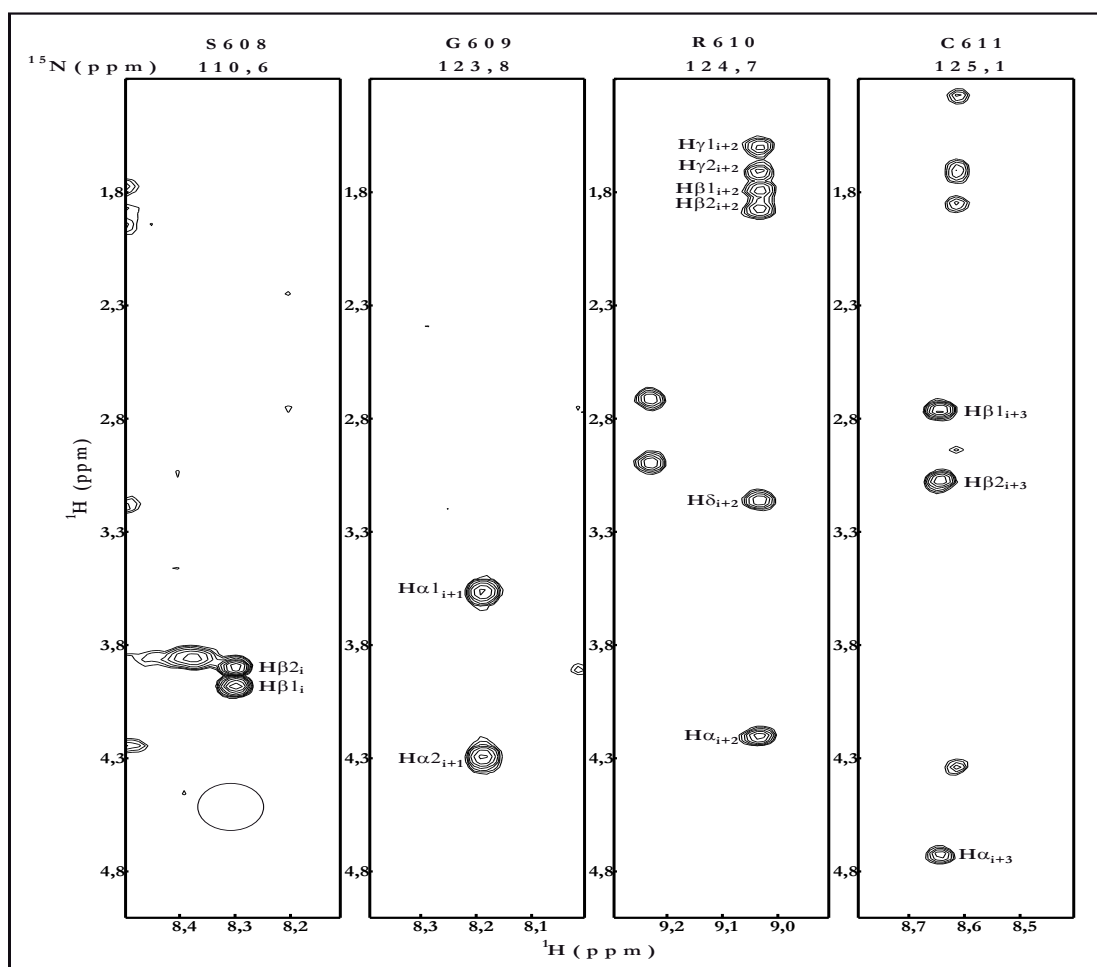


Abbildung 4.18: Zuordnung der Signale der Aminosäuren der Abfolge S608 bis C611 der EGF-like Domäne des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H -editierten-Spektrums

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H -editierten-Spektrums, die die Signale der Seitenketten der Aminosäuren der $\text{H}\alpha$ bis $\text{H}\delta$ -Atome zeigen. Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist. Der Kreis markiert die Position des $\text{H}\alpha$ -Signals des S608, das in diesem Spektrum nicht zu sehen war.

Durch Analyse der Signale der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome konnten die Verschiebungen einem Argininrest zugeordnet werden. Somit konnte das R610 in diesen Spektren verifiziert werden.

In den letzten Ausschnitten der Abbildungen 4.17 und 4.18 lagen die Resonanzen in vergleichbaren Bereichen wie in den 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)CACB- und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HN(CO)HAHB-Spektren. Es traten keine weiteren Signale auf. Dadurch konnte auch das C611 eindeutig identifiziert werden. Die sequenzielle Zuordnung der Signale wurde in vergleichbarer Art für alle 62 Aminosäuren der rekombinanten EGF-like Domäne von ADAM17 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.4.2 Auswertung der NOESY-Experimente

Die Strukturinformationen der EGF-like Domäne von ADAM17 wurden aus den NOESY-Experimenten, dem 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY und dem 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY, gewonnen. In den NOESY-Experimenten werden Kreuzsignale zwischen ^1H -Atomen sichtbar, die sich in einem Abstand bis zu 5 Å voneinander entfernt befinden. Diese Kopplung entsteht durch den *Nuclear-Overhauser-Effekt* (NOE). Somit sind in diesen Experimenten zusätzlich zu den intraresidualen auch interresiduale Signale zu beobachten. Die intraresidualen Signale beziehen sich auf Interaktionen innerhalb der Aminosäure (i). Die interresidualen Resonanzen entstehen durch die Interaktionen von Aminosäuren untereinander. Dabei können diese sich in ihrer Sequenz in unmittelbarer Nähe (Aminosäure (i-1)) oder weit voneinander entfernt befinden. Diese kommen aufgrund der Faltung des Proteins in eine räumliche Nähe zueinander. Die interresidualen Resonanzen werden in sequenzielle, medium-, und long-range Kontakte unterschieden. Der Abstand der sequenziellen Kontakte liegt in dem Bereich (i-1) bzw. (i+1), während die medium-range Resonanzen Interaktionen über eine Entfernung von (i+2) bis (i+4) bezeichnen. Erst bei einer weiteren Entfernung werden die Kontakte long-range genannt.

4.4.2.1 Auswertung des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Experimentes

Im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Experiment, welches zur Zuordnung der Signale in den NOESY-Experimenten verwendet wurde, waren die Resonanzen der Protonen der Aminosäure (i) zu sehen. In einem ersten Schritt wurde die vorher durchgeführte sequenzielle Zuordnung auf das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Spektrum übertragen. Abbildung 4.19 zeigt die Resonanzen der Aminosäuresequenz -L607-S608-G609-R610-C611-. Durch den Vergleich dieses Spektrums mit dem 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HC(CO)NH- ^1H -editierten-Experiment (Abbildung 4.18) konnten die Zuordnungen der Aminosäuren verifiziert werden. Zusätzlich tauchten die Signale des $\text{H}\alpha$ -Atoms des S608 auf. Die sequenzielle Zuordnung wurde vom 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Spektrum auf das 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrum übertragen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4.20 am Beispiel des R584 und des L588 zusehen. Die Resonanzen der $\text{H}\delta$ -Atome des Leucins wurden zusätzlich hinzugefügt. Diese wurden durch den Vergleich mit dem 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrum identifiziert.

4. Ergebnisse

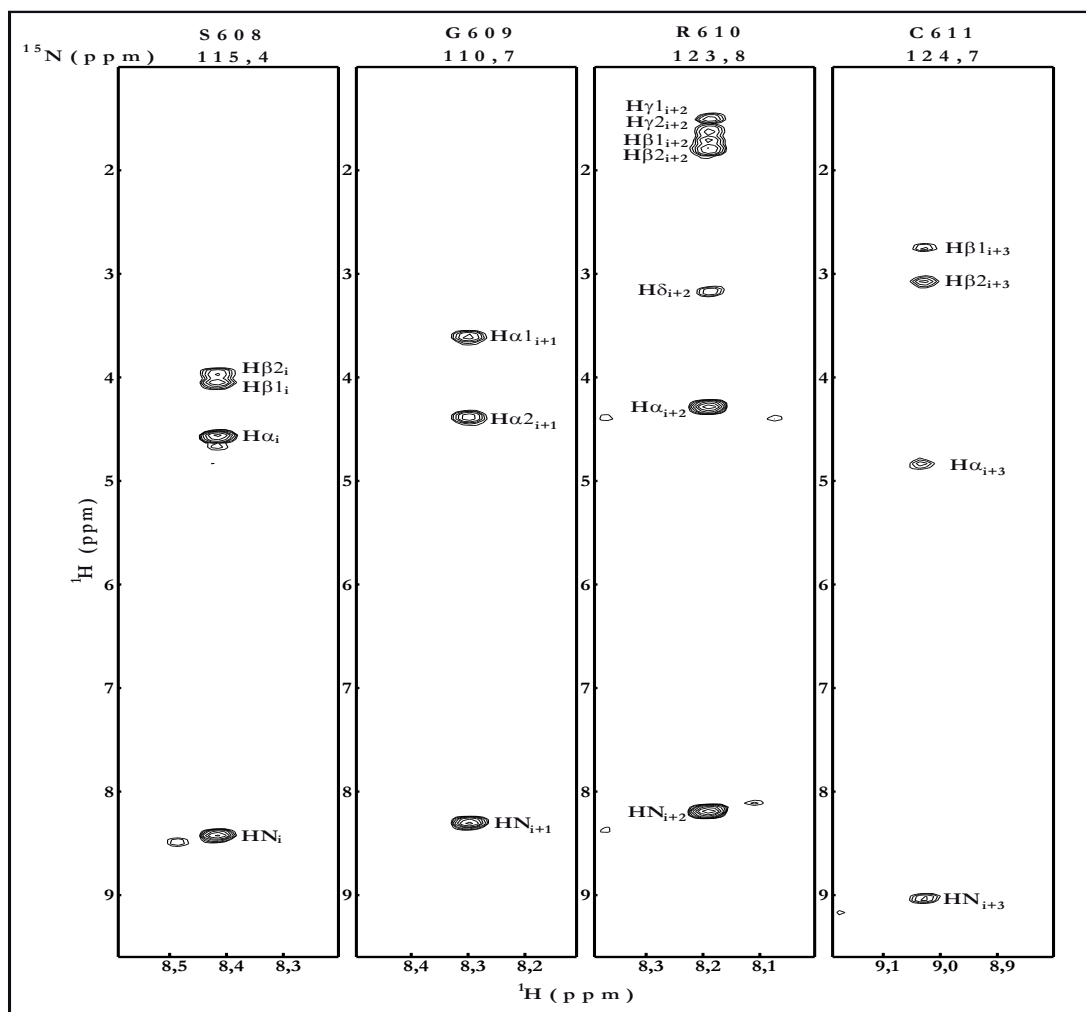


Abbildung 4.19: Zuordnung der Signale der Aminosäuren der Abfolge S608 bis C611 der EGF-like Domäne im 3D- ^1H - ^{15}N -TOCSY-Spektrum

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- ^1H - ^{15}N -TOCSY-Spektrums, die die Signale der Seitenketten der Aminosäuren der $\text{H}\alpha$ bis $\text{H}\delta$ -Atome zeigen. Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist.

4. Ergebnisse

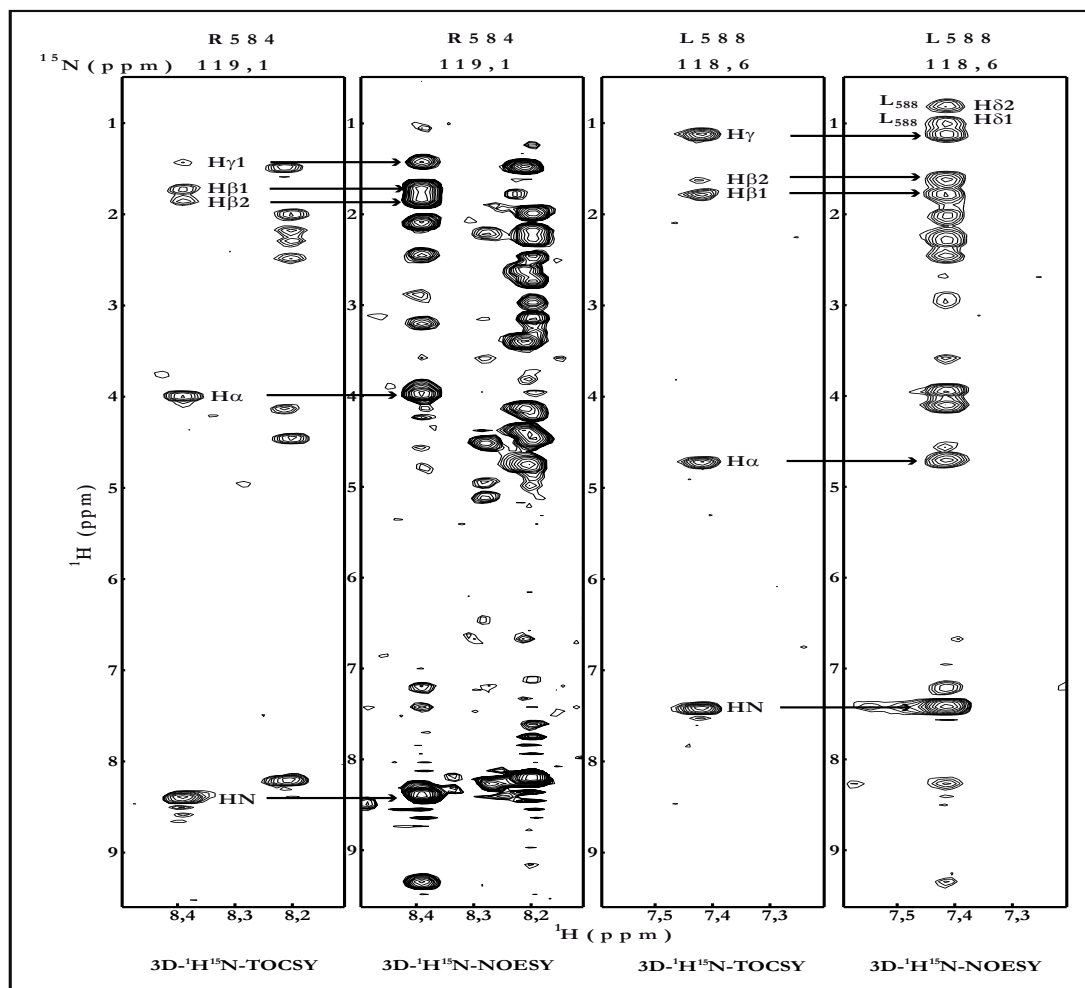


Abbildung 4.20: Zuordnung der Signale der Aminosäuren R584 und L588 im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrum

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Spektrums (linke Rechtecke der jeweiligen Aminosäure) und die des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrums (rechte Rechtecke). Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der beiden Spektren.

Nach der Zuordnung der intraresidualen Signale wurden die interresidualen Signale zugeordnet. Dabei konnten im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrum Interaktionen der Protonen der Seitenketten mit Amidprotonen, sowie die der Amidprotonen untereinander, detektiert werden. In Abbildung 4.21 wird die Zuordnung der sequenziellen Kontakte der Aminosäure ($i-1$) durch die Pfeile dargestellt. Im Falle des Signals des Amidprotons des E587 und des $\text{H}\alpha$ -Atoms des Q583 lagen diese Resonanzen mit denen der Aminosäure (i) übereinander.

4. Ergebnisse

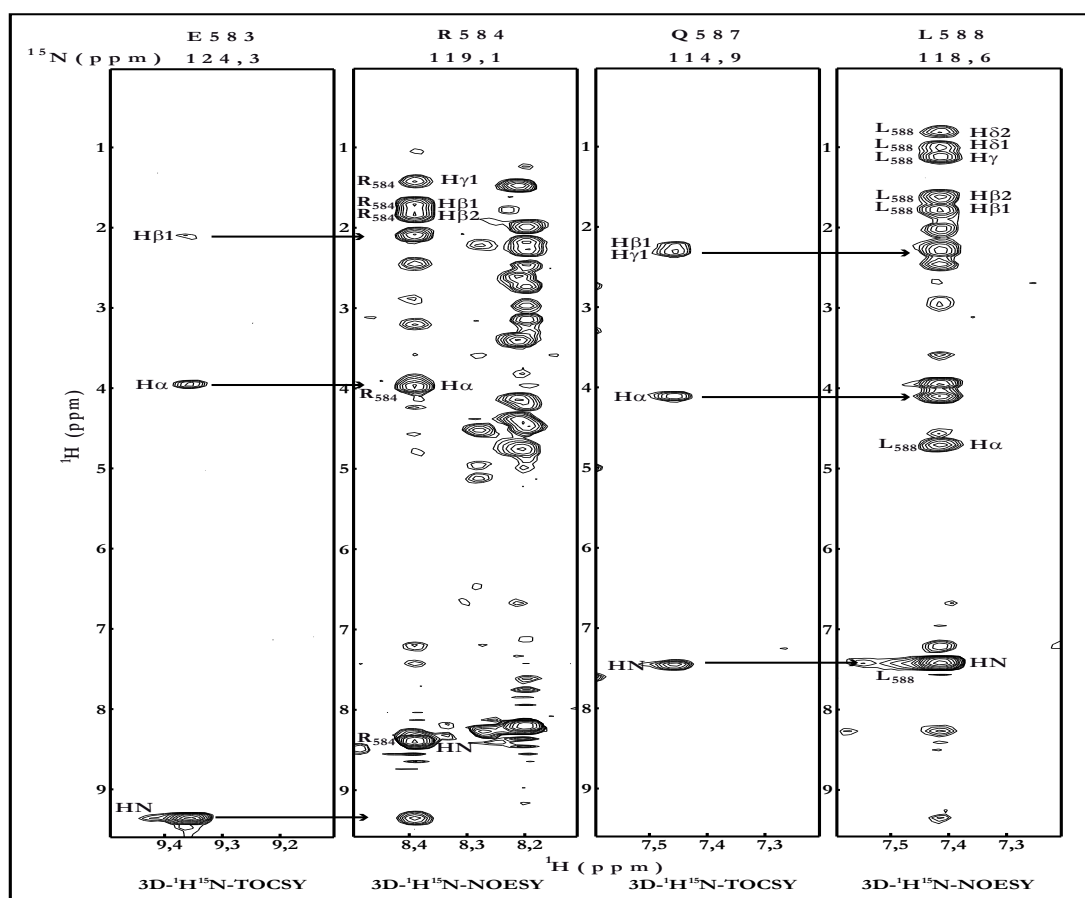


Abbildung 4.21: Zuordnung der sequenziellen Signale der Aminosäuren R583 und L588 im 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrum

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Spektrums (linke Rechtecke der jeweiligen Aminosäure) und die des 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrums (rechte Rechtecke). Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der beiden Spektren. Die bereits zugeordneten Resonanzen sind mit den jeweiligen Positionen der Aminosäure und der jeweiligen Bezeichnung der H-Atome gekennzeichnet.

Im Anschluss wurden die medium- und long-range Kontakte identifiziert. Dazu wurde nach Kreuzsignalen zwischen zwei Protonen gesucht. Diese entstehen wenn die Spinsysteme zweier Atome interagieren. In Abbildung 4.22 sind die Kreuzsignale der Amidprotonen der Aminosäuren F634 und E642 zu sehen.

Auf die gleiche Weise wurden die interresidualen Interaktionen zwischen den Amidprotonen selbst und den Protonen der Seitenketten für die 62 Aminosäuren der EGF-like Domäne bestimmt.

4. Ergebnisse

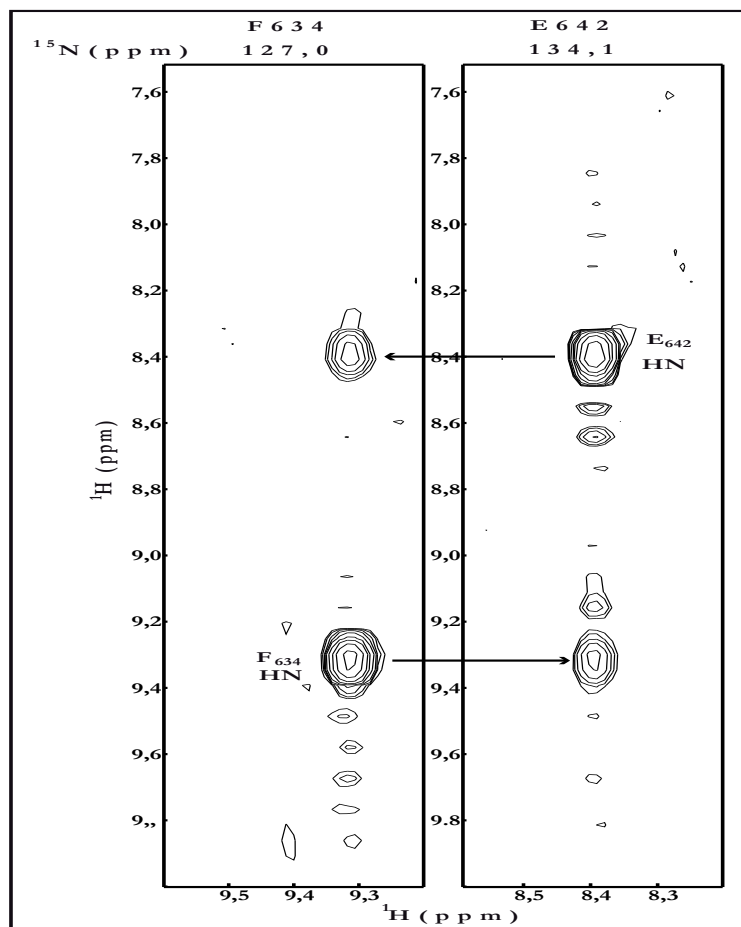


Abbildung 4.22: Zuordnung der Kreuzsignale der Amidprotonen im 3D-¹H¹⁵N-NOESY-Spektrum
Dargestellt sind Ausschnitte des 3D-¹H¹⁵N-NOESY-Spektrums der Aminosäuren F634 und E642. Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz, die oberhalb der Rechtecke zu sehen ist. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der beiden Spektren.

4.4.2.2 Auswertung des 3D-¹H¹³C-NOESY-Experimentes

Um weitere Informationen über die Struktur des Proteins zu erhalten, wurden die Interaktionen der Protonen der Aminosäureketten untereinander hinzugefügt. Diese konnten aus dem 3D-¹H¹³C-NOESY-Spektrum gewonnen werden. Dazu wurde das sequenzielle Assignment auf dieses Spektrum übertragen. Die Verschiebungen der Protonen der Seitenketten sowie der Amidprotonen wurden durch einen Vergleich mit dem 3D-¹H¹⁵N-TOCSY-Spektrum gewonnen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4.23 für die Aminosäure V602 dargestellt. Die für die Identifizierung der Aminosäure notwendigen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Seitenkette stammt aus dem 3D-¹H¹⁵N-HC(CO)NH-¹³C-editierten-Spektrum. Dadurch konnten die Signale des V602 bis zum C γ 1-Atom bestimmt werden (Abbildung 4.23).

4. Ergebnisse

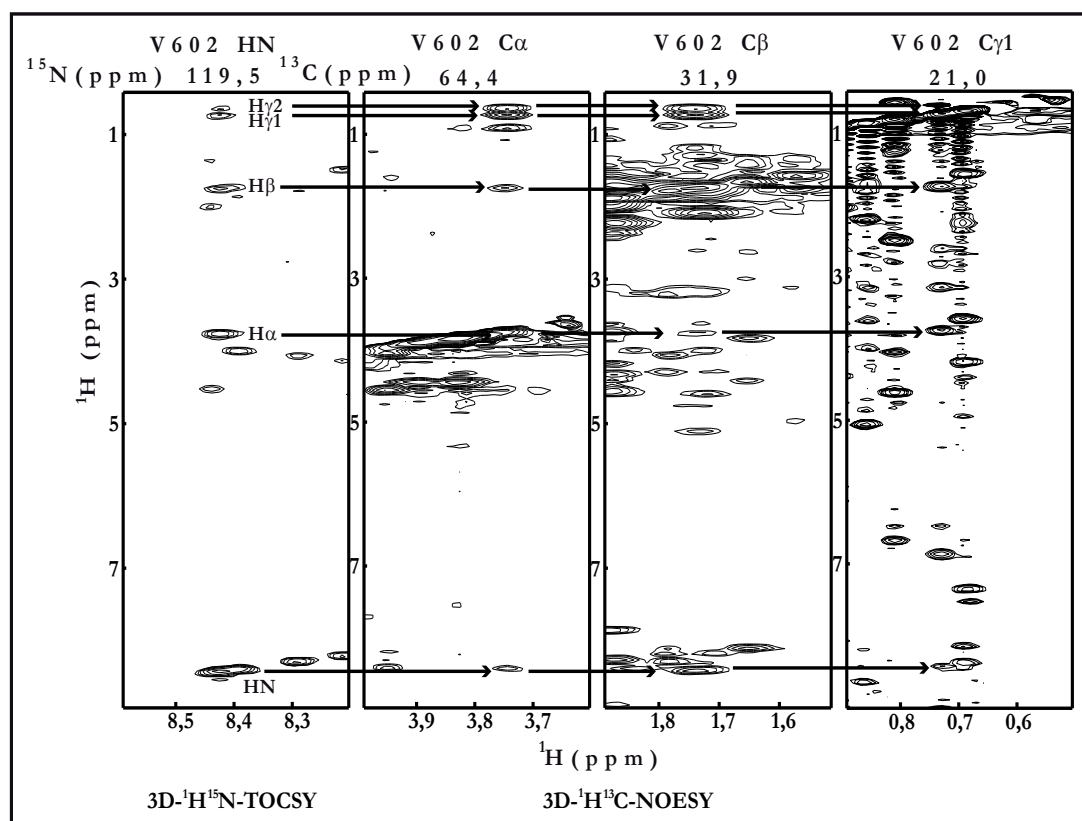


Abbildung 4.23: Zuordnung des sequenziellen Assignments im 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrum der Aminosäure V602

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY- und 3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-Spektrens. Definiert sind die Ausschnitte durch die Amid-Stickstofffrequenz (3D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY) und die Kohlenstofffrequenzen (3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY), die oberhalb der Rechtecke zu sehen sind. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der Spektren. Die interresidualen Resonanzen der Aminosäure sind mit der jeweiligen Bezeichnung der H-Atome gekennzeichnet.

Danach wurden die Kreuzsignale der Atome der verschiedenen Seitenketten in dem 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrum identifiziert. In Abbildung 4.24 ist ein Beispiel der Aminosäuren V602 und L642 zu sehen. Das $\text{H}\alpha$ -Atom des V602 zeigte ein Kreuzsignal zu dem $\text{H}\delta 1$ -Atom des L642. Diese entsprechenden Signale traten auch beim L642 auf. Des Weiteren war das Signal des $\text{H}\gamma 2$ -Atoms des Valins im Ausschnitt des L642 zu erkennen. Für alle 62 Aminosäure-Reste, die in der EGF-like Domäne von ADAM17 enthalten waren, erfolgte auf diese Weise die Zuordnung der Kontakte der Seitenketten untereinander.

4. Ergebnisse

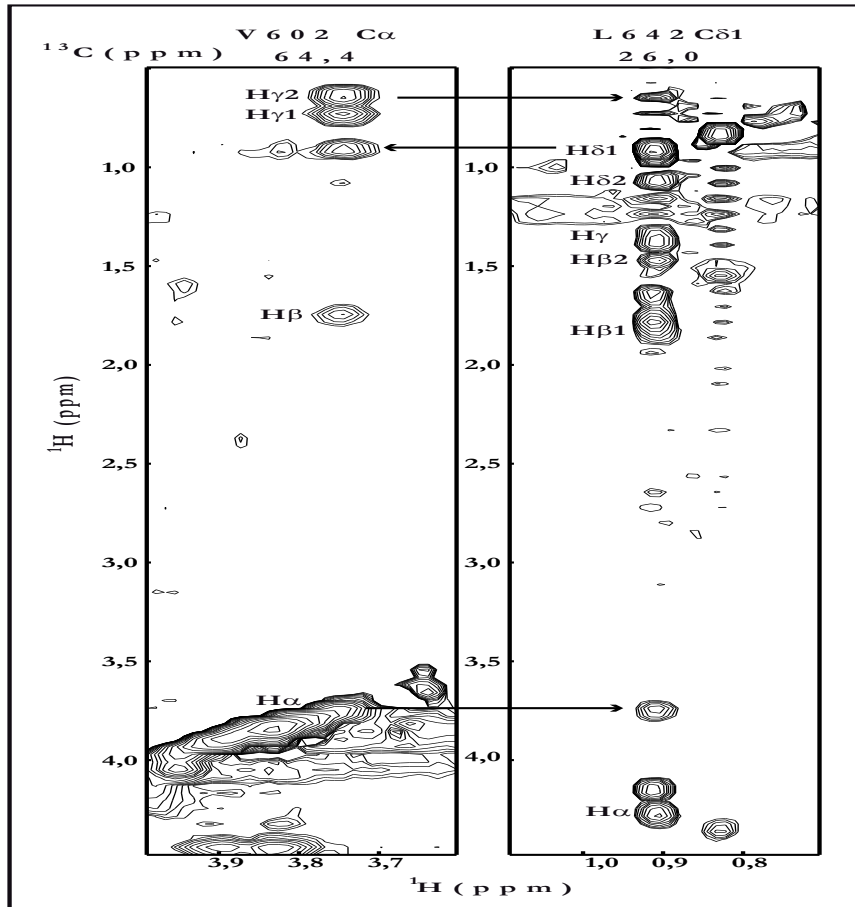


Abbildung 4.24: Zuordnung der Kreuzsignale des 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrums

Dargestellt sind Ausschnitte des 3D- $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrums der Aminosäuren V602 und L642. Definiert sind die Ausschnitte durch die Kohlenstofffrequenzen, die oberhalb der Rechtecke zu sehen sind. Die Pfeile zeigen die korrelierenden Signale der Spektren.

4.4.3 Bestimmung der Disulfidbrücken und der Diederwinkel des Proteinrückgrats

Die EGF-like Domäne von ADAM17 enthält zehn Cysteinreste. Diese Reste sind, wie der Ellmann-Test zeigte, über fünf Disulfidbrücken miteinander verbunden. Da die Cysteine zu ADAM10 konserviert sind, wurden die Verknüpfungen der Cysteinreste von ADAM10 auch für ADAM17 angenommen. Daraus resultierten die folgenden Disulfidbrücken: C582 zu C604, C591 zu C611, C593 zu C591, C600 zu C635 und C630 zu C641.

Die Reste der C600, C635, C630 und C641 lagen in räumlicher Nähe zueinander. Dadurch waren theoretisch zwei weitere Disulfidbrücken der C600 und C630 möglich und wurden in die erste Strukturberechnung mit einbezogen. Diese Varianten lauteten: C600 zu C630 und C635 zu C641; sowie C600 zu C641 und C630 zu C635.

4. Ergebnisse

Nach der Berechnung wurde deutlich, dass diese Disulfidbrücken durch Überkreuzung nicht geschlossen werden konnten oder dass eine der fünf Cysteinbrücken nicht geschlossen war. Da laut Ellman-Test alle Disulfidbrücken geschlossen waren, konnten diese Varianten ausgeschlossen werden. Des Weiteren war die Variante, die den Disulfidbrücken von ADAM10 entsprach, im Vergleich zu den beiden anderen energetisch begünstigt. Dadurch wurden für die Berechnungen der Struktur das Disulfidbrücken-Muster von ADAM10 angenommen.

Für die Vorhersage der Diederwinkel des Proteinrückgrats der EGF-like Domäne wurde das Programm TALOS (Cornilescu, Delaglio et al. 1999; Shen, Delaglio et al. 2009) verwendet. Es wurden chemische Verschiebungen der Amidprotonen, des Stickstoffs, der H α -Protonen, des Carbonylkohlenstoffatoms, sowie der C α - und C β -Atome dazu verwendet, die theoretischen Diederwinkel des Proteinrückgrats zu bestimmen. Diese Vorhersage wurde in die letzte Strukturberechnung mit einbezogen.

4.4.4 Strukturberechnung

Die Strukturberechnung wurde mit dem Programm Cyana (Guntert 2004) durchgeführt. Dazu wurden 1820 NOE-Abstände aus den 3D-¹H¹⁵N-NOESY- und 3D-¹H¹³C-NOESY-Experimenten verwendet. Die zu ADAM10 homologen Disulfidbrücken und die durch das Programm TALOS (Cornilescu, Delaglio et al. 1999; Shen, Delaglio et al. 2009) vorhergesagten Diederwinkel des Proteinrückgrats wurden in die Berechnung mit einbezogen. Von 400 berechneten Strukturen wurden die 20 besten Strukturen ausgewählt. Aus diesen wurde eine mittlere, energieminierte Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 berechnet. In Tabelle 4.1 ist die Statistik der Strukturberechnung der 20 besten Strukturen der EGF-like Domäne sowie die Auswertung der Diederwinkel des Proteinrückgrats der gemittelten Struktur nach Ramachandran (Ramachandran and Sasisekharan 1968) dargestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.1: Statistik der Strukturberechnung der 20 Strukturen

Die auftretenden Abweichungen von den Strukturvorgaben lagen in allen Strukturen unterhalb von 0,5 Å (rmsd = root mean square deviation/ mittlere quadratische Abweichung).

*für die Bereiche 582-586, 589-591, 603-604, 612-613, 629-630, 633-634

Abstandsvorgaben	Anzahl
intraresidual ($ i-j = 0$)	446
sequentiell ($ i-j = 1$)	472
medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	300
long-range ($ i-j \geq 5$)	602
Disulfidbrücken	5*10
Insgesamt	1424
Paarweise rmsd	
mittlere rmsd des Rückgrats	0,12 +/- 0,04 Å
mittlere rmsd der schweren Atome	0,76 +/- 0,08 Å
Paarweise rmsd der Sekundärstrukturbereiche*	
mittlere rmsd des Rückgrats	0,09 +/- 0,04 Å
mittlere rmsd der schweren Atome	0,75 +/- 0,15 Å
Ramachandran-Diagramm der mittleren Struktur	
meistbegünstigte Bereiche (%)	70,4
zusätzlich erlaubte Bereiche (%)	27,8
allgemein erlaubte Bereiche (%)	0,0
nicht erlaubte Bereiche (%)	1,9
Targetfunktion der 20 besten Strukturen	16,91 bis 17,41

4.4.5 Das Ramachandran-Diagramm der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne

Das Ramachandran-Diagramm der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 ist in Abbildung 4.25 dargestellt. Es zeigt die möglichen Konformationen der Diederwinkel ψ und φ in einer Proteinstruktur. Dabei werden den Winkeln Bereiche potentieller Energie zugeordnet. Die dunkel blauen Regionen korrespondieren mit Bereichen niedriger potentieller Energie und werden daher als meistbegünstigte Bereiche bezeichnet. Die blauen und hellblauen Regionen zeigen zusätzlich bzw. allgemein erlaubte Bereiche. Bei der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 lagen 70,4 % der Diederwinkel im erlaubten und 27,8 % im zusätzlich erlaubten Bereich (Tabelle 4.1). Im allgemein erlaubten Bereich befanden sich keine der ermittelten Winkel des Proteinrückgrats. Die weißen Regionen stehen für eine hohe potentielle Energie der Torsionswinkel. Bei der gemittelten Struktur lagen 1,9 % der Diederwinkel der Aminosäuren, d.h. eine Aminosäure, in diesem Bereich. Bei dieser Aminosäure handelt es sich um D616, das sich in einem Loop des Proteins befindet.

4. Ergebnisse

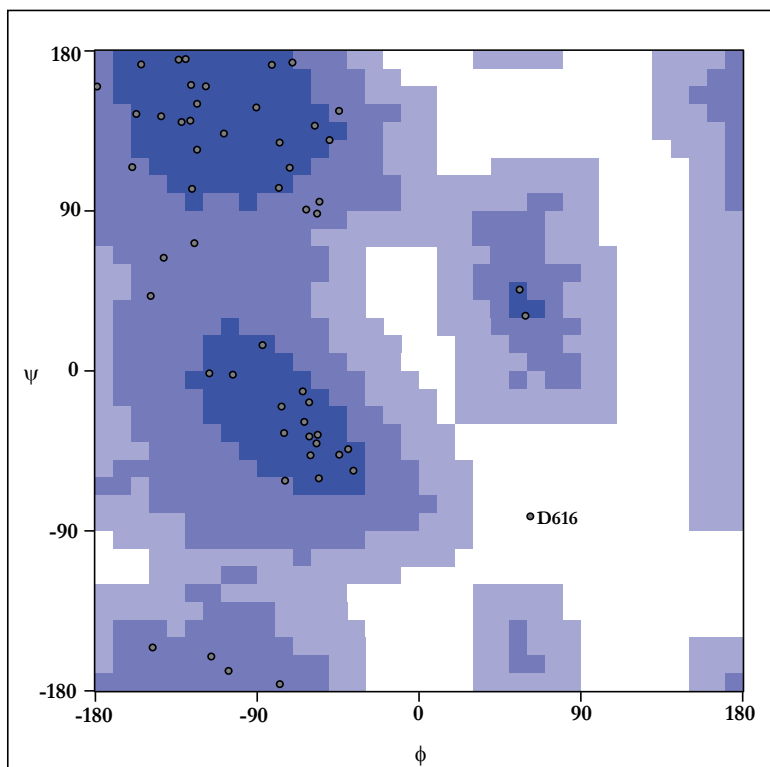


Abbildung 4.25: Ramachandran-Diagramm der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17

Darstellung der Diederwinkel des Proteinrückgrats der gemittelten Struktur der EGF-like Domäne. Die dunkel blauen bis hellblauen Regionen bezeichnen die meistbegünstigten bis erlaubten Bereiche. Die weißen Regionen bezeichnen die nicht erlaubten Bereiche, das D616 befindet sich in einer solchen Regionen.

4.5 Struktur der EGF-like Domäne

In Abbildung 4.26 ist die Struktur der EGF-like Domäne dargestellt. Das Ensemble der besten Strukturen weicht nur im N- und C-terminalen Bereich leicht von einander ab (Abbildung 4.26 A). Das zeigt, dass die 20 besten Strukturen energetisch wenige Unterschiede zueinander aufweisen und sich in dem Molekül keine Bereiche mit hoher Flexibilität befanden. Die Qualität der 20 Strukturen wird auch in Abbildung 4.26 B deutlich. In dieser sind die 20 Strukturen nach Superpositionierung inklusive ihrer Aminosäureseitenketten dargestellt. Die Positionen der Seitenketten der Aminosäuren wichen nur in wenigen Bereichen voneinander ab. Die Seitenkette mit der höchsten Flexibilität war das F634. Diese geringen Abweichungen der 20 Strukturen zeigten auch die rmsd (*root mean square deviation*) Werte (Tabelle 4.1). Dieser lag für das Proteinrückgrat bei $0,12 \pm 0,04 \text{ \AA}$ und für die Strukturelemente bei $0,09 \pm 0,04 \text{ \AA}$.

4. Ergebnisse

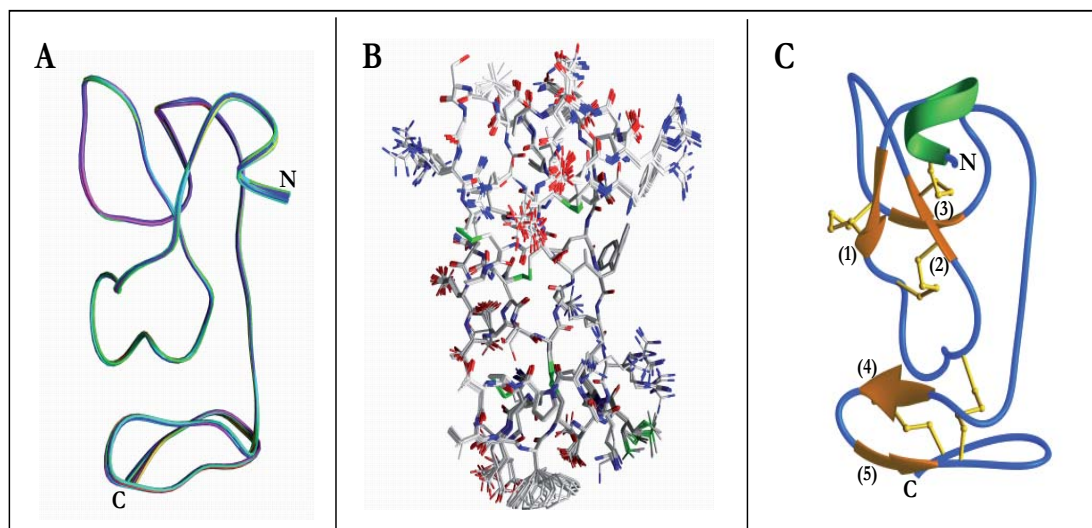


Abbildung 4.26: Tertiärstruktur der EGF-like Domäne von ADAM17

A: „Spaghetti-Darstellung“ der 20 besten Strukturen der Berechnung. N und C bezeichnen die N- und C-terminalen Enden des Proteins.

B: Darstellung der 20 Strukturen nach Superpositionierung inklusive der Aminosäureseitenketten. Die Disulfidbrücken sind grün dargestellt. Die Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten sind blau, die negativ geladenen rot und die ungeladenen oder hydrophoben weiß dargestellt.

C: Bandmodell der gemittelten und energieminierten Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17. Die Sekundärstruktur besteht aus einer α -Helix (grün), einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (1-3) (orange) und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (4-5) (orange). In gelb sind die fünf Disulfidbrücken dargestellt. N und C bezeichnen den N- und C-terminalen Bereich des Proteins.

Die gemittelte, energieminierte Struktur der EGF-like Domäne ist in Abbildung 4.26 C dargestellt. Das Protein lässt sich aufgrund der enthaltenen Sekundärstrukturelemente in zwei Regionen unterteilen. Der N-terminale Bereich enthält eine α -Helix und ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Stabilisiert wird die Region durch drei Disulfidbrücken. Die α -Helix wird durch die Aminosäurereste des C582 bis E586 gebildet. Der erste Strang des β -Faltblattes wird durch die Aminosäurereste E589 bis C591, der zweite durch die Reste C603 und C604 und der dritte durch die Reste V612 und P613 gebildet. Die erste Disulfidbrücke (C582 und C604) verbindet die α -Helix mit dem zweiten Strang des β -Faltblattes. Der erste Strang des Faltblattes ist über eine Disulfidbrücke (C591 und C611) mit einem vor dem dritten Strang befindlichen Cysteinrest verbunden. Die dritte Disulfidbrücke, die sich im N-terminalen Bereich befindet, wird durch die Reste C593 und C603 gebildet. Die N-terminale und die C-terminale Region der EGF-like Domäne sind durch eine Disulfidbrücke (C600 und C635) verbunden. Als Sekundärstrukturelemente enthält der C-terminale Bereich ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Die Stränge des antiparallel angeordneten β -Faltblattes werden durch die Aminosäurereste des P629 und C630 und des G633

4. Ergebnisse

und F634 gebildet. Eine Stabilisierung der C-terminalen Region entsteht durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen dem vierten β -Faltstrang und dem C-Terminus. Die in der EGF-like Domäne enthaltenen fünf Disulfidbrücken sorgen für die geringe Flexibilität der Struktur.

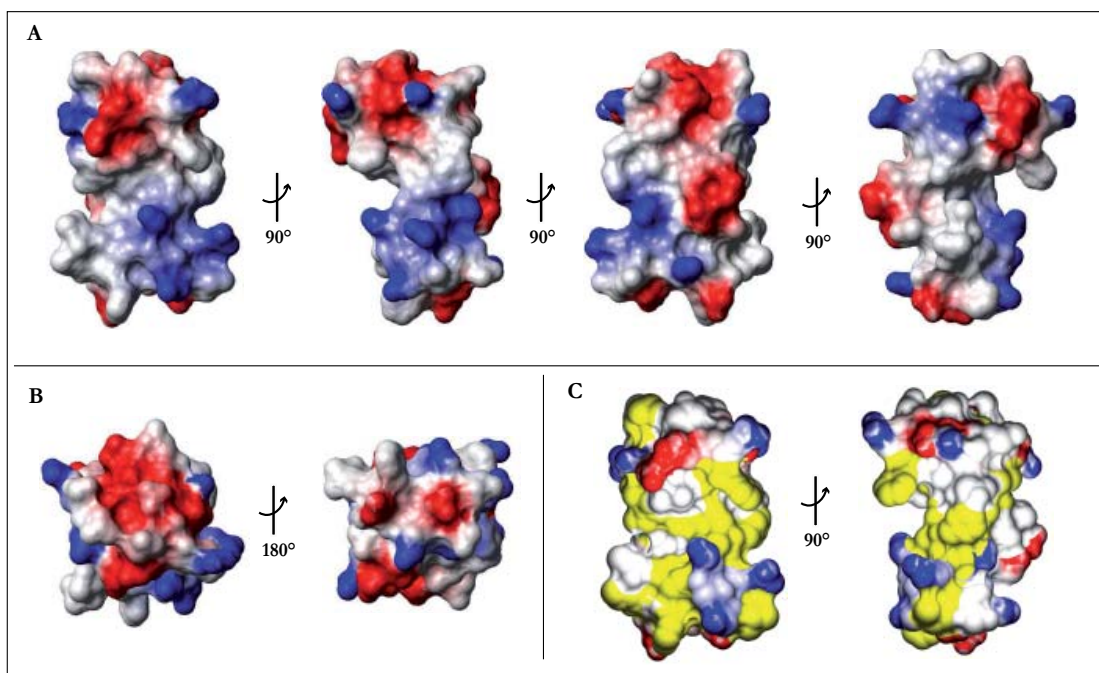


Abbildung 4.27: Darstellung des Oberflächenpotenzials der EGF-like Domäne von ADAM17

A: Darstellung der positiv (blau) und negativ geladenen (rot) Bereiche der Oberfläche der EGF-like Domäne. Die ungeladenen Bereiche sind weiß dargestellt. Die Position des ersten Moleküls entspricht der mittleren Struktur. (Abbildung 4.27 C)

B: Ober- und Unteransicht des Proteins. Dabei entsteht die Oberansicht des Moleküls durch eine Drehung des ersten Moleküls in A um 90° .

C: Darstellung der hydrophoben Bereiche (gelb) der Oberfläche. Die ungeladenen Bereiche sind weiß dargestellt. Die Positionen entsprechen den ersten beiden Darstellungen in A.

Die gemittelte Struktur der EGF-like Domäne ermöglicht die Darstellung des Oberflächenpotenzials des Proteins (Abbildung 4.27). Auf der Oberfläche der EGF-like Domäne befinden sich negativ (rot) und positiv (blau) geladene Regionen, die durch ungeladene Bereiche voneinander getrennt sind (Abbildung 4.27 A). Die Aufsicht des Moleküls in Abbildung 4.27 B (linke Struktur) zeigt, dass es dort hauptsächlich negativ geladen ist. Die gegenüberliegende Seite der EGF-like Domäne besitzt sowohl negativ als auch positiv geladene Bereiche (Abbildung 4.27 B, rechte Struktur). Die ungeladenen Areale der Oberfläche beinhalten zum großen Teil Reste der hydrophoben Aminosäuren (Abbildung 4.27 C). Die ungeladene Tasche der Oberfläche erwies sich als überwiegend hydrophob (Abbildung 4.27 A, erstes Bild; Abbildung 4.27 C, erstes Bild).

4. Ergebnisse

4.6 Vergleich der Struktur der EGF-like Domänen von ADAM17 und ADAM10

Die gemittelte Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 wurde dazu verwendet, in der Proteindatenbank des DALI-Servers (Holm, Kaariainen et al. 2008; Holm und Rosenstrom 2010) nach strukturhomologen Proteinen zu suchen. Der Vergleich ergab, dass nur die EGF-like Domäne von ADAM10 zu der EGF-like Domäne von ADAM17 strukturhomolog ist. Die beiden Proteine gehören zu der Superfamilie der zinkabhängigen Metalloproteasen, die sich in die Adamalysine und die ADAMs unterteilt (Seals und Courtneidge 2003). Beide ADAMs zeichnen sich durch eine vergleichbare Domänenstruktur (Takeda 2009) und eine 29 prozentige Identität in ihrer Aminosäuresequenz aus (Black, Rauch et al. 1997; Moss, Jin et al. 1997).

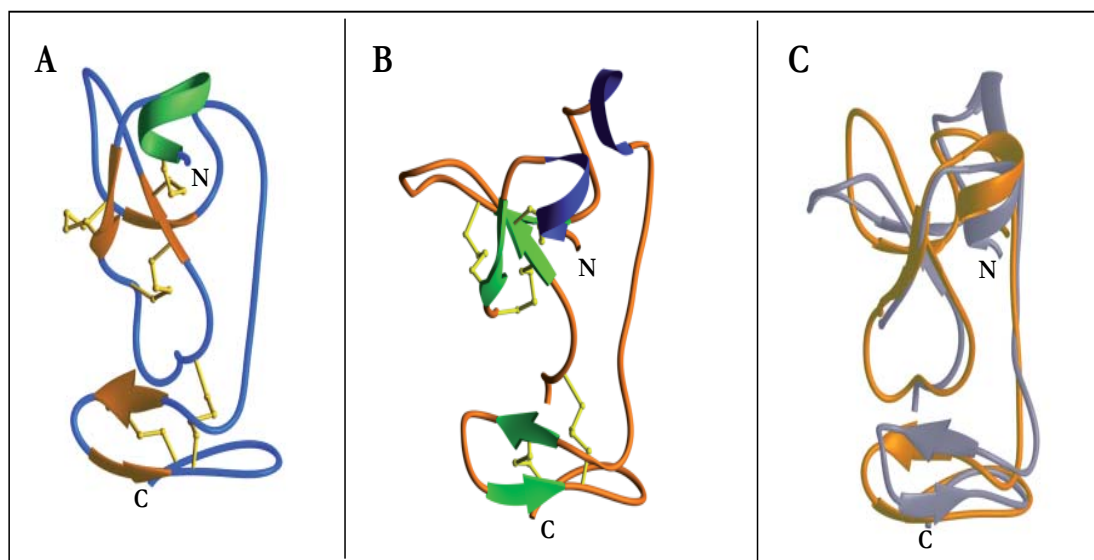


Abbildung 4.28: Vergleich der Tertiärstruktur der EGF-like Domänen von ADAM17 und ADAM10

A: Bandmodell der EGF-like Domäne von ADAM17. Die Sekundärstruktur besteht aus einer α -Helix (grün), einem dreisträngigen (orange) und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (orange). Die fünf Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. N und C bezeichnen den N- und C-Terminus des Proteins.

B: Bandmodell der EGF-like Domäne von ADAM10. Die Sekundärstruktur besteht aus zwei α -Helices (blau), einem dreisträngigen (grün) und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (grün). In gelb sind die fünf Disulfidbrücken dargestellt.

C: Überlagerung der Tertiärstrukturen von ADAM17 und ADAM10. Die gold farbene Struktur repräsentiert ADAM17. ADAM10 wird durch die graue Struktur dargestellt.

Die Strukturhomologie wird in den vergleichenden Darstellungen (Abbildung 4.28) deutlich. Die beiden Domänen besitzen die gleiche Anzahl an β -Faltblättern, die sich an vergleichbaren Positionen im Molekül befinden (Abbildung 4.28 C). In der Struktur von ADAM10 ist eine zweite α -Helix zu sehen, die in ADAM17 nicht vorkommt. Innerhalb der Struktur

4. Ergebnisse

von ADAM10 konnten die Positionen der Aminosäuren A583 bis D590 nicht bestimmt werden (Janes, Saha et al. 2005). Daraus resultiert die Lücke in der Struktur von ADAM10. Im Vergleich der beiden Strukturen miteinander ist zudem ein Unterschied in der Position des zweiten und des dritten Loops erkennbar. Der zweite Loop ist bei ADAM10 flacher als bei ADAM17, während der dritte Loop eine „aufrechtere“ Position im Molekül einnimmt. Der C-Terminale Bereich, der ein zweisträngiges β -Faltblatt enthält, besitzt bei ADAM10 einen steileren Winkel. Dadurch liegt dieser Bereich bei ADAM10 höher als bei ADAM17.

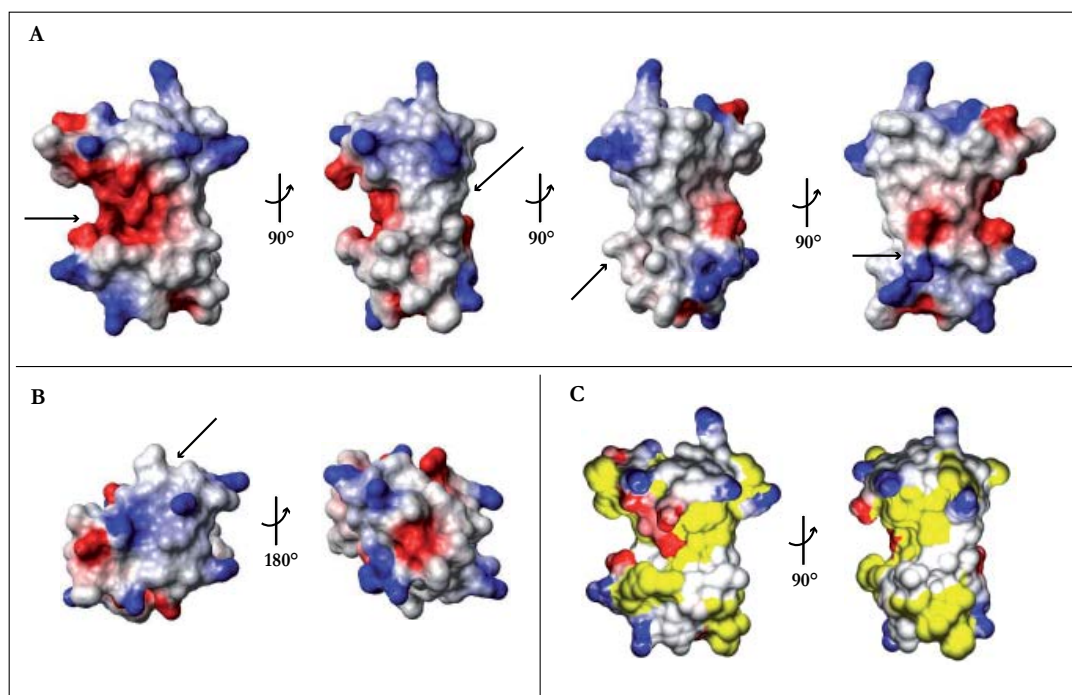


Abbildung 4.29: Darstellung des Oberflächenpotenzials der EGF-like Domäne von ADAM10

- A: Darstellung der positiv (blau) und negativ geladenen (rot) Bereiche der Oberfläche der EGF-like Domäne. Die ungeladenen Bereiche sind weiß dargestellt. Die Position des ersten Moleküls entspricht der Darstellung der Tertiärstruktur von ADAM10 (Abbildung 4.29 B). Die Pfeile zeigen die im Vergleich zu ADAM17 geänderte Ladung der Oberfläche.
- B: Ober- und Unteransicht des Proteins. Dabei entsteht die Oberansicht des Moleküls durch eine Drehung des ersten Moleküls in A um 90° .
- C: Darstellung der hydrophoben Bereiche (gelb) der Oberfläche. Die ungeladenen Bereiche sind weiß dargestellt. Die Positionen entsprechen den ersten beiden Darstellungen in A.

Die größten Unterschiede zwischen den beiden Domänen sind in der Verteilung der Oberflächenladung der Moleküle zu sehen. Die Oberflächenladung von ADAM17 ist in Abbildung 4.27 und die von ADAM10 in Abbildung 4.29 dargestellt. Die Unterschiede der Ladungen zwischen den beiden Domänen ist in Abbildung 4.29 durch die Pfeile gekennzeichnet. An der Oberfläche von ADAM10 befindet sich eine negativ geladene Tasche. Unterhalb dieser

4. Ergebnisse

Tasche befindet sich die hydrophobe Seitenkette eines Phenylalanins (Janes, Saha et al. 2005). Zu sehen ist dieser Bereich in der ersten Darstellung in Abbildung 4.29 A. Diese Tasche ist bei ADAM17 ungeladen und besitzt einen hydrophoben Charakter (Abbildung 4.27 A und Abbildung 4.27 C, erstes Molekül). Die Oberansicht der EGF-like Domäne von ADAM10 zeigt, dass das Molekül in diesem Bereich ungeladen ist (Abbildung 4.29 B, linkes Molekül). Im Gegensatz dazu ist ADAM17 dort negativ geladen (Abbildung 4.27 B, linkes Molekül). Die Unterseite von ADAM17 weist eine negative Oberflächenladung auf (Abbildung 4.27 B, rechtes Molekül). ADAM10 zeigt an der Unterseite einen höheren positiv geladenen Anteil als ADAM17 (Abbildung 4.29 B, rechtes Molekül). ADAM17 enthält in diesem Bereich mehr hydrophobe Anteile als ADAM10. Ein Vergleich der Oberflächenladungen in Abbildung 4.27 A und 4.29 A zeigt, dass ADAM17 eine höhere Ladungsdichte besitzt als ADAM10. ADAM17 enthält mehr hydrophobe Anteile als ADAM10.

4.7 Vergleich der Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 mit dem murinen Epidermalen Wachstumsfaktor (mEGF)

Das namensgebende Molekül der EGF-like Domänen ist der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF). Die Sekundärstrukturelemente des EGFs sollten in den EGF-like Domänen wieder zu erkennen sein.

ADAM17 besitzt vergleichbar zu dem mEGF ein dreisträngiges und ein zweisträngiges β -Faltblatt (Abbildung 4.30 A und C). Die Struktur der EGF-like Domäne kann vergleichbar zu mEGF in zwei Regionen aufgeteilt werden (Alewood, Nielsen et al. 2005).

Der N-terminale Bereich der EGF-like Domäne von ADAM17 beinhaltet eine α -Helix und ein dreisträngiges β -Faltblatt. Das mEGF zeigt in der N-terminalen Region keine α -Helix aber ein dreisträngiges β -Faltblatt. Die zweiten und dritten β -Faltstränge der Strukturen sind identisch angeordnet (Abbildung 4.30 C). Die Ausrichtung des ersten Strangs der Strukturen ist analog anzusehen. Die Position des ersten Strangs in der Aminosäuresequenz der EGF-like Domäne von ADAM17 ist leicht versetzt im Vergleich zu dem ersten Strang des mEGFs. Der Loop zwischen dem ersten und dem zweiten Strang des β -Faltblattes besitzt in beiden Proteinen eine ähnliche Ausrichtung.

4. Ergebnisse

Die C-terminale Region enthält ein kleines zweisträngiges β -Faltblatt. Die Stränge werden in beiden Proteinen durch je zwei Aminosäurereste gebildet. Die Ausrichtung der Faltblätter ist in beiden Molekülen homolog.

Der Vergleich der EGF-like Domäne von ADAM17 mit dem mEGF zeigt, dass eine Strukturhomologie der beiden Proteine gegeben ist.

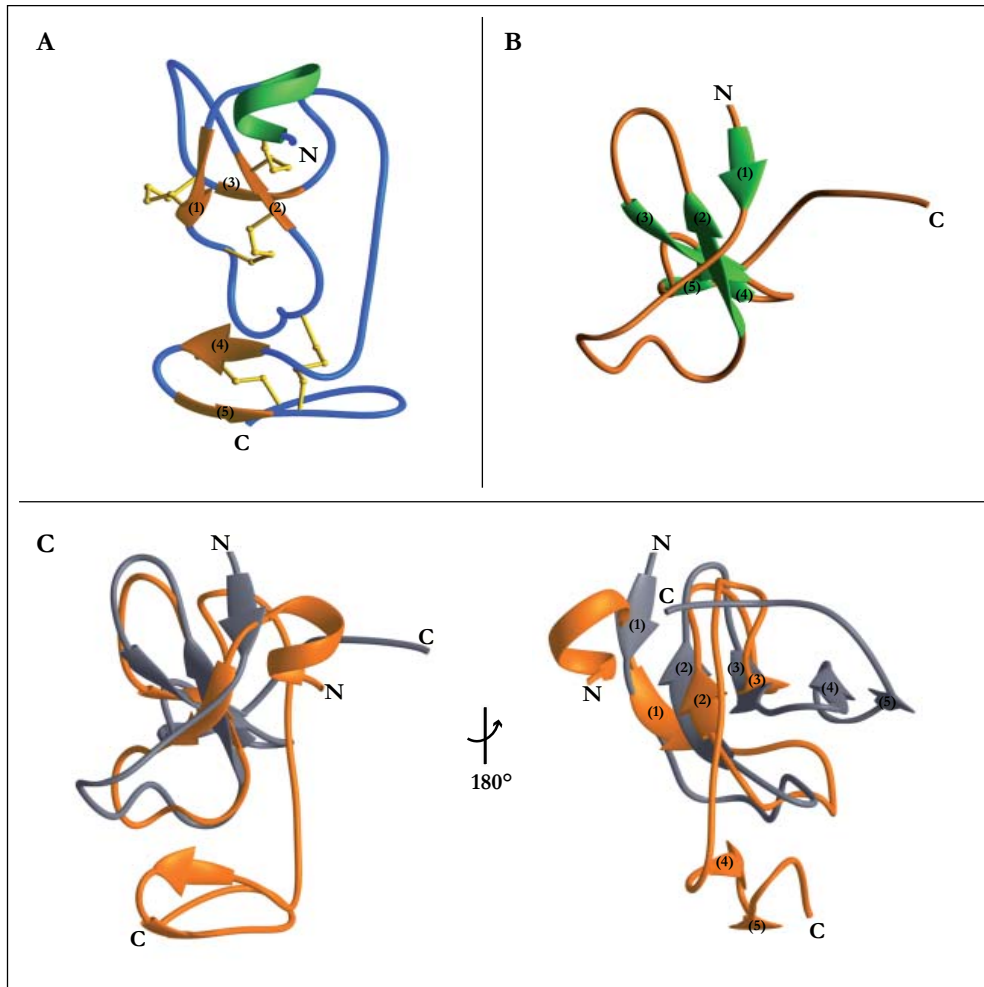


Abbildung 4.30: Vergleich der Sekundärstrukturelemente der EGF-like Domäne von ADAM17 mit dem murinen Epidermalen Wachstumsfaktor (mEGF)

A: Bandmodell Darstellung der EGF-like Domäne von ADAM17. Die Sekundärstruktur besteht aus einer α -Helix (grün), einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (1-3) (orange) und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (4-5) (orange). Die Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. N und C bezeichnen die N- und C-terminalen Enden des Proteins.

B: Bandmodell des murinen Epidermalen Wachstumsfaktors (mEGF). Die Sekundärstruktur besteht aus einem dreisträngigen (1-3) und einem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (4-5) (grün).

C: Überlagerung der Tertiärstrukturen der EGF-like Domäne von ADAM17 und mEGF. Die goldfarbene Struktur repräsentiert ADAM17 und die graue Struktur den mEGF.

4. Ergebnisse

4.8 Vergleich der EGF-like Domäne von ADAM17 mit der cysteinreichen- und EGF-like Domäne von ADAM22

Die meisten Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie besitzen eine cysteinreiche- und EGF-like Domäne. Zwischen den Domänen existieren in der Faltungstopologie und den Sekundärstrukturelementen Unterschiede. Diese werden am Beispiel von ADAM22 erläutert und sollen mit der Struktur von ADAM17 verglichen werden.

Die cysteinreichen Domänen gehören laut Einordnung der Proteindatenbank SCOP (structural classification of proteins) (Tung und Yang 2007; Andreeva, Howorth et al. 2008) zu der Klasse der All- β -Proteine, der β -Trefoil-Faltungstopologie und der Superfamilie der Ricin B-like Lectine. Als Sekundärstrukturelemente beinhaltet die β -Trefoil-Faltungstopologie in der Regel zwölf β -Faltstränge, die in drei antiparallelen β - β - β -Loops angeordnet sind (Gosavi, Whitford et al. 2008).

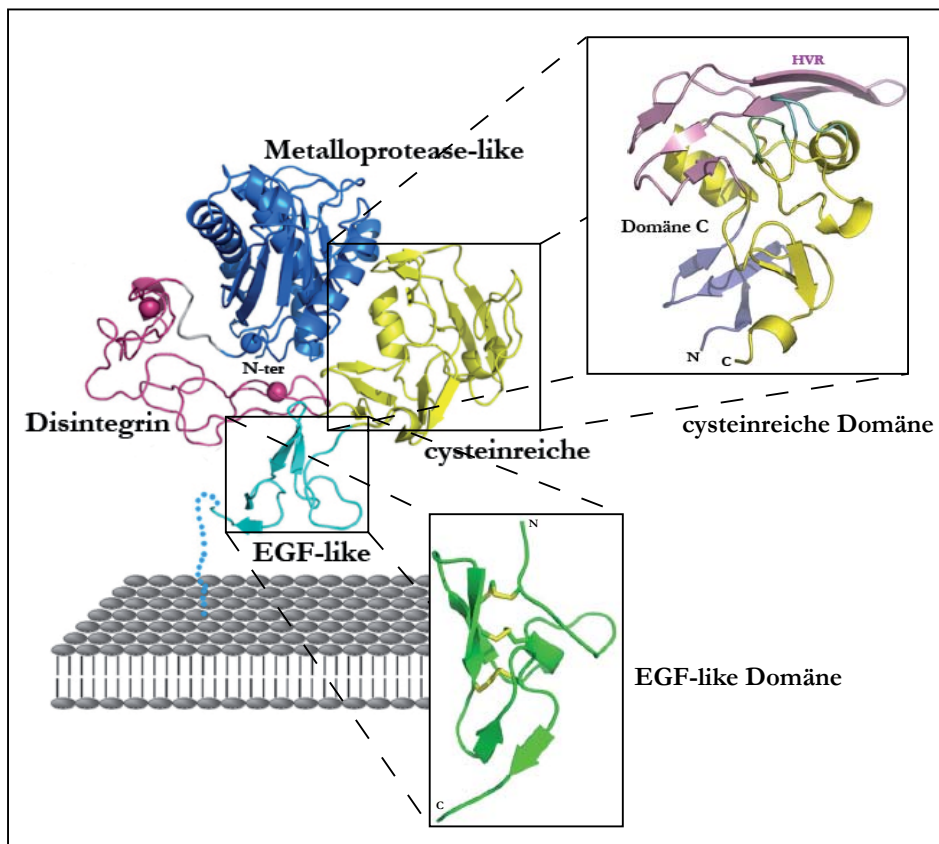


Abbildung 4.31: Darstellung der Tertiärstruktur der cysteinreichen- und EGF-like Domäne von ADAM22 (modifiziert nach Liu, Shim et al. 2009)

Darstellung der extrazellulären Domänen von ADAM22. Die cysteinreiche Domäne (gelb) und die EGF-like Domäne (grün) sind hervorgehoben. Die Disulfidbrücken der EGF-like Domäne sind gelb dargestellt. Die Hypervariablen Region (HVR) der cysteinreichen Domäne ist in violett zu sehen.

4. Ergebnisse

Die Struktur der cysteinreichen Domäne von ADAM22 (Liu, Shim et al. 2009) enthält als Sekundärstrukturelemente vier α -Helices, zwei dreisträngige β -Faltblätter und ein zweisträngiges β -Faltblatt (Abbildung 4.31). Die Tertiärstruktur wird durch sechs Disulfidbrücken stabilisiert. Die β -Faltblätter weisen die, für die cysteinreichen Domänen, typische β -Trefoil-Faltungstopologie auf.

Die EGF-like Domäne von ADAM22 (Abbildung 4.31) zeigt die für EGF-like Domänen charakteristische Knottin-Faltungstopologie (1.6). Sie lässt sich vergleichbar zu dem murinen EGF (mEGF) (Abbildung 4.30) in zwei Regionen einteilen. Der N-terminale Bereich enthält eine α -Helix, die über eine Disulfidbrücke mit dem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt verbunden ist. Diese Anordnung entspricht dem Disulfidbrücken-stabilisierten α/β -Motiv der Knottin-Faltungstopologie. Die Ausbildung der drei Disulfidbrücken, die nach dem EGF-Motiv angeordnet sind (1.6), stabilisiert die N-terminale Region. Der C-terminale Bereich der EGF-like Domäne von ADAM22 enthält ein kleines zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Abbildung 4.31).

Ein Vergleich der Tertiärstruktur der EGF-like Domäne von ADAM17 (Abbildung 4.30 A) mit der cysteinreichen Domäne von ADAM22 (Abbildung 4.31) zeigt, dass die cysteinreiche Domäne mehr Sekundärstrukturelemente als die Domäne von ADAM17 enthält. Die für cysteinreiche Domänen charakteristische β -Trefoil-Faltungstopologie lässt sich nicht in der Domäne von ADAM17 erkennen.

Die EGF-like Domäne von ADAM22 (Abbildung 4.31) weist zur Domäne von ADAM17 Homologien in den Sekundärstrukturelementen auf. Beide Domänen lassen sich in zwei Bereiche unterteilen (Abbildung 4.30 A und Abbildung 4.31). Die N-terminale Region von ADAM17 lässt das α/β -Motiv der EGF-like Domänen erkennen. Die enthaltene α -Helix ist über eine Disulfidbrücke mit einem Strang des dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattes verbunden. Die C-terminale Region von ADAM17 enthält ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Aufgrund der Ausbildung der fünf Disulfidbrücken ist die EGF-like Domäne von ADAM17 in beiden Bereichen stabilisiert, während sich die EGF-like Domäne von ADAM22 durch eine flexible C-terminale Region auszeichnet. Dieser Vergleich zeigt, dass zwischen den beiden EGF-like Domänen Strukturhomologien zuerkennen sind.

5. Diskussion

Innerhalb dieser Arbeit ist es gelungen, die EGF-like Domäne von ADAM17 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und zu reinigen. Im Anschluss konnte die Tertiärstruktur der Domäne in guter Auflösung bestimmt werden (Abbildung 4.26). Diese Struktur wird nun in den Kontext der EGF-like Domänen eingeordnet. Aufgrund der Struktur werden im Anschluss Rückschlüsse auf die Funktion der Domäne gezogen.

5.1 Einordnung der EGF-like Domäne von ADAM17

Die Domäne, die sich bei ADAM17 C-terminal zur Disintegrin-Domäne befindet, besitzt in der Literatur zwei verschiedene Namen: cysteinreiche Domäne und EGF-like Domäne. Dadurch kommt es in der Literatur zu Missverständnissen. So wird beschrieben, dass ADAM10 und ADAM17 keine EGF-like Domäne besitzen (Takeda 2009). Daraus folgt, dass die strukturell homologe Domäne von ADAM10 in der Veröffentlichung der Struktur als cysteinreiche Domäne bezeichnet wird (Janes, Saha et al. 2005). Andere Arbeiten bezeichnen diese Domäne als EGF-like Domäne (Reddy, Slack et al. 2000).

Um die Domäne von ADAM17 eindeutig den EGF-like Domänen zuordnen zu können, werden deren Sekundärstrukturelemente auf Homologien mit dem mEGF und der EGF-like Domäne von ADAM22 untersucht.

Die Sekundärstrukturelemente der EGF-like Domäne von ADAM17 zeigen im Vergleich zu dem mEGF starke Homologien (Abbildung 4.30). Die Anordnung der β -Faltblätter ist vergleichbar. Dadurch ist das erste Kriterium der Einordnung zu der Klasse der EGF-like Domänen erfüllt.

Im letzten Jahr wurde die Kristallstruktur der extrazellulären Domänen von ADAM22 bestimmt (Liu, Shim et al. 2009). Diese Struktur ist die erste Darstellung des extrazellulären Bereiches eines Mitglieds der ADAM-Proteasfamilie. Dadurch ist es möglich, die EGF-like Domäne von ADAM17 mit der cysteinreichen- und der EGF-like Domäne eines Mitglieds dieser Proteasfamilie zu vergleichen.

Die cysteinreiche Domäne von ADAM22 zeigt in den Sekundärstrukturelementen keinerlei Homologie zu der EGF-like Domäne von ADAM17 (Abbildung 4.26 und Abbildung 4.31).

5. Diskussion

Sie enthält eine höhere Anzahl an Sekundärstrukturelementen, die zudem eine andere Anordnung besitzen. Die für cysteinreichen Domänen charakteristische β -Trefoil-Faltungstopologie ist in der Domäne von ADAM17 nicht zu identifizieren. Daraus resultiert, dass es sich bei der untersuchten Domäne von ADAM17 nicht um eine cysteinreiche Domäne handelt.

Zu der EGF-like Domäne von ADAM22 ist in den Sekundärstrukturelementen eine Homologie zu erkennen. Beide lassen sich in zwei Bereiche aufteilen.

In der N-terminalen Region ist bei ADAM17 das für die Knottin-Faltungstopologie charakteristische Disulfidbrücken-stabilisierte α/β -Motiv zu erkennen (Bulet, Hetru et al. 1999) (Abbildung 4.26). Die α -Helix ist über eine Disulfidbrücke mit dem zweiten Strang des dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattes verbunden. Das dreisträngige β -Faltblatt ist ein weiteres Sekundärstrukturelement der Knottin-Faltungstopologie (Hwang, Lee et al. 2010). Der C-terminale Bereich von ADAM17 und ADAM22 enthält zwei kleine zweisträngige antiparallele β -Faltblätter.

Aus der gefundenen Übereinstimmung der untersuchten Domäne von ADAM17 zu dem mEGF und der EGF-like Domäne von ADAM22 lässt sich schließen, dass diese Domäne von ADAM17 den EGF-like Domänen zuzuordnen ist. Durch die strukturelle Homologie zu ADAM10 wird diese auch den EGF-like Domänen angehören und nicht, wie bei Janes, Saha et al. 2005 beschrieben, den cysteinreichen Domänen.

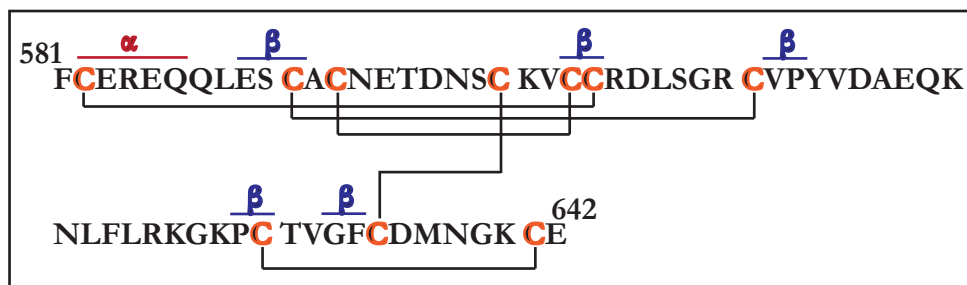


Abbildung 5.1: Aminosäuresequenz der EGF-like Domäne von ADAM17

Darstellung der Sequenz der EGF-like Domäne von ADAM17 im Einbuchstabencode. Orange sind die Cysteinreste hervorgehoben. Deren Disulfidbrücken sind durch die verbundenen Linien dargestellt. Die Konsensussequenz der Disulfidbrücken lautet: 1-6, 2-7, 3-5, 4-9 und 8-10. Die Sekundärstrukturelemente sind mit α für α -Helix (rot) und mit β für β -Faltstrang (blau) dargestellt.

5. Diskussion

Die Domänen von ADAM17 und ADAM10 unterscheiden sich von allen bisher bekannten EGF-like Domänen durch die Ausbildung der Disulfidbrücken (Abbildung 4.27 und Abbildung 5.1). Innerhalb dieser Domänen ist das charakteristische EGF-Motiv der Disulfidbrücken nicht zu erkennen (Harris, Chung et al. 2003). Das kommt unter anderem durch eine höhere Anzahl der Disulfidbrücken innerhalb der EGF-like Domäne von ADAM17 und ADAM10 zustande. Aufgrund der Anordnung der Disulfidbrücken ist die EGF-like Domäne von ADAM17 und ADAM10 in der Superfamilie der EGF/ Laminin-Proteine einer eigenen Familie zuzuordnen. Diese Familie sollte den Namen ADAMs EGF-like Domäne erhalten.

5.2 Substraterkennung

In zuvor durchgeführten Studien wurde die Region der Disintegrin- und cysteinreichen Domäne, der Mitglieder der ADAM-Familie, für die Interaktion mit Substraten identifiziert. Bei ADAM17 und ADAM10 besteht dieser Bereich aus der Disintegrin- und EGF-like Domäne. So konnte für ADAM10 gezeigt werden, dass das Substrat der Ephrin-A5/ EphA3-Komplexe an die EGF-like Domäne bindet (Janes, Saha et al. 2005).

In der cysteinreichen Domäne der Mitglieder der ADAM-Proteasfamilie sind zwei Bereiche für die Substratbindung bzw. Proteininteraktion favorisiert worden. Dabei handelt es sich um das variable Segment und die Hypervariable Region (Takeda 2009).

Die vergleichbaren Regionen sind ebenfalls in der EGF-like Domäne von ADAM17 und ADAM10 vorhanden (Abbildung 5.2). Das variable Segment ist bei ADAM17 drei Aminosäuren und bei der Hypervariablen Region sechs Aminosäuren kürzer als bei ADAM10. Beide Regionen liegen in den flexiblen Loop-Regionen des N-terminalen Bereichs der EGF-like Domäne von ADAM17. Das variable Segment liegt, sowohl bei ADAM17 als auch bei ADAM10, innerhalb einer Tasche. Für diese Tasche konnte bei ADAM10 nachgewiesen werden, dass dort die Bindung zu seinem Substrat stattfindet (Janes, Saha et al. 2005). Bei ADAM17 besitzt diese Tasche hydrophobe Eigenschaften (Abbildung 4.27 und 5.2). Da eine Interaktion mit anderen Proteinen bevorzugt in hydrophoben Regionen erfolgt und für ADAM10 die Tasche für die Substratinteraktionen identifiziert wurde, sollte

5. Diskussion

auch bei ADAM17 in diesem Bereich die Substraterkennung der Domäne stattfinden.

Bei dem Vergleich der beiden Domänen fällt nicht nur die unterschiedliche Oberflächenladung innerhalb der Tasche, sondern auch die unterschiedliche Ausrichtung der Loops auf (Abbildung 4.27 und 4.29 und 5.2). Diese Unterschiede könnten die Substratspezifität der Proteasen erklären. Obwohl keine Erkennungssequenz des *Sheddings* der Substrate gefunden worden ist (White 2003), sind diese beiden Enzyme in der Lage, sowohl gleiche als auch unterschiedliche Substrate dem *Sheddingprozess* zuzuführen (Reiss und Saftig 2009).

Für ein für ADAM10 spezifisches Substrat, den Ephrin A5/ Eph A3-Komplex, konnte gezeigt werden, dass dieses innerhalb der negativ geladenen Tasche bindet (Janes, Saha et al. 2005). Die EGF-like Domäne von ADAM17 ist für das *Shedding* einiger Substrate essenziell. Dazu gehört z.B. der IL1-Rezeptor-II (Reddy, Slack et al. 2000). Dieses Substrat wird spezifisch von ADAM17 proteolytisch gespalten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Unterschiede der Strukturen und der Oberflächenladung in den Substratspezifitäten der Proteasen begründet sein könnten.

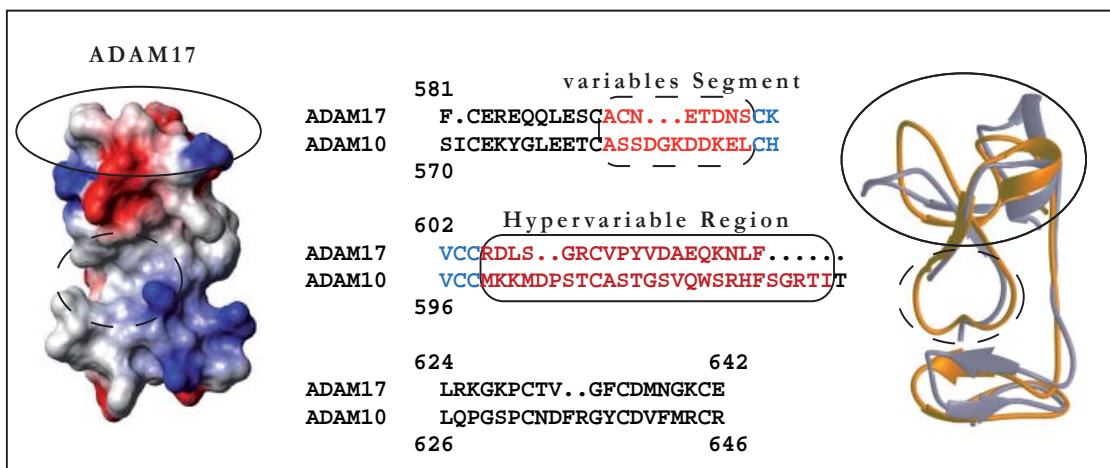


Abbildung 5.2: Vergleich des variablen Segmentes und der Hypervariablen Region bei ADAM10 und ADAM17

Darstellung der Sequenzen der EGF-like Domänen von ADAM17 und ADAM10 im Einbuchstabencode der Aminosäuren. Die roten Buchstaben bezeichnen die Bereiche des variablen Segmentes und der Hypervariablen Region (HVR) und die blauen Buchstaben das Thioredoxinmotiv in der EGF-like Domäne. Die Kreise kennzeichnen die Bereiche innerhalb der Bandstruktur der Domänen. Auf der rechten Seite sind die superpositionierten EGF-like Domänen von ADAM17 und ADAM10 zu sehen. Die gold farbene Struktur repräsentiert ADAM17. ADAM10 wird durch die graue Struktur dargestellt. Eine Darstellung des Oberflächenpotenzials der EGF-like Domäne von ADAM17 ist auf der linken Seite zu sehen. Positive Ladungen sind blau und negative rot dargestellt.

5. Diskussion

5.3 Anordnung der extrazellulären Domänen von ADAM17

Eine Möglichkeit der Anordnung der extrazellulären Domänen bietet die vierblättrige Kleeblattstruktur (Abbildung 1.2) (Liu, Shim et al. 2009). Die Kleeblattstruktur wird von der Metalloprotease-, der Disintegrin-, der cysteinreichen- und der EGF-like Domäne gebildet. Da eine vergleichbare Anordnung durch elektronenmikroskopische Untersuchung ebenfalls bei ADAM12-S in Verbindung mit der Pro-Domäne beobachtet wurde (Abbildung 1.2) (Wewer, Morgelin et al. 2006), könnte diese auch auf andere Mitglieder der ADAM-Familie übertragbar sein. Bei ADAM17 kann die vierblättrige Kleeblattstruktur nur in Verbindung mit der Pro-Domäne entstehen.

Dabei sollte die Struktur vergleichbar zu der von ADAM12-S aufgebaut sein (Abbildung 1.2 A). Die Pro-Domäne ist über nicht kovalente Bindungen an die Protease-Domäne assoziiert. Unterhalb der katalytischen Domäne ist demnach die Disintegrin-Domäne lokalisiert. Die EGF-like Domäne befindet sich in diesem Fall an einer vergleichbaren Position wie die cysteinreiche Domäne von ADAM22. Dabei steht sie mit der Pro-Domäne über eine Kontaktfläche in Verbindung. Dadurch wird die Assoziation der Pro-Domäne an die katalytische Domäne reguliert.

Nach der Ablösung der Pro-Domäne wird bei ADAM17 die vierblättrige Kleeblattstruktur zu einer dreiblättrigen Kleeblattstruktur. Dabei ist die Metalloprotease-Domäne über Interaktionsflächen mit der Disintegrin- und der EGF-like Domäne assoziiert. Die Interaktionsfläche der EGF-like Domäne zur katalytischen Domäne wird der Verbindungsloop zwischen der N-terminalen und C-terminalen Region darstellen (Abbildung 4.26).

Bei dieser Anordnung ist die Hypervariable Region (HVR) der EGF-like Domäne direkt neben dem aktiven Zentrum der Protease-Domäne positioniert. Dadurch kann, wie im „*closed-to-open*“ Model des *Sheddings* (Liu, Shim et al. 2009) beschrieben (Abbildung 1.6), das Substrat nach Bindung an die HVR der Metalloprotease-Domäne zugeführt werden.

5. Diskussion

5.4 Beeinflussung der Aktivität von ADAM17

Die Aktivität der Mitglieder der ADAM-Proteasen kann sowohl negativ als auch positiv durch externe Faktoren beeinflusst werden (Murphy 2009).

5.4.1 Ablösung der Pro-Domäne von der Protease-Domäne

Die Mitglieder der ADAM-Proteasefamilie werden in einer inaktiven Form synthetisiert (Reiss und Saftig 2009). Dabei hält die Pro-Domäne die katalytische Domäne der Enzyme in einer inaktiven offenen Konformation (Leonard, Lin et al. 2005). Für die Aktivierung der Protease wird die Pro-Domäne von der Protease-Domäne durch Furin-Prodomänen-Konvertasen proteolytisch gespalten. Die Interaktion zwischen den Domänen bleibt während des Transportes und der Sekretion der ADAM-Protease bestehen (Smith, Gaultier et al. 2002; Wewer, Morgelin et al. 2006; Liu, Shim et al. 2009). Die nicht kovalente Bindung wird erst durch die Mitwirkung der EGF-like Domäne gelöst (Milla, Leesnitzer et al. 1999; Gonzales, Solomon et al. 2004; Li und Fan 2004).

Um die Ablösung der Pro-Domäne zu gewährleisten, scheint eine stabile Tertiärstruktur der EGF-like Domäne von entscheidender Bedeutung zu sein. So wurde innerhalb der EGF-like Domäne eine Punktmutation identifiziert, die eine Synthese und Sekretion der Protease ermöglicht, aber die Ablösung der Pro-Domäne von der katalytischen Domäne unterbindet (Li und Fan 2004).

Dabei wird vermutet, dass die Mutation des C600 zu einem Tyrosin die Tertiärstruktur der EGF-like Domäne beeinflusst und dadurch die Ablösung nicht mehr erfolgen kann. Die Struktur der EGF-like Domäne zeigt, dass das C600 eine Disulfidbrücke mit dem C635 ausbildet (Abbildung 5.1). Durch diese Disulfidbrücke wird die N-terminale Region mit der C-terminalen verbunden und die Struktur erfährt eine Stabilisierung (Abbildung 4.26). Durch eine Mutation dieses Cysteins zu einem Tyrosin ist die Verbindung zwischen den Regionen nicht mehr gegeben. Durch die Unterbrechung der Verbindung kann die für die Ablösung der Pro-Domäne wichtige Konformationsänderung nicht mehr erfolgen. Das C600 sollte in so fern für die Funktion der Ablösung der Pro-Domäne durch die EGF-like Domäne von essentieller Bedeutung sein.

5. Diskussion

5.4.2 Regulierung der Aktivität durch Proteindisulfidisomerasen

Bei der Reaktion der EGF-like Domäne mit den Thiolisomerasen oder Proteindisulfidisomerasen (PDI) scheint das C600 ebenfalls eine Rolle zu spielen. Die Isomerasen sind über ein Thioredoxinmotiv (CxxC) in der Lage mit einem Protein zu interagieren und die Disulfidbrücken in diesem Bereich zu modifizieren. Für ADAM17 ist eine Verminderung der Aktivität durch Proteindisulfidisomerasen gefunden worden, die durch eine Modifizierung der Disulfidbrücken in der Disintegrin- und EGF-like Domäne hervorgerufen wird (Willems, Tape et al. 2010).

Das Thioredoxinmotiv in der EGF-like Domäne liegt zwischen C600 und C603 (Abbildung 5.2). Diese Erkennungssequenz ist in der hydrophoben Tasche lokalisiert, zwischen dem variablen Segment und der Hypervariablen Region. In diesen Bereichen ist eine Interaktion mit anderen Proteinen wahrscheinlich.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die PDI mit ADAM17 einen schwachen Komplex ausbildet (Willems, Tape et al. 2010).

Es ist möglich, dass die Isomerase durch die Bindung an dem variablen Segment oder an der HVR zu ihrem Erkennungsmotiv geleitet wird. Dort bildet die PDI zwischen ihren freien Thiolgruppen und den in dem Motiv befindlichen Cysteinresten ein Gleichgewicht aus. Die EGF-like Domäne wird dadurch in einer inaktiven Konformation gehalten, die den Zugang zum aktiven Zentrum der katalytischen Domäne unterbindet. (Willems, Tape et al. 2010). Erst eine Verminderung der Aktivität der PDI durch PMA-Zugabe führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu einer aktiven Form von ADAM17. Dadurch kann es wieder zu einer Konformationsänderung der Domäne kommen, die den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht.

Die Verbindung zwischen der N-terminalen und C-terminalen Region der EGF-like Domäne scheint dementsprechend von Bedeutung für die *Sheddingaktivität* der ADAM17-Protease zu sein.

5.4.3 Beeinflussung der TIMP-3 Inhibierung von ADAM17 durch die EGF-like Domäne

Ein weiterer Mechanismus für die Regulierung der Aktivität von ADAM17 bieten natürliche Inhibitoren, genannt TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteases*). ADAM17 lässt sich durch die N-terminale Domäne von TIMP-3 in der Aktivität negativ beeinflussen. Die Inhibierung durch die N-terminale Domäne von TIMP-3 wird durch den Bereich der Disintegrin- und EGF-like Domäne von ADAM17 vermindert (Lee, Verma et al. 2002; Lee, Dodds et al. 2003).

Die Oberflächenladung der EGF-like Domäne von ADAM17 lässt auf einen möglichen Grund für die verminderte Inhibierung durch TIMP-3 schließen. Die EGF-like Domäne von ADAM17 ist im N-terminalen Bereich negativ geladen (Abbildung 4.27). Für die Bindung von TIMP-3 zu der katalytischen Domäne wurde die N-terminale Domäne von TIMP-3 ausgemacht. Der positiv geladene Bereich in der C-terminalen Domäne von TIMP-3 wurde für eine Interaktion zu ECM-Proteinen identifiziert (Lee, Dodds et al. 2003).

Der Interaktionsbereich zu den ECM-Proteinen wird an der Verminderung der Inhibierung durch TIMP-3 beteiligt sein. So kommt es zwischen dem negativ geladenen Bereich der C-terminalen Domäne von TIMP-3 und der positiv geladenen Region der EGF-like Domäne von ADAM17 zu einer Interaktion. Die dadurch entstehenden Anziehungskräfte vermindern die elektrostatische Bindung zwischen der katalytischen Domäne von ADAM17 und der N-terminalen Domäne von TIMP-3. Daraus resultiert eine Reduzierung der Inhibierung der Protease durch TIMP-3.

Dass die C-terminale Domäne von TIMP-3 an der Verminderung der Inhibierung beteiligt ist, konnte von Lee et al. bereits gezeigt werden (Lee, Dodds et al. 2003). Durch einen Austausch der in diesem positiv geladenen Bereich befindlichen Lysinreste zu negativ geladenen Glutamatresten konnte eine Erhöhung der Inhibierung durch TIMP-3 festgestellt werden. Die Anziehungskräfte zwischen der C-terminalen Domäne von TIMP-3 und der EGF-like Domäne von ADAM17 wird durch die Ladungsänderung vermindert. Die Bindung der N-terminalen Domäne zu der katalytischen Domäne von ADAM17 wird verstärkt und die Aktivität der Protease ist vermindert.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Tertiärstruktur der EGF-like Domäne von ADAM17 aufgeklärt. Aufgrund dieser Struktur wurden verschiedene Möglichkeiten für eine Substraterkennung und Bindung, sowie für die Regulierung der Aktivität von ADAM17 diskutiert.

Eine genaue Aussage bezüglich der Funktion ist aufgrund der Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 nicht möglich. Sie kann als Grundlage für weitere Analysen dienen.

In weiterführenden Experimenten sollte die Substratbindung an die EGF-like Domäne von ADAM17 verifiziert werden.

Eine Immunpräzipitation unter Verwendung der rekombinant exprimierten EGF-like Domäne und potentieller Substrate wie TNF- α und IL1-Rezeptor-II wird zeigen ob eine Interaktion erfolgt.

Eine weitere Methode, um die Bindung zwischen der EGF-like Domäne von ADAM17 und eines Substrates zu bestimmen, ist die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR = *surface plasmonen resonance*). Der Vorteil der SPR-Messung ist, dass zum einen eine Bindung zwischen den Proteinen, zum anderen aber auch Bindungskonstanten bestimmt werden können.

Mit diesen Methoden kann auch eine putative Bindung der C-terminalen Domäne von TIMP-3 an die EGF-like Domäne von ADAM17 überprüft werden.

Wenn eine Bindung zwischen einem Substrat und EGF-like Domäne identifiziert worden ist, kann in einem zweiten Schritt überprüft werden, ob die Interaktion über die hydrophobe Tasche erfolgt.

Dazu werden in die DNA-Sequenz der rekombinant exprimierten Domäne Punktmutationen für Aminosäuren eingefügt, die die hydrophoben Eigenschaften der Tasche definieren. Dazu eignen sich z.B. das A592 oder das L624. Bei einer Verminderung der Bindung ließe sich feststellen, ob die Substraterkennung innerhalb der hydrophoben Tasche lokalisiert ist (Janes, Saha et al. 2005).

Eine weitere wichtige Analysemethode ist die Untersuchung der Tertiärstruktur der EGF-like Domäne in Verbindung mit einem Substrat mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie. Dadurch kann überprüft werden, welche Aminosäurereste an einer Interaktion beteiligt sind.

6. Ausblick

Da die Metalloprotease ADAM17 an der Entstehung vielfältiger Krankheiten wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, könnte die rekombinant exprimierte EGF-like Domäne ein therapeutischer Ansatz sein. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Variante von ADAM17, bestehend aus der Disintegrin-, EGF-like-, Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne von ADAM17, in der Lage ist, als dominant-negativer Inhibitor der endogenen Metalloprotease zu wirken (Solomon, Pesti et al. 1999). Somit könnte auch die rekombinant exprimierte EGF-like Domäne einen Inhibitor für ADAM17 darstellen. Dies ist ein Ansatz, um Krankheiten zu behandeln, die durch eine erhöhte ADAM17-Aktivität entstehen.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2004). *Molekularbiologie der Zelle* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KG; Weinheim.
- Almeida, E. A. C., A. P. J. Huovila, et al. (1995). „Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor.“ *Cell* 81(7): 1095-1104.
- Alewood, D., K. Nielsen, et al. (2005). „The role of disulfide bonds in the structure and function of murine epidermal growth factor (mEGF).“ *Growth Factors* 23(2): 97-110.
- Amour, A., C. G. Knight, et al. (2000). „The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3.“ *FEBS Lett* 473(3): 275-279.
- Andreeva, A., D. Howorth, et al. (2008). „Data growth and its impact on the SCOP database: new developments.“ *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D419-425.
- Aue, W. P., E. Bartholdi, et al. (1976). „Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance.“ *The Journal of Chemical Physics* 64(5): 2229-2246.
- Baldwin, A. J. and L. E. Kay (2009). „NMR spectroscopy brings invisible protein states into focus.“ *Nat Chem Biol* 5(11): 808-814.
- Baron, M., D. G. Norman, et al. (1992). „The three-dimensional structure of the first EGF-like module of human factor IX: comparison with EGF and TGF- α .“ *Protein Sci* 1(1): 81-90.
- Bax, D. V., A. J. Messent, et al. (2004). „Integrin $\alpha 5\beta 1$ and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells.“ *J Biol Chem* 279(21): 22377-22386.
- Black, R. A., C. T. Rauch, et al. (1997). „A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells.“ *Nature* 385(6618): 729-733.
- Bloch, F. (1946). „Nuclear Induction.“ *Physical Review* 70(7-8): 460.
- Bloch, F., W. W. Hansen, et al. (1946). „Nuclear Induction.“ *Physical Review* 69(3-4): 127.
- Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, et al. (1993). „Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins.“ *FEBS Lett* 331(1-2): 134-140.
- Bulet, P., C. Hetru, et al. (1999). „Antimicrobial peptides in insects; structure and function.“ *Developmental & Comparative Immunology* 23(4-5): 329-344.
- Carson, M. (1991). „Ribbons 2.0.“ *J. Appl. Crystallogr.* 24: 946-950.
- Carver, J. A., R. M. Cooke, et al. (1986). „A high resolution ^1H NMR study of the solution structure of human epidermal growth factor.“ *FEBS Letters* 205(1): 77-81.
- Cornilescu, G., F. Delaglio, et al. (1999). „Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology.“ *J Biomol NMR* 13(3): 289-302.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, et al. (1995). „NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.“ *J Biomol NMR* 6(3): 277-293.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley, et al. (2008). „The ADAM metalloproteinases.“ *Mol Aspects Med* 29(5): 258-289.
- Ellman, G. L. (1959). „Tissue sulfhydryl groups.“ *Arch Biochem Biophys* 82(1): 70-77.
- Ernst, R. R. and W. A. Anderson (1966). „Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance.“ *Review of Scientific Instruments* 37(1): 93-102.
- Fiaux, J., E. B. Bertelsen, et al. (2002). „NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex.“ *Nature* 418(6894): 207-211.
- Gomis-Ruth, F. X. (2003). „Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases.“ *Mol Biotechnol* 24(2): 157-202.
- Gonzales, P. E., A. Solomon, et al. (2004). „Inhibition of the tumor necrosis factor- α -converting enzyme by its pro domain.“ *J Biol Chem* 279(30): 31638-31645.

7. Literaturverzeichnis

- Gosavi, S., P. C. Whitford, et al. (2008). „Extracting function from a beta-trefoil folding motif.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10384-10389.
- Guntert, P. (2004). „Automated NMR structure calculation with CYANA.“ *Methods Mol Biol* 278: 353-378.
- Harris, R. C., E. Chung, et al. (2003). „EGF receptor ligands.“ *Experimental Cell Research* 284(1): 2-13.
- Holm, L., S. Kaariainen, et al. (2008). „Searching protein structure databases with DaliLite v.3.“ *Bioinformatics* 24(23): 2780-2781.
- Holm, L. and P. Rosenstrom (2010). „Dali server: conservation mapping in 3D.“ *Nucleic Acids Res* 38 Suppl: W545-549.
- Hooper, N. M. (1994). „Families of zinc metalloproteases.“ *FEBS Lett* 354(1): 1-6.
- Horiuchi, K., S. Le Gall, et al. (2007). „Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx.“ *Mol Biol Cell* 18(1): 176-188.
- Hwang, J. S., J. Lee, et al. (2010). „Isolation and Characterization of Psacothasin, a Novel Knottin-Type Antimicrobial Peptide, from *Psacothea hiliaris*.“ *J Microbiol Biotechnol* 20(4): 708-711.
- Iba, K., R. Albrechtsen, et al. (2000). „The Cysteine-Rich Domain of Human Adam 12 Supports Cell Adhesion through Syndecans and Triggers Signaling Events That Lead to β 1 Integrin-Dependent Cell Spreading.“ *The Journal of Cell Biology* 149(5): 1143-1156.
- Janes, P. W., N. Saha, et al. (2005). „Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans.“ *Cell* 123(2): 291-304.
- Johnson, B. A. (2004). „Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules.“ *Methods Mol Biol* 278: 313-352.
- Killock, D. J. and A. Ivetic (2010). „The cytoplasmic domains of TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding.“ *Biochem J* 428(2): 293-304.
- Lee, M. H., P. Dodds, et al. (2003). „Tailoring tissue inhibitor of metalloproteinases-3 to overcome the weakening effects of the cysteine-rich domains of tumour necrosis factor- α converting enzyme.“ *Biochem J* 371(Pt 2): 369-376.
- Lee, M. H., V. Verma, et al. (2002). „The C-terminal domains of TACE weaken the inhibitory action of N-TIMP-3.“ *FEBS Lett* 520(1-3): 102-106.
- Leonard, J. D., F. Lin, et al. (2005). „Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch.“ *Biochem J* 387(Pt 3): 797-805.
- Li, X. and H. Fan (2004). „Loss of ectodomain shedding due to mutations in the metalloprotease and cysteine-rich/disintegrin domains of the tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE).“ *J Biol Chem* 279(26): 27365-27375.
- Liu, H., A. H. Shim, et al. (2009). „Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor instead of metalloproteinase: insights on ADAM function.“ *J Biol Chem* 284(42): 29077-29086.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lottspeich, F. and J. W. Engels (2006). *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag; Elsevier GmbH; München.

7. Literaturverzeichnis

- Maskos, K., C. Fernandez-Catalan, et al. (1998). „Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme.“
Proc Natl Acad Sci U S A 95(7): 3408-3412.
- Milla, M. E., P. E. Gonzales, et al. (2006). „The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch.“ *Cell Biochem Biophys* 44(3): 342-348.
- Milla, M. E., M. A. Leesnitzer, et al. (1999). „Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE).“
J Biol Chem 274(43): 30563-30570.
- Montelione, G. T., K. Wuthrich, et al. (1986). „Identification of two anti-parallel beta-sheet conformations in the solution structure of murine epidermal growth factor by proton magnetic resonance.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8594-8598.
- Moss, M. L., M. Bomar, et al. (2007). „The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events.“
J Biol Chem 282(49): 35712-35721.
- Moss, M. L., S. L. Jin, et al. (1997). „Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α .“ *Nature* 385(6618): 733-736.
- Murphy, G. (2009). „Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the [] Sheddases.“ *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(2): 138-145.
- Nicholls, A., K. A. Sharp, et al. (1991). „Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons.“
Proteins 11(4): 281-296.
- Orth, P., P. Reichert, et al. (2004). „Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human ADAM33.“ *Journal of Molecular Biology* 335(1): 129-137.
- Puente, X. S. and C. Lopez-Otin (2004). „A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors.“ *Genome Res* 14(4): 609-622.
- Purcell, E. M., H. C. Torrey, et al. (1946). „Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid.“ *Physical Review* 69(1-2): 37.
- Reddy, P., J. L. Slack, et al. (2000). „Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme.“ *J Biol Chem* 275(19): 14608-14614.
- Ramachandran, G. N. and V. Sasisekharan (1968). „Conformation of polypeptides and proteins.“ *Adv Protein Chem* 23: 283-438.
- Reiss, K., A. Ludwig, et al. (2006). „Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion.“
Pharmacology & Therapeutics 111(3): 985-1006.
- Reiss, K. and P. Saftig (2009). „The „a disintegrin and metalloprotease“ (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions.“
Semin Cell Dev Biol 20(2): 126-137.
- Rose-John, S., G. H. Waetzig, et al. (2007). „The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches.“ *Expert Opin Ther Targets* 11(5): 613-624.
- Saha, S., J. Boyd, et al. (2001). „Solution structure of the LDL receptor EGF-AB pair: a paradigm for the assembly of tandem calcium binding EGF domains.“
Structure 9(6): 451-456.
- Savage, C. R., Jr., T. Inagami, et al. (1972). „The primary structure of epidermal growth factor.“ *J Biol Chem* 247(23): 7612-7621.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). „The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions.“ *Genes Dev* 17(1): 7-30.
- Shen, Y., F. Delaglio, et al. (2009). „TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts.“
J Biomol NMR 44(4): 213-223.

7. Literaturverzeichnis

- Smith, K. M., A. Gaultier, et al. (2002). „The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo.“ *J Cell Biol* 159(5): 893-902.
- Solomon, K. A., N. Pesti, et al. (1999). „Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFR_{II} secretion.“ *J Immunol* 163(8): 4105-4108.
- Takeda, S. (2009). „Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases.“ *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(2): 146-152.
- Tellier, E., M. Canault, et al. (2006). „The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts.“ *Experimental Cell Research* 312(20): 3969-3980.
- Tung, C. H. and J. M. Yang (2007). „fastSCOP: a fast web server for recognizing protein structural domains and SCOP superfamilies.“ *Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue): W438-443.
- van Gunsteren, W. F., et al. (1996). „Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide.“ vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich: 1-1042.
- Vriend, G. (1990). „WHAT IF: a molecular modeling and drug design program.“ *J Mol Graph* 8(1): 52-56, 29.
- Wewer, U. M., M. Morgelin, et al. (2006). „ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme.“ *J Biol Chem* 281(14): 9418-9422.
- White, J. M. (2003). „ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions.“ *Curr Opin Cell Biol* 15(5): 598-606.
- Willems, S. H., C. J. Tape, et al. (2010). „Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17.“ *Biochem J* 428(3): 439-450.
- Williamson, M. P., T. F. Havel, et al. (1985). „Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry.“ *Journal of Molecular Biology* 182(2): 295-315.

8. Abkürzungsverzeichnis

8. Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
%	Prozent
A, C, Y,...	Bezeichnung der Aminosäuren im Einbuchstabencode
Å	Ångström
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif</i>
AmpR	Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Lactamase)
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
\vec{B}_0	äußeres Magnetfeld
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
°C	Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
C_m	Massenkonzentration
δ	chemische Verschiebung
d	Schichtdicke der Küvette
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
D ₂ O	Schweres Wasser (Deuteriumoxid)
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
ΔE	Energiedifferenz der Energieniveaus
E_{280}	Absorption bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm
ECM-Protein	extrazelluläre Matrixproteine (<i>extracellular matrix proteins</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
mEGF	muriner epidermaler Wachstumsfaktor
EN	Elektronegativität
f1 origin of replication	Replikationsstelle des M13-Phagen
FASL	FAS Ligand
FID	freier Induktionszerfall (<i>free induction decay</i>)

8. Abkürzungsverzeichnis

γ	gyromagnetisches Verhältnis
g	Gramm
gp130	Glykoprotein 130
GuHCl	Guanidin-Hydrochlorid
h	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
h	Plancksches Wirkungsquantum (Formel)
h	Zeit in Stunde(n) (hinter einer Zahl)
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
His	6 His- <i>tag</i> kodierender Bereich
His ₆ - <i>tag</i>	sechsmal Histidin- <i>tag</i>
HSQC	<i>heteronuclear-single quantum coherence</i>
HVR	Hypervariable Region
-I	negativer induktiver Effekt
$\vec{+I}$	positiver induktiver Effekt
I	Gesamtspin des Atomkerns
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
IL-1-R-II	Interleukin-1-Rezeptor-II
k	Boltzmannkonstante
K	Kelvin
Kann	Kanamycin-Resistenz-Gen (Aminoglycosid-Antibiotikum)
KCl	Kaliumchlorid
kD	kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Lac I	kodierender Bereich des lac-Repressors
lac Z	kodierender Bereich des Lactose-Operons
\vec{LB}	Luria Broth (<i>lysogeny broth</i>)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
J	Eigenrotation der Atomkerne
l	Liter
μ	magnetische Momente der Atomkerne
$\vec{\mu m}$	Micrometer
m	Spin der Protonen und Neutronen im Atomkern
m	Masse
mAu	<i>milli-absorbance-units</i>
ml	Milliliter

8. Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
mM	Millimolar (mmol/l)
μl	Mikroliter
M	Molar (mol/l)
\vec{M}	molekulare Masse (g/mol)
\vec{M}_0^r	makroskopische Gesamtmagnetisierung
\vec{M}_y	y-Magnetisierung
M_z	z-Magnetisierung
mV	Millivolt
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MHz	Megahertz
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
min	Minuten
MUC1	<u>Mucin</u> 1
N	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N _α , N _β	Teilchenanzahl innerhalb der Energie-niveaus in α- und β-Position
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natrium-di-hydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Ni	Nickel
NMR	kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTP	Nukleosidtriphosphate
NOE	<u>Nuclear-Overhauser-Effekt</u>
NOESY	<u>Nuclear-Overhauser effect and exchange spectroscopy</u>
OD	optische <u>Dichte</u>
ori	<i>origin of replication</i>
ox	oxidiert
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	<u>Proteindisulfid</u> isomerase
PKC	<u>Proteinkinase C</u>
PMA	<u>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</u>
ppm	<i>parts per million</i>
Prep	Preparation

8. Abkürzungsverzeichnis

r	Abstand der Kerne zueinander
red	reduziert
rmsd	mittlere quadratische Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sec	Sekunden
SCOP	<i>structural classification of proteins</i>
sIL-6-R	löslichen Form des IL-6-Rezeptors
SVMP	Schlangengiftprotease (<i>snake venom metalloprotease</i>)
τ_c	Rotationskorrelationszeit des Moleküls
T	Temperatur
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
t_1, t_2, t_3	Zeitvariablen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
TMS	Tetramethylsilan
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TOCSY	<i>total-correlation spectroscopy</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Einheit für Enzymaktivitäten (<i>Unit</i>)
UV	Ultraviolett
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
(v/v)	(volume/ volume)
ω	Messignal der Gruppen bei der NMR-Messung
ω_0	Lamor-Frequenz
(w/v)	(weight/ volume)

9. Anhang

9.1 Vektorkarten

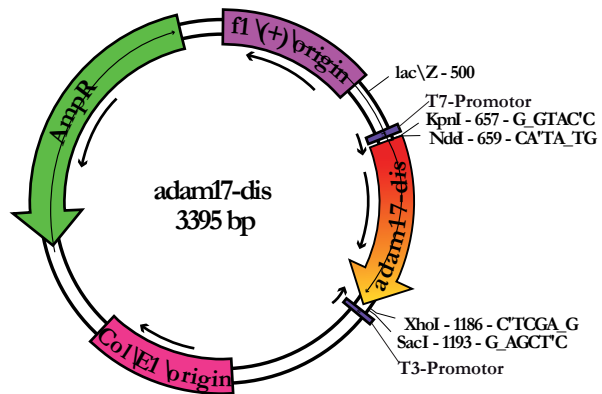
f1 *origin of replication* = Replikationsstelle des M13-Phagen; lac Z = kodierende Bereich des Lactose-Operons; AmpR = Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Lactamase); Lac I = kodierender Bereich des lac-Repressors; MCS = multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*); ori = *origin of replication*; Kan = Kanamycin-Resistenz-Gen (Aminoglycosid-Antibiotikum); adam17-dis = kodierende DNA-Sequenz der Disintegrin- und EGF-like Domäne von ADAM17; EGF-like = kodierende DNA-Sequenz der EGF-like Domäne von ADAM17; His = 6 His-tag kodierender Bereich

Ableserichtung: \longrightarrow vorwärts \longleftarrow rückwärts

adam17-dis

(Gene Art Regensburg)

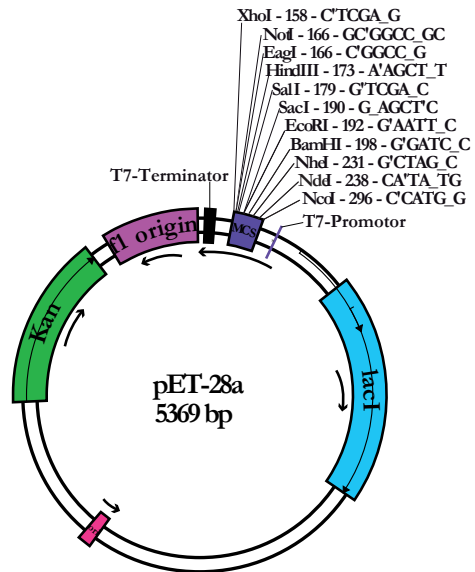
f1 origin	3-459
lac Z	500
T7-Promotor	624-646
adam17-dis	659-1188
T3-Promotor	1206-1223
Col/E1/origin	1666-2106
AmpR	2409-3266



pET28-a

(Novagen/ Merck KG, Darmstadt)

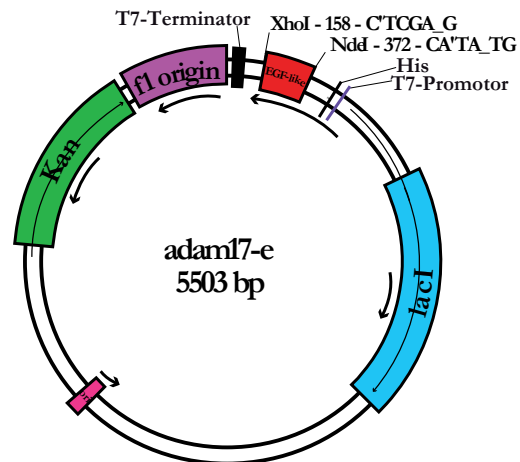
T7-Terminator	26-72
MCS	158-296
enthält His-	(270-287) und T7-tag (207-239)
T7-Promotor	370-386
Lac I	773-1852
pBR322 ori	3224-3286
Kan	3995-4807
f1 origin	4903-5358



adam17-e

(wurde während dieser Arbeit erstellt)

T7-Terminator	26-72
EGF-like	164-371
His	477-494
T7-Promotor	514-530
Lac I	980-2059
pBR322 ori	3431-3493
Kan	4202-5014
f1 origin	5048-5503



9.2 Lebenslauf

Name: Verena Pawlak

Geburtsdatum: 15.10.1979

Geburtsort: Bochum

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch



08/1986 - 07/1990	Grundschule Hordel
08/1990 - 07/1999	Goethe – Schule Bochum; Abschluss: Abitur
10/1999 - 03/2006	Studium Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
04/2005 - 11/2005	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erdmann am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung für Systembiochemie an der Ruhr-Universität Bochum Thema: “Heterologe Expression in Insektenzellen und Charakterisierung der AAA-ATPasen Pex1p und Pex6p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “
22.11.2005	Diplom im Fach Biochemie
01/2006 - 02/2006	studentische Hilfskraft an dem Institut für Physiologische Chemie, Abteilung für Systembiochemie an der Ruhr-Universität Bochum
03/2006 - 09/2006	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung für Systembiochemie an der Ruhr-Universität Bochum
10/2006 - 12/2006	wissenschaftliche Angestellte am ZMBP-Pflanzenbiochemie der Eberhard Karls Universität in Tübingen
11/2007 - 06/2010	Promotionsarbeit und wissenschaftliche Angestellte am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger mit dem Thema: “Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der EGF-like Domäne von ADAM17 mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie.“

Posterpräsentation:

Verena Pawlak, Inken Lorenzen, Björn Spudy, Madlen Mohr, Mohammad Shomali, Frank Sönnichsen, Joachim Grötzinger; „The disintegrin and EGF-like domain of ADAM17“ Fourth International Symposium of the SFB 415 „Signal Transduction Research - Basic Principles and Clinical Perspectives“; September 10 to September 12, 2009; Hamburg; Germany

Verena Pawlak, Inken Lorenzen, Björn Spudy, Madlen Mohr, Mohammad Shomali, Frank Sönnichsen, Joachim Grötzinger; „The disintegrin and EGF-like domain of ADAM17“ First International Symposium on Structural Systems Biology; Sep 24, 2009 - Sep 25, 2009; Hamburg, Germany

9.3 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger für das interessante Thema der Doktorarbeit, die fachliche Betreuung und die Korrektur der Arbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Rose-John möchte ich mich für die Aufnahme im Biochemischen Institut bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Scheidig für die Übernahme des Koreferats.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanke ich mich bei Prof. Dr. F. Sönnichsen (Institut für Organische Chemie, CAU zu Kiel).

Bei Frau Dr. Inken Lorenzen möchte ich mich für Korrektur der Arbeit und für ihren fachlichen Rat im Rahmen der Laborarbeit sowie der Auswertung der NMR-Spektren bedanken.

Für die Einführung in den Laboralltag zu Beginn meiner Doktorarbeit und den fachlichen Rat im Rahmen der Laborarbeit sowie der Auswertung der NMR-Spektren möchte ich mich bei Dr. Sascha Jung bedanken.

Für eine gute kollegiale Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grötzinger bedanken: Björn Spudy, Dr. Ahmad Trad, Dr. Matthias Michalek, Mohammad Shomali, Madlen Mohr, Jana Kieper, Margot Schluesselhuber, Britta Hansen, Ursula Mundt, Jessica Schneider, Janina Schröder und Sina Viehweg.

Allen anderen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Biochemischen Instituts danke ich für die schöne Zeit.

Für die Korrektur meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Yvonne Serfert und Jessica Boesler bedanken.

Bei meinem Freund Ralph Störtzer bedanke ich mich für die Korrektur der Arbeit, seine Geduld und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium nicht möglich gewesen wäre.

9.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Verena Pawlak, dass ich die vorgelegte Dissertation, abgesehen von der Betreuung meines Doktorvaters, selbständig verfasst habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und dabei sind keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet worden.

Diese Arbeit ist noch keiner anderen Universität im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt worden.

Des Weiteren erkläre ich, bisher kein weiteres Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Kiel, den 22.09.2010



Verena Pawlak