

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung der Membranproximalen Domäne von ADAM17 und CANDIS

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Markus Friedrich Schrader
aus Kiel

Kiel, 2019

1. Berichtstatter
Institut

Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Biochemisches

2. Berichtstatter

Prof. Dr. Ottmar Janßen, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung:

30.09.2019

Zum Druck genehmigt:

10.07.2019

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	III
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Proteolyse	1
1.2. Die ADAM Proteasen	2
1.2.1. ADAM17	4
1.2.2. Regulation und Substraterkennung von ADAM17	7
1.2.3. Mit ADAM17 assoziierte Krankheiten.....	11
1.3. Die MPD17 mit CANDIS	13
2. Material und Methoden	16
2.1. Chemikalien und Reagenzien	16
2.2. Materialien.....	17
2.3. Puffer und Lösungen	17
2.3.1. Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur.....	17
2.3.2. Puffer und Lösungen für die Elektrophorese.....	18
2.3.3. Puffer und Lösungen für Renaturierungsexperimente und Proteinreinigung	19
2.3.4. Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	20
2.4. Geräte	20
2.5. Antikörper und Enzyme, <i>Kits</i>	21
2.6. Mikrobiologische Methoden	21
2.6.1. <i>Escherichia coli</i> als Proteinexpressionssystem	21
2.6.2. Kultivierung von Bakterien	22
2.6.3. Plasmid-DNA Transformation in <i>E. coli</i>	22
2.6.4. <i>Glycerolstock</i> Präparation	23
2.7. Molekularbiologische Methoden.....	23
2.7.1. Plasmid-DNA Isolierung	23
2.7.2. Agarosegelelektrophorese	24
2.7.3. DNA Konzentrationsbestimmung	24
2.7.4. PCR Klonierung	24
2.7.4.1. PCR Amplifizierung des <i>Inserts</i>	25
2.7.4.2. Restriktionsverdau von <i>Insert</i> und Vektor.....	26
2.7.4.3. Ligation von <i>Insert</i> und Vektor	26
2.7.5. DNA Sequenzierung.....	27

2.8.	Proteinreinigung	27
2.8.1.	Ernte und Aufschluss einer Bakterienkultur.....	27
2.8.2	Isolierung von <i>Inclusion bodies (Ibs)</i> aus dem Zellpellet.....	27
2.8.3	Verfahren zur Renaturierung.....	28
2.8.4.	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	30
2.8.5.	Präparative Gelfiltration	30
2.8.6.	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	31
2.8.7.	Konzentrierung von Proteinlösungen	32
2.9.	Analytische Methoden.....	32
2.9.1.	Proteinkonzentrationsmessung	32
2.9.2.	Diskontinuierliche SDS-PAGE	32
2.9.3.	Western Blot.....	34
2.9.4.	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	34
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Rekombinante Proteinexpression der opMPD17-CANDIS	36
3.1.2.	Rekombinante Proteinexpression der opMPD17-CANDIS mit GRP78	37
3.2.	Isolierung der cIMPD17-CANDIS	40
3.2.1.	Proteinexpression und Isolierung von <i>Inclusion bodies (Ibs)</i>	40
3.2.2.	Renaturierungsexperimente	40
3.2.2.1.	Renaturierung mittels <i>Rapid Dilution</i>	41
3.2.2.2.	Renaturierung über Dialyse	42
3.2.2.3.	Renaturierung über Dialyse und <i>Rapid Dilution</i>	44
4.	Diskussion	47
4.1.	Expression und Reinigung der opMPD17-CANDIS.....	47
4.2.	Isolierung der cIMPD17-CANDIS	48
4.3.	Ausblick.....	50
4.4.	Zusammenfassung	51
5.	Literaturverzeichnis.....	52
	Anhang	a
	Danksagung	f
	Eidesstattliche Erklärung.....	g

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

ABBILDUNG 1: DIE METZINKIN GENFAMILIE	2
ABBILDUNG 2: DOMÄNENSTRUKTUR DER ADAM FAMILIE	3
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR VON ADAM17	4
ABBILDUNG 4: KATALYTISCHE DOMÄNE VON ADAM17	6
ABBILDUNG 5: DARSTELLUNG DER OFFENEN (LINKS) UND GESCHLOSSENEN (RECHTS) MPD17 STRUKTUR MIT CANDIS	13
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG DES <i>SHEDDING</i> PROZESS	15
ABBILDUNG 7: GELFILTRATION VON MPD-CANDIS	37
ABBILDUNG 8: GELFILTRATION NACH IMAC	38
ABBILDUNG 9: NI-NTA REINIGUNG	38
ABBILDUNG 10: GELFILTRATION NACH IMAC	39
ABBILDUNG 11: SDS-PAGE ANALYSE	39
ABBILDUNG 12: <i>IB</i> REINIGUNG	40
ABBILDUNG 13: GELFILTRATION AUF EINER SD75 SÄULE	40
ABBILDUNG 14: RP-HPLC CHROMATOGRAMM NACH <i>RAPID DILUTION</i> UND WESTERNBLOT	41
ABBILDUNG 15: GELFILTRATION NACH VERDÜNNUNG UND RENATURIERUNG	42
ABBILDUNG 16: ANALYSE DER MONOMEREN GLFILTRATIONSFRAKTION	43
ABBILDUNG 17: DLS MESSUNG	43
ABBILDUNG 18: GELFILTRATION NACH <i>RAPID DILUTION</i>	44
ABBILDUNG 19: SDS-PAGE ANALYSE	45
ABBILDUNG 20: GELFILTRATION NACH <i>RAPID DILUTION</i>	46
ABBILDUNG 21: GELFILTRATION NACH <i>RAPID DILUTION</i>	46
ABBILDUNG 22: NMR STRUKTURDATEN DER CLMPD MIT CANDIS	48
ABBILDUNG 23: SCHEMA DES PET-DUET-1_MPD-CANDIS_GRP KONSTRUKTS	B
ABBILDUNG 24: SDS-PAGE ANALYSE	B
ABBILDUNG 25: SD75 EICHGERADE	C
ABBILDUNG 26: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	C
ABBILDUNG 27: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	D
ABBILDUNG 28: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	D
ABBILDUNG 29: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	D
ABBILDUNG 30: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	E
ABBILDUNG 31: GELFILTRATION NACH RENATURIERUNG	E
ABBILDUNG 32: SDS-PAGE ANALYSE	E
TABELLE 1: TYPISCHER PCR ANSATZ	25
TABELLE 2: TYPISCHES PCR PROGRAMM	25
TABELLE 3: LIGATIONSANSATZ	26
TABELLE 4: PIPETTIERSHEMA FÜR VIER 15%IGE SDS-PAGE GELE	33
TABELLE 5: RENATURIERUNGSSCREEN	42

Abkürzungen

Für chemische Elemente, physikalische Einheiten, SI Einheiten, Nukleinbasen und Aminosäuren wurden die üblichen Abkürzungen genutzt.

APS	Ammoniumpersulfat
CD	Circulardichroismus
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GuHCl	Guanidiniumchlorid
Hb-EGF	Heparinbindender-EGF
iRhom	inaktiv-rhombode Intramembranserinproteasen
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
min.	Minuten
MW	Molekulargewicht
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
ÜN	über Nacht
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
ss	Einzelstrang
TBE	Tris-Borat-EDATA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP3	Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trisaminomethan
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Proteolyse

Proteolyse definiert die Spaltung der Säureamidbindung eines Peptids oder Proteins mittels Proteasen (= Proteinasen). Dieser Vorgang geschieht entweder durch Exopeptidasen, welche N- oder C-terminal der Peptidkette angreifen, oder durch Endopeptidasen, die inmitten der Primärstruktur spalten [1]. Proteasen bewerkstelligen diese hydrolytische Katalyse über ihr enzymatisch aktives Zentrum, welches ihr funktionelles Hauptmerkmal ist. Nach diesem lassen sich Proteasen funktionell klassifizieren. So werden Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen unterschieden. Metalloproteasen sind, mit Ausnahme von Cobalt- und Mangan-haltigen Enzymen, Zinkproteasen [2].

Das Produkt limitierter Proteolyse ist ein einfach oder begrenzt geschnittenes Peptid. Bei multiplen Schnittstellen führt Proteolyse meist zur Degradation [3]. Proteolyse ist ein irreversibles Ereignis [4]. Im Gegensatz zu reversiblen Modifikationen, bei denen nebst nicht-kovalenten Modifikationen auch kovalente Bindungen ausgebildet und wieder gelöst werden können (Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen u.v.a.), stellt die Proteolyse ein zunächst endgültiges Ereignis dar. Davon ist abzuleiten, dass Proteolyse Vorgänge steuert, welche für den Organismus von existentieller Bedeutung sind. So wird das Leben oder Sterben einer Zelle mittels Proteolyse bestimmt (z.B. apoptotische Aktivierung von Caspasen). Proteolyse steuert weiterhin eine große Anzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in einem Organismus [5]:

Die Blutgerinnung wird über Gerinnungsfaktoren aktiviert, welche zunächst fast alle Zymogene sind und zur Familie der Serinproteasen gehören. Mittels limitierter Proteolyse wird die aktive Form freigesetzt, genauso wie beim Gewebsauf- und abbau, an dem Matrixmetalloproteasen (MMP) extrazellulär Wachstumsregulatoren- und faktoren freisetzen können [3]. Hormone, wie Insulin und Enzyme, die die Verdauung regulieren, werden sämtlich über limitierte Proteolyse aktiviert. Höhere Lebewesen, wie der Mensch, zeichnen sich durch eine hochentwickelte homöostatische Regulation aus, um Entzündungs-, wachstums und Abwehrprozesse über die große Familie von proteolytisch freigesetzten Interleukinen und Chemokinen zu regulieren.

Ein weiteres Beispiel für die Proteolyse ist die Aktivierung der Granzyme, welche Effektoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind [3].

Bei diversen Prozessen zeigte sich, dass Proteolyse von Zelloberflächenproteinen, auch Ectodomänen-*shedding* genannt, welche u.a. Interleukine und Wachstumsfaktoren freisetzt, eine enorme Bedeutung in Organismen besitzt. Dieser wichtige Mechanismus hilft Zellen ihr Repertoire und die Freisetzung an oberflächlich exprimierten Proteinen zu regulieren [6]. Schätzungsweise 10% aller Zelloberflächenproteine werden mittels Proteolyse gespalten und somit in den Extrazellulärraum entlassen [7]. Neben dem regulierten *shedding* existiert die konstitutive Katalyse, welche spontan Substrate spaltet, sobald sie an das katalytische Zentrum gelangen (siehe auch 1.2.2.).

Zahlreiche Typen von Membranproteinen werden durch das Ectodomain-*shedding* freigesetzt, wie z.B. Zytokine und ihre Rezeptoren (TNF- α , IL-6R, TNF-Rezeptor 1 und 2, TGF- α , Hb-EGF), sowie Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin [8]. Diese Oberflächen-Proteolyse wird hauptsächlich von Zink-abhängigen Mitgliedern der Metzinkine vermittelt, wie den ADAMs und Matrixmetalloproteasen [6].

1.2. Die ADAM Proteasen

Die ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) gehören zu den Metalloendoproteasen. Nach der MEROPS Klassifikation, die Gliederung über strukturkonservierte Motive vornimmt [2], lassen sie sich weiter in die größte Subgruppe der Metzinkine und weiter in die Gruppe der Adamalysine einteilen.

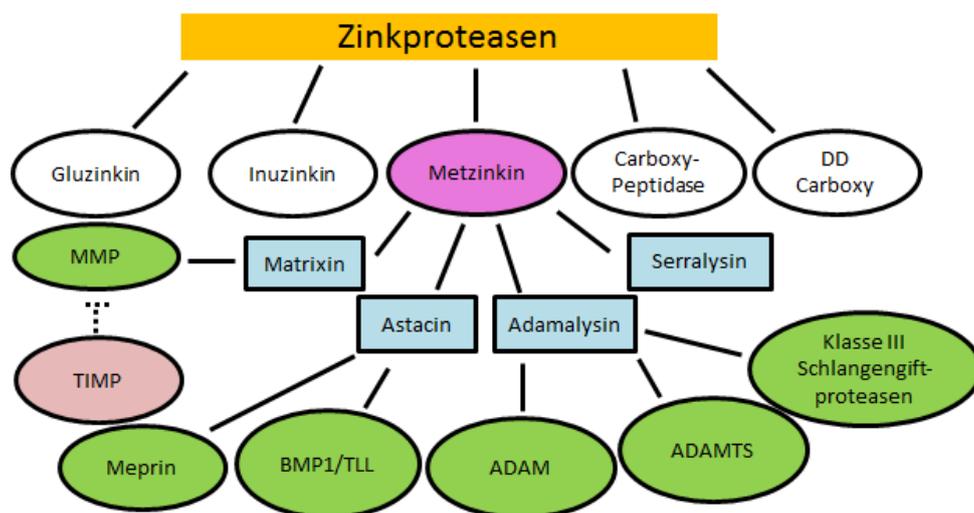


Abbildung 1: Die Metzinkin Genfamilie. Eine schematische Darstellung der Untergruppen innerhalb der Metzinkin Superfamilie. Modifiziert nach Huxley-Jones [4].

Zu den Adamalysinen gehören, neben den ADAMs, die Schlangengiftproteasen SVMPs [9–10]. Weitere Mitglieder der Metzinkin-Familie sind die Astacine, mit einzigartig wirksamen Meprinen, die Matrixmetalloproteasen und die Serralysine (siehe Abb.1).

ADAMs sind Typ-I-Transmembranproteine und haben etwa eine Länge von 750 AS [11]. Ihr Aufbau enthält eine N-terminale Signalsequenz, eine Prodomäne, eine Katalytische Domäne (Metalloproteinase-*like* Domäne) eine Disintegrin Domäne und eine EGF Domäne, gefolgt von der Transmembranregion und einem cytoplasmatischen Teil (siehe Abb.2). ADAM10 und 17 besitzen statt der Cysteinreichen und EGF Domäne eine Membranproximale Domäne (MPD) [12]. Zudem besitzt ADAM17 eine juxtamembranöse Region. Diese wird als “Conserved ADAM17 dynamic interaction sequence”, kurz CANDIS, bezeichnet [13].



Abbildung 2: Domänenstruktur der ADAM Familie. Modifiziert nach [4].

ADAMs sind hoch konserviert und kommen in fast allen Spezies, beginnend bei den Nematoden, bis zu den Vertebraten vor [11]. 40 ADAMs in unterschiedlichen Spezies sind bisher bekannt. Zudem wird angenommen, dass ungefähr 21 ADAMs im Menschen exprimiert werden, von denen 13 katalytisch aktiv sind [11]. ADAMs spielen bei fast allen Lebensprozessen eine wichtige Rolle, bei epithelialer und neuronaler Entwicklung, Myoblastenfunktion, Zell-Zell Interaktion, Regeneration und Proliferation, Differenzierung, malignen Geschehen und Inflammation [14].

1.2.1. ADAM17

ADAM17 wurde als erstes in Verbindung mit einem Substrat, dem inflammatorisch und regulatorisch breit wirksamen Interleukin TNF- α entdeckt und daher zunächst als TNF- α Converting Enzyme (TACE) benannt [15]. An der Zelloberfläche exprimiertes ADAM17 ist, wie die übrigen Mitglieder der ADAMs, ein Typ-I integrales Membranprotein und 824 AS lang [16]. Exprimiert wird ADAM17 zwar ubiquitär, da sich mRNA in nahezu jedem menschlichen Gewebe nachweisen lässt, jedoch ist aktives ADAM17 auf der Zelloberfläche nur in einer geringen Anzahl an Zellen zu finden [17]–[18]. Dieses sind neben regenerierenden und differenzierenden Zellen häufig an Entzündungen beteiligte und entartete Zellen [11]. Daran lässt sich erkennen, dass die Aktivität an der Zelloberfläche, wo das *shedding* der Substrate stattfindet, streng reguliert ist und ADAM17 eng mit pathophysiologischen Prozessen vergesellschaftet ist.

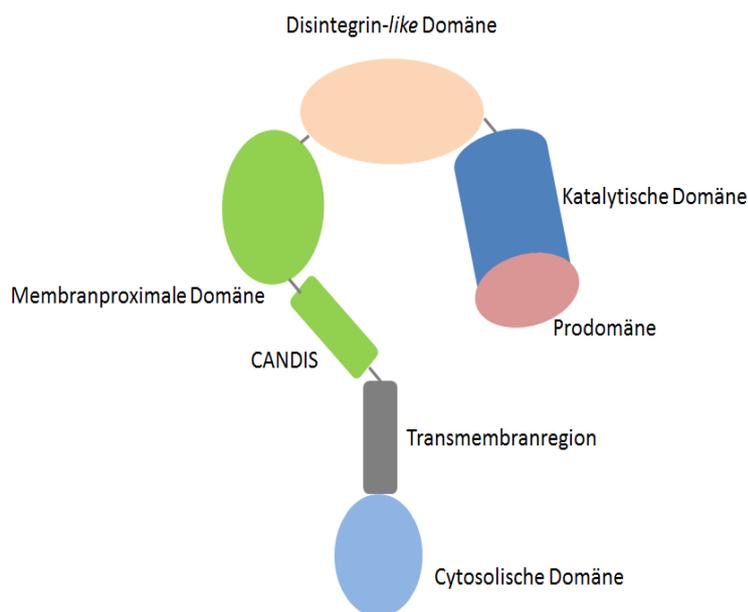


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM17 nach Grötzinger *et al.* [18]. Die Ektodomäne erstreckt sich N-terminal beginnend von der Prodomäne bis zur membraninteragierenden Region CANDIS. Oberflächenpräsentiertes ADAM17 besitzt die Prodomäne, welche im Golgi abgespalten wird, nicht mehr. Die Disintegrin-like Domäne ist für die C-förmige Struktur und Flexibilität der Ektodomäne wesentlich. Die MPD mit CANDIS spielt bei der Substratbindung und Regulierung eine wichtige Rolle.

Spaltung ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die eigentliche Aktivität in einer kontinuierlichen katalytischen Aktivität und im *shedding*, welches erst induziert werden muss, äußert [18]. Katalyse kann, sofern die proteolytische Erkennungssequenz des Substrats nahe genug in der Umgebung der katalytischen Domäne liegt, permanent stattfinden. *Shedding* dagegen beschreibt einen komplexeren Prozess, bei dem nicht katalytische Domänen *exo-site* Regionen des Substrats erkennen und dadurch die

ADAM17 besitzt deshalb eine so zentrale Bedeutung, da viele und heterogene Substrate von ihr freigesetzt werden. Bislang sind über 70 Substrate, wie dem proinflammatorischen TNF- α , EGFR Liganden, u.v.a. bekannt, die eine Rolle in der Immunantwort, Zellregeneration und Differenzierung, sowie bei der Krebsentstehung spielen [18]. Die durchs *shedding* entstandenen, gelösten Ektodomänen können ihr Substrat antagonisieren, wie im Fall von IL-1-R_{II}. Dort antagonisiert gelöster Rezeptor (i.e. die Ektodomäne) seinen Liganden, das IL-1 [6]. Allerdings können lösliche Rezeptoren auch als Agonisten via *transsignaling* wirken. Ein Beispiel dafür ist der IL-6R [19]–[20]. *Transsignaling* beschreibt, dass durch ADAM17 *shedding* löslicher IL-6R in einem Rezeptor-Liganden-Komplex, also IL-6R und IL-6 an IL-6R defizienten Zellen einen Signalprozess auslösen, der zur Inflammation führt [20]. Klassisches IL-6 *signaling* am zellständigen IL-6R löst dagegen gegenteilige Effekte aus.

ADAM17 und ADAM10 unterscheiden sich innerhalb der ADAMs durch das Vorhandensein der MPD anstelle der EGF Domäne. Die hochkonservierte juxtamembranöse *stalk*-Region CANDIS fehlt jedoch in ADAM10. Im Folgenden sind die Domänen von ADAM17 und ihre Funktion beschrieben.

Prodomäne: Die Prodomäne ADAM17 ist, neben TIMP3, der einzig bisher bekannte natürliche Inhibitor von ADAM17. Die Domäne enthält ein Konsensus Cystein *Switch* Motiv (Pro-Lys-Val-Cys-Gly-Tyr), welches das Zink-Ion im katalytischen Zentrum bindet und damit inaktiviert. Diese Interaktion findet nach Translation auf dem Weg zwischen ER und Golgi Apparat statt [18]. Dort wird die Prodomäne von Protein Konvertasen, wie Furin, prozessiert. Die Struktur der Prodomänen ist bisher für keine ADAM ermittelt worden. Genauso wenig ist die genaue Länge einer voll funktionellen Domäne eindeutig. *In silico fold recognition* Vorhersagen schlagen eine Tudor Domäne vor, die hauptsächlich aus *beta-sheets* besteht [18]. Diese CD-Daten decken sich mit laboreigenen (Grötzinger). Dort konnte ein stabiles Konstrukt exprimiert und gereinigt werden, das jedoch keine spezifische Faltung aufzuweisen scheint [Grötzinger, unveröffentlicht], [21].

Katalytische Domäne: Die strukturellen Begebenheiten, bzw. die Faltungstopologie der katalytischen Domäne zeigt, dass ADAM17 in enger Verwandtschaft zu den Schlangengiftproteinasen steht und damit ein Mitglied der

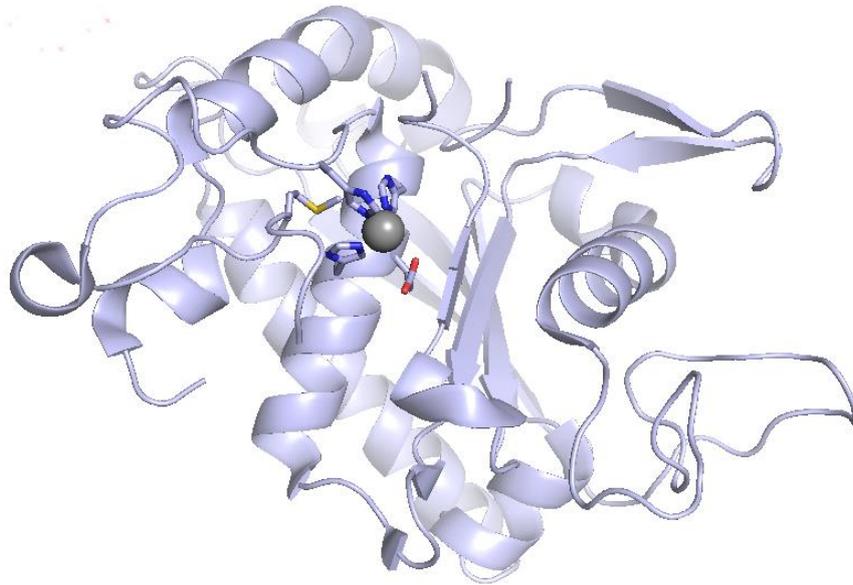


Abbildung 4 Katalytische Domäne von ADAM17 (PDB 3E8R). Das zentrale Zink Ion wird vierfach durch drei Histidine und eine Glutaminsäure komplexiert. Das dissoziierbare H_2O (nicht gezeigt) wird über Komplexbindung aktiviert und kann nukleophil den ersten Schritt der Peptidspaltung einleiten. Die Methioninseitenkette zeigt den *Met-turn* an.

Adamalysine bzw. der ADAM Familie [22] ist. Wie unter 1.2. besprochen, wird ADM17 weiterhin zu den Metzinkinen gerechnet, deren typisches katalytisches Zentrum aus drei Histidinresten und einer Glutaminsäure besteht, die das zentrale Zink Ion vierfach komplexieren. Das dissoziierbare Wassermolekül greift nukleophil an der Peptidbindung des Substrats an [18].

Zudem ordnet ein *konservierter Met-turn* die katalytische Domäne von ADM17 in die Familie der Metzinkine [23] ein. Die Substratspezifität wird maßgeblich durch die P1-P3 *sites* determiniert [24]–[25]. An der Regulierung der Katalytischen Domäne ist TIMP3 beteiligt, welches an diese binden kann (genauer unter 1.2.2.).

Disintegrin Domäne: Die Struktur der ADAM Disintegrin Domäne ist mit der Disintegrin Domäne der Schlangengifte eng verwandt (siehe Abb.1) [26–27]. Die konservierte Integrin Interaktionssequenz Arg-Gly-Asp (RGD) ist dagegen nur bei ADAM15 vorhanden. Neben dem Fehlen der RGD-Sequenz sind zusätzliche Cysteinreste vorhanden, weshalb die Disintegrin Domäne (mit Ausnahme von ADAM15) auch als *Disintegrin-like* und *Cystein-rich* Domäne bezeichnet werden sollte [28]. Dennoch interagieren besonders die katalytisch inaktiven Mitglieder der ADAMs über ihren Disintegrin Domänen, wie ADAM3, 9, 12, 15, 28 und 33 mit Integrinen [29–32]. Diese Wechselwirkung ist als Adhäsionsfunktion (Zell-Zell-Matrix) zu sehen. Die Interaktion ist bei ADAM17 auf die des $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Typs begrenzt [33–34]. Die Konsequenzen dieser Interaktion werden unter 1.2.2. besprochen.

Zudem scheint die Disintegrin Domäne verantwortlich für die gebogene Struktur der Ektodomäne. Durch das Ektodomänen *bending* wird die Katalytische Domäne und die MPD zueinander gebracht, was für den katalytischen Prozess essentiell ist [26].

Membranproximale Domäne: Wie bereits unter 1.2. genannt, besitzt ADAM17, wie ADAM10 auch, eine einzigartige Domäne, die MPD. Diese Domäne ist sowohl an der Substratbindung, als auch an der Regulation der *shedding* Aktivität beteiligt [18], [35].

Nach Strukturaufklärung und Charakterisierung der MPD war ersichtlich, dass diese Domäne in zwei Disulfidisomeren, mit unterschiedlicher Konformation, existiert. Es existiert eine offene, flexible und eine, aufgrund der Funktion und Domärentopologie, geschlossen bezeichnete, rigide Form. Beide unterscheiden sich in den Disulfiden Verknüpfungen [36]. Die Isomerisierung findet mittels der Protein-disulfid-isomerasen (PDI) statt, von denen beschrieben wurde, dass sie einen negativen Effekt auf die ADAM17 Aktivität auf der Zelloberfläche besitzen [37–38]. Es wurde gezeigt, dass die PDI die offene Form der MPD in die geschlossene überführt und damit ADAM17 inaktiviert. Die PDI stellt also einen Schalter der ADAM17 Aktivität dar [36].

Hinsichtlich der Substratbindung zeigte sich sowohl für die offene MPD (folgend opMPD17 genannt) und für die geschlossene Form (folgend als clMPD17 bezeichnet), dass membrangebundene MPD für die Erkennung von zwei Typ-I-Transmembranproteinen, jedoch nicht für die Interaktion mit TNF- α erforderlich ist [37].

1.2.2. Regulation und Substraterkennung von ADAM17

Die Regulation ADAM17 beginnt kurz nach der ribosomalen Expression. Als Membranprotein wird es am rER als Zymogen translatiert. Die Prodomäne dient zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich als Faltungshelfer und Transportunterstützung, sowie als Schutz vor Selbstverdau [38–39]. Nach *trafficking* ins trans-Golgi Netzwerk wird die Prodomäne durch Furin(-ähnliche) Konvertasen gespalten. Das weitere Schicksal der Prodomäne nach Abspaltung im Golgi ist unklar. Auch die Spaltung durch Konvertasen bedeutet nicht zwangsläufig, dass Teile der Prodomäne nicht an der katalytischen Domäne verbleiben [21].

Nach Prozessierung im Golgi und Fertigstellung des Glykosylierungsmusters wird ADAM17 maturiert an die Zelloberfläche geschickt. Nur ein Teil des muren ADAM17s ist an der

Zelloberfläche vorhanden. Der Rest wird intrazellulär gespeichert [40–42]. Da es eine extrazellulär wirkende Protease ist, ist die Oberflächenexpression einer der entscheidenden Schritte bei der Regulierung ADAM17.

Regulation an der Zelloberfläche

An der Zelloberfläche wird die Ektodomäne maßgeblich über TIMP3 und die $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Interaktion reguliert, sowie über die MPD und CANDIS.

ADAM17 kann mit seiner Disintegrin Domäne über cis Wechselwirkungen (gleiche Zelle) oder trans Wechselwirkung (Zell-Zell) mit dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin interagieren [34], [43–44]. Diese Wechselwirkung inhibiert direkt das ADAM17 *shedding* über sterische Blockade des katalytischen Zentrums. Zudem binden bei der cis Wechselwirkung ADAM17 und das Integrin schon intrazellulär bevor beide an der Zelloberfläche exprimiert werden [43]. Eine Aktivierung der Integrine lässt den Komplex dissoziieren. Dies geschieht z.B. durch Serotonin vermitteltes GPCR-*signaling*. Nachdem das inhibierende $\alpha_5\beta_1$ -Integrin dissoziiert ist, wird die ADAM17 *shedding* Aktivität ermöglicht [43-45].

Die Unterschiede zwischen ADAM10 und 17 hinsichtlich der Integrinbindung erklären möglicherweise das verschiedene *shedding* Verhalten [18]. Die Integrin Interaktion ist bei ADAM10, welches konstitutiv aktiv ist, nicht bekannt. ADAM17 dagegen muss fürs *shedding* aktiviert werden. Dieser wird wahrscheinlich über die inhibierende TIMP3 Interaktion und/oder $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Bindung hergestellt [18].

TIMP3 ist ein 24 kDa großes Protein und neben der Prodomäne ADAM17 der einzig bisher bekannte natürliche Inhibitor, jedoch nicht ADAM17 spezifisch [18], [46]. Liegt ADAM17 dimerisiert vor, steigt die Affinität zu TIMP3 erheblich und hält ADAM17 damit in einem inaktiven Zustand.

Auch die MPD und CANDIS spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation. Die MPD stellt mit 5 Disulfiden ein System dar, welches PDI sensitiv ist und damit inaktiviert werden kann. CANDIS hat vielfältige Funktionen. CANDIS erkennt Substrate, wird direkt durch die Isomerisierung beeinflusst und weist als α -Helix eine starke Multimerisierungstendenz *in vitro* und *in vivo* auf [13], [47]. Zudem interagiert CANDIS mit der Zellmembran und beeinflusst damit die Orientierung der gesamten Ektodomäne. Neue Untersuchungen zeigen, dass die MPD von ADAM10 durchs *bending* der Ektodomäne direkt mit der Katalytischen Domäne interagiert und so die Aktivität moduliert [48].

Oberflächenexpression und intrazelluläres ADAM17 trafficking

Die Oberflächenexpression einer Zelle ist einem ständigen Umbau begriffen. Es findet z.B. ein kontinuierlicher *turnover* von ADAM17 statt. Nach clathrinabhängiger Internalisierung kann ADAM17 entweder recycelt werden oder nach Verschmelzung mit lysosomalen Vesikeln degradiert werden [42]. Inwiefern der Aktivierungszustand von ADAM17 Einfluss auf den Internalisierungsprozess und weiterhin auf die Entscheidung Recycling oder Degradation hat, ist unklar. Bisher wurde lediglich gezeigt, dass die PDI an der Zelloberfläche die MPD in die geschlossene Form überführt und damit ADAM17 inaktiviert. Ob damit schon der Weg nach Internalisierung vorgegeben ist (Abbau der inaktivierten Protease) oder ob eine mögliche Reaktivierung nach Internalisierung möglich ist, ist unklar. Dies müsste über eine bislang unbekannte PDI geschehen [18].

Ein neuer Sekretionsweg ist nach Untersuchung an HIV Patienten entdeckt worden, die einen erhöhte TNF- α Spiegel aufwiesen [49]. Vermehrtes TNF- α ist auf erhöhtes ADAM17 *shedding* zurückzuführen, welches wiederum Resultat eines alternativen Sekretionsprozesses ist. Mechanistisch ist das Nef Protein bestimmend, dass nach Internalisierung ADAM17 zur Sekretion führt. Diese sekretierten Vesikel führen zum *shedding* auf Makrophagen [48–49]. Ein ähnlicher Effekt wurde nach PMA Stimulation in Makrophagen entdeckt [51].

PMA selbst ist der stärkste bekannte, allerdings nichtphysiologische ADAM17 Aktivator. ADAM17 ist das einzige Mitglied der ADAM-Familie, das auf Stimulation durch PMA anspricht [52]. Eine PMA Stimulation führt, als nichtphysiologischer PKC Aktivator, zu gesteigerter ADAM17 Zelloberflächenexpression. Der Internalisierung folgend sind zwei Wege der ADAM17 Vesikel möglich: Einmal zur Sekretion als extrazelluläre Vesikel oder zur lysosomalen Degradation [53].

Ein gesteigertes *shedding* mittels intrazellulärer Vesikel ist bisher nur nach PMA Stimulation und nach HIV Infektion beschrieben worden, weshalb dieser alternative Sekretionsprozess kein regulärer physiologischer Weg zu sein scheint [18]. Eine ausgedehnte PMA-Stimulation bewirkt jedoch langfristig die Internalisierung von ADAM17 und führt damit zu verminderter Aktivität [39].

Regulation im Cytosol - Auswirkungen auf die Ektodomäne

Es wurden iRhoms [54], welche katalytisch inaktive Homologe der Rhomboid Intramembranserinproteasen sind, insbesondere iRhom1 und iRhom2, als wichtige ADAM17 Aktivitätsregulatoren identifiziert [54–56]. Aufgrund der cytoplasmatischen Modifikation wird abgeleitet, dass die dominante Interaktionsstelle zwischen ADAM17 und den iRhoms im Cytoplasma oder in den Transmembranregionen liegt [58]. Neben ihrer Funktion im ER *trafficking* zum Golgi scheint iRhom2 zusätzlich ADAM17 hinsichtlich der Substratspezifität zu beeinflussen [56],[59]. Phosphorylierung der cytoplasmatischen iRhom2 Domäne stellt einen entscheidenden Einfluss auf die *shedding* Aktivität dar. Weiterhin gewährleisten iRhoms die Stabilität an der Zelloberfläche [56]. In murinem ADAM17 sind cytoplasmatische Phosphorylierungen an Serin oder Threonin mit einer erhöhten ADAM17 Aktivität assoziiert [60]. Im vorgeschlagenen Mechanismus wird angenommen, dass ADAM17 in ruhenden Zellen am cytoplasmatischen Y735 dephosphoryliert vorliegt und dadurch als Dimer vorliegt. Als solches steigt die Affinität zum stärksten natürlichen Inhibitor TIMP3 und hält damit ADAM17 in einem inaktiven Zustand. Bei Phosphorylierung hingegen, welche durch den Erk oder p38 MAPKinase Weg ausgelöst werden, monomerisiert ADAM17, was eine Reduzierung der inhibierenden TIMP3 Interaktion zur Folge hat [61].

Der cytoplasmatischen Domäne von ADAM17 kommt also, obwohl sie nicht direkt an der *shedding* Aktivierung beteiligt ist, eine wichtige regulatorische Aufgabe zu [18], [59], [62], da sie bei Phosphorylierung allgemein die ADAM17 Expression an der Zelloberfläche erhöht [63] und neben dem *forward trafficking* aus dem ER auch an der Lokalisation von ADAM17 eine wichtige Rolle spielt [61], [40]. Ein weiterer cytosolischer ADAM17 Regulationsfaktor ist das Ca^{2+} Ionophor Ionomycin. Calcium-Einstrom aktiviert ADAM17 [64].

Substraterkennung

Gelangen Substrate in ausreichende Nähe zum aktiven Zentrum von ADAM17, d.h. werden sie von Strukturen (*sites*) nahe des katalytischen Zentrum anhand ihrer Sequenz (zukünftig *cleavage site* genannt) erkannt, kommt es zur Katalyse und Freisetzung von Peptiden. Erkennen jedoch außerhalb der Katalytischen Domäne Strukturen, auch *exo-site* Regionen genannt, ein Substrat unabhängig von dessen *cleavage site* und kommt es zur Freisetzung der Substrat-Ektodomäne, spricht man vom eigentlichen *shedding*. Dazu muss sich, da alle *cleavage sites* der ADAM17 Substrate membranah lokalisiert sind, die katalytische Domäne

membranwärts bewegen. Dies setzt neben der gebogenen Ektodomänenstruktur, die als C-ähnlich beschrieben wurde, eine zusätzliche Flexibilität der Ektodomäne voraus [18].

Die Produkte der kontinuierlichen Katalyse und des *sheddings* sind verschieden. Bei der Katalyse werden kleinere Peptide geschnitten, deren *cleavage sites* aufgrund ihrer Größe an der katalytischen Domäne erkannt und dort geschnitten werden. Bei dem komplexeren Prozess des *sheddings* hingegen kommt es nach Bindung des Substrats zum *bending* der C-ähnlichen ADAM17 Ektodomäne, damit Substrate an den membrannahen *cleavage sites*, geschnitten werden. Es resultieren freigesetzte Substrat-Ektodomänen. Kontinuierliche katalytische Aktivität und *shedding* kann nicht gleichzeitig vorkommen, da das katalytische Zentrum nur ein Substrat zurzeit spalten kann. Über 70 ADAM17 Substrate sind bisher bekannt. Für die meisten ist die Bindungsstelle unbekannt. Die MPD-CANDIS Region ist jedoch als Bindungsstelle für die Substrate IL-1R_{II} und IL-6R, nicht aber für pro-TNF- α beschrieben worden [37].

1.2.3. Mit ADAM17 assoziierte Krankheiten

Die Beteiligung ADAM17 an malignen Erkrankungen, kardiovaskulären-, inflammatorischen-, und neurologischen Störungen gilt heute als gesichert [65]. Die jeweiligen Pathogenitätsmechanismen lassen sich meist auf das fehlerhafte *shedding* der ADAM17 Substrate zurückführen [65]. Eine verminderte oder gesteigerte Expression ist ein Pathogenitätsmarker, ist häufig jedoch nicht kausal mit dem jeweiligen Krankheitsbild in Beziehung zu setzen [7].

Es wurde von einer homozygoten inaktiven ADAM17 Deletionsmutante in einem Patienten berichtet. Für den Patienten stellte dies, neben Erkrankung an Dermatitis, Gastroenteritis und einer Kardiomyopathie, keinen lebensbedrohlichem Zustand dar. Zudem wurde über keine kompensatorisch gesteigerte Aktivität des engsten Verwandten ADAM10 berichtet. Dies ist ein Hinweis, dass der menschliche Organismus den globalen Ausfall ADAM17 über bisher nicht bekannte Mechanismen kompensieren kann [66].

ADAM17 spielt eine Rolle bei der koronaren Herzkrankheit, deren ballistischer Endpunkt der Myokardinfarkt ist. In atherosklerotisch veränderten Plaques wurden Zellen mit gesteigerter ADAM17 Expression nachgewiesen [12]. Bei der weit verbreiteten Krankheit des alten

Menschen, dem Morbus Alzheimer, spielen Amyloide pathogenetisch eine große Rolle. Die Aktivität von ADAM9, 10 und 17 wird als günstig angesehen, da sie das amyloid precursor protein (APP) als α -Sekretase in neuroprotektives lösliches sAPP α spalten [65]. Außerdem wird ADAM17 bei epidermalen Barriere-defekten eine potentiell therapeutische Rolle zugesprochen, da ADAM17 am EGFR *shedding* beteiligt ist [67].

Wie unter 1.2.2. beschrieben, ist von HIV Patienten berichtet worden, dass deren erhöhte TNF- α Spiegel, die systemisch für Entzündungen sorgen und den Krankheitsprozess vorantreiben, durch einen alternativen ADAM17 Sekretionsprozess erzeugt werden [50].

Maligne Erkrankungen

Die häufigsten Krebsarten, das Prostata-, Mamma-, Kolon-, Bronchial-, und das weniger prävalente Nierenzellkarzinom weisen alle eine erhöhte ADAM17 mRNA-Expression auf [12]. Krebs wird heutzutage nach den 6 einfachen und 10 erweiterten "Hallmarks of Cancer" nach Weinberg und Hanahan charakterisiert [68]. Eines der Merkmale ist das Unterhalten der proliferativen Signale mittels Wachstumsfaktoren, häufig EGF. Ein Überschuss an ADAM17 vermitteltem *shedding* resultiert in gesteigerter Freisetzung von EGFR Liganden, welche die Tumorprogression antreiben. So ist ADAM17 für die Aktivierung des EGFR durch TGF- α von Nöten und schafft Tumore in Nacktmäusen [69]. Ein weiteres Malignitätskriterium ist das invasive Wachstum. Proteasen, die Extrazellulärmatrix abbauen, scheinen Voraussetzung für Metastasierung zu sein [11]. Untermauert wird dies durch die Beobachtung, dass eine Nierenzellkarzinomlinie nach ADAM17-*silencing* ihr invasives Potential verlor. Zudem hemmte ein Antikörper gegen die ADAM17 Disintegrin-Domäne die Interaktion zwischen Fibroblasten und Karzinomzellen [39], [70]. Ein erhöhtes *shedding* scheint also eindeutig mit Malignität assoziiert zu sein, ein verringertes ADAM17 *shedding* dagegen verursacht Probleme in der Entwicklung und Regeneration, da das EGFR *signaling* für die Gewebsregeneration nicht ausreichend ist.

Inflammatorische Prozesse

ADAM17 setzt TNF- α , einem der wirkungsvollsten Entzündungs-Interleukine, frei und scheint somit ein geeignetes Ziel therapeutischer Intervention zu sein. Sowohl bei chronisch entzündlichen Prozessen, Autoimmungeschehen und bei der Krebsprogression sind ADAM17 vermittelte Interleukine, v.a. TNF- α , relevant. Arthritis, Kolitis und akutes Herzversagen sind auf einen teilweise massiven Anstieg von löslichem TNF- α zurückzuführen, während membranständiges TNF- α dabei keine Rolle spielt [11], [71]. ADAM17 ist, wie in 1.2.1.

angesprochen, am Selektin *shedding*, sowie am *shedding* der Adhäsionsproteine ICAM-1 und VCAM beteiligt. Diese regulieren die transendotheliale Migration, dem kritischen Schritt bei der Evasion von Immunzellen ins entzündete Gewebe [11].

Klinische Studien für ADAM17 Inhibitoren wurden aufgrund von fehlender Wirksamkeit und Anzeichen schwerwiegender Nebenwirkungen abgebrochen [72].

1.3. Die MPD17 mit CANDIS

Die Membranproximale Domäne (MPD) der ADAM17 Ektodomäne, der C-terminal eine konservierte membraninteragierende *stalk* Region, CANDIS, folgt, existiert in zwei Disulfidisomeren, welche durch die PDI isomerisiert werden: Eine offene Form (opMPD) (siehe Abb. 5), die mit dem *shedding* aktiven ADAM17 korreliert und es CANDIS ermöglicht seine Substrate IL-1R_{II} und IL-6R zu binden. Das andere Isomer ist die geschlossene Form, cMPD, dem permanent inaktiven ADAM17 zugehörig. cMPD kann kein Phosphatidylserin

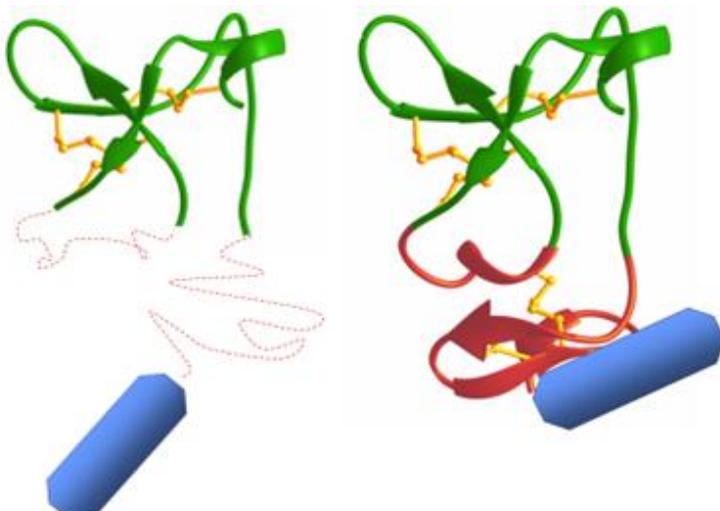


Abbildung 5: Darstellung der offenen (links) und geschlossenen (rechts) MPD17 Struktur mit CANDIS. Der obere Teil der MPD wird von der PDI Isomerisierung nicht beeinflusst. Der untere Teil ist in der offenen Form flexibel (rot gepunktet) und CANDIS frei und zugänglich. Kompakter ist die MPD in der geschlossenen Form. CANDIS scheint dort nicht flexibel zu sein und mit der MPD zu interagieren. Die PS Wechselwirkung findet am flexiblen Teil statt (übernommen von Grötzinger).

(PS) binden [36–37], [72]. Funktionelle Studien lassen vermuten, dass CANDIS flexibel und zugänglich in der opMPD vorliegt, in der cMPD allerdings verborgen bleibt [73].

Beide Isomere unterscheiden sich in den Disulfiden, nämlich C600-C639 und C635-C641 in der offenen und C600-C635 sowie C639-641 in der geschlossenen [36]. Die geschlossene Form, deren Domänenstruktur durch N- und

C-terminal verbundene Disulfide kompakt und rigide geformt ist, unterscheidet sich topologisch deutlich von der offenen (siehe Abb.5). Sie ist im Vergleich zur geschlossenen etwas elongierter und flexibler. Interessanterweise kann die PDI weder im oxidierten noch reduzierten Zustand eine einmal in die geschlossene Form überführte MPD in die offene

überführen [36]. Der frühzeitigen Inaktivierung der opMPD durch ER ständige PDIs wirkt das Chaperon GRP78 entgegen [74].

Die MPD trennen 29 AS von der Transmembranregion, wobei die ersten 14 AS einer evolutionär einzigartig konservierten Sequenz entsprechen, die CANDIS genannt wird. Interessanterweise gibt es diese bei dem engen Verwandten ADAM10 nicht. Diese Sequenz bildet eine amphipathische α -Helix, die mit der Zellmembran interagieren kann (siehe Abb.6) [75]. Diese Interaktion wird durch PS-Präsentation angetrieben, weshalb man davon ausgeht, dass die MPD mit CANDIS bei der Konformationsänderung der Ektodomäne, dem membranwärts gerichteten *bending*, involviert ist und so das *shedding* ermöglicht.

CANDIS ist essentiell für die ADAM17 Substraterkennung, da gezeigt werden konnte, dass CANDIS allein ausreichend ist, um Substrate zu binden [75]. Zudem scheint die MPD je nach Konformation direkt CANDIS zu beeinflussen. Die Substratbindung ist nur möglich, wenn die offene Konformation der MPD vorliegt [75]. Man vermutet, dass CANDIS in der clMPD nicht frei zugänglich ist. Die fehlende Substratbindung in der geschlossenen Form ist ein zusätzlicher Grund, warum ADAM17 nach PDI Wirkung inaktiv ist.

Bisher sind drei der über 70 Substrate ADAM17 der MPD-CANDIS Region zugeordnet worden. Es scheint bisher so, dass CANDIS nur mit Typ-I-Transmembran Proteinen interagiert, da es nicht proTNF- α , bindet. Die Bindungsstelle für das Typ-II-Transmembranprotein pro-TNF- α liegt nämlich außerhalb der MPD [18].

Die Bindungsstelle CANDIS am IL-6R beginnt an der IL-6R *stalk* Region N-terminal bis zu seiner *cleavage site* [75]. Die Bindungsstelle CANDIS am IL-6R und die *cleavage site*, an der die Katalytische Domäne spaltet, liegen also eng beieinander. Anhand dieses Zusammenhangs konnte das Modell der C-förmig gestalteten Ektodomäne und das PS-abhängige *shedding* untermauert werden (vgl. Abb.6) [26]. Zudem wurde das *up* und *down bending* ADAM17 durch folgende Experimente weiter bestätigt: Die *cleavage site* am IL-6R wurde membranfern elongiert und damit der IL-6R *stalk* Region, entzogen. Eine Elongation von 10 AS führte zur vollständigen Aufhebung des *sheddings* [76].

Die Membraninteraktion CANDIS ist allerdings nicht immer positiv für das *shedding*. Sie kann die Aktivität blockieren, indem cholesterinreiche Regionen mit CANDIS interagieren [75]. Die regulative Rolle von cholesterinreichen Regionen in der äußeren Schicht der Zellmembran ist mehrfach beschrieben worden [77]. ADAM17 scheint nun in solchen cholesterinreichen Mikrodomänen zu verweilen [52]. Dadurch wird CANDIS Interaktion mit

der Zellmembran unterbunden. Dementsprechend wirkt sich die Scramblase, ein Enzym, das die Lipidinnen- und Außenschicht neu verteilt, positiv auf die CANDIS Aktivität aus. Sie reduziert den Cholesteringehalt der Außenschicht und bringt PS nach außen [18], [75]. Es wurde gezeigt, dass die MPD mit CANDIS dimerisiert und multimerisiert [47]. Inwiefern CANDIS jedoch bei der inhibierenden Dimerisierung ADAM17 involviert ist und welche Funktion Multimerisierung der MPD-CANDIS besitzt, ist unklar.

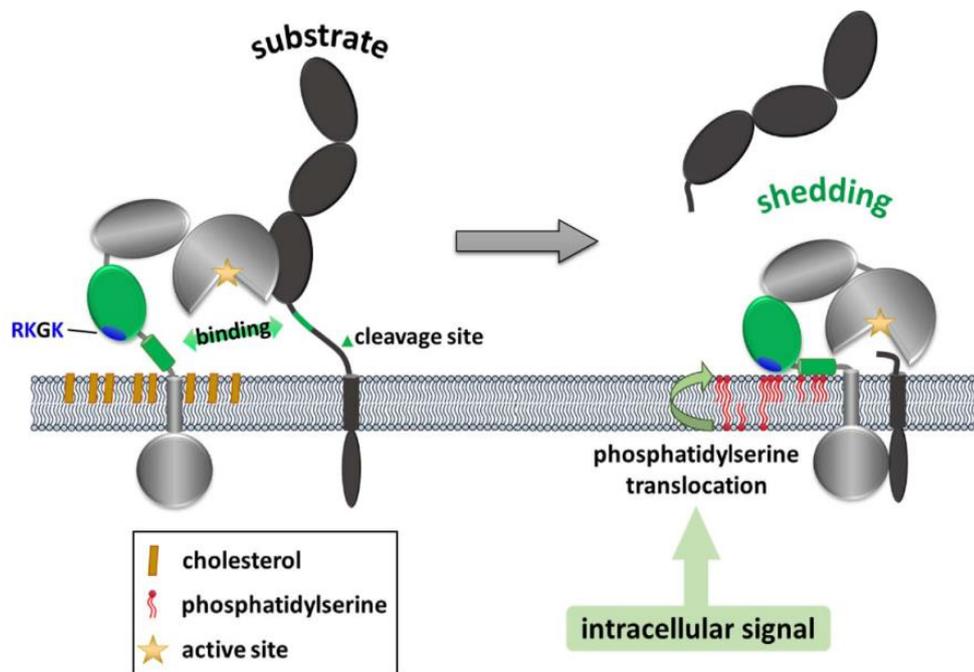


Abbildung 6 Schematische Zeichnung des shedding Prozess. ADAM17 verbleibt in ruhenden Zellen in cholesterinreichen Mikrodomänen. Nach Scramblase Umverteilung der Lipidzusammensetzung (grüner Pfeil) gelangt PS in die äußere Membranschicht. Durch das positiv geladene RKGK Motiv bindet die MPD mit CANDIS an die Membran. Dies führt zur Neupositionierung der Substrat cleavage site innerhalb des aktiven ADAM17 Zentrums. Die stalk Region des Substrats (grün) bindet membranproximal an ADAM17. In enger räumlicher Nähe befindet sich die cleavage site des Substrats. Um dort zu spalten, muss sich die Ektodomäne membranwärts bewegen (i.e. bending der gesamten Ektodomäne). Übernommen von Grötzinger *et al.* [18].

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-bisacrylamid Lösung Rotiporese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Acetonitril/ 0.1 % TFA	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfate (APS), ≥98%, p.a	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe.
APS	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Merck, Darmstadt
Coomassie G-250	Roth, Karlsruhe
Glycerin, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Glycin Pufferan ®	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glutathion (reduziert)	Roth, Karlsruhe
Glutathion (oxidiert)	Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Gibco/Life Technologies, Waltham
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ 2x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
NaOH-Plättchen	Roth, Karlsruhe
37 % Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris (Pufferan, ≥99.9%)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
TritonX-100 (reinst.)	Roth, Karlsruhe
Wasser/ 0.1 % TFA	Roth, Karlsruhe

Alle Chemikalien wiesen, sofern nicht anders bezeichnet, eine Reinheit von ≥ 98% auf.

2.2. Materialien

HisTrap™ HP 1 ml	GE Healthcare, München
HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade-Säule	GE Healthcare, München
Membranfilter (0.45 µm, 0.22 µm)	Merck Millipore, Burlington
Pierce™ Protein Concentrator 10 MWCO	Thermo Fisher, Waltham
Pierce™ Protein Concentrator 3 MWCO	Thermo Fisher, Waltham
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt; Nümbrecht,
PVDF-Membran	Whatman, Maidstone
1,5 und 2 ml Reagiergefäße	Sarstedt; Nümbrecht
Rollenmischer RM5	Karl Hecht KG, Sonderheim/Rohn
Nitril-Einmalhandschuhe	Roth; Karlsruhe
5 ml Spritze	Becton Dickinson, Franklin Lakes
10 ml Spritze	Becton Dickinson, Franklin Lakes
VortexGenie 2	Scientific Industries, New York
Whatmanpapier	Roth, Karlsruhe
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

2.3. Puffer und Lösungen

2.3.1. Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium Fertigmischung (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)	Luria Broth, Merck
Zellaufschlusspuffer für die Bakterienkultur	1x PBS (140 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 1.47 mM KH ₂ PO ₄) + Benzonase oder Proteaseninhibitor-Cocktail
LB-Agar Platten (für ca. 10 Platten)	2 g NaCl, 2 g Trypton/Pepton, 1 g Hefeextrakt, 4 g Agar, ddH ₂ O ad 200 ml)
Ampicillin (<i>stock</i> Konzentration: 100 mg/ml)	Vorkultur 1:1000, Hauptkultur 1:500
Kanamycin (<i>stock</i> Konzentration: 30mg/ml)	Vor- und Hauptkultur 1:1000

Das LB Medium wurde bei Raumtemperatur (RT) mit ddH₂O gemischt, autoklaviert und nach Abkühlen mit dem Antibiotikum versetzt.

2.3.2. Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

Lämmli 5x reduzierender Probenpuffer	35% (v/v) Glycerol, 400 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5, 10 mM SDS, 6 µM Bromphenolblau, 25% β-Mercaptoethanol
Lämmli 5x nicht reduzierender Probenpuffer	35% (v/v) Glycerol, 400 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5, 10 mM SDS, 6 µM Bromphenolblau, 25% β-Mercaptoethanol
Coomassie-haltige Proteinfärbelösung	25% Methanol, 10% Essigsäure, 126.6 µM Coomassie G-250, in ddH ₂ O
Entfärbelösung	10% Methanol, 10% Essigsäure, in ddH ₂ O
6x DNA-Probenpuffer Fertigmischung	Thermo Fisher, Waltham
10x SDS-PAGE Laufpuffer	0.25 mM Tris, 1.92 M Glycin, 1% SDS
5x TBE Laufpuffer (Einwaage für 1 Liter)	54 g Tris, 27.5g Borsäure, 4.6 g EDTA, ddH ₂ O ad 1 l
1% Agarosegel	0.5 g Agarose in 50 ml 0.5xTBE
Lösungen für die Silberfärbung (Einwaage für 100 ml)	
Fixierlösung	30% Ethanol, 10% Eisessig
Lösung A (Reduktion)	6.8 g Natriumacetat x 3 H ₂ O, 0.2 g Natriumthiosulfat, 30 ml 100% Ethanol
Lösung B (Färbung)	0.1 g Silbernitrat + 70 µl 37% Formaldehyd
Lösung C (Entwicklung)	2.5 g Natriumcarbonat pH 11.5, 50 µl 37% Formaldehyd
Lösung D (Stopplösung)	1.68 g Natrium EDTA pH 8

Die Laufpuffer wurden 1:10 verdünnt und in die Elektrophoresekammern bis zur vollständigen Benetzung der Gele gefüllt.

2.3.3. Puffer und Lösungen für Renaturierungsexperimente und Proteinreinigung

10x PBS (Einwaage für 1 Liter)	1.4 M NaCl (80 g), 26.8 mM KCl (2 g), 80.9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (14.4 g), 14.7 mM KH ₂ PO ₄ (2 g)
IMAC-Puffer	1x PBS + Imidazol (50-500 mM) pH 8.0
Gelfiltrationspuffer	1x PBS pH 7.5
Denaturierungspuffer	6.0 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer pH 8.0
Renaturierungspuffer 1	1.0 M Guanidiniumhydrochlorid, 3.0 mM reduziertes Glutathion, 0.3 mM oxidiertes Glutathion, 50 mM Natrium- hydrogenphosphatpuffer pH 8.0
Renaturierungspuffer 2	1.0 M Guanidiniumhydrochlorid, 3.0 mM reduziertes Glutathion, 0.3 mM oxidiertes Glutathion, 50 mM Natrium- hydrogenphosphatpuffer pH 8.0
Renaturierungspuffer 3	50 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer pH 7.4
Alternative zu Renaturierungspuffer 3	1x PBS pH 7.4
Mod. Renaturierungspuffer 1	2.0 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer pH 8.0, 3.0 mM reduziertes Glutathion, 0.3 mM oxidiertes Glutathion
Mod. Renaturierungspuffer 2	2.0 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer pH 8.0, 3.0 mM reduziertes Glutathion, 0.3 mM oxidiertes Glutathion
Renaturierungspuffer 4	50 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer pH 8.0, 3.0 mM reduziertes Glutathion, 0.3 mM oxidiertes Glutathion

Alle unter 2.3.3. aufgeführten Puffer wurden entgast, z.T. wurden sie, nachdem O₂ über eine Vakuumpumpe entzogen worden war, mit N₂ unter einem Druck von 1.5 bar für 2 h begast.

2.3.4. Puffer und Lösungen für den Western Blot

Methanol	Roth, Karlsruhe
10x TBS	0.5 M Tris, 1.5 M NaCl, HCl auf pH 7.4
1x TBST	1x TBS, 0.05% Tween-20
10x Transferpuffer	0.25 M Tris, 1.9 M Glycin
6% Milchpulver in 1xTBST	
ECL SuperSignal® West Pico	Thermo Scientific, Waltham
Chemoluminescent Substrate	

2.4. Geräte

Agarosegellaufkammer Mini-Sub	Biorad, München
ÄKTAExplorer	GE Healthcare, München
ÄKTAFLC	GE Healthcare, München
ÄKTApurifier	GE Healthcare, München
Assistent Rollenmischer RM5	Hecht KG, Sonderheim/Rohn
Biometra PCR T-Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
Blot-Detektion - Fluorochem Q, Multiimage III	Biozym Scientific GmbH, Hes.-Oldendorf
Blot-Detektion - Las1000	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
BP1212 S Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GFL3015 Schüttler	GFL, Burgwedel
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham
Heidolph MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach
Laser Spectroscatter 201	RiNA GmbH, Berlin
HPLC-System	Shimadzu, Kyoto
Inkubator Multitron Standard	Infors HAT, Bottmingen
KERN EW 2200-2NM Einwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Lyophylle - Alpha 2-4 LSC	M.Christ Gefriertrocknungsanl., Osterode
Mikrowelle R 202	Sharp, Osaka
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad, München
NanoDrop ND1000	peQLab Biotechnologie GmbH
pH-Meter MP225/ pH-Meter Elektrode inlab 410	Mettler Toledo, Gießen
Präzisionsküvette 1.5 ml	Helma GmbH Co., Mühlheim
Reinstwasseranlage Milli Q-Plus	Millipore, Massachusetts
Sanyo Ultra Low	Sanyo, Osaka
SDS-PAGE Laufkammer Mini Protean	Biorad, München
Sigma 4-16K Zentrifuge	Sigma, Kawasaki
Sonifikator - Sonopuls UW2200	Bandelin, Berlin
Sorvall® RC 5B Plus	Thermo Scientific, Waltham
Spektrophotometer U2001	Hitachi, Chiyoda
SP quick Schlauchpumpe	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Welch IImvac™ MP 201 E	Fisher Scientific, Waltham
Western Blot Imaging FluorChemQ	Alpha Innotech, Hessisch Oldendorf

2.5. Antikörper und Enzyme, *Kits*

anti-His ₆ Maus	Biochemisches Institut, Kiel
anti-Maus HRP conjugated	Promega, Madison
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machery Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid Easy Pure	Machery-Nagel, Düren
NucleoBond® Xtra Midi	Machery-Nagel, Düren
Wizard® Plus SV Minipreps	Promega, Madison
Fast Digest BamHI	Thermo Scientific, Waltham
Fast Digest SalI	Thermo Scientific, Waltham
Pfu DNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Waltham

2.6. Mikrobiologische Methoden

2.6.1. *Escherichia coli* als Proteinexpressionssystem

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein häufig genutzter bakterieller Organismus für die Protein Expression. *E. coli* Bakterien sind Gram negative Stäbchen. Gentechnisch modifizierte Stämme erlauben eine pro- und eukaryotische Proteinsynthese in großem Maßstab, welche vergleichsweise günstig ist. Eine Vielzahl an Plasmiden ist für die Transformation und Expression vorhanden. Die Limitierung, die solch ein prokaryotischer Organismus mit sich bringt, ist ein fehlender Enzymapparat um komplexe Glykosylierungs- oder Phosphorylierungsmuster herzustellen, die für die Löslichkeit, Faltung und Funktion eukaryotischer Proteine häufig unerlässlich ist. Zudem fehlen Chaperone, die eine korrekte Konformation und den Zeitpunkt der Freilassung einer aktiven Form sicherstellen. Weiterhin ist davon auszugehen, dass Proteinkomplexe in *E. coli* aufgrund der Größenlimitation nicht funktional exprimiert werden können [78]. Verschiedene modifizierte Stränge existieren, die eine auf eukaryotische Proteine ausgerichtete DNA, wie *codon* Gebrauch (*E. coli*, Rosetta), Expressionseffizienz (*E. coli* pLys), Disulfidbrückensynthese (*E. coli* origami) u.v.a. beherbergen.

Für eigene Versuche wurde auf den konventionellen BL21(DE3) Stamm zurückgegriffen. Nach IPTG Gabe diffundiert der lac Repressor vom lac Promotor und ermöglicht die Transkription der T7 Polymerase, welche klonierte Gene auf dem transformierten Plasmid in hoher Effizienz transkribiert [79].

2.6.2. Kultivierung von Bakterien

Während der Arbeit mit Bakterien wurde auf eine ausreichende Arbeitsflächendesinfektion mit 70%-igem Ethanol geachtet. Bei der Transformation von Bakterien (2.6.3.) wurde unter Schutz des Bunsenbrenners gearbeitet.

Bakterien wurden ausschließlich in LB Medium kultiviert. Dazu wurde das Medium autoklaviert, abgekühlt und Antibiotika dazugegeben (Arbeitskonzentration: Kanamycin 30 µg/ml, Ampicillin 50-100 µg/ml). Vorkulturen wurden aus *Glycerolstocks* als 15-50 ml Kulturen präpariert und ÜN bei 37°C inkubiert. Diese dicht gewachsenen Kulturen wurden dann zum frischen Medium (meist 0.5 l) 1:100 dazugeben. Diese Hauptkultur wurde anschließend bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0.4-0.8 wachsen gelassen. Schließlich wurde IPTG als Aktivator des lac-Operons dazugegeben [80]. Die IPTG Konzentration betrug entweder 0.1 oder 1 mM. Die Hauptkultur wurde bei 20°C (ÜN Expression), meist aber bei 37°C vierstündig im Inkubator exprimiert. Für Plasmid Vervielfältigung wurde der dafür optimierte *E. coli* Stamm XL10 Gold verwendet (siehe 2.6.3.).

2.6.3. Plasmid-DNA Transformation in *E. coli*

Die *E. coli* Stämme BL21 (für die Proteinexpression) und der XL10 Gold Stamm (genutzt für die DNA Isolierung) wurden mit vorhandenen oder neu klonierten Plasmiden transformiert. Die Plasmidkonzentration betrug mindestens 100 ng/µl.

Zuerst wurden 50 µl der kompetenten Stämme auf Eis aufgetaut, mit dem Plasmid gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben im Hitzeblock für 30 Sekunden bei 42°C erwärmt. Es folgte eine Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Danach wurden 250 µl LB Medium ohne Antibiotikum dazugegeben und die Proben wurden für 45 min. bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurden die Bakterien auf einer mit dem Selektionsantibiotikum versetzter LB-Agar Platte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.6.4. *Glycerolstock* Präparation

Um die Bakterienkultivierung einmal transformierter Zellen zu vereinfachen, wurden *Glycerolstocks* hergestellt. Vorkulturen für die Hauptkultur wurden aus diesem *Glycerolstock* angeimpft. Die *Glycerolstocks* entstanden aus dichten BL21 Kulturen. Dazu wurden 0.9 ml einer dichten ÜN Kultur ($OD_{600} \geq 5$) mit 300 μ l steriler 50% (v/v) Glycerollösung gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Plasmid-DNA Isolierung

Plasmid DNA und deren Fragmente wurde zum einen aus einer bakteriellen Kultur gewonnen, zum anderen aus Agarosegelen nach Elektrophorese isoliert.

Transformierte ÜN Kulturen (zwischen 15 und 50 ml) von *E. coli* wurden bei 4°C für 15 min. bei 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zur DNA Isolierung gebraucht. Dies wurde, sofern die Kultur bis 10 ml groß war mit dem NucleoSpin® Plasmid Easy Pure und Wizard® Plus SV Minipreps Kit durchgeführt, sofern es um DNA Isolierung in größerem Maßstab (10-200 ml) ging, wurde das NucleoBond® Xtra Midi Kit gebraucht. Dies war z.B. der Fall wenn DNA aus *low copy E. coli* Stämmen (wie BL21) gewonnen werden sollte oder wenn DNA präparativ zur Herstellung von Plasmid *stocks* genutzt wurde. Bei allen Kits wurde analog des Herstellerprotokolls gearbeitet. Allerdings wurde bei den Mini-Präparationen im letzten Schritt meist ein H_2O Volumen zwischen 30-50 μ l gewählt, anstatt von 100 μ l, um die DNA Konzentration zu erhöhen.

Nach Agarosegelelektrophorese (siehe 2.7.2.) wurde das gesuchte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mittels des NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kits gereinigt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.7.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Größenauftrennung von DNA Fragmenten. Negativ geladene DNA läuft entlang eines elektrischen Feldes zur Anode [80].

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 0.5 g Agarose in 50 ml 0.5x TBE gelöst und bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Nach Vorlage von 1 µl Ethidiumbromid in die Gelkammer wurde das Gel gegossen, der Probenkamm gesteckt und nach Erstarren in eine mit 0.5x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und mit einem Größenmarker laufengelassen. Nach Auftrennung unter einer Spannung von 90 V wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.7.3. DNA Konzentrationsbestimmung

Das Absorptionsmaximum elektromagnetischer Strahlen von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm [81]. Der molare Extinktionskoeffizient für dsDNA ist bekannt ($\epsilon_{260} = 50 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) und trägt daher bei der linearen Lambert-Beer Beziehung zur Konzentrationsbestimmung unbekannter DNA Konzentrationen bei:

$$A_{260} = c * d * \epsilon$$

c = Konzentration, d = Länge der Küvette im Strahlengang

Um die Reinheit von DNA Lösungen zu bestimmen, wurde der Absorptionsquotient $A_{260/280}$ herangezogen. Aromatische Aminosäureseitenketten in Proteinen absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm. Dieser Quotient hilft die Verteilung von DNA zu Protein (i.d.F. als Verunreinigung anzusehen) abzuschätzen. Am NanodropR (ND-1000 spectral photometer) wurde erst mit ddH₂O der Leerwert eingestellt, dann wurden 2 µL der dsDNA Lösung aufgetragen und die Messung durchgeführt.

2.7.4. PCR Klonierung

Das Ziel der PCR Klonierung ist es, ein rekombiniertes DNA Molekül herzustellen. Das entstandene DNA Konstrukt ermöglicht dann, sobald es als Vektor in einen Expressionsorganismus (hier *E. coli*) eingebracht wurde, ein Protein (i.d.F. MPD17-CANDIS) zu exprimieren. Dazu wird in einen Zielvektor, der zuvor mit Restriktionsenzymen und einem dephosphorylierenden Enzym behandelt wurde, eine DNA-Sequenz (*Insert*) eingefügt. Diese

ist bereits in einer PCR-Reaktion vervielfältigt und ebenfalls mit Restriktionsenzymen behandelt worden. Eine Ligase verbindet dann Vektor mit *Insert*. Die neu erzeugten DNA-Moleküle werden anschließend zur Vermehrung in Bakterien transformiert.

2.7.4.1. PCR Amplifizierung des *Inserts*

Bei einer PCR wird ab dem dritten Zyklus der Reaktion ein DNA Fragment exponentiell amplifiziert. Gezeigt ist ein typischer PCR Ansatz. Wurden mehrere Ansätze getestet, wurde ein Master-Mix erstellt, der ein vielfaches Volumen eines einfachen Ansatzes (siehe Tab.1) enthielt.

Tabelle 1 Typischer PCR Ansatz.

Bestandteil	Volumen [μ l]
10x Pfu Puffer	5
25 mM dNTPs	0.4
100ng/ μ l Matrize	1
10 μ M Vorwärts-Primer	1
10 μ M Rückwärts-Primer	1
ddH ₂ O	40.6
Pfu Polymerase	1

Tabelle 2 Typisches PCR Programm.

Wiederholungen	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min.]
1	95	2
20	1. 95 2. 55-60 3. 72	0.5 1 5
1	72	10
1	4	900

Das PCR Produkt wurde über das NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Eine Agarosegelelektrophorese diente der Größenanalyse. Zudem wurde es zum Ausschluss von Punktmutationen sequenziert (siehe 2.7.5.).

2.7.4.2. Restriktionsverdau von *Insert* und Vektor

Zur gezielten Fragmentierung von DNA dienen Restriktionsendonukleasen. Diese sind Restriktionsenzyme, welche aus Bakterien und Archaeen stammen und palindromisch angeordnete Basenpaare in einem dsDNA-Strang erkennen. Nach Spaltung der Phosphodiesterbindung resultiert eine frei 5` und 3`-OH Gruppe. Die resultierenden Enden können überstehend oder glatt sein. Um eine Religation während der Reaktion zu vermeiden, wird der größere DNA Abschnitt (Vektor) mit einer Phosphatase behandelt.

3 µg des *Inserts* und Vektors wurden mit den Restriktionsenzymen Fast Digest BamHI und Fast Digest Sall 1h bei 37 °C in einem 50 µl Ansatz verdaut. Dabei wurden die beiden Enzyme in doppelter Konzentration mit je 3 µl eingesetzt. Gepuffert wurde die Reaktion in einem 2x Tango Puffer. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C wirkte 1h die Phosphatase bei 37 °C. Die getrennten Ansätze mittels des NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kits gereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.7.4.3. Ligation von *Insert* und Vektor

Das Zusammenfügen des *Inserts* und Vektors findet enzymatisch mit Hilfe der T4-DNA Ligase statt. Unter ATP Verbrauch wird eine erneute Phosphodiesterbindung geknüpft. Der Ligationsansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und nach Hitzeinaktivierung der Ligase über das NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt. Die Konzentration wurde erneut photometrisch bestimmt und das ligierte Konstrukt in *E. coli* XL10 Gold transformiert. Selektiert wurde auf LB-Agarplatten.

Tabelle 3 Ligationsansatz. Gezeigt ist eine typische Stöchiometrie des MPD-CANDIS *Inserts* und pET-Duet1 Vektors.

Stöchiometrie <i>Insert</i> /Vektor	5:1
Volumen	[µl]
Vektor [0.9 ng/µl]	1
<i>Insert</i> [55 ng/µl]	11.5
10 T4 Ligasepuffer	2
H ₂ O	4.5
T4 Ligase	1

2.7.5. DNA Sequenzierung

Nachdem pDNA mittels des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up gereinigt worden war, wurde sie in einer Konzentration zwischen 80-200 ng/µl eingestellt und zu Eurofins Scientific SE zur Sequenzierung geschickt. Das Absorptionsverhältnis betrug $A_{260/260} > 1.8$. Dieser Quotient ist ein Maß für die Reinheit von DNA (Absorptionsmaximum dsDNA bei 260 nm). Verunreinigungen durch bakterielle Proteine absorbieren bei 280 nm. Die jeweiligen Konstrukte wurden mittels der Sanger-Methode sequenziert.

2.8. Proteinreinigung

2.8.1. Ernte und Aufschluss einer Bakterienkultur

Zwischen 0.5 l (zur *IB* Isolierung) und 5 l (zur Isolierung von löslichem Protein) einer *E. coli* Kultur wurden meist nach 4h, seltener nach ÜN Kultivierung bei 4500 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in kühlem Zellaufschlusspuffer (siehe 2.3.1.) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis dreimal jeweils für eine Minute sonifiziert (Puls-Pause Zeitintervall von 50 %, Amplitudenleistung: 40 %). Das entstandene Lysat wurde für 15 min. bei 11000 g bei 4°C zentrifugiert. Sofern lösliches Zielprotein aus dem entstandenen Überstand isoliert werden sollte, wurde der Überstand über eine 0.2 µm Membran filtriert und anschließend für die Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie verwendet (siehe 2.8.4., 2.8.5.). Sollte aus *Inclusion bodies* Protein über Renaturierung isoliert werden, wurde der Überstand verworfen und vorhandenes Pellet genutzt (siehe 2.8.2.).

2.8.2 Isolierung von *Inclusion bodies* (*Ibs*) aus dem Zellpellet

Nach Lyse der Bakterienkultur entstandenes Pellet wurde in 1x PBS + 0.5% Tween aufgenommen, resuspendiert und für 3 min. sonifiziert (Puls-Pause Zeitintervall von 50 %, Amplitudenleistung: 40 %). Anschließend wurde für 20 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in PBS und Tween aufgenommen. Das Pellet wurde insgesamt dreimal mit Detergenz und dreimal ohne gewaschen. Anschließend wurden die *IBs* in 6 M GuHCl, gepuffert in 50 mM Natriumhydrogenphosphat pH 8 aufgenommen und gelöst. Um noch verbliebene unlösliche Zelltrümmer, Präzipitate, DNA

sowie (Lipo-)polysaccharide und Lipide zu entfernen, wurde diese Suspension für 10 min. bei 11000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Renaturierung eingesetzt. Alternativ wurden nach Lösen der *IBs* unlösliche Bestandteile durch Filtration über eine 0.2 µm Membran abgetrennt. Das Redoxpaar wurde entweder erst unter Dialyse zugesetzt, meist aber schon direkt nach Lösen der *IBs* in gepufferter 6 molarer Guanidiniumchloridlösung.

2.8.3 Verfahren zur Renaturierung

Renaturierung wurde erstmals von Anfinsen an der Ribonuklease A genauer beschrieben. Er konnte zeigen, dass jedes Protein unter physiologischen Bedingung in seiner nativen Konformation im Zustand minimaler freier Energie vorliegt (Anfinsen Dogma) [82]. Auch wenn ein Protein denaturiert wurde, ist es möglich dieses unter geeigneten Bedingungen zu renaturieren. Renaturierung setzt bei den *Ibs* an. Typischerweise werden aggregierte Proteine in einem chaotropen Reagenz (meist 8 M Urea oder 6 M Guanidiniumchlorid), alternativ in ionischen Detergenzien gelöst und denaturiert. Zudem finden meist Additive wie DTT Anwendung, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Renaturierung kann nur unter Entfernung des denaturierenden Agens stattfinden. Das geschieht z.B. mittels semipermeabler Membranen (5 kDa *cut-off*). Im Membranschlauch gelöstes Volumen wird gegen ein Größeres (meist 1:100-1:200) dialysiert.

Es existieren weitere Methoden zur Entfernung des denaturierenden Agens. So kann beispielsweise über einen laminaren Fluss in Mikrokanälen das Agens in kurzer Zeit entfernt werden [83]. Dieser Vorgang wird auch als *Rapid Dilution* verstanden, welcher modifiziert in freier Lösung oder auf Säulen zur Affinitätschromatographie Anwendung findet. Ziel der *Rapid Dilution* ist es zeitlich die Proteinaggregation während des Renaturierungsprozesses zu minimieren, indem in chaotropen Substanzen gelöste Proteine schlagartig verdünnt werden.

Zudem ist Renaturierung mittels folgend aufgeführter Stoffe möglich: Verwendet man Aminosäuren wie Argininhydrochlorid (ArgHCl) kann die Proteinaggregation während der Renaturierung verhindert werden [83]. Glycerin, Polyethylenglykole, Alkohole und Zucker agieren als Protein stabilisatoren, indem sie hydrophobe Interaktionen stabilisieren. Während des Renaturierungsprozesses binden diese Additive an Faltungsintermediate der partiell denaturierten Proteine [84].

Auch Cyclodextrine inhibieren die Proteinaggregation während des Renaturierungsprozesses. Die Cyclodextrin basierte Methode wird auch artifizielle Chaperon-assistierte Renaturierung genannt [85]. Bei den Renaturierungsversuchen von MPD-CANDIS kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz.

1. Im Denaturierungspuffer (siehe 2.3.3.) gelöste *Ibs* wurden in einem Dialyseschlauch in einem Volumenverhältnis von 1:200 gegen Renaturierungspuffer 1 (siehe 2.3.3.) ÜN dialysiert. Anschließend wurde gegen Renaturierungspuffer 2 (2.3.3.) ÜN dialysiert. Schließlich wurde ÜN gegen Renaturierungspuffer 3 (2.3.3.) dialysiert.
In Varianten von Verfahren 1 wurde die Guanidiniumchlorid Konzentration vor dem finalen Dialyseschritt von 1 M auf 3 M erhöht (siehe 3.2.2.). Nach den Dialysen wurde das Schlauchvolumen von präzipitierten Bestandteilen abgetrennt und entweder mittels IMAC gereingt oder konzentriert, um dann über die Gelfiltration analysiert zu werden. Zudem wurden nach dem letzten Dialyseschritt renaturierte Proteine mittels HPLC untersucht. Zum Teil wurden die *Ibs* vor Dialyse mit 10 mM DTT 12 h vorbehandelt. Dieses wurde dann im ersten Dialysevorgang entfernt. Außerdem wurden die einzelnen Dialyseschritte zeitlich variiert (siehe dazu 3.2.2.)
2. Eine wesentliche Modifikation von 1. bestand darin, nach Lösen der *Ibs* in Denaturierungspuffer die modifizierten Renaturierungspuffer 1 und 2 (siehe 2.3.3.) zu verwenden. Im finalen Schritt wurde dann entweder gegen den Renaturierungspuffer 3 dialysiert oder das Schlauchvolumen wurde auf einer Ni-NTA Säule gebunden, um dort anschließend Proteine durch 1x PBS zu renaturieren. Die zurückgefalteten Proteine wurden auf der Gelfiltrationssäule analysiert.
3. In einer weiteren Variante wurden die *Ibs* (gelöst in 2 M Guanidiniumchlorid pH 8 nach nach Einwirken des Glutathion Redox-Paars) auf 1 ml konzentriert (2-3 mg/ml) und gegen ein kleines Volumen PBS pH 7.4 (10 ml) eingetroppt. Nach Abtrennen präzipitierter Proteine wurde das Volumen konzentriert und auf der Gelfiltrationssäule analysiert.
4. In Denaturierungspuffer gebundene *IBs* wurden auf einer Nickelsäule gebundenen, in 1 ml eluiert (6 M Guanidiniumchlorid + 500 mM Imidazol) und in 1 l Renaturierungspuffer 4 eingetroppt. Anschließend wurde das Volumen zur Isolierung des Zielproteins über eine Ni-Säule gegeben und das Eluat mittels HPLC oder Gelfiltration untersucht.

2.8.4. Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die IMAC ist eine Form der Affinitätschromatographie und wird zur Trennung und Isolierung von Peptiden und Proteinen genutzt. Rekombinante wt Proteine und Mutanten werden nach Expression in einem pro- oder eukaryotischen System und nach Aufschluss der Zellen über einen Histidin *tag* (häufig His₆) mittels einer Nickelsäule gereinigt. Die Nickelsäulen enthalten Nickelionen, die über eine Komplexbindung an eine NTA-Matrix gebunden sind.

Die starke Komplexbindung der 6 Histidinreste an die Ni-NTA Matrix wurde genutzt um das Zielprotein (MPD17-CANDIS) von übrigen *E. coli* Proteinen, die unspezifisch an die Ni-NTA Matrix banden, zu isolieren. Die Säule wurde erst mittels Zellaufschlusspuffers (siehe 2.3.4) äquilibriert. Danach wurde das Lysat (Proteingemisch) auf die Säule geladen (Flussrate: 1 ml/min), anschließend wurde die Säule an ein ÄKTA System (siehe 2.4.) angeschlossen. Nach Bindung der Proteine an die Säule wurden über steigende Imidazolkonzentrationen (meist 50 mM, 100 mM, 200 mM) Verunreinigungen von der Säule gewaschen und das Zielprotein mit einer Konzentration von 500 mM Imidazol in 1x PBS eluiert.

Die Elution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden Proben vom Laden der Säule, Waschen und der Elution mittels SDS-PAGE analysiert. Elutionsproben wurden konzentriert und entweder mittels Gelfiltration oder RP-HPLC weiter aufgetrennt.

2.8.5. Präparative Gelfiltration

Gelfiltration trennt Proteingemische über ihr Laufverhalten auf einer Polydextran-Matrix. Dieses Verhalten hängt vom hydrodynamischen Radius eines Proteins ab, welcher - bei Annahme einer globulären Struktur -, mit seiner Größe korreliert. Gelfiltration ist daher gleichbedeutend mit Größentrennung. Das Elutionsvolumen ist proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Es ergibt sich demnach ein linearer Zusammenhang von beiden. Da dieser nur eine Näherung bedeutet, ist eine Abweichung von 2-5 kDa bei dieser Trennmethode zu erwarten. Die Polydextran-Matrix besitzt Poren unterschiedlicher Größe. Proteine, deren hydrodynamischer Radius geringer als der Porendurchmesser ist, werden zeitlich verzögert vom Laufmittelfluss (meist gepufferte Salzlösungen) erfasst, größere Proteine werden schneller eluiert. Proteine oder Aggregate, die größer als das Exklusionslimit

sind werden daher ohne jegliche Trennung mit dem Ausschlussvolumen (*void volume*) der Säule eluiert.

Die Reinigung von MPD-CANDIS erfolgte über eine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade-Säule an einem Biologischen DuoFlow FPLC (alternativ Purifier, Biorad). Die Proben wurden vorher meist auf ein Volumen zwischen 1 und 5 ml konzentriert, über eine 0,2 µm Membran filtriert und auf die Säule gespült. Das Proteingemisch wurde unter einer Flussrate von 1 ml/min getrennt und bei einer Fraktionsgröße von 3 ml eluiert. Die Elution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden Proben verschiedener Elutionszeitpunkte genommen und via SDS-PAGE analysiert.

2.8.6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zwei häufig genutzte Varianten dieser Chromatographiemethode sind die normale Phase und die reverse Phase HPLC. Bei der normalen Phasen HPLC werden Substrate auf einer festen, wasserlöslichen, polaren Phase, der Säulenmatrix (Siliciumdioxid) mittels eines hydrophoben Laufmittels, z.B. Hexan aufgetrennt. Nicht polare Komponenten werden schneller eluiert als polare [86].

Bei der reversen Phase HPLC (RP-HPLC) besteht die Säulenmatrix aus modifizieren hydrophoben Silicatpartikeln. Meist sind es C₈ oder C₁₈ Kohlenwasserstoffe. Zur Trennung wird ein polares Lösungsmittel, protisch, wie aprotisch verwendet (Wasser/Methanol oder Wasser/Acetonitril/TFA). Polare Komponenten werden nun schneller als apolare eluiert. Hydrophobere Substrate binden über van der Waals Kräfte an der CH-Matrix [87]. In dieser Arbeit wurde die RP-HPLC genutzt.

Die MPD-CANDIS kann durch seine 10 Cysteine, die im Regelfall 5 Disulfide ausbilden, eine Vielzahl an Isomeren bilden. Von diesen vielen möglichen Disulfidisomeren dürften nur wenige thermodynamisch stabil sein. Um die stabilste und biologisch aktive Disulfidspezies zu reinigen, wurden Proteingemische und MPD-CANDIS Isomere nach Renaturierung oder Gelfiltration auf der RP-HPLC voneinander getrennt. Es wurde die MultoHigh-Bio-200-C18 5µl Säule am Prominence-System (Shimadzu) verwendet. Getrennt wurde mittels eines Acetonitril/0.1% TFA und H₂O/0.1% TFA Gemisches unter ansteigender Acetonitrilkonzentration (0.64% pro Minute). Z.T. wurde auf der Säule auch präparativ gearbeitet.

2.8.7. Konzentrierung von Proteinlösungen

Unterschiedliche Trennungs- und Analysemethoden, wie die Gelfiltration (siehe 2.8.5.) oder die HPLC (2.8.6.) machen es notwendig Proteinlösungen vor der Säulentrennung zu konzentrieren. Dies geschah mittels der 10 kDa *cut-off*, bzw. 3 kDa *cut-off* Konzentratoren (PierceTM Protein Concentrator) bei 3900 rpm an der Sigma 4-16K Zentrifuge. Die Laufzeit war abhängig von der Probengröße und den gewünschten Zielkonzentrationen, welche am NanoDrop ND1000 bestimmt wurde. Die Proteinlösung wurde immer wieder resuspendiert, um Bindungen und Präzipitation an der Konzentratoren-Membran zu verhindern.

2.9. Analytische Methoden

2.9.1. Proteinkonzentrationsmessung

Analog zu DNA Konzentrationsmessungen basieren Proteinkonzentrationsmessungen auf dem Labert-Beer-Gesetz (siehe 2.7.3.3.). Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Bei 280 nm Wellenlänge absorbieren hauptsächlich aromatische Aminosäureseitenketten. Da die Aminosäuresequenz der MPD-CANDIS Konstrukte vorhanden war, konnte ϵ über das Programm ProtParam berechnet werden. Die Konzentration einer Proteinlösung wurde am Nanodrop gemessen (ND-1000 spectral Photometer). Häufig wurde jedoch die Gesamtproteinkonzentration über einen gemittelten Extinktionskoeffizienten bestimmt.

2.9.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode um Proteingemische anhand ihres Molekulargewichts für analytische Zwecke zu trennen und sichtbar zu machen. Diese Methode nutzt den Unterschied der elektrophoretischen Mobilität von Polypeptidketten unterschiedlicher Länge. Da jedoch bei einer Elektrophorese Peptide gleicher (oder sehr ähnlicher) Größe aufgrund ihrer Aminosäuren Zusammensetzung und der damit verbundenen unterschiedlichen elektrischen Gesamtladung bei einer Elektrophorese unterschiedlich weit in der Polyacrylamid Matrix

wandern würden, wird dieser Faktor mittels SDS ausgeschaltet. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine entfaltet und die elektrische Ladung pro Größe vereinheitlicht.

Der SDS-PAGE Ladepuffer enthält β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken auflöst, Erhitzen der Proben auf 95 °C gewährleistet eine vollständige Denaturierung. Sowohl Sammel-, wie Trenngel werden über die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid mit Hilfe des Polymerisationsstarters APS und Katalysators TEMD hergestellt. Sammel- und Trenngel sind unterschiedlich gepuffert (Sammelgel: pH 6.8, Trenngel pH 8.8) [88]. Der leicht azide pH bewirkt eine Vereinheitlichung der Lauffront zu einer engen Bande. Nachdem das Trenngel gegossen war, wurde die Oberfläche mit einer dünnen Schicht aus Isopropanol benetzt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgezogen und das Sammelgel gegossen.

Tabelle 4 Pipettierschema für vier 15%ige SDS-PAGE Gele.

	15% Trenngel	7.5% Sammelgel
30% Acrylamid Stammlösung	7.5 ml	1.3 ml
Tris/HCl 1.5 M pH 8.8	3.75 ml	
Tris/HCl 1.5 M pH 6.8		2.5 ml
ddH ₂ O	3.5 ml	6.1 ml
SDS 10%	150 μ l	100 μ l
TEMED	7.5 μ l	10 μ l
APS sol 10%	150 μ l	100 μ l

Es wurden 15-30 μ l Probe nach Mischen mit 5x SDS-PAGE Probenpuffer (siehe 2.3.2., reduzierend und nicht-reduzierend) aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Gele liefen unter einer Spannung von 200 V für 45 Minuten. Sichtbar gemacht wurden die Banden nach 120 minütiger Inkubation mittels einer Coomassie Färbelösung. Zum Entfärben wurde Entfärbelösung (siehe 2.3.2.) oder ddH₂O verwendet.

Sofern eine Silberfärbung angewendet wurde, um nach Coomassie Färbung schwach bis nicht sichtbare Banden hervorzuheben, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Das Gel wurde 30 min. fixiert (siehe 2.3.2.) und anschließend kurz mit H₂O gewaschen. Danach wurde das Gel 30 min. in Lösung A (2.3.2.) inkubiert und mehrfach mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel wiederum 30 min. in Lösung B (2.3.2.) inkubiert.

Einem folgenden schnellen Waschvorgang mit H₂O folgte eine Inkubation in 50 ml Lösung C (2.3.2.) unter Schütteln. Anschließend wurde Lösung D (2.3.2.) dazugegeben, um die Färbung zu beenden.

2.9.3. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode um die Anwesenheit von Proteinen und Peptiden, bzw. alle durch Antikörper detektierbaren Epitope anzuzeigen. Diese Methode gehört zu den sensitivsten Proteinnachweismethoden. Ein sekundärer Antikörper bindet an den primären und mittels gekoppelter enzymatischer Lichtreaktion am sekundären Antikörper wird der Epitop-Antikörper Komplex detektiert. Auf diese Art wird ein Signal amplifiziert und Proteinmengen um die 0.1 ng können detektiert werden [89].

Nachdem eine PVDF Membran mit reinem Methanol aktiviert worden war, wurde sie auf das Gel angepasst und beidseits von Transferpuffer (siehe 2.3.4.) getränkten Whatmanpapieren bedeckt. Anschließend wurde sie in eine ausgekleidete Gelhalterungskassette gelegt und nach Einsetzen in die Blotkammer wurde der Blotting Vorgang mit einer Spannung von 90 V gestartet. Kühlakkumulatoren und Lagerung der Blotkammer in Eis schützte die Membran vor Überhitzung. Nach Entnahme der Membran wurde diese mit Blockierlösung (6% Milchpulver in TBS-T) für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde der in Blockierlösung aufgenommene Primärantikörper in einer 1:1000 aufgetragen und ÜN bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T jeweils 10 Minuten gewaschen und der in Blockierlösung aufgenommene Sekundärantikörper in 1:5000 Verdünnung für eine Stunde bei RT dazugegeben. Abschließend wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen und der Sekundärantikörper mit fusionierter Peroxidase dazugegeben. Durch chemolumineszentes Substrat der Peroxidase wurden Lichtquanten zur Detektion gebracht.

2.9.4. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) stellt eine Methode zur Bestimmung der Größenverteilung von Suspensionen, Polymeren (Makromolekülen) oder kleinen Partikeln dar [90]. Trifft Licht auf Partikel (bis zu einem Durchmesser von 0.1 µm), wird es in alle Raumrichtungen gestreut und man spricht von Rayleigh-Streuung [91].

Dabei stellt jedes hochmolekulare Oligomer oder Aggregat ein Streuzentrum dar. Bei Einstrahlung von monochromatischen und kohärenten Laserlicht interferieren die einzelnen Streuwellen. Diese Interferenz wirkt sich auf die Streuintensität aus. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der Zentren und der damit verbundenen sich ändernden Interferenz fluktuiert die Intensität. Werden diese Fluktuationen zeitlich analysiert, lassen sich damit Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit der Teilchen (Zentren) in Lösung schließen.

Durch die Geschwindigkeit lässt sich wiederum der Diffusionskoeffizient berechnen. Der hydrodynamische Radius wird dann über die Stokes-Einstein Beziehung aus dem Diffusionskoeffizienten berechnet [92]. Der hydrodynamische Radius der isolierten MPD-CANDIS Spezies nach Gelfiltration wurde als DLS Messung mit Hilfe des Laser Spectroscatter 201 bestimmt. Dafür wurden 40 μl konzentrierte Proteinlösung (ca. 0.75 mg/ml) in eine Präzisionsküvette mit 1.5 nm Schichtdicke gefüllt. Nach Kalibrierung mit einer BSA Probe erfolgten Probenaufnahmen bei RT. Daten von 34 Messungen je 5 Sekunden wurden akkumuliert. Diese wurden durch die Gerätesoftware analysiert und der hydrodynamische Radius der Fraktion bestimmt.

3. Ergebnisse

Anhand der offenen und geschlossenen MPD17 Strukturen konnte nach Entdeckung und Charakterisierung der amphiphilen α -Helix CANDIS angenommen werden, dass diese bei beiden MPD17-Disulfidisomeren jeweils eine andere Orientierung zur MPD aufweist [36-37]. In der offenen, flexiblen Form, die aufgrund zu hoher Flexibilität C-terminal nicht im NMR gelöst werden konnte [36], scheint CANDIS beweglich und frei für Interaktion mit Liganden zu sein (IL-1R_{II} und IL-6R). Der Versuch zur Isolierung und massenspektrometrischen Untersuchung von opMPD-CANDIS war zuvor unternommen worden [93] und wurde in dieser Arbeit nur komplementär bearbeitet (siehe 3.1. und 3.1.2.).

In der geschlossenen MPD scheint CANDIS für Liganden nicht zugänglich zu sein [94]. Wahrscheinlich ist eine andere MPD-CANDIS Konformation, welche auf Stabilisierungen zwischen CANDIS mit der MPD oder CANDIS und der Zellmembran basiert, dafür verantwortlich [36]. Aufgrund der cMPD Struktur und einem Experiment von Grötzinger war die Arbeitshypothese, dass ein MPD-CANDIS Fusionsprotein unter den richtigen Renaturierungsbedingungen als stabiles Monomer vorliegt und einer NMR Strukturlösung zugänglich sein könnte.

3.1. Rekombinante Proteinexpression der opMPD17-CANDIS

Vorarbeiten von Grahl [93] an der opMPD17-CANDIS zeigten, dass im Gegensatz zur Reinigung der opMPD [94] starke Oligomerisierung auftrat. Diese ging nicht auf ungenügende Faltung oder Disulfidmultimerisierung zurück, sondern war durch CANDIS bedingt [93]. Trotz Modifikation der Expressions- und Reinigungsfaktoren sowie unter Zuhilfenahme von Detergenzien war es nicht möglich, monomeres MPD-CANDIS in signifikanter Menge zu isolieren. Die Bildung von Oligomeren, welche im DLS nachgewiesen wurden, legte nahe, dass es sich um CANDIS verursachte hochmolekularer Aggregate handelte [93].

Nach eigener MPD-CANDIS Expression (pet28a Plasmid) war aggregiertes MPD-CANDIS löslich im Überstand nachweisbar (vgl. Abb.19A, 2). Die Expression in verschiedenen *E. coli* Stämmen zeigte, dass auch besondere Expressionsstämme wie Rosetta und Origami zu keiner

wesentlich höheren Konzentration nach Aufschluss führten (Daten nicht gezeigt).

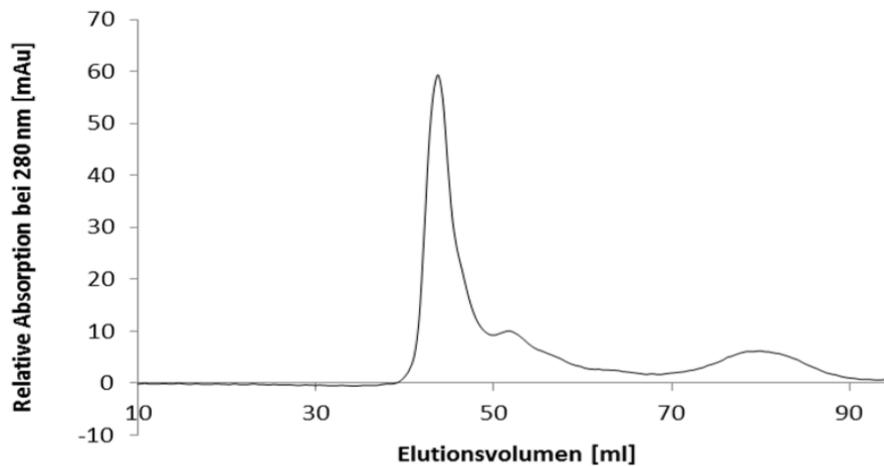


Abbildung 7 Gelfiltration von MPD-CANDIS. Übernommen von [93]. Nach 80 ml des Elutionsvolumens auf einer SD75 Säule fand sich monomeres MPD-CANDIS. Die Analyse des größten *peaks* um 45 ml zeigte aggregiertes MPD-CANDIS.

Als *ultima ratio* wurde MPD17-CANDIS mit dem natürlichen Faltungshelfer GRP78 in Bakterien coexprimiert. *In vivo* wirkt GRP78 der frühzeitigen Inaktivierung der opMPD durch ER ständige PDIs entgegen [74]. Die Arbeitshypothese war, dass Coexpression mit einem Chaperon CANDIS stabilisieren und so die Aggregation verhindern könnte.

3.1.2. Rekombinante Proteinexpression der opMPD17-CANDIS mit GRP78

Um MPD17-CANDIS mit dem Chaperon GRP78 zu stabilisieren, sollten beide mit Hilfe eines Coexpressionsvektors in *E. coli* B121 exprimiert werden.

Dazu wurde MPD17 aus einem pET-Duet-1_MPD17_GRP78 Vektor (siehe Abb.23A) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sall* ausgeschnitten und das PCR *Insert* MPD-CANDIS inkloniert. Ein N-terminaler His₆ *tag* erlaubte eine Reinigung über IMAC. Das entstandene Konstrukt, welches keine Thrombinschnittstelle mehr besaß, wurde mittels Colony PCR und durch Sequenzierung (EurofinsGenomics) mit den fw- und rv-T7 Primern überprüft. Nach erfolgter Klonierung und einem Expressionstest (Daten nicht gezeigt) wurde MPD-CANDIS mit GRP78 in einer 5 l Kultur exprimiert

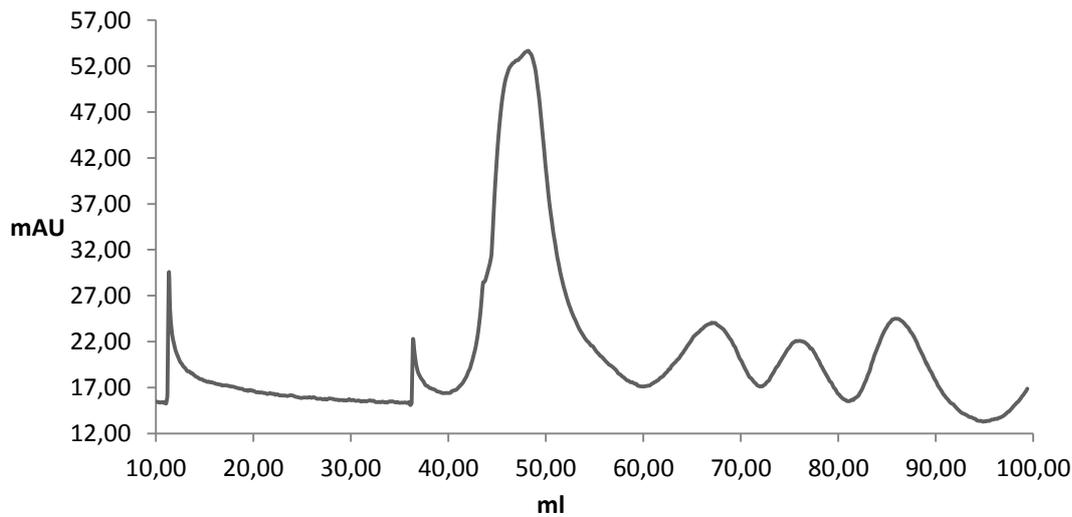


Abbildung 8 Gelfiltration nach IMAC. Zuvor war MPD-CANDIS nach Induktion mit GRP78 in einer 5 l Kultur 4 Stunden bei 37°C exprimiert worden. Nach ca. 85 ml eluierte monomeres MPD17-CANDIS.

und mittels 1 ml Nickelsäule am Äkta System gereinigt (siehe Abb.24). Anschließend wurde dieses Eluat auf einer SD75 Säule Größen getrennt. Dort konnte monomeres MPD17-CANDIS nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (siehe Abb.8), das zügig präzipitierte.

Modifikation der Expressionsdauer und Temperatur (ÜN bei 16°C) zeigten nach Reinigung über eine 1 ml Nickelsäule (Abb.9) während der Gelfiltration ein ähnliches Ergebnis (siehe Abb.10). Monomeres MPD-CANDIS war nur in geringen Mengen nachweisbar und nach SDS-PAGE nicht durch Coomassie- und Silberfärbung detektierbar (siehe Abb.11).

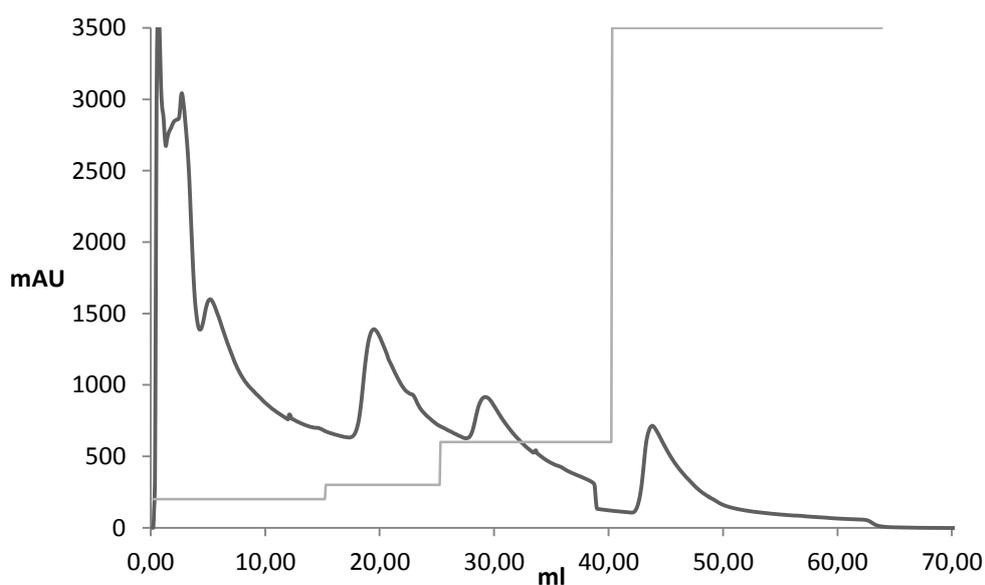


Abbildung 9 Ni-NTA Reinigung. Nach Aufschluss einer 5 l Kultur (ÜN bei 16° C) wurde das Lysat über eine 1 ml Ni-NTA Säule an einem Äkta System mit den Imidazolstufen 50 mM 75 mM und 150 mM gereinigt. Anschließend wurde mit 400 mM Imidazol eluiert.

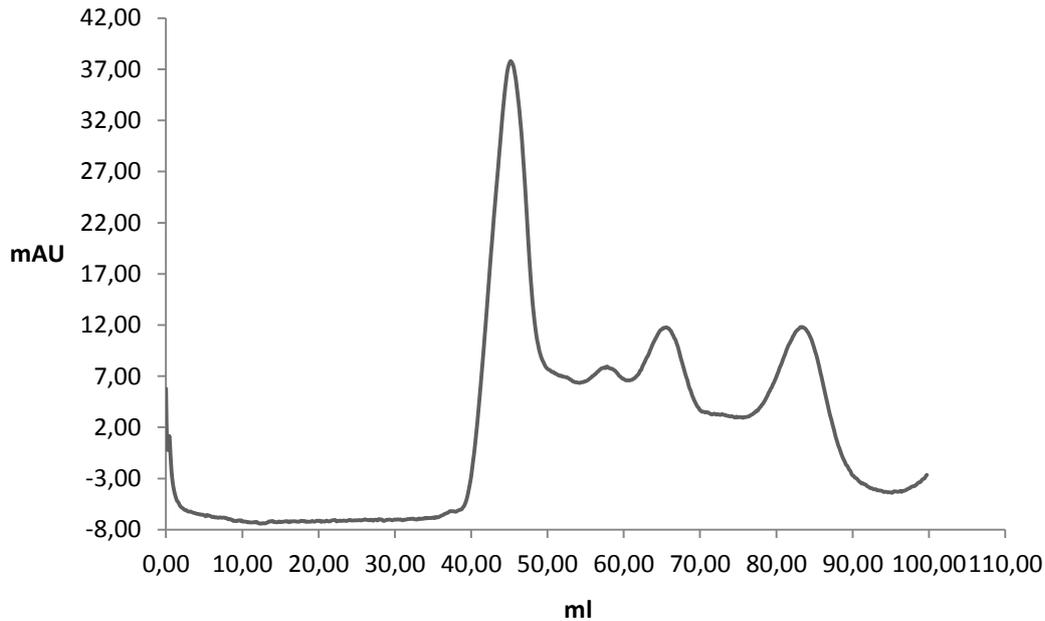


Abbildung 10 Gelfiltration nach IMAC. Nach ca 85 ml eluierte monomeres MPD17-CANDIS. Die Spezies um 45 ml entsprach einer 100 kDa und 80 kDa großen Verunreinigung (siehe Abb.11, 1). Der zweite *peak* bei 65 ml entsprach einer ca. 40 kDa großen Verunreinigung (siehe Abb.11, 2).

Ursächlich für die geringe Ausbeute war die irreversible Präzipitation von MPD-CANDIS nach Nickelsäulenelution. Diese fand sowohl zeitabhängig, als auch bei hohen Salzkonzentrationen und Temperaturveränderungen statt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die GRP78 MPD-CANDIS Bindung während der IMAC, spätestens jedoch während der Gelfiltration gestört wurde. Sobald GRP78 MPD-CANDIS nicht im Komplex stabilisierte, aggregierte MPD-CANDIS zügig.

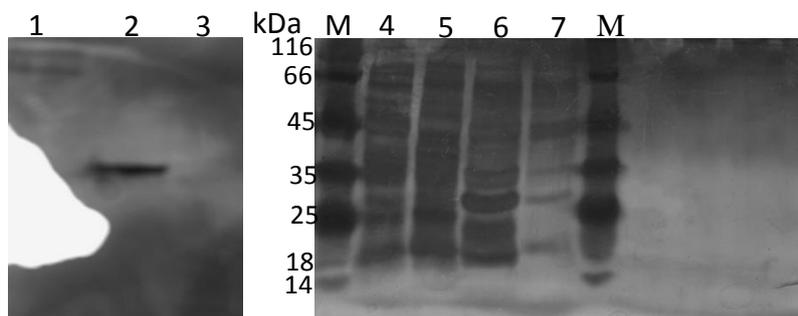


Abbildung 11 SDS-PAGE Analyse nach Expression, IMAC und Gelfiltration von MPD-CANDIS mit GRP78. Die Proben 1-3 und 7 entsprechen der Gelfiltration. MPD-CANDIS ist 12 kDa groß und lief in diesem Gel bei ca. 18 kDa. **M:** Marker. **1:** Probe des Gelfiltrations*peaks* bei 45 ml. Die untere Bande entsprach wahrscheinlich GRP78. **2:** Probe des 65 ml *peaks*. **3:** Probe des Monomeren*peaks*. Die Probe war so gering konzentriert, dass in der Silberfärbung kein Protein nachweisbar war. **4:** Probe kurz nach Induktion. **5:** 4 h nach Induktion. **6:** 400 mM Elutionsfraktion nach IMAC. **7:** Probes des Gelfiltrations*peaks* bei 45 ml.

3.2. Isolierung der cMPD17-CANDIS

Die cMPD-CANDIS stellt den inaktiven Zustand von ADAM17 dar und entsteht, indem die PDI an der Zelloberfläche opMPD-CANDIS in die kompakt, rigide Konformation überführt. Zu diesem Disulfidisomer gelangt man *in vitro* über Renaturierung [94]. Ziel war es über eine geeignete Renaturierungsmethode an monomeres cMPD-CANDIS zu gelangen und dieses anschließend für weitere Analytik einzusetzen.

3.2.1. Proteinexpression und Isolierung von *Inclusion bodies (Ibs)*

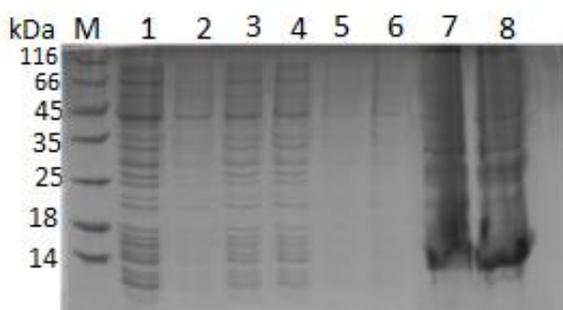


Abbildung 12 *Ib* Reinigung. M: Marker, 1-6: Waschschritte, 7,8: In 6 M GuHCl gelöste Proteine.

Ibs wurden nach Überexpression des pET28-MPD17-CANDIS Konstrukts in *E. coli* BL21, Aufschluss der Bakterienkultur und Zentrifugation aus einem unlöslichen Pellet gemäß Protokoll (siehe 2.8.2.) von Verunreinigungen befreit und anschließend zu Renaturierungsversuchen eingesetzt.

3.2.2. Renaturierungsexperimente

Nach etabliertem cMPD Protokoll vorzugehen [94] führte während der Dialysen zur Präzipitation. Monomeres cMPD-CANDIS entstand in nicht signifikanter Menge (siehe Abb.13). Daher wurden modifizierte Renaturierungsmethoden getestet (siehe 3.2.2.f).

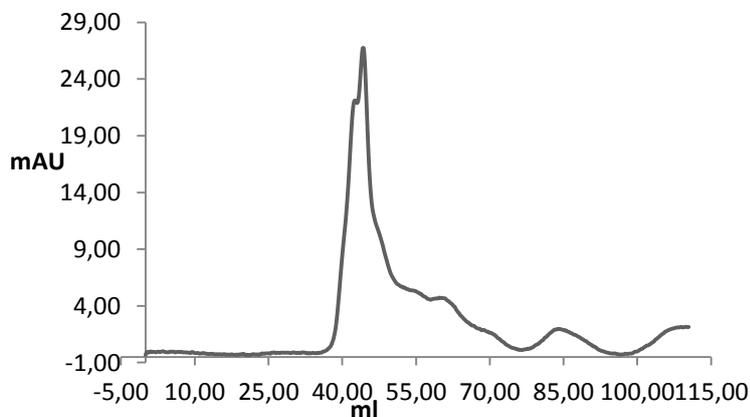


Abbildung 13 Gelfiltration auf einer SD75 Säule. Nach Durchführung des unmodifizierten cMPD Renaturierungsprotokolls. Der Monomerenpeak lag um 85 ml des Elutionsvolumens.

3.2.2.1. Renaturierung mittels *Rapid Dilution*

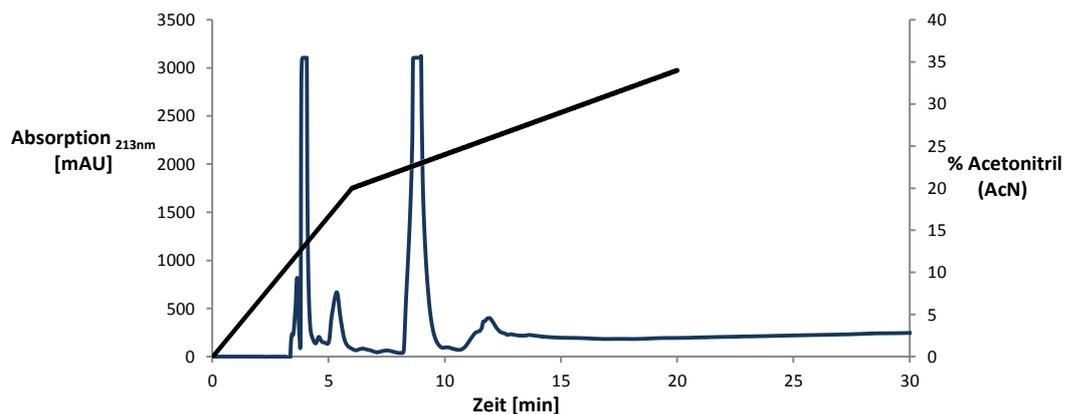
Eine schlagartige Renaturierung sollte es CANDIS hydrophober Seite durchs plötzliche Verdünnen nicht erlauben homologe Aggregate zu bilden. Um die Disulfidbrückenbildung sicherzustellen, wurde das aufgereinigte MPD-CANDIS in einem phosphathaltigen Redoxpuffer schlagartig $1:10^6$ -fach verdünnt. Renaturiertes MPD-CANDIS wurde anschließend über eine Nickelsäule gebunden und mittels RP-HPLC analysiert.

Von Düsterhöft [94] war beschrieben worden, dass die cIMPD auf einer MultoHigh-Bio-200-C18 Säule bei einem steigenden Acetonitril Gradienten von 0.64 Prozentpunkte/Minute bei ca. 28% Acetonitril/0.1%TFA eluiert. Die offene Form eluierte aufgrund der amphiphilen Helix CANDIS bei 29%.

cIMPD-CANDIS eluierte zwischen 23.5 und 24% (siehe Abb. 14A) und damit im Vergleich zur cIMPD um 4 Prozentpunkte früher, was - abzüglich einer gewissen Temperatur und Druck bedingten Ungenauigkeit -, dafür sprach, dass die Domänetopologie von cIMPD-CANDIS kompakt und die Polarität im Vergleich zur cIMPD noch verstärkt war.

Der Zeitpunkt der Elution wies auf ein nicht aggregiertes, monomeres Protein hin. Aufgrund der geringen, nicht signifikanten Ausbeute ($< 50 \mu\text{g/l}$) nach HPLC Reinigung war die *Rapid Dilution* zur Isolierung der cIMPD-CANDIS Isolierung jedoch nicht geeignet.

A



B

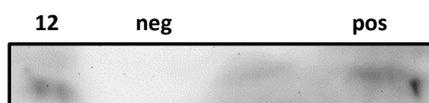


Abbildung 14 A) RP-HPLC Chromatogramm nach *Rapid Dilution* und Ni-NTA Reinigung. Die MPD-CANDIS Fraktion eluierte bei 24% Acetonitril. **B) Westernblot.** Die 12. gesammelte Fraktion, i.e. der Hauptpeak nach 9 Minuten enthielt MPD-CANDIS. Als Primärantikörper wurde der anti-His Maus-Antikörper verwendet. Gereinigte *Ibs* nach Überexpression dienten der Positivkontrolle.

3.2.2.2. Renaturierung über Dialyse

Da die herkömmliche Dialyse und *Rapid Dilution* mit zu hohen Ausbeuteverlusten verbunden waren und die Aggregation von CANDIS nicht signifikant reduziert wurde, war die Überlegung, das Proteingemisch vor dem letzten Dialyseschritt mit 3 M GuHCl zurückzulösen. Bereits aggregiertes CANDIS sollte partiell denaturiert werden, so dass keine Helix Wechselwirkungen mehr bestanden. Bei anschließender Dialyse sollte sich CANDIS an die cMPD legen. Dieser Modifikation wurde ein *screen* unterzogen, welcher DTT Vorbehandlung und verschiedenen hohe Proteinkonzentrationen untersuchte.

Tabelle 5 Renaturierungsscreen. Veränderungen bezogen sich auf das Referenzchromatogramm (siehe Abb.26). Die Pfeile indizieren eine chromatographisch festgestellte Änderung des Monomerpeaks. Die Unterschiede waren allerdings minimal.

Vorbehandlung	Geringe Konzentration (<0.5 mg/ml)	Hohe Konzentration (>1.5 mg/ml)
DTT [8 mM]	siehe Abb.27 ↑	siehe Abb.29 ↔
Kein DTT	siehe Abb.28 ↑	siehe Abb.30 ↔

Der Renaturierungsscreen zeigte keine wesentlichen Veränderungen. Eine weitere Modifizierung bestand darin, präzipitiertes Protein (Großteil MPD-CANDIS) erneut in 6 M GuHCl-Lösung zu denaturieren und zu verdünnen (auf 50-100 ml). Anschließend wurde gegen 1x PBS ÜN bei RT dialysiert. Der Verdünnungseffekt sollte CANDIS-CANDIS Aggregation verhindern. Diese Modifizierung führte zu erhöhter monomerer MPD-CANDIS Ausbeute, war allerdings nicht reproduzierbar (Abb.15).

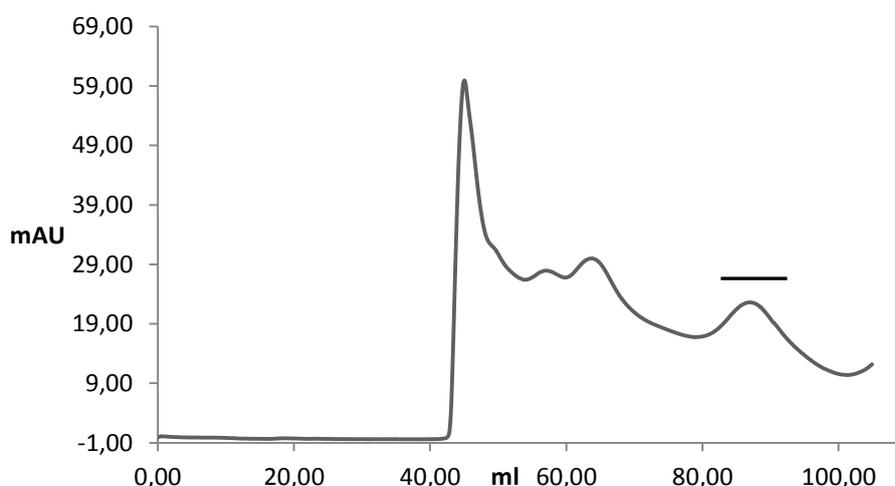


Abbildung 15 Gelfiltration nach Verdünnung und Renaturierung. Mit dem Balken ist der Elutionsbereich des Monomers um 85 ml gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Über Gelfiltration gewonnene Monomerfraktion wurde mittels RP-HPLC untersucht. Dort zeigte sich eine MPD-CANDIS Spezies, welche als cIMPD-CANDIS anzusehen ist.

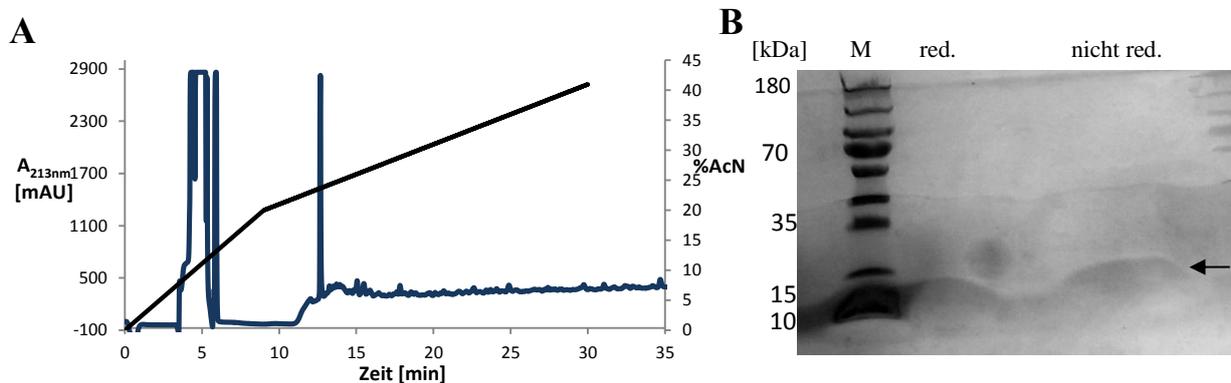


Abbildung 16 Analyse der monomeren Gelfiltrationsfraktion (Abb.15). **A) RP-HPLC Lauf der MPD17-Monomerfraktion:** Es wurden schätzungsweise 20 μg der Monomerfraktion verwendet. Bei 24.5 % Acetonitril eluierte das stabile Disulfidisomer cIMPD-CANDIS. **B) Silbergel nach Gelfiltration.** Nicht reduzierende Bedingungen zeigten, dass keine Disulfidoligomere entstanden waren. Der Pfeil zeigt geringe Mengen an cIMPD-CANDIS.

Zudem wurde die Monomerfraktion durch DLS Messung untersucht. Nach korrekter Autokorrelation, wurden 34 Messungen einer ca. 1 mg/ml konzentrierten cIMPD-CANDIS Lösung durchgeführt. Durch die geringe cIMPD-CANDIS Konzentration war das Ergebnis der Messung zwar etwas eingeschränkt, d.h. ein genauer Radius war nicht bestimmbar, wohl aber war die fehlende Aggregation nachzuweisen.

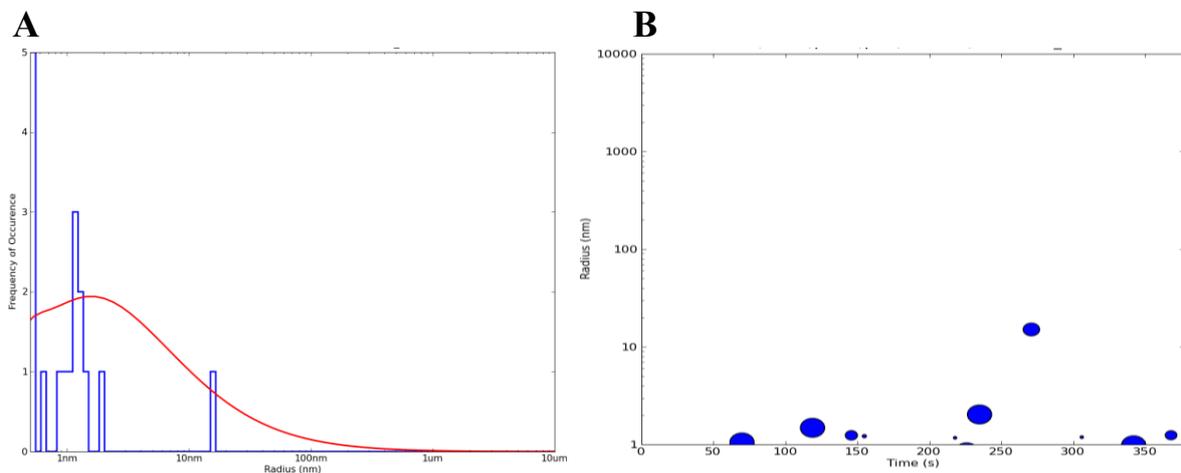


Abbildung 17 DLS Messung. **A)** Die Verteilung verdeutlicht, dass hochmolekulare Aggregate nicht vorhanden waren. Es ist davon auszugehen, dass die meisten Radii zwischen 0 und 1 nm lagen, was auf ein nicht aggregiertes und in diesem Fall monomeres, globuläres Protein hinweist. **B)** Graphische Darstellung der ermittelten Partikelradii einer ca. 1 mg/ml konzentrierten monomeren Gelfiltrationsfraktion. Der Großteil der Messungen bestimmte einen Radius um 1 nm. Bis auf einen Ausreißer zeigten die Messungen, dass keine Aggregate vorlagen.

3.2.2.3. Renaturierung über Dialyse und *Rapid Dilution*

Um die Ausbildung der Disulfidbrücken an der MPD sicherzustellen und die Präzipitation zu verhindern, wurde ein Protokoll etabliert, bei dem zuerst das Glutathion-Redoxpaar ohne Präzipitation wirkte und anschließend eine *Rapid Dilution* auf der Nickelsäule/in Lösung durchgeführt wurde.

Die frühzeitige Präzipitation des Proteingemisches, welche bei niedrigen GuHCl Konzentrationen (1 M) auftrat, sollte somit verhindert und der damit verbundene Verlust an Redoxpaar zugänglichen MPD-CANDIS (vgl. Abb.32) eingeschränkt werden.

Zuerst wurde die Löslichkeitsgrenze in GuHCl gelöster Proteine ermittelt. Diese lag bei 1.5 M GuHCl. Folgend wurde eine höhere Grenze, nämlich 2 M GuHCl gewählt, um Präzipitation vollkommen auszuschließen. Das Ergebnis ist in Abb.18 und Abb.19B gezeigt. Bis auf eine kleine monomere Schulter war keine erhöhte Ausbeute an Monomer ersichtlich.

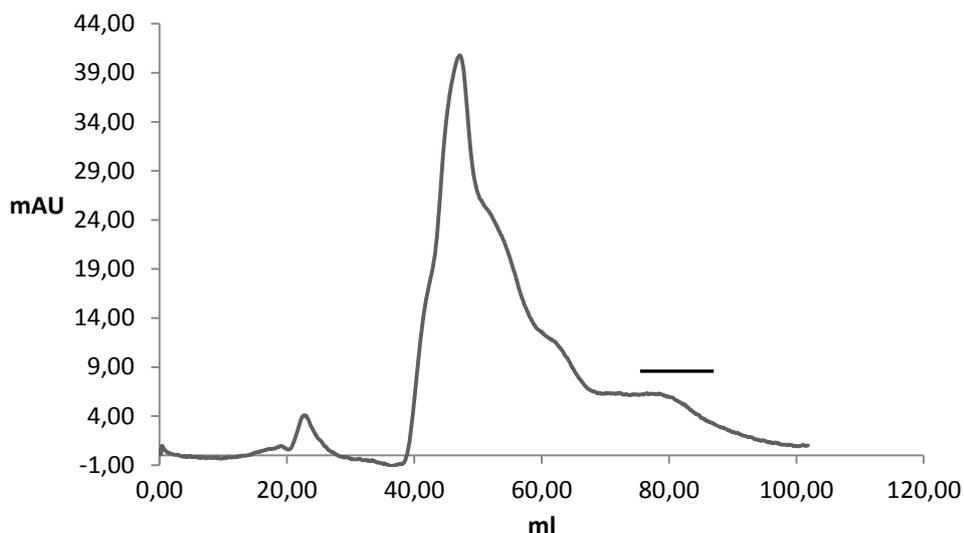


Abbildung 18: Gelfiltration nach *Rapid Dilution*. 5 ml des Nickelsäulen Eluats wurden auf einer SD75 Säule getrennt. Zwischen 45 und 50 ml des Elutionsvolumens ist die "Hauptverunreinigung" zu sehen (siehe Abb.19A, 6). Interessanterweise handelte es sich dabei nicht um aggregiertes MPD-CANDIS. Bei 80 ml fand sich ein *peak*, welcher monomerem cMPD-CANDIS entsprach (Balken). Eine HPLC Analyse wies dort monomeres cMPD-CANDIS nach (Daten nicht gezeigt).

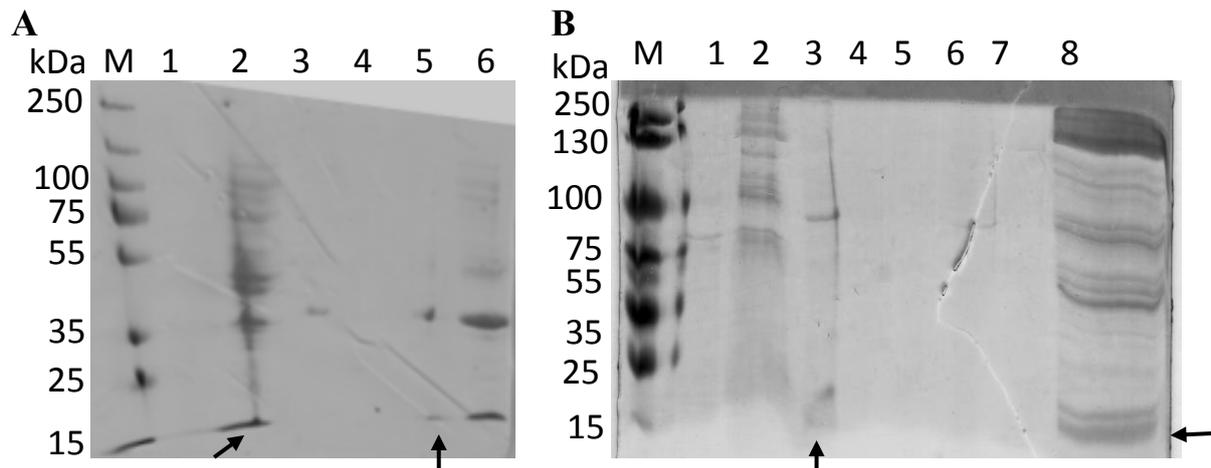


Abbildung 19 A) SDS-PAGE Analyse. M: Marker 1: leer. 2: Überstand nach Aufschluss. Pfeil zeigt opMPD-CANDIS an. 3: Analyse der Verunreinigungen beim Waschen der *Ibs*. Bei ca. 40 kDa fand sich die "Hauptverunreinigung", ein bakterielles Protein, welches den Großteil der globulären Proteine nach Renaturierung ausmacht. 4: leer. 5: Gewaschene *Ibs* (1:10), Pfeil MPD-CANDIS. 6: Präzipitat nach Dialyse in 1x PBS. **B) Rapid Dilution auf der Säule.** 1: Durchfluss (FT) Nickelsäule. 2: konzentrierter Nickelsäulen-FT. Der Großteil an cIMPD-CANDIS band an die Nickelsäule (fehlende Bande bei 15 kDa). 3: 1. ml des Nickelsäulen-Eluats (in 400 mM Imidazol), Pfeil zeigt cIMPD-CANDIS an. Das Eluat war zugleich Ladekontrolle der Gelfiltration (Abb. 18). 4: 2-3. ml des Nickelsäulen-Eluats. 5: 4-5. ml des Nickelsäuleneluats. 6: Analyse des *peaks* bei 50 ml Elutionsvolumen (Abb.18). Es zeigt sich eine ca. 100 kDa große Verunreinigung. 7: Gelfiltrationsladekontrolle (siehe Abb.31). 8: Präzipitat nach ÜN Dialyse. Pfeil zeigt cIMPD-CANDIS an.

Um zu klären, ob die konstante Löslichkeit (2 M GuHCl) und die damit verbundene verbesserte Disulfidbrückenbildung einen entscheidenden Effekt auf die cIMPD-CANDIS Ausbeute hatte, wurden als Kontrolle *Ibs* (2M GuHCl + Puffer) in einem Schlauch ÜN gegen 1x PBS 7.4 dialysiert, konzentriert und über die Gelfiltration gereinigt (siehe Abb.31). Es zeigte sich allerdings, dass in diesem Schritt cIMPD-CANDIS nebst anderen Proteinen fast vollständig präzipitierte (siehe Abb.19B, 8). Diese Beobachtung entsprach den bisherigen: CANDIS allein, nicht die Ausbildung der Disulfidbrücken, ist der entscheidende Faktor. Sobald CANDIS frei liegt, präzipitiert es MPD-CANDIS.

Interessanterweise änderte aber auch, neben längerer Inkubation mit dem Redox-Paar, die *Rapid Dilution* auf der Säule nichts an der Ausbeute an monomerem cIMPD-CANDIS (siehe Abb.18). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Experiment in einem größeren Maßstab durchgeführt (Abb.20). Es eluierte hauptsächlich die „Hauptverunreinigung“ (ca. 40 kDa, bei 60 ml Elutionsvolumen).

Zudem wurde eine 1 ml konzentrierte 1 mg/ml Lösung in 10 ml 1x PBS pH 7.4 eingetroppt (siehe Abb.21A). Dieses Experiment entsprach einer *Rapid Dilution*. Die RP-HPLC Analyse der winzigen monomeren Schulter im Chromatogramm wies monomeres cIMPD-CANDIS nach (Abb.21B).

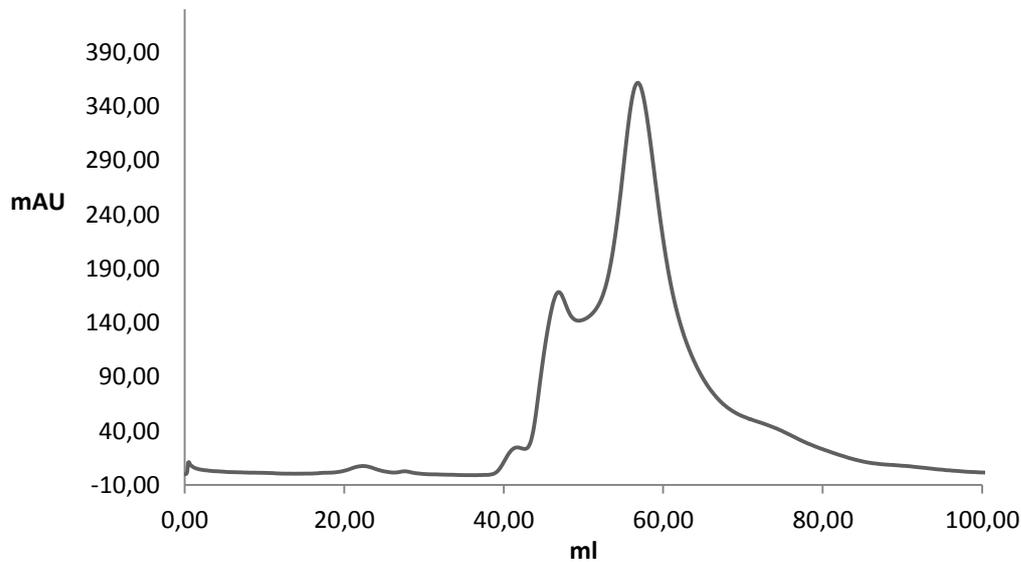
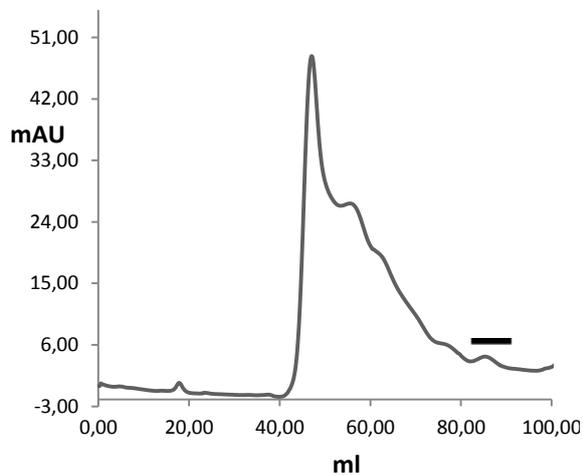


Abbildung 20 Gelfiltration nach *Rapid Dilution*. 2 ml des Nickeleluats wurden auf einer SD75 Gelfiltrationssäule untersucht. Monomeres cIMPD-CANDIS fand sich nicht. Das Eluat zwischen 50 und 60 ml entsprach der "Hauptverunreinigung" (siehe Abb.19A, 3). Obwohl das Redoxpaar über 2 Tage wirken konnte und CANDIS Aggregation durchs schlagartige Verdünnen verhindert werden sollte, war keine erhöhte Ausbeute an monomerem cIMPD-CANDIS zu erzielen.

A



B

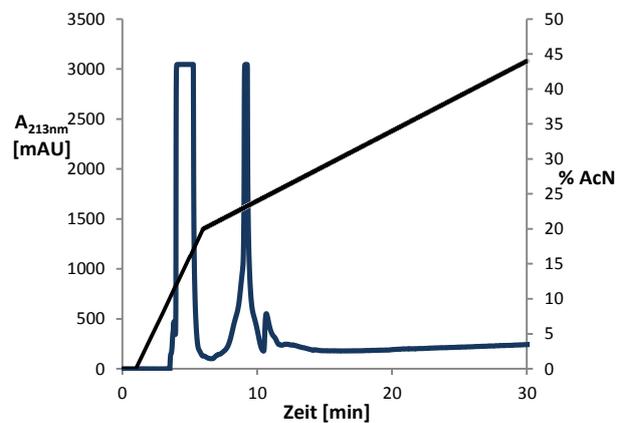


Abbildung 21 A) Gelfiltration nach *Rapid Dilution*. 1 ml eines in 2 M Guanidiniumchlorid gelösten Proteingemisches, das zuvor mit dem Redoxpaar behandelt worden war, wurde auf 1 mg/ml konzentriert und in 10 ml 1x PBS pH 7.4 eingetropt. Trotz 2-tägiger Dialyse mit dem Redoxpaar und *Rapid Dilution* war keine erhöhte Ausbeute an monomerem MPD-CANDIS sichtbar. Lediglich die **RP-HPLC Analyse B)** wies cIMPD-CANDIS nach. Dort eluierte cIMPD-CANDIS nach 9 Minuten bei 24% Acetonitril.

4. Diskussion

4.1. Expression und Reinigung der opMPD17-CANDIS

Die herkömmliche prokaryotische Proteinexpression, die sowohl wegen ausreichender Ausbeute an nicht komplexen Proteinen als auch aufgrund der Zeit-Kosten Effizienz genutzt wird, lässt sich prinzipiell durch folgende Faktoren deutlich verbessern:

Neben der Optimierung der Expressions- und Aufschlussbedingungen kann über Zeit- und Temperaturmodifikation sowie über Einsatz von Additiven (z.B. Salze, Detergenzien, Redoxagentien) und durch Angleichung an eukaryotische Expression mittels spezieller prokaryotischer Expressionsstämme eine erhöhte Ausbeute erzielt werden. Sollten beschriebene Modifikationen, wie im Fall von opMPD-CANDIS, keine Wirkung haben, ist als letzte Option die Coexpression mit einem eukaryotischen Faltungshelfer möglich. In diesem Fall wurde der beschriebene ADAM17 Ligand GRP78 [74] genutzt. Dabei wurden vornehmlich hydrophobe oder ungefaltete Bereiche des Proteins stabilisiert.

Dieser Expressionsversuch erhöhte zunächst die Konzentration an MPD-CANDIS. Sobald die GRP78 MPD-CANDIS Bindung jedoch gestört wurde, aggregierte MPD-CANDIS zügig (vgl. 3.1.2.). Zudem schien es schon intrazellulär Expressionsschwierigkeiten zu geben, da der GRP78 MPD-CANDIS Komplex nicht reproduzierbar isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Aussagen über die Faltung von MPD-CANDIS konnten bei Coexpression mit GRP78 nicht getroffen werden, da weder MALDI Messungen, noch CD- und ¹N-NMR-Messungen aufgrund zu geringer MPD-CANDIS Ausbeute durchgeführt wurden. Es konnte daher weder genau bestimmt werden, ob die zeitweise durch GRP78 stabilisierte MPD-CANDIS Spezies richtig gefaltet war, noch ob sie das stabilste biologisch aktive opMPD Isomer darstellte. Die Ergebnisse der IMAC (hohe MPD-CANDIS Konzentration im Komplex mit GRP78) und Gelfiltration (monomere Fraktion, die anschließend aggregierte) sprachen allerdings dafür, dass es sich zeitweise um opMPD-CANDIS handelte (vgl. 3.1.2.). Die Coexpression hätte intrazellulär theoretisch auch die geschlossene Form stabilisieren können. Da jedoch nur eine instabile MPD-CANDIS Spezies nach Gelfiltration isolierbar war, war nicht davon auszugehen, dass CANDIS stabilisiert an die cIMPD gebunden war.

4.2. Isolierung der cMPD17-CANDIS

CANDIS Aggregation und die damit verbundenen geringen Ausbeuten sowohl an opMPD-CANDIS, wie cMPD-CANDIS Monomer (vgl. 3.1.ff und 3.2.ff, [93]) führten zu der Zielsetzung CANDIS Aggregation bei der Reinigung der cMPD-CANDIS zu unterdrücken. Gemäß dem op/cMPD Modell ist CANDIS in der cMPD-CANDIS Form als stabilisiert anzunehmen. Damit wird MPD-CANDIS Aggregation weniger wahrscheinlich (vgl. 3.2.2.f).

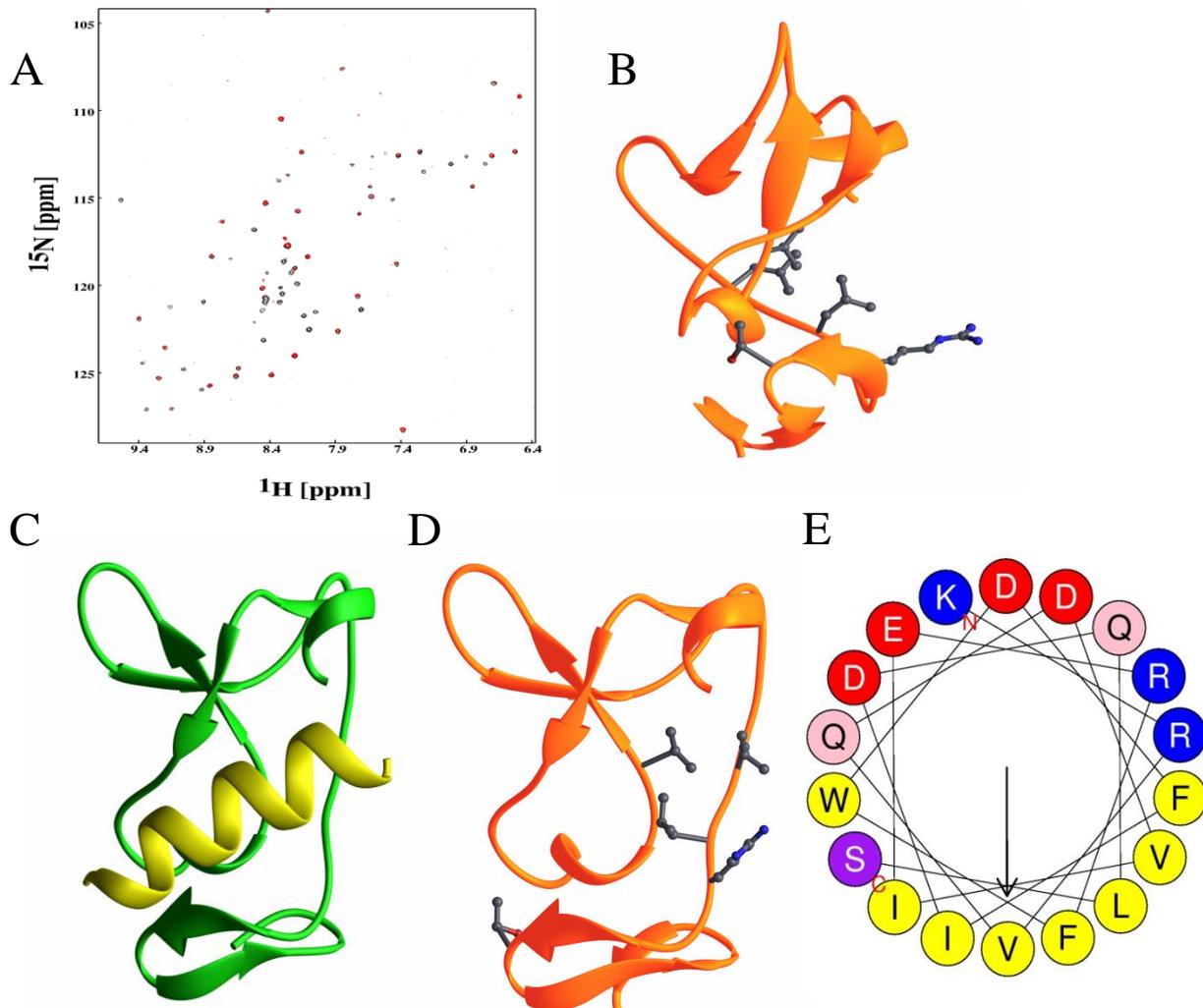


Abbildung 22 NMR Strukturdaten der cMPD mit CANDIS. **A)** CANDIS bindet an die cMPD. Die ^{15}N -markierte cMPD wurde denaturiert und mit unmarkiertem CANDIS Peptid gemischt. Die interagierenden Reste wurden in einem ^1H - ^{15}N Spektrum identifiziert (rote Punkte). **B)** Fünf Aminosäurereste, nämlich Valin, zwei Leucine, sowie Arginin und Threonin konnten bisher identifiziert werden (Experiment von Grötzinger). **C)** Modellierung von CANDIS in die cMPD. **D)** Zusammen mit **B)** ergibt sich der Eindruck, dass es eine hydrophobe Bindung im Kern der cMPD gibt und die Salzbrücken-, bzw. Wasserstoffbrückenbindung peripher, an der Oberfläche besteht. **E)** CANDIS Darstellung als Helix Rad wurde mit dem Programm Heliquest erstellt. Die hydrophobe Fläche V L F V I I bindet wahrscheinlich an die identifizierte hydrophobe Tasche von cMPD. Es ist weiterhin denkbar, dass einer oder mehrere der drei basischen Aminosäuren (vgl. Abb.21D) ähnlich der cMPD [73] mit der Zellmembran interagieren. **A-D)** übernommen von Grötzinger.

Dass diese Stabilisierung auf der cIMPDP-CANDIS Interaktion beruht, wurde durch ein NMR Experiment von Grötzinger untermauert (Abb. 22A–D). Dabei wurde bereits hergestelltes ^{15}N markiertes cIMPDP denaturiert und mit unmarkiertem CANDIS Peptid (im Überschuss) denaturiert. Nach Isolierung des Monomers wurden Reste in einem ^1H - ^{15}N Spektrum identifiziert.

Wie die Strukturdaten zeigen, liegt CANDIS stabilisiert in einer Grube der cIMPDP, welche eine hydrophobe Tasche besitzt (Abb.22B). Es ist wahrscheinlich, dass die Helix in diesem hydrophoben Bereich, der aus zwei Leucinresten und Valin besteht, mit ihrer hydrophoben Seite (VLFVII) wechselwirkt. Die unterschiedliche Elution von cIMPDP und cIMPDP-CANDIS während der RP-HPLC untermauert diese Beobachtung. Die cIMPDP ohne CANDIS scheint hydrophober zu sein (Elution bei 28% Acetonitril). Wird der hydrophobe Bereich durch CANDIS hydrophobe Seite gebunden, resultiert ein hydrophileres Protein (Elution bei 24% Acetonitril).

Weiterhin wird CANDIS über eine Salzbrücke (cIMPDP-Arg), sowie eine Wasserstoffbrückenbindung (cIMPDP-Thr) stabilisiert.

Ein Nachteil des Experiments von Grötzinger war, dass stabiles cIMPDP mit stöchiometrisch überschüssigem CANDIS renaturiert wurde. Zudem konnte die Orientierung der Helix so nicht eindeutig bestimmt werden. Dieses Experiment lieferte jedoch wichtige Hinweise für weitere Renaturierungsversuche. Um die Aggregation der amphiphilen Helix CANDIS zu verhindern, muss sie an der cIMPDP gebunden werden. Dieses Ziel wurde mit drei Renaturierungsansätzen (siehe 3.2.2.f) adressiert und war durch die Isolierung kleiner Mengen an cIMPDP-CANDIS erfolgreich.

Denkbar wäre es, dass CANDIS in hohem Überschuss als eine Art kompetitiver Ligand bei Renaturierungsversuchen eingesetzt wird. CANDIS-CANDIS Aggregation würde zwar weiterhin auftreten, jedoch wären es fast ausschließlich Helix Aggregate. Durch anschließende Verdünnung oder Trennung würden sich diese Aggregate lösen und cIMPDP fusioniertes CANDIS könnte sich an die MPDP legen. Die Kosten an dem kommerziell hergestellten Peptid wären allerdings zu groß. Zudem ist der Erfolg fraglich, da schon bisherige Verdünnungsversuche nur bedingt erfolgreich waren (vgl. 3.2.2.2.). Zudem sollte zukünftig nach Monomerenisolation die HPLC-MS Technik zum Einsatz kommen, da so isoliertes cIMPDP-CANDIS verlustfreier analysiert werden könnte.

4.3. Ausblick

Die Freisetzung inflammatorischer Signale auf der einen und Geweberegeneration auf der anderen Seite sind einige der vielfältigen Funktionen von ADAM17 (vgl. 1.2.f). Die MPD-CANDIS stellt zweifelsfrei als Bindungsstelle für Substrate (IL-1R_{II} und IL-6R) und über PDI gesteuerte Isomerisierung einen Schalter und Regulator dar. Die Identifizierung aller an MPD-CANDIS Bindung beteiligter Aminosäurereste würde diese Interaktion genau beschreiben und könnte CANDIS Wechselwirkung mit der Zellmembran und Liganden molekular aufschlüsseln.

Einer dynamischen Interaktionssequenz entsprechend, die flexibel ist und ihrer amphiphilen Natur folgend sowohl mit der geladenen Zellmembran als auch über hydrophobe Wechselwirkung die MPD und Liganden zu binden vermag, zeigte CANDIS deutliche *in vitro* Aggregation. Diese Charakterisierung entspricht den *in vivo* Daten [47]. CANDIS ist als Interaktionssequenz, wenn Wechselwirkung mit Phospholipiden, Ca²⁺, Cholesterin und Liganden auftritt, zugleich auch der Oligomerisierung unterworfen.

Während die opMPD-CANDIS wie beschrieben aggregierte, konnte die clMPD-CANDIS jedoch in geringen Mengen mittels Renaturierung monomer stabil isoliert werden.

Es ist davon auszugehen, dass die flexible Helix CANDIS teilweise an die clMPD bindet und dadurch die Reinigung dieser Form begünstigt. Das Gleichgewicht zwischen freier und gebundener Helix scheint jedoch zugunsten der freien Form verschoben, sodass bei der Proteinreinigung hauptsächlich CANDIS vermittelte Aggregate entstehen.

Zukünftig könnte das Experiment von Grötzinger (vgl. 4.2.) wiederholt werden, um alle CANDIS bindenden Reste der clMPD zu identifizieren. Zuhilfenahme bioinformatischer Methoden könnte CANDIS exakt in die clMPD modellieren. Danach ist das Design eines Peptidanalogs oder *small molecules* denkbar, welches die CANDIS Bindung an die MPD oder mit Liganden moduliert.

4.4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die isomer (open/closed) vorliegende Membranproximale Domäne (MPD) von ADAM17 als wt Fusionsprotein mit CANDIS zu isolieren und weiterhin über Strukturdaten die molekulare Interaktion aufzuschlüsseln. Eine ausreichende Konzentration an monomerem MPD-CANDIS für die massenspektrometrische Identifizierung des Disulfidisomers und für NMR Messungen konnte aufgrund von erheblicher Aggregationsneigung während des Expressions- und Reinigungsverfahrens nicht hergestellt werden.

Eine *in vitro* stabile cIMPD-CANDIS Bindung scheint zu schwach zu sein, um größere Mengen cIMPD-CANDIS zu isolieren. So ist davon auszugehen, dass während der Renaturierung die flexible, amphiphile Helix CANDIS nur zu einem geringen Teil an die cIMPD bindet und hauptsächlich homologe CANDIS Aggregate entstehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass opMPD-CANDIS vollständig aggregiert und monomer nicht isolierbar ist, während bei der Renaturierung und Reinigung der cIMPD eine monomere Spezies isolierbar und charakterisierbar ist.

5. Literaturverzeichnis

- [1] P. R. Bergethon, "Introduction to the Principles and Practice of Biophysical Chemistry," in *The Physical Basis of Biochemistry*, Springer, New York, NY, 1998, pp. 3–7.
- [2] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. Database issue, pp. D343–350, Jan. 2012.
- [3] "Garland Science - Book: Janeway's Immunobiology + 8." [Online]. Available: <http://www.garlandscience.com/product/isbn/9780815342434>. [Accessed: 30-Mar-2018].
- [4] J. Huxley-Jones, T.-K. Clarke, C. Beck, G. Toubaris, D. L. Robertson, and R. P. Boot-Handford, "The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*," *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, p. 63, Apr. 2007.
- [5] "Lehninger Principles of Biochemistry - Principles-of-Biochemistry-by-ALbert-Leningher.pdf." [Online]. Available: http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/mini/Principles-of-Biochemistry-by-ALbert-Leningher.pdf. [Accessed: 30-Mar-2018].
- [6] C. P. Blobel, "Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 606–612, Oct. 2000.
- [7] J. Scheller, A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John, "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration," *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 8, pp. 380–387, Aug. 2011.
- [8] J. J. Peschon *et al.*, "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development," *Science*, vol. 282, no. 5392, pp. 1281–1284, Nov. 1998.
- [9] A. Chalaris, C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John, and J. Scheller, "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 90, no. 6–7, pp. 484–494, Jul. 2011.
- [10] C. Camodeca, D. Cuffaro, E. Nuti, and A. Rossello, "ADAM metalloproteinases as potential drug targets," *Curr. Med. Chem.*, Mar. 2018.
- [11] D. R. Edwards, M. M. Handsley, and C. J. Pennington, "The ADAM metalloproteinases," *Mol. Aspects Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 258–289, Oct. 2008.
- [12] P. Saftig and K. Reiss, "The 'A Disintegrin And Metalloproteases' ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential?," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 90, no. 6–7, pp. 527–535, Jul. 2011.
- [13] S. Düsterhöft *et al.*, "A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 23, pp. 16336–16348, Jun. 2014.
- [14] D. F. Seals and S. A. Courtneidge, "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2003.
- [15] R. A. Black *et al.*, "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells," *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 729–733, Feb. 1997.
- [16] "ADAM17 - Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 precursor - Homo sapiens (Human) - ADAM17 gene & protein." [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P78536>. [Accessed: 31-Mar-2018].
- [17] M. L. Moss *et al.*, "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha," *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 733–736, Feb. 1997.
- [18] J. Grötzinger, I. Lorenzen, and S. Düsterhöft, "Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1864, no. 11 Pt B, pp. 2088–2095, 2017.
- [19] A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, K. Yamamoto, and S. Rose-John, "Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease," *Dig. Dis. Basel Switz.*, vol. 30, no. 5, pp. 492–499, 2012.
- [20] S. Rose-John, "IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 9, pp. 1237–1247, Oct. 2012.

- [21] E. Wong *et al.*, “Harnessing the natural inhibitory domain to control TNF α Converting Enzyme (TACE) activity in vivo,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Dec. 2016.
- [22] K. Maskos *et al.*, “Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 7, pp. 3408–3412, Mar. 1998.
- [23] N. Cerdà-Costa and F. X. Gomis-Rüth, “Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains,” *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 23, no. 2, pp. 123–144, Feb. 2014.
- [24] J. Tucher *et al.*, “LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries,” *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 2205–2214, Apr. 2014.
- [25] S. Riethmueller *et al.*, “Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation,” *PLoS Biol.*, vol. 15, no. 1, p. e2000080, Jan. 2017.
- [26] S. Takeda, T. Igarashi, H. Mori, and S. Araki, “Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs’ MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 11, pp. 2388–2396, Jun. 2006.
- [27] D. Lu, M. Scully, V. Kakkar, and X. Lu, “ADAM-15 disintegrin-like domain structure and function,” *Toxins*, vol. 2, no. 10, pp. 2411–2427, 2010.
- [28] S. Takeda, “[Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases],” *Tanpakushitsu Kakusan Koso.*, vol. 54, no. 13, pp. 1754–1759, Oct. 2009.
- [29] Y. Takahashi, D. Bigler, Y. Ito, and J. M. White, “Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 809–820, Apr. 2001.
- [30] K. Eto, W. Puzon-McLaughlin, D. Sheppard, A. Sehara-Fujisawa, X. P. Zhang, and Y. Takada, “RGD-independent binding of integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 45, pp. 34922–34930, Nov. 2000.
- [31] P. Zigrino, R. Nischt, and C. Mauch, “The disintegrin-like and cysteine-rich domains of ADAM-9 mediate interactions between melanoma cells and fibroblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 8, pp. 6801–6807, Feb. 2011.
- [32] L. C. Bridges, D. Sheppard, and R. D. Bowditch, “ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 7$,” *Biochem. J.*, vol. 387, no. Pt 1, pp. 101–108, Apr. 2005.
- [33] J. Huang, L. C. Bridges, and J. M. White, “Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 10, pp. 4982–4991, Oct. 2005.
- [34] D. V. Bax *et al.*, “Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 21, pp. 22377–22386, May 2004.
- [35] A. Sommer, S. Bhakdi, and K. Reiss, “How membrane asymmetry regulates ADAM17 shedase function,” *Cell Cycle*, vol. 15, no. 22, pp. 2995–2996, Jul. 2016.
- [36] S. Düsterhöft *et al.*, “Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 15, pp. 5776–5781, Apr. 2013.
- [37] I. Lorenzen *et al.*, “The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II,” *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 8, pp. 1093–1100, Apr. 2012.
- [38] M. E. Milla *et al.*, “Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE),” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 43, pp. 30563–30570, Oct. 1999.
- [39] T. Klein and R. Bischoff, “Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 17–33, Jan. 2011.
- [40] S. M. Soond, B. Everson, D. W. H. Riches, and G. Murphy, “ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 11, pp. 2371–2380, Jun. 2005.
- [41] K. Endres, A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz, and R. Postina, “Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which

- is degraded upon phorbol ester stimulation,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 11, pp. 2386–2393, Jun. 2003.
- [42] I. Lorenzen *et al.*, “Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 35067, Oct. 2016.
- [43] P. Gooz, Y. Dang, S. Higashiyama, W. O. Twal, C. J. Haycraft, and M. Gooz, “A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin in kidney mesangial cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33350, 2012.
- [44] A. Trad *et al.*, “ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody-toxin conjugates,” *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 62, no. 3, pp. 411–421, Mar. 2013.
- [45] A. Saha, S. Backert, C. E. Hammond, M. Gooz, and A. J. Smolka, “Helicobacter pylori CagL activates ADAM17 to induce repression of the gastric H, K-ATPase alpha subunit,” *Gastroenterology*, vol. 139, no. 1, pp. 239–248, Jul. 2010.
- [46] G. Murphy, “Tissue inhibitors of metalloproteinases,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 11, p. 233, Nov. 2011.
- [47] I. Lorenzen, A. Trad, and J. Grötzinger, “Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 415, no. 2, pp. 330–336, Nov. 2011.
- [48] Seegar TCM, Killingsworth LB, Saha N, Meyer PA, Patra D, Zimmerman B, Janes PW, Rubinstein E, Nikolov DB, Skinotis G, Kruse AC, Blacklow SC, “Structural Basis for Regulated Proteolysis by the α -Secretase ADAM10,” *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1638-1648.
- [49] Z. A. Percario, M. Ali, G. Mangino, and E. Affabris, “Nef, the shuttling molecular adaptor of HIV, influences the cytokine network,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 159–173, Apr. 2015.
- [50] J.-H. Lee *et al.*, “HIV-Nef and ADAM17-Containing Plasma Extracellular Vesicles Induce and Correlate with Immune Pathogenesis in Chronic HIV Infection,” *EBioMedicine*, vol. 6, pp. 103–113, Apr. 2016.
- [51] C. Ostalecki *et al.*, “HIV Nef- and Notch1-dependent Endocytosis of ADAM17 Induces Vesicular TNF Secretion in Chronic HIV Infection,” *EBioMedicine*, vol. 13, pp. 294–304, Nov. 2016.
- [52] E. Tellier *et al.*, “The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts,” *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 20, pp. 3969–3980, Dec. 2006.
- [53] E. Groth *et al.*, “Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 11, pp. 2795–2808, 2016.
- [54] M.-Y. Lee, K.-H. Nam, and K.-C. Choi, “iRhoms; Its Functions and Essential Roles,” *Biomol. Ther.*, vol. 24, no. 2, pp. 109–114, Mar. 2016.
- [55] C. Adrain, M. Zettl, Y. Christova, N. Taylor, and M. Freeman, “Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE,” *Science*, vol. 335, no. 6065, pp. 225–228, Jan. 2012.
- [56] T. Maretzky *et al.*, “iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 28, pp. 11433–11438, Jul. 2013.
- [57] O. M. Siggs *et al.*, “iRhom2 is required for the secretion of mouse TNF α ,” *Blood*, vol. 119, no. 24, pp. 5769–5771, Jun. 2012.
- [58] A. G. Grieve, H. Xu, U. Künzel, P. Bambrough, B. Sieber, and M. Freeman, “Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling,” *eLife*, vol. 6, 22 2017.
- [59] S. M. Le Gall *et al.*, “ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 22, pp. 3913–3922, Nov. 2010.
- [60] E. Díaz-Rodríguez, J. C. Montero, A. Esparís-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella, “Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 2031–2044, Jun. 2002.
- [61] P. Xu, J. Liu, M. Sakaki-Yumoto, and R. Derynck, “TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association,” *Sci. Signal.*, vol. 5, no. 222, p. ra34, May 2012.

- [62] P. Reddy *et al.*, “Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 19, pp. 14608–14614, May 2000.
- [63] P. Xu and R. Derynck, “Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation,” *Mol. Cell*, vol. 37, no. 4, pp. 551–566, Feb. 2010.
- [64] H. K. al et, “Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Horiuchi+gall+schulte+yamguchi>. [Accessed: 30-Mar-2018].
- [65] M. L. Moss and J. W. Bartsch, “Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 43, no. 23, pp. 7227–7235, Jun. 2004.
- [66] D. C. Blaydon *et al.*, “Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 16, pp. 1502–1508, Oct. 2011.
- [67] C.-W. Franzke *et al.*, “Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 6, pp. 1105–1119, Jun. 2012.
- [68] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [69] M. Borrell-Pagès, F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga, and J. Arribas, “TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 5, pp. 1114–1124, Mar. 2003.
- [70] A. Trad *et al.*, “The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblast- carcinoma cell interactions,” *Int. J. Oncol.*, vol. 42, no. 5, pp. 1793–1800, May 2013.
- [71] V. Baud and M. Karin, “Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives,” *Trends Cell Biol.*, vol. 11, no. 9, pp. 372–377, Sep. 2001.
- [72] S. Rose-John, “ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets,” *Pharmacol. Res.*, vol. 71, pp. 19–22, May 2013.
- [73] A. Sommer *et al.*, “Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11523, May 2016.
- [74] M. Schäfer *et al.*, “GRP78 protects a disintegrin and metalloprotease 17 against protein-disulfide isomerase A6 catalyzed inactivation,” *FEBS Lett.*, vol. 591, no. 21, pp. 3567–3587, 2017.
- [75] S. Düsterhöft *et al.*, “Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 54, no. 38, pp. 5791–5801, Sep. 2015.
- [76] S. Riethmueller *et al.*, “Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 25550, 06 2016.
- [77] V. Matthews *et al.*, “Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE),” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 40, pp. 38829–38839, Oct. 2003.
- [78] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, Apr. 2014.
- [79] T. P. Malan, A. Kolb, H. Buc, and W. R. McClure, “Mechanism of CRP-cAMP activation of lac operon transcription initiation activation of the P1 promoter,” *J. Mol. Biol.*, vol. 180, no. 4, pp. 881–909, Dec. 1984.
- [80] Joseph Sambrook, David W. Russell: *Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY 2001.* .
- [81] “Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates - ScienceDirect.” [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202083800484>. [Accessed: 12-Jun-2018].
- [82] C. B. Anfinsen, “Principles that Govern the Folding of Protein Chains,” *Science*, vol. 181, no. 4096, pp. 223–230, Jul. 1973.
- [83] H. Yamaguchi and M. Miyazaki, “Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies,” *Biomolecules*, vol. 4, no. 1, pp. 235–251, Feb. 2014.

- [84] K. Kohyama, T. Matsumoto, and T. Imoto, “Refolding of an unstable lysozyme by gradient removal of a solubilizer and gradient addition of a stabilizer,” *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 147, no. 3, pp. 427–431, Mar. 2010.
- [85] D. L. Daugherty, D. Rozema, P. E. Hanson, and S. H. Gellman, “Artificial chaperone-assisted refolding of citrate synthase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 51, pp. 33961–33971, Dec. 1998.
- [86] R. J. Gritter, J. M. Bobbitt, and A. E. Schwarting, *Einführung in die Chromatographie*. Springer-Verlag, 2013.
- [87] “LC_World_Talk_Special_Issue_Volume1.pdf.” .
- [88] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- [89] W. N. Burnette, “‘Western blotting’: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A,” *Anal. Biochem.*, vol. 112, no. 2, pp. 195–203, Apr. 1981.
- [90] W. I. Goldberg, “Dynamic light scattering,” *Am. J. Phys.*, vol. 67, no. 12, pp. 1152–1160, Nov. 1999.
- [91] T. Hiroi and M. Shibayama, “Measurement of Particle Size Distribution in Turbid Solutions by Dynamic Light Scattering Microscopy,” *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 119, Jan. 2017.
- [92] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, “Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,” *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, Oct. 2016.
- [93] “Masterarbeit_AnneGrahl.pdf.” .
- [94] “Dissertation-Du_sterho_ft.pdf.” .

Anhang

1.1. DNA-Sequenz des Konstrukts im pET-28:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
ATGTTCTGCGAGAGGGAACAGCAGCTGGAGTCCTGTGCATGTAATGAAACTGACAACTCC
TGCAAGGTGTGCTGCAGGGACCTTTCCGGCCGCTGTGTGCCCTATGTCGATGCTGAACAA
AAGAACTTATTTTTGAGGAAAGGAAAGCCCTGTACAGTAGGATTTTGTGACATGAATGGC
AAATGTGAGAAACGAGTACAGGATGTAATTGAACGATTTTGGGATTCATTGACCAGCTG
AGCATCAATACTTTTGGAAAGTAA

MPD-CANDIS Aminosäuren-Sequenz. Dieses Konstrukt wurde für Renaturierungsversuche eingesetzt:

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMFCEREQQLESCACNETDNSCKVCCRDLSGRCVPYVDAEQK
NLFLRKGKPC TVGFCDMNGKCEK|RVQDVIERFWDFIDQLSINTFGK-**

Isolelektrischer Punkt: pH 7.02

Größe: 107 Aminosäuren, 12.46 kDa

CANDIS ist hervorgehoben.

1.2. DNA-Sequenz von MPD17-CANDIS im pET-Duet-1 Vektor:

Aminosäuren-Sequenz:

**MGSSHHHHHSQDPFCEREQQLESCACNETDNSCKVCCRDLSGRCVPYVDAEQKNLFLRKG
KPC TVGFCDMNGKCEK|RVQDVIERFWDFIDQLSINTFGK.**

Isolelektrischer Punkt: pH 6.27

Größe: 100 Aminosäuren, 11.55 kDa

CANDIS ist hervorgehoben. Diesem Konstrukt fehlt die Thrombinschnittstelle LVPRG.

Folgend gezeigt ist die MPD17-CANDIS und GRP78 translatierte Proteinsequenz nach DNA Sequenzierung durch EurofinsGenomics. Aufgrund der Länge von über 2000 bp und Abbruch der Polymerase bei Sequenzierung war das mittlere Drittel der GRP78 Sequenz nur unvollständig erfasst. Durch die 5'-Sequenzierung mittels des T7 fw-Primers, welche die MPD17-CANDIS Sequenz und den einen Großteil von GRP78 enthielt (siehe unten), sowie mittels der T7 rv -Primer Sequenzierung konnte davon ausgegangen werden, dass MPD17-CANDIS und GRP78 funktionell coexprimiert wurden.

Translation mittels ExPASyTranslate:

FCLTLRRRYT **Met** GSSHHHHHSQDPFCEREQQLESCACNETDNSCKVCCRDLSGRCVPYVDAEQKNLFLRKGKPC TVGFCD **Met** NGKCEKRVQDVIERFWDFIDQLSINTFGK [...]

EGDIHH **Met** EEEDKKEDVGT VVGIDLGTTYSCVGVFKNGRVEIIANDQGNRITPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTSNPENTVFD AKRLIGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVEXKTKPYIQVDIGGGQTKTFAPEEISA **Met** VLTKXKEXAEA YLGKKVTHAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLXV **Met** RIINEPTAAAIAYGLDKREGXKNILVFDLGGGTDFVSLLTIDNGVF [...]

DVNGILRVTAEDKGTGNKNKITITNDQNRLTPEEIER **Met** VNDAEKFAEEDKKLKERIDTRNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKET **Met** EKAVEEKIEWLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYGSA GPPTGEEDTAEKDEL **Stop**

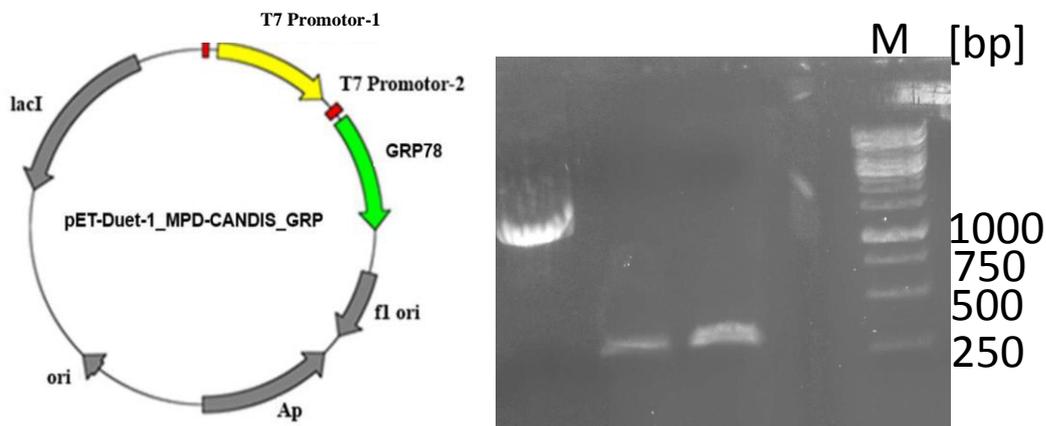


Abbildung 23 A) Schema des pET-Duet-1_MPD-CANDIS_GRP Konstrukts. Gelb ist MPD-CANDIS gezeigt. B) Colony PCR. Von links nach rechts. Supercoiled pET-Duet-1_MPD-CANDIS_GRP. Mitte: Als *template* der beiden amplifizierten *Inserts* bei 300 bp dienten zwei Kolonien auf einer Agarplatte. Der fw-Primer ist 5' MPD17-CANDIS, der rv-Primer CANDIS spezifisch. Ganz rechts: Negativkontrolle (leer) und Marker (1kb GeneRuler™ 1kbp DNA ladder).

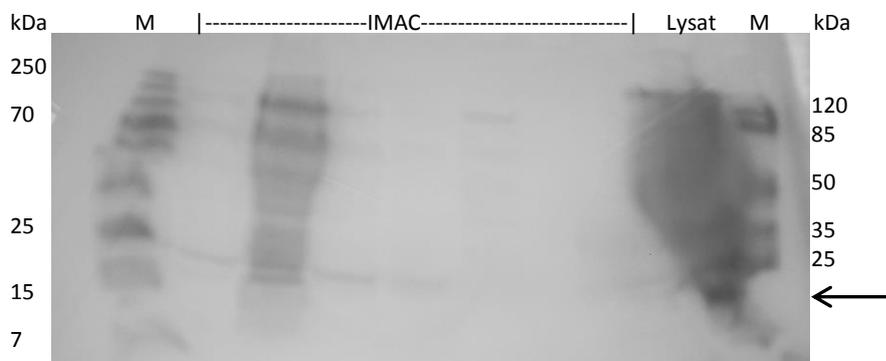


Abbildung 24 SDS-PAGE Analyse nach Überexpression von pET-Duet-1_MPD-CANDIS_GRP78, Lyse und IMAC Reinigung. Der Pfeil zeigt MPD17-CANDIS.

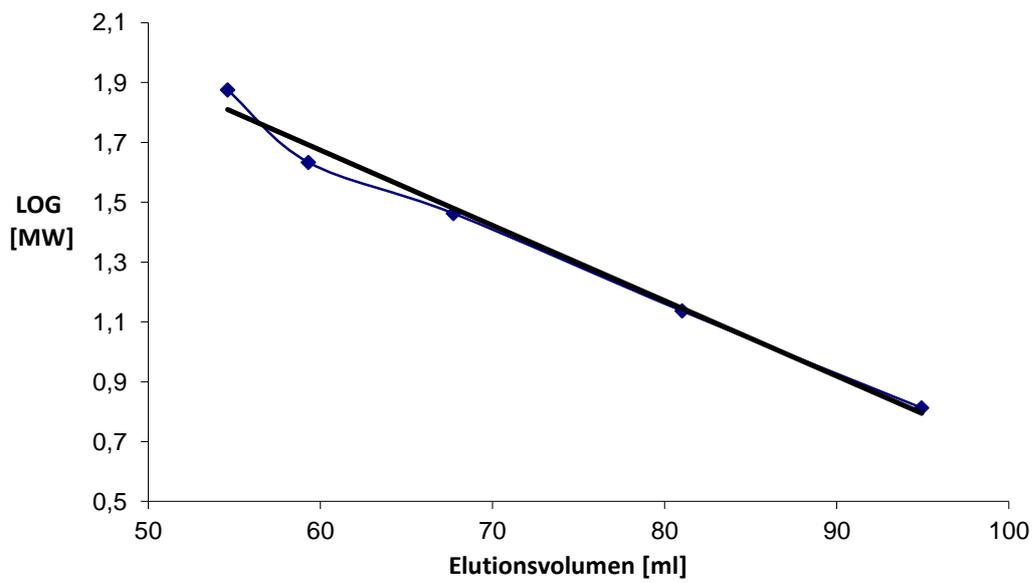


Abbildung 25 SD75 Eichgerade.

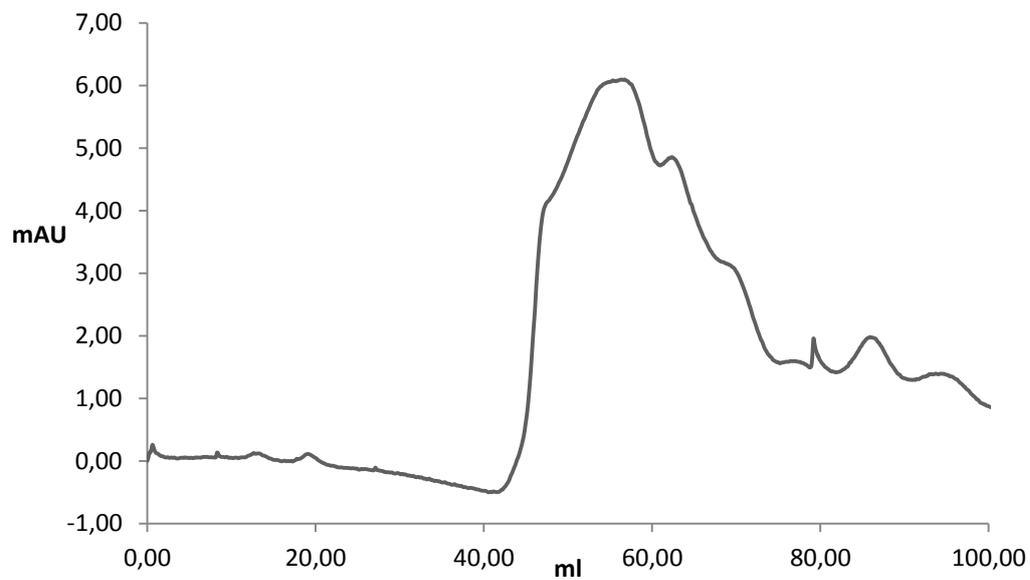


Abbildung 26 Gelfiltration nach Renaturierung. Dieser SD75 Lauf ist als Referenz für den Dialysescreen zu sehen. Zur Renaturierung wurde ein Proteingemisch der Konzentration 1.5 mg/ml eingesetzt.

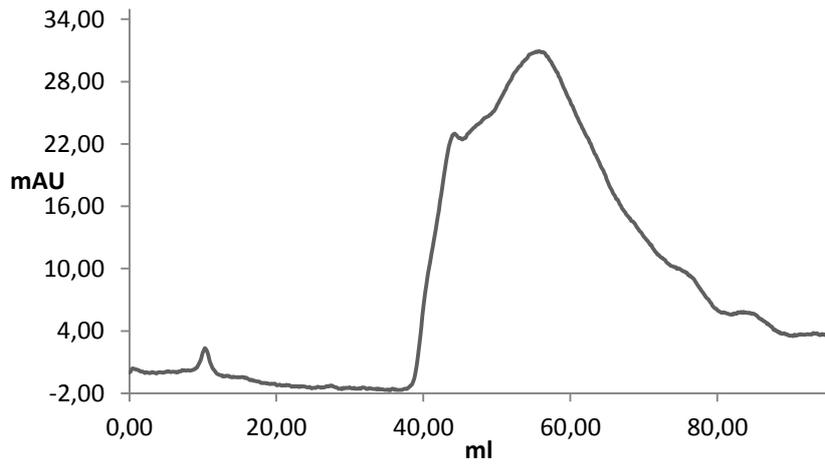


Abbildung 27 Gelfiltration nach Renaturierung. Gering konzentrierte Proteinlösung; Vor Renaturierung DTT behandelt.

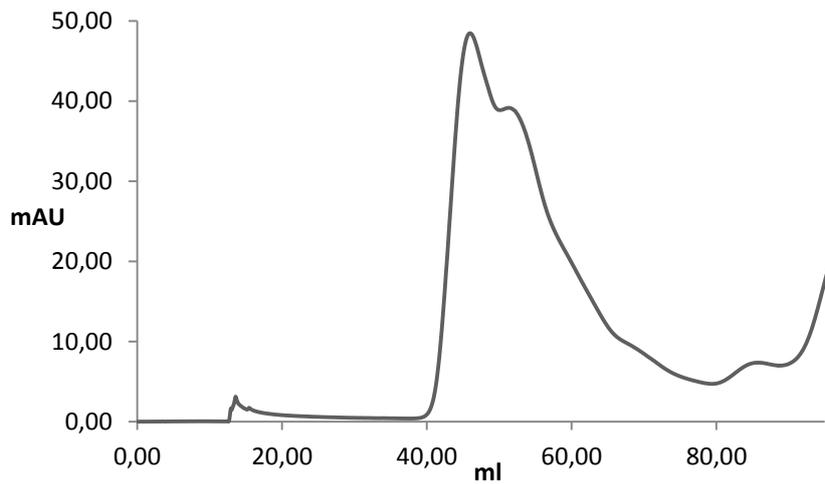


Abbildung 28 Gelfiltration nach Renaturierung. Gering konzentrierte Proteinlösung; Ohne DTT Vorbehandlung.

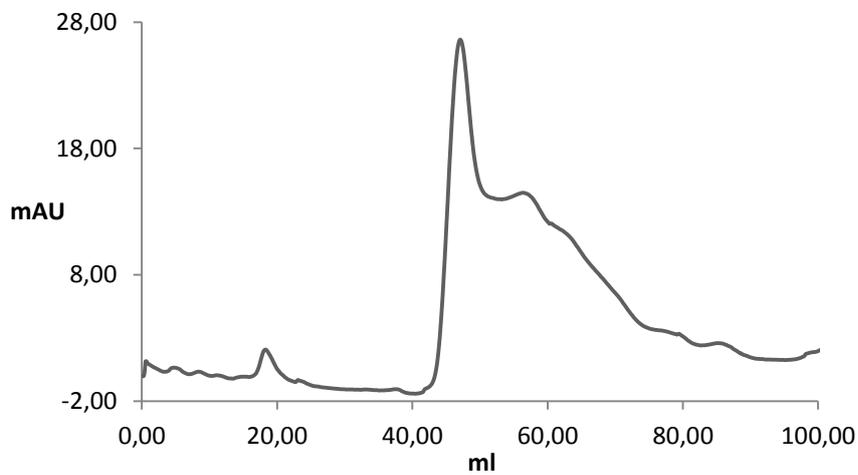


Abbildung 29 Gelfiltration nach Renaturierung. Hoch konzentrierte Proteinlösung; DTT vorbehandelt.

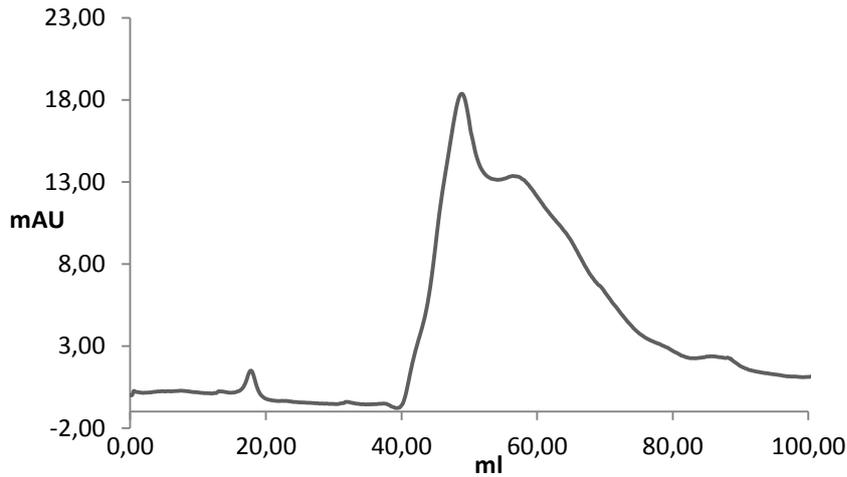


Abbildung 30 Gelfiltration nach Renaturierung. Hochkonzentrierte Proteinlösung; Ohne DTT Zusatz vor Renaturierung.

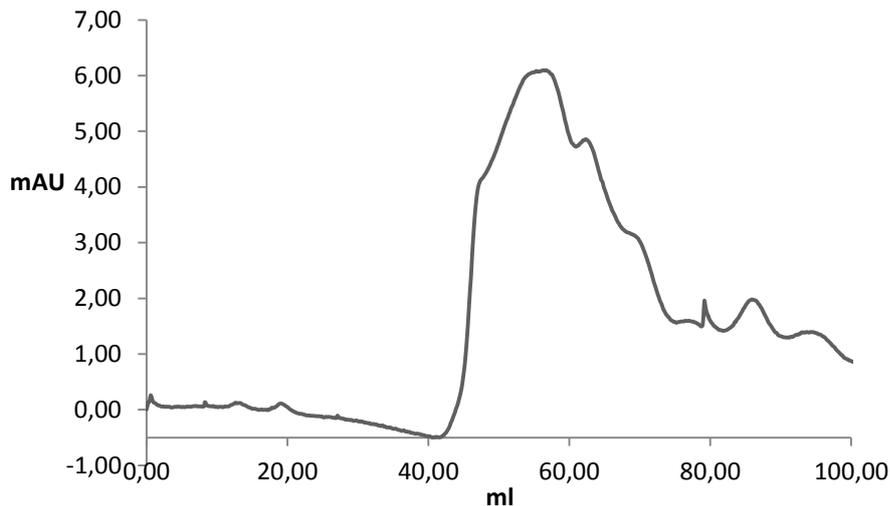


Abbildung 31 Gelfiltration nach Renaturierung. Das Proteingemisch wurde im letzten Schritt bei ÜN Dialyse gegen 1x PBS pH 7.4 renaturiert. Eine winzige monomere Schulter um 85 ml wies nicht daraufhin, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute an monomeren MPD-CANDIS hatte.



Abbildung 32 SDS-PAGE Analyse nach Renaturierung über Dialyse. Während das Redox-Paar wirkte (1.Dia/Präzi), präzipitierte ein Teil von MPD-CANDIS, da die Löslichkeit bereits unterschritten wurde. Ein weiterer Großteil präzipitierte im finalen Schritt (3. Dialyse Präzi). Im Überstand (red. Nicht red.) war nach Renaturierung hauptsächlich die ca. 40 kDa große Hauptverunreinigung zu sehen und nur ein geringer Teil an MPD-CANDIS (Pfeil).

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Joachim Grötzinger, der diese Arbeit ermöglicht hat. Zudem bin ich meiner Betreuerin PD Dr. Inken Lorenzen für viele nützliche Anstöße, sowie Anne Bartels, Theis Hülsebus, Florian Hamann und Fabian Uhrlaub für die positive und schöne Arbeitsatmosphäre im Labor dankbar.

Meiner Familie und Verlobten sowie meinen engen Freunden bin ich für das Gelingen des Zweitstudiums und dieser Promotion zu tiefer Dankbarkeit verpflichtet.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Markus Friedrich Schrader, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe. Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Gezeichnet:

Datum:
