



Funktionelle Analyse der Meprin Metalloproteasen α und β hinsichtlich ihrer physiologischen Regulation und biologischen Bedeutung

Kumulative Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von Jana Hedrich
geboren am 06.05.1983 in Wiesbaden

Mainz, 2011

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

für meine

Familie

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 2009 bis November 2011 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Becker-Pauly am Institut der Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt. Die erzielten Ergebnisse wurden in den folgenden vier Veröffentlichungen detailliert beschrieben:

1. Schütte A., Hedrich J., Stöcker W., Becker-Pauly C.; "Let it flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin α_2 ." PLoS One. 2010 Jan 21;5(1):e8835.
2. Hedrich J., Lottaz D., Meyer K., Yiallourous I., Jahnen-Dechent W., Stöcker W. and Becker-Pauly C.; „Fetuin-A and Cystatin C are Endogenous Inhibitors of human Meprin Metalloproteases“, Biochemistry. 2010 Oct 5;49(39):8599-607.
3. Hedrich J., Nitzsche E., Jefferson T., Arnold P, Dejung M., Sterchi E., Bond J., Brieger J., Becker-Pauly C.;" The Metalloprotease Meprin α cleaves the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) thereby releasing the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and enhancing angiogenesis." (Manuskript)
4. Jefferson T., Auf dem Keller U., Bellac C., Metz V. V., Broder C., Hedrich J., Ohler A., Maier W., Magdolen V., Sterchi E., Bond J. S., Jayakumar A., Traupe H., Pietrzik C., Postina R., Overall C. M., Becker-Pauly C.; "From Proteomics to Biology: The Degradome of the Metalloproteases Meprin α and β at a glance: TAILS degradomics analysis reveals substrates, inhibitors, and a proteolytic cascade between Meprin β and ADAM10" (Manuskript)

Diese Dissertation wurde kumulativ angefertigt und die erzielten Ergebnisse und deren wissenschaftliche Relevanz werden im Folgenden zusammengefasst und diskutiert.

Eltville, November 2011

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	2
2.1 Die Metalloproteasen Meprin α und β	3
2.2 Regulation der Meprine	5
2.3 Identifizierte endogene Meprin-Inhibitoren.....	7
2.3.1 Fetuin-A	7
2.3.2 Cystatin C	8
2.3.3 Elafin	9
2.4 Bekannte biologische Funktionen der Metalloprotease Meprin α	10
2.5 Der Prozess der Angiogenese	14
2.5.1 CTGF als Wachstumsfaktor in der Angiogenese	16
2.5.2 VEGF-A als Schlüsselregulator der Angiogenese.....	18
2.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
3. Ergebnisse und Diskussion.....	21
3.1 Endogene Regulation der Metalloproteasen Meprin α und Meprin β	21
3.2 Physiologische Rolle der Metalloprotease Meprin α in der Angiogenese	29
4. Material und Methode	35
4.1 Untersuchung der Angiogenese im <i>Hen's Egg Test</i> , als <i>in vivo</i> Modellsystem	35
4.1.1 Die Vorteile des HET CAM.....	36
4.1.2 Probleme, die bei der Durchführung des HET CAM auftreten können.....	36
4.1.3 Die Entwicklung des Hühnereies bis zum vierten Bebrütungstag	36
4.1.4 Präparation der Eier für den HET CAM.....	37

4.1.5 Quantifizierung der Angiogenese im HET CAM	38
4.2 Generierung von primären murinen Fibroblasten aus Meprin α - und β - <i>knockout</i> Mäusen	39
5. Ergebnisse der Generierung von primären murinen Fibroblasten.....	41
6. Ausblick	42
7. Literaturverzeichnis.....	44
8. Anhang	57
8.1 Veröffentlichung 1: Gen- <i>knockdown</i> enthüllt angiogene Funktion der Metalloprotease Meprin α	57
8.2 Veröffentlichung 2: Fetuin-A und Cystatin C sind endogene Meprin Inhibitoren	62
8.3 Veröffentlichung 3: Regulation der Angiogenese durch die Metalloprotease Meprin α	71
8.4 Veröffentlichung 4: Analyse von Meprin-Substraten und potentialen Meprin-Inhibitoren.....	89
8.5 Abkürzungen	134
8.6 Symbole für Aminosäuren	136
Curriculum Vitae	137
Danksagung	139
Eidesstattliche Erklärung.....	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Proteasen und Metalloproteasen nach Barrett <i>et al.</i> (2011) und Gomis-Rüth (2003).....	3
Abb. 2: Domänenorganisation der humanen Metalloproteasen Meprin α und Meprin β	4
Abb. 3: Domänenorganisation des humanen Fetuin-A.	7
Abb. 4: Aminosäuresequenz und Struktur von Cystatin C.	9
Abb. 5: Aminosäuresequenz und Struktur des humanen Elafin.	10
Abb. 6: Molekulare Schritte der Angiogenese.	15
Abb. 7: Domänen und Interaktionspartner des CTGF mit der Bedeutung für Zell- und Gewebsbiologie.	17
Abb. 8: Schematische Darstellung der VEGF-A Isoformen, Rezeptoren und VEGF-A Signaleffekte.....	19
Abb. 9: Identifizierung von Fetuin-A als endogenen Meprin-Inhibitor.	21
Abb. 10: Bestimmung des K_i für die Meprine mit bovinem Fetuin-A und Fetuin-A Prozessierung.	22
Abb. 11.: Cystatin C ist ein endogener Meprin α -Inhibitor.	24
Abb. 12.: Inhibition von Meprin α durch Elafin.....	25
Abb. 13.: Prozessierung von SLPI durch Meprin	27
Abb. 14.: Prozessierung von Clusterin durch Meprin α und β	28
Abb. 15.: Meprin α_2 Gen- <i>knockdown</i> im Zebrafisch.	29
Abb. 16.: Proteolytische Prozessierung von VEGF-A durch Meprin α	30
Abb. 17: HET CAM Assay zur Untersuchung der angiogenen Wirkung von Meprin und VEGF-A.	31
Abb. 18: Meprin α Prozessierung von CTGF reguliert die Angiogenese.	32
Abb. 19: Lokalisation von VEGF-A mittels Immunogoldnachweis.	33
Abb. 20.: Aufsicht auf die Blutgefäße in einem Hühnerei und schematische Darstellung der Lage der CAM. .	35
Abb. 21: Darstellung des Versuchsverlaufes und beispielhafte Fotos der applizierten Eier.	38
Abb. 22: Zur Quantifizierung umgewandelter Fotos des HET CAM.	39
Abb. 23: Primäre und stabile Zellkulturen.	41

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In der Merops-Datenbank veröffentlichte Substrate für Meprin α	11
Tab. 2: Für Meprin α beschriebene Expressionsorte und ihre physiologische Bedeutung.	13
Tab. 3: Einbuchstaben- und Dreibuchstabenkode der Aminosäuren	136

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein besseres Verständnis der beiden Metalloproteasen Meprin α und β in ihrem proteolytischen Netzwerk hinsichtlich ihrer physiologischen Regulation durch endogene Inhibitoren, wie auch der biologischen Funktion von Meprin α für den Prozess der Angiogenese, zu erlangen.

Mit der Analyse des ersten identifizierten endogenen Meprin-Inhibitors Fetuin-A gelang die Bestimmung der K_i -Werte für Meprin α mit $4,2 \times 10^{-5}$ M und $1,1 \times 10^{-6}$ M für Meprin β . Des Weiteren konnte für Meprin β eine Schnittstelle im Fetuin-A validiert werden. Mit der Identifizierung von Cystatin C, einem Cystein-Protease-Inhibitor als endogener Inhibitor der Metalloprotease Meprin α , mit einem K_i -Wert von $8,5 \times 10^{-6}$ M, wurden erstmals Proteasefamilie-übergreifende Inhibitionsmechanismen für Metalloproteasen offenbart.

Die Analyse von drei potentiellen Meprin-Inhibitoren, identifiziert als Substrate in einem neuen Proteomics-Analyse-Verfahren *terminal amine isotopic labeling of substrates* (TAILS), ermöglichte die Charakterisierung von Elafin als spezifischen Meprin α -Inhibitor. Für Elafin ist es außerdem gelungen, die durch TAILS ermittelte Schnittstelle für Meprin α mittels Edman Sequenzierung zu validieren. Der *secretory leukocyte peptidase inhibitor* (SLPI), ein Elafin-Homolog, konnte als weiteres Meprin α -Substrat bestätigt werden. Außerdem gelang es, die Meprin α -Schnittstelle im SLPI zu validieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, ein besseres Verständnis der biologischen Funktion der Metalloprotease Meprin α zu erlangen. Hier konnte *in vivo* eine stark pro-angiogene Wirkung von Meprin α gezeigt werden und erstmals die Expression von Meprin α , jedoch nicht von Meprin β , in Endothelzellen nachgewiesen werden. Zugleich konnte mit der Analyse der durch die TAILS-Methode identifizierten pro-angiogenen Substrate *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) und *connective tissue growth factor* (CTGF) der Regulationsmechanismus von Meprin α in der Angiogenese identifiziert werden. So ist Meprin α durch die Spaltung von CTGF in der Lage VEGF-A – gebunden und inhibiert im Komplex mit CTGF – durch proteolytische Spaltung von CTGF wieder freizusetzen. Somit wird die inhibierte VEGF-A-Aktivität wieder vollständig hergestellt.

Mit der Charakterisierung der ersten endogenen Meprin-Inhibitoren ist es gelungen, zu einem besseren Verständnis der endogenen Regulation der Meprine beizutragen und eine Proteasefamilie-übergreifende endogene Regulation aufzuzeigen. Mit der Entdeckung von Meprin α als pro-angiogene Protease und der Entschlüsselung des angiogenen Regulationsmechanismus konnte eine essentielle biologische Bedeutung dieser Protease beschrieben werden.

2. Einleitung

Dem menschlichen Genom wird seit seiner vollständigen Entschlüsselung 2003 (Collins, Lander *et al.* 2004) viel Aufmerksamkeit entgegengebracht, doch es sind die Proteine, die als molekulare „Maschinen“ die Funktionen des Lebens bestimmen. Mit diesem Bewusstsein gewinnt die Erforschung des Proteoms neben der Erforschung des Genoms immer mehr an Bedeutung. Nach dem erfolgreichen Abschluss des *Human Genom Project* 2003 definiert nun offiziell das *Human Proteom Project* (Legrain, Aebersold *et al.* 2011) neue Meilensteine der Forschung, die es zu erreichen gilt. Mit dem *Human Proteom Project* wurde die Identifikation des gesamten humanen Proteoms – *from the genom to the proteom* – zum Ziel der Forschung erklärt. Das Proteom, als Gesamtheit aller Proteine eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt, ist der ausschlaggebende Faktor für den physiologischen Istzustand. Das Proteom befindet sich dabei im Gegensatz zu dem immer konstanten Genom in einem ständigen dynamischen Prozess von Synthese und Degradation. Eine wichtige Gruppe der Proteine sind die Proteasen, welche im Menschen mit 565 bisher identifizierten Proteasen, mehr als 2 % des humanen Genoms ausmachen (Ordonez, Puente *et al.* 2009). Proteolytische Enzyme, welche Peptidbindungen anderer Proteine hydrolysieren, übernehmen im gesamten Proteomnetzwerk essentielle Funktionen für zellbiologische Prozesse wie Stoffwechsel-, Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge sowie in morphologischen Prozessen (Lopez-Otin and Bond 2008).

Besonderheiten des aktiven Zentrums und unterschiedliche Spaltmechanismen lassen eine Untergliederung der Proteasen in sieben verschiedene Hauptgruppen zu. So werden Serin-, Threonin-, Asparagin-, Cystein-, Glutamat-, Aspartat- und Metalloproteasen nach ihrer funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum eingeteilt. Glutamat-, Aspartat- und Metalloproteasen machen sich ein aktiviertes Wassermolekül für die Spaltung der Peptidbindung zu Nutze, während die anderen Proteasegruppen auf Hydroxyl-, Amino- oder Sulfhydrylgruppen als katalytische Neutrophile zurückgreifen (Ordonez, Puente *et al.* 2009; Rawlings, Barrett *et al.* 2011). Eine Einteilung der Proteasen nach ihrem aktiven Zentrum spiegelt jedoch nicht ihre Verwandtschaftsverhältnisse wieder. Aus diesem Grund werden die sieben Protease-Klassen nach Sequenz- und Strukturähnlichkeiten weiter in Familien und Clans untergliedert, welche in Abb. 1 dargestellt sind.

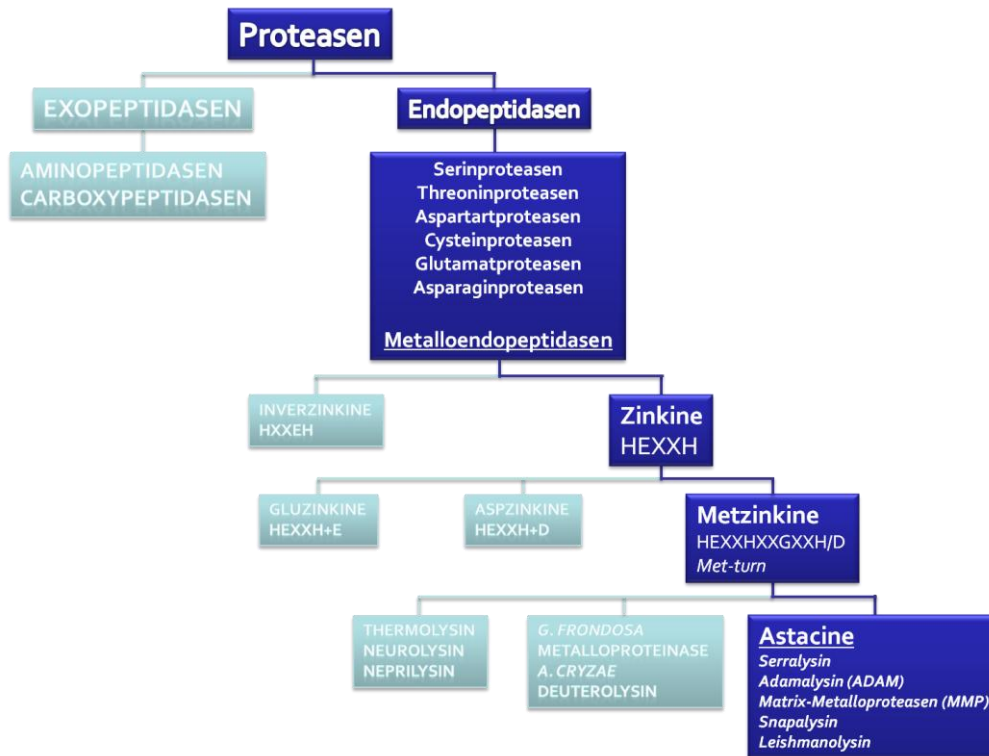


Abb. 1: Einteilung der Proteasen und Metalloproteasen nach Barrett *et al.* (2011) und Gomis-Rüth (2003).

Forschungsgegenstand dieser Arbeit waren die beiden Metalloproteasen Meprin α und β , welche im Folgenden näher beschrieben werden.

2.1 Die Metalloproteasen Meprin α und β

Die Meprine (*metallo-endoropeptidase from renal tissue*) werden auf Grund ihrer Struktur- und Sequenzhomologien zu der Astacin-Familie und der Metzinkin-Superfamilie gerechnet (Stöcker and Bode 1995; Stöcker, Grams *et al.* 1995). Die Astacine sind durch ihr Zink-bindendes Motiv (HExxHxxGxxH), einem Met-turn, mit konserviertem Tyrosin-Rest und einem Methionin-Rest in der β 1,4-Schleife charakterisiert (Bode, Gomis-Rüth *et al.* 1993; Stöcker, Grams *et al.* 1995). Die Meprine gehören zu den sechs humanen Astacinen und konnten bisher nur in Vertebraten beschrieben werden (Beynon, Shannon *et al.* 1981; Sterchi, Green *et al.* 1982; Warren, Hillier *et al.* 2008; Schütte, Hedrich *et al.* 2010). Meprin α und β weisen untereinander eine 44 %ige Identität der Aminosäuresequenz auf (Eldering, Grunberg *et al.* 1997).

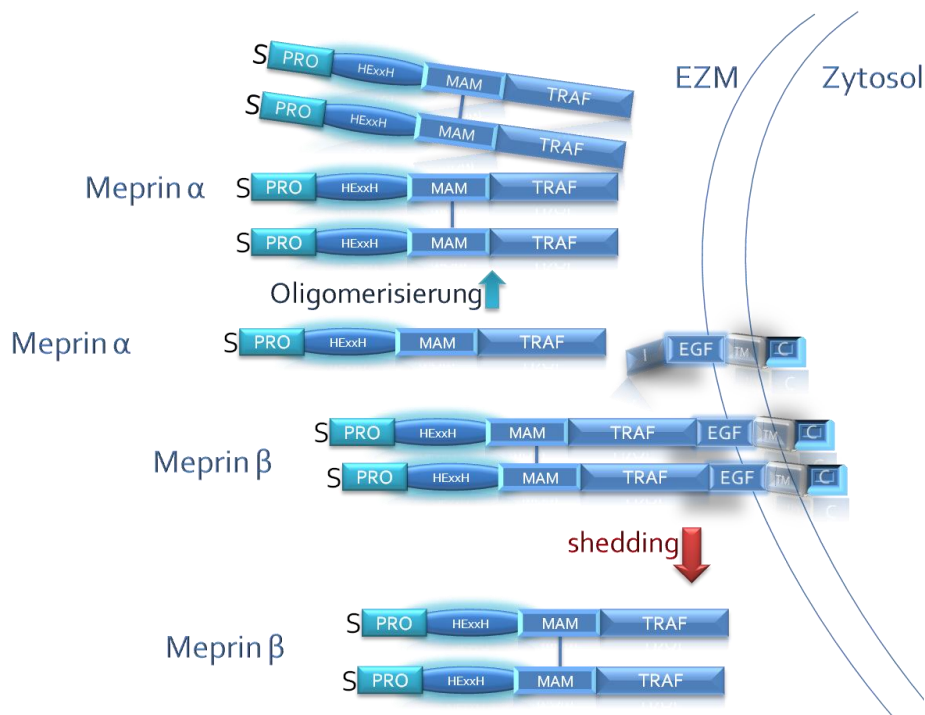


Abb. 2: Domänenorganisation der humanen Metalloproteasen Meprin α und Meprin β.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Meprin α und Meprin β. Meprin α liegt nach Furin-Prozessierung innerhalb der *inserted*-Domäne als sezernierte Protease in der extrazellulären Matrix vor. Über Disulfidbrücken (blaue Verbindungen) werden Dimere geknüpft, die sich über nicht kovalente Verbindungen zu Oligomeren von bis zu 6 MDa zusammen lagern können. Meprin β liegt meist Membran-gebunden vor, kann jedoch nach *Shedding*-Prozessen von z.B. ADAM10/17 löslich in der extrazellulären Matrix vorliegen. Domänen: (S) Signalpeptid; (Pro) Propeptid; (HExxH) katalytische Domäne; (MAM) *meprin A5 protein tyrosin phosphatase μ*-Domäne; (TRAF) *tumor necrosis factor receptor associated factor*; (I) *inserted*-Domäne; (EGF) *epidermal growth factor* ähnliche-Domäne. (TM) transmembran-Domäne.

Beide Proteine besitzen eine Multidomänenstruktur (Abb. 2). Dem Signalpeptid folgen die Prodomäne und die Proteasedomäne. C-terminal der Proteasedomäne schließen sich die MAM-Domäne (*meprin A5 protein tyrosin phosphatase μ*) und die TRAF-Domäne (*tumor necrosis factor receptor associated factor*) an. Meprin α weist im Gegensatz zu Meprin β nach der TRAF-Domäne noch eine zusätzliche sogenannte *inserted*-Domäne auf. Den Abschluss bilden bei beiden Meprinen die EGF- (*epidermal growth factor*) ähnliche-, die Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne (Marchand, Tang *et al.* 1994). Somit gehören Meprin α und Meprin β auf Grund ihres extrazellulär lokalisiertem N-Terminus zu den Multidomän-Typ-1-Membranproteinen, welche sowohl Membran-gebunden wie auch sezerniert vorliegen können (Marchand, Volkmann *et al.* 1996). So erfährt Meprin α im Endoplasmatischen Retikulum innerhalb der *inserted*-Domäne eine proteolytische Prozessierung und wird daraufhin in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Hier bildet Meprin α oligomere Strukturen, die Größen bis zu 6 MDa aufweisen können und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Ring- und Kettenstrukturen sichtbar werden (Becker, Kruse *et al.* 2003; Bertenshaw, Norcum *et al.* 2003). Meprin β dagegen liegt meist als Membran-

gebundenes Dimer vor, wobei es nach Protein-*shedding* im Bereich der EGF-Domäne auch gelöst in der extrazellulären Matrix vorkommen kann (Johnson and Hersh 1994; Hahn, Pischitzis *et al.* 2003; Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript). Entdeckt wurden Meprin α und Meprin β in der Niere und im Dünndarm von Maus und Mensch (Beynon, Shannon *et al.* 1981; Sterchi, Green *et al.* 1982). Im Dünndarm sind die Meprine über ihre Transmembranregion in der Bürstensaummembran lokalisiert (Lottaz, Maurer *et al.* 1999).

Inzwischen konnte die Expression von Meprin in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden. So wurde Meprin α in Niere (Yamaguchi, Fukase *et al.* 1994; Oneda, Lods *et al.* 2008), Darm (Sterchi, Naim *et al.* 1988; Bankus and Bond 1996), Lunge (Bergin, Greene *et al.* 2008), verschiedenen Leukozyten-Populationen (Crisman, Zhang *et al.* 2004; Lottaz, Buri *et al.* 2007), Epidermis (*Stratum basale*, *Stratum corneum*) (Becker, Kruse *et al.* 2003), Bauchspeicheldrüse, fötaler Leber (Sterchi, Stocker *et al.* 2008), Hoden- und Tumorgewebe (Lottaz, Maurer *et al.* 1999; Matters, Manni *et al.* 2005) beschrieben. Meprin β dagegen ist weiter verbreitet und zusätzlich in Gehirn (Jefferson, Causevic *et al.* 2011), Leber und Herz zu finden (Sterchi, Stocker *et al.* 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression der Meprine entwicklungsabhängig ist (Kumar and Bond 2001). Im Modellorganismus des Zebrafisches (*Danio rerio*) konnte eine Meprin-Expression in den für Maus, Ratte und Mensch bekannten Geweben Niere, Darm, Leber, Herz, Epidermis und zusätzlich in Kiemen und Kopfnieren gezeigt werden. Anders als in den untersuchten höheren Vertebraten werden im Zebrafisch drei Meprine (Meprin α_1 , Meprin α_2 und β) exprimiert (Schütte, Lottaz *et al.* 2007).

2.2 Regulation der Meprine

Proteasen führen ihre physiologischen Funktionen streng kontrolliert innerhalb eines komplexen Netzwerkes von Substraten, Inhibitoren, *Enhancern* und Proteasen zur Aktivierung und Inhibition aus. Infolgedessen ist ein Ungleichgewicht in den hochkomplexen Interaktions-Netzwerken des Proteoms nicht selten die Ursache für pathophysiologische Fehlfunktionen. Die Proteintranslation wird durch zahlreiche Signalwege mittels Transkriptionsfaktoren reguliert. Im Fall der beiden Metalloproteasen Meprin α und β ist über die Regulation auf Transkriptionsebene noch sehr wenig bekannt. Faktoren und Signalwege, die eine Meprin-Expression regulieren, sind noch nicht identifiziert. Es ist jedoch beschrieben, dass Meprin während der Entwicklung unterschiedlich reguliert wird. Ab Tag 11 ist eine steigende Expression der beiden Meprine im Darm von Mäusen zu beobachten, während bis zur 3. Woche, mit der Umstellung von Milch auf feste Nahrung, die Meprin α -Expression deutlich herunter reguliert wird. Hier diskutieren die Autoren eine Regulation der Meprin α -Expression durch gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren, welche für die Neuorganisation des Darmepithels mit der Umstellung der Nahrung verantwortlich sind. Der

Mechanismus wurde jedoch nicht weiter erforscht (Kumar and Bond 2001). Eine veränderte Expression der Meprine unter pathologischen Bedingungen ist zwar beschrieben (Trachtman, Valderrama *et al.* 1995; Crisman, Zhang *et al.* 2004; Kronenberg, Bruns *et al.* 2010), jedoch ist auch hier der regulierende Mechanismus nicht näher analysiert.

Nach der Expression liegen Proteasen in einer inaktiven Form als Zymogene vor und können somit zusätzlich durch Aktivierung, die Abspaltung des Propeptides, reguliert werden. Dies garantiert, dass Proteasen nach ihrer Expression erst an ihrem Zielort aktiv sind. Für einige wenige Proteasen fehlt dieser Mechanismus der Regulation. Wie im Fall des *Limulus*-Astacins LAST_MAM, welche schon in ihrer zymogenen Form aktiv sind (Becker-Pauly, Bruns *et al.* 2009). Im Fall der Meprine wird das Propeptid durch Serinproteasen abgespalten und die Proteaseaktivität hergestellt (Johnson and Bond 1997; Rosmann, Hahn *et al.* 2002; Becker, Kruse *et al.* 2003; Bond, Matters *et al.* 2005; Ohler, Debela *et al.* 2010). *In vitro* kann Meprin-Aktivität durch proteolytische Prozessierung der Proformen mittels Trypsin erreicht werden. Unter physiologischen Bedingungen ist eine Aktivierung der Meprine durch Trypsin im Darm und Plasmin zusammen mit *kallikrein-related peptidases* (KLKs) in der Haut wahrscheinlich (Becker, Kruse *et al.* 2003). So aktivieren KLK 4 und 8 als spezifische Aktivatoren Meprin β und KLK 5 auch Meprin α (Becker-Pauly, Howel *et al.* 2007; Ohler, Debela *et al.* 2010). Diese hier beschriebenen Unterschiede in der Aktivierung der beiden Meprine deuten auf deren unterschiedliche physiologische Funktionen hin. Sofern beide Meprine exprimiert werden, können sie nur unter der Voraussetzung gleichzeitig aktiv sein, dass auch ihre Interaktionspartner zur gleichen Zeit aktiv gegenwärtig sind.

Einmal aktivierte Proteasen können durch endogene Inhibitoren zeitlich begrenzt oder irreversibel gehemmt werden. Meprine werden jedoch nicht durch die für Metalloproteasen beschriebenen *tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMPS) inhibiert (Kruse, Becker *et al.* 2004). So war lange die endogene Regulation der Meprine unbekannt. Für murines Meprin konnte 2005 das Mannan-binde-Protein als endogener Inhibitor beschrieben werden (Hirano, Ma *et al.* 2005). Dieses ist jedoch nicht in der Lage humanes Meprin zu inhibieren. Mit der Identifizierung von Fetuin-A, Cystatin C und Elafin (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010; Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript) konnten erstmals endogene Inhibitoren der humanen Meprine beschrieben werden.

Als vierte Regulationsstufe werden Proteasen, wie alle Proteine, durch ihre Halbwertszeit reguliert. Hier erfolgt der Abbau der Proteasen in der extrazellulären Matrix durch proteolytische Prozessierung. Für Meprin α konnte in Zellkultur von Nierenzellen eine Halbwertszeit von 9 h und für

Meprin β von 12 h beschrieben werden (Hall, Sterchi *et al.* 1993). Inwieweit diese Prozesse zufällig ablaufen oder reguliert sind, ist ein weiteres offenes Feld der Meprin-Forschung.

2.3 Identifizierte endogene Meprin-Inhibitoren

2.3.1 Fetuin-A

Fetuin-A/ α 2-HS-Glycoprotein ist ein hoch glykosyliertes Plasmaprotein, das der Cystatin-Superfamilie der Cystein-Protease-Inhibitoren angehört (Brown and Dziegielewska 1997). Fetuin-A wird als 350 Aminosäuren langes Vorläuferprotein hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Epithelien exprimiert. Ist Fetuin-A sezerniert, wird es durch proteolytische Prozessierung innerhalb des *Connective-Peptide* in seine 2-Ketten Form konvertiert, während die zwei Ketten des löslichen Fetuin-A (mit einer apparenten Molekularmasse von 55 kDa) über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (Lee, Bowman *et al.* 1987).

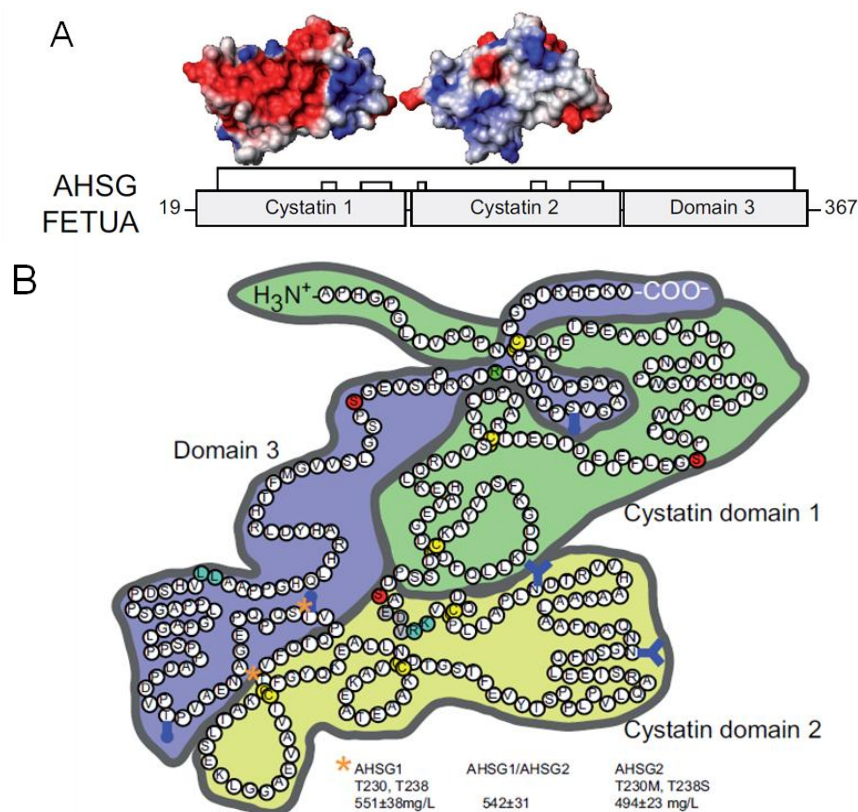


Abb. 3: Domänenorganisation des humanen Fetuin-A.

(A) Schematische Struktur des humanen Fetuin-A mit zwei Cystein-ähnlichen Domänen und einer Fetuin spezifischen dritten Domäne. Die Disulfidbrücken sind als schwarze Verbindungen eingezeichnet. Die Modelle der beiden Cystein-Domänen zeigen negativ geladene Bereiche in rot und positiv geladene Bereiche in blau. (B) Die hypothetische Struktur von Fetuin-A als Cartoon zeigt die drei Fetuin-Domänen. Eingezeichnet sind Disulfidbrücken in gelb (C-C), Phosphorylierungen in rot, Glykosylierungen als blaue Symbole, bekannte Protease-Schnittstellen in grün, allelische Varianten sind mit orangenen Sternchen markiert. (Jahnen-Dechent, Heiss *et al.* 2011)

Fetuin-A liegt zirkulierend im Blutplasma wie auch lokalisiert in der extrazellulären Matrix vor (Jahnen-Dechent, Heiss *et al.* 2011). Fetuin-A konnte bisher in allen untersuchten Vertebratengenomen identifiziert werden und eine Expression wurde in Ratte, Schaf, Schwein, Kaninchen, Meerschwein, Rind, Maus und Mensch gezeigt (Brown, Saunders *et al.* 1992), wobei der höchste Expressionslevel in der Fötalphase auftritt, wodurch sich auch der Name ableitet. Seit der Entdeckung des humanen Fetuin-A 1960/61 (J.F. 1960; Schmid and Burgi 1961) sind vielfältige physiologische Funktionen beschrieben worden. So ist Fetuin-A als Inhibitor der Kalzifizierung beschrieben (Goustin and Abou-Samra 2011; Jahnen-Dechent, Heiss *et al.* 2011). Auberger *et al.* konnten die Inhibition der Tyrosin-Kinaseaktivität des Insulin-Rezeptors zeigen (Auberger, Falquerho *et al.* 1989) und als Akut-Phase-Protein ist eine anti-inflammatorische Wirkung des Fetuin-A beschrieben (Jahnen-Dechent, Heiss *et al.* 2011). Des Weiteren konnte eine Hemmung des TGF β -Signalweges in Osteoblasten gezeigt werden (Szwera, Liu *et al.* 2002). Der Phänotyp der Fetuin-A *knockout* Mäuse zeigt Defekte in den Wachstumsfugen der Knochen, eine gesteigerte Knochenbildung und erhöhte Gewebskalzifizierung (Jahnen-Dechent, Heiss *et al.* 2011). Obgleich Fetuin-A zu der Familie der Cystein-Protease-Inhibitoren gehört, wurde bisher für humanes Fetuin-A nur die Inhibition von Trypsin beschrieben (Ashida, Yamamoto *et al.* 2000) und eine Inhibition von Papain oder Cathepsin konnte nicht bestätigt werden (Brown, Dziegielewska *et al.* 1992). Das Fetuin-A Homolog aus dem Karpfen wurde im Inhibitionskomplex mit Nephrosin, einem Astacin, im Karpfen entdeckt. Hier wird dem Karpfen-Fetuin auf Grund seiner Expression in der Nebenniere eine Bedeutung für die Immunantwort zugesprochen (Tsai, Chen *et al.* 2004).

2.3.2 Cystatin C

Cystatin C ist ein weiteres Mitglied der Cystatin-Superfamilie der Cystein-Protease-Inhibitoren, welches als extrazellulär sezerniertes Protein zu den Typ-II Cystatinen gehört (Abrahamson, Mason *et al.* 1991). Es besteht aus einer einfachen 120 Aminosäuren-langen Polypeptidkette mit einem apparenten Molekulargewicht von 14 kDa (Abb. 4) und wurde das erste Mal noch unter dem Namen *post-gamma globulin* in Gehirnflüssigkeit und Urin von Patienten mit akutem Nierenversagen identifiziert (Tonnel, Colle *et al.* 1979). Inzwischen konnte eine Expression von Cystatin C in Hoden, Nebenhoden, Prostata, Samenblase, vaskulären glatten Muskelzellen, Gehirn und Thymusdrüse und in verschiedensten Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Cole, Dickson *et al.* 1989; Abrahamson, Olafsson *et al.* 1990; Tsuruta, O'Brien *et al.* 1993; Shi, Sukhova *et al.* 1999). Heute wird Cystatin C als potentieller Biomarker für akutes Nierenversagen und ein möglicher Einsatz als Wirkstoff in neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (Gauthier, Kaur *et al.* 2011; Hawkins 2011). Für Cystatin C, dem meist vertretenen extrazellulären Cystein-Protease-Inhibitor, wurde bisher eine

Inhibition der Cysteinproteasen Papain, Cathepsin B, Cathepsin L und Cathepsin H beschrieben (Hall, Hakansson *et al.* 1995; Brown and Dziegielewska 1997).

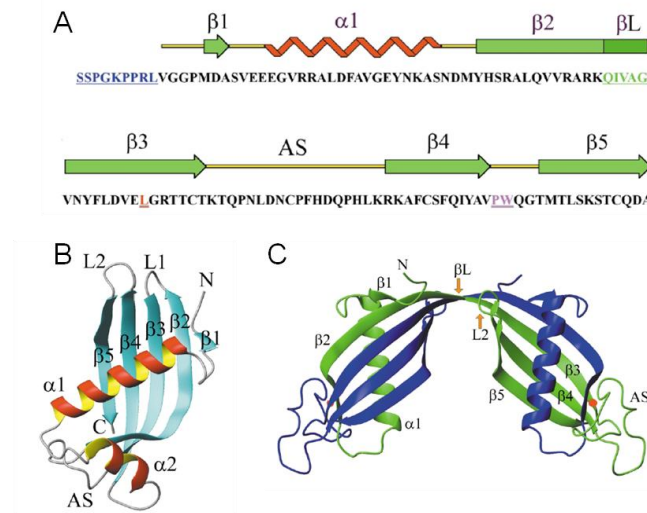


Abb. 4: Aminosäuresequenz und Struktur von Cystatin C.

(A) Aminosäuresequenz des humanen Cystatin C mit darüber gelegten Elementen der Kristallstruktur. In blau ist der N-Terminus dargestellt, welcher strukturell nicht aufgelöst werden konnte. Grün sind β -Faltblätter und rot eine α -Helix dargestellt. (C) Cystatin C Dimer welches über die L1 (grüne Aminosäuren) und L2 (lila Aminosäuren) Domänen verbunden ist. (Janowski, Kozak *et al.* 2001)

Zusammen mit Cathepsin L ist Cystatin C an der Bindung der Keimzelle an die Sertoli-Zellen sowie der Bildung der interzellulären Verbindungen, Keimzellwanderung und ihrer Reifung beteiligt (Ericksonlawrence, Zabudoff *et al.* 1991; Mruk, Zhu *et al.* 1997). Eine weitere für Cystatin C beschriebene physiologische Funktion ist der Schutz vor neurodegenerativen Veränderungen (Gauthier, Kaur *et al.* 2011). Cystatin C konnte weiterhin als wirksamer Inhibitor gegen Cysteinproteasen von Bakterien und Viren beschrieben werden (Cimerman, Kosorok *et al.* 1996; Jasir, Kasprzykowski *et al.* 2003). Demzufolge kommt ihm auch eine Rolle in der Immunantwort zu. Eine reduzierte Cystatin C-Expression in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen wird mit Arteriosklerose und Arterienverengungen in Verbindung gebracht (Shi, Sukhova *et al.* 1999).

2.3.3 Elafin

Elafin wird seit seiner Entdeckung 1990 nach seiner anti-proteolytischen Funktion der Antileukoproteinasen (ALP)-Superfamilie zugeordnet (Wiedow, Schroder *et al.* 1990). Mit der Entdeckung der vielfältigen physiologischen Funktionen dieses Proteins wird es seit einiger Zeit auch der WAP (*why acid protein*) *four-disulfide core* (WFDC)-Familie zugeordnet (Scott, Weldon *et al.* 2011). Elafin wird als 117 Aminosäuren langes Vorläuferprotein (Trappin-2/Pre-Elafin) exprimiert.

Durch proteolytische Prozessierung wird inhibitorisches Elafin (WAP-Domäne: 61-177) freigesetzt (Abb. 5). Dabei übernimmt die erste Domäne, die Transglutamin-Substrat-Domäne, Funktionen der Proteininteraktionen in der extrazellulären Matrix und die WAP-Domäne wichtige Proteasen-inhibierende Funktion. Bisher wurde eine inhibierende Wirkung des prozessierten Elafin für Elastase 1, Elastase 2, Myeloblastin, Proteinase-3 und Arginylpeptidase, jedoch nicht gegen Trypsin, Chymotrypsin oder Cathepsin G beschrieben (Wiedow, Schroder *et al.* 1990; Zani, Nobar *et al.* 2004; Bellemare, Vernoux *et al.* 2008).

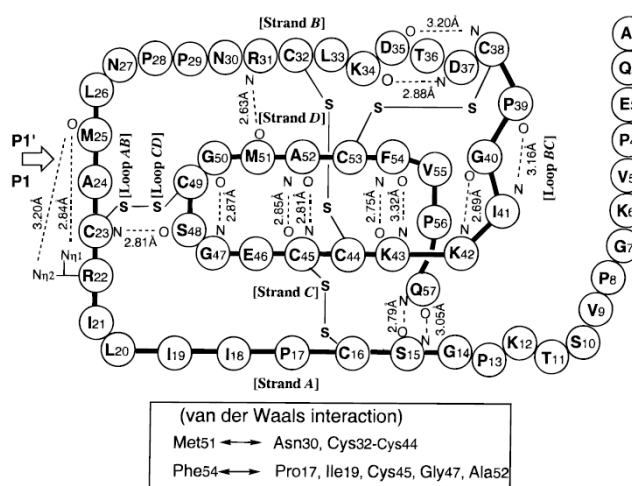


Abb. 5: Aminosäuresequenz und Struktur des humanen Elafin.

Die schematische Darstellung des Elafin nach der Kristallstruktur zeigt das prozessierte Trappin von Aminosäure Ala61 bis Glu117 (Elafin). Disulfidbrücken sind über dünne schwarze Verbindungen eingezeichnet. Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien angegeben. (Tsunemi, Matsuura *et al.* 1996)

Elafin ist hauptsächlich in Epithelien, wie der Haut und dem Lungenepithel, exprimiert und fungiert hier als Proteaseinhibitor und schützt das Gewebe vor proteolytischem Abbau während Entzündungsprozessen (Sallenave and Silva 1993; Ying and Simon 1993; Scott, Weldon *et al.* 2011). Weiterhin ist eine physiologische Bedeutung des Elafin als Abwehrmolekül, mit anti-mikrobiellen und anti-inflammatorischen Eigenschaften beschrieben worden (van Bergen, Andriessen *et al.* 1996; Williams, Brown *et al.* 2006).

2.4 Bekannte biologische Funktionen der Metalloprotease Meprin α

Die Entschlüsselung der biologischen Funktion einer Protease ist das Ziel der Protease-Forschung. Verschiedenste Ansätze sollen die Rolle im proteolytischen Netzwerk und damit die spezielle Funktion der Metalloprotease Meprin α offenbaren. Die Funktion der Metalloprotease Meprin α wird seit ihrer Entdeckung 1981 durch Identifikation ihrer Substrate, ihrer Expressionsorte und ihrer Bedeutung für (patho)physiologische Situationen untersucht. Eine weitere Möglichkeit stellt die Analyse von *knockout* Mäusen dar, welche durch den gezeigten Phänotyp die eigentliche Funktion einer Protease offenlegen sollen. Ein ähnlicher Ansatz ist der *Gen-knockdown* im Zebrafisch, welcher im Vergleich zu der *knockout* Maus den Vorteil hat, dass eine Kompensation durch andere Proteasen

nicht überlebenswichtig ist und somit der ausbleibende Selektionsdruck seltener zu Kompensationsmechanismen führt. Über Strukturanalysen und Definition der Spaltspezifitäten können weitere Daten erhalten werden, die im Gesamtbild zu der Charakterisierung der Protease beitragen.

Für Meprin α wurden seither sechs Substrate in der MEROPS-Datenbank beschrieben (Tab. 1). Demzufolge haben und werden Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript) einen enormen Beitrag leisten, verdeutlicht durch die Identifizierung von über 200 Meprin α -Substraten durch den neuartigen Proteomics-Approach TAILS.

Tab. 1: In der Merops-Datenbank veröffentlichte Substrate für Meprin α . (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/substrates?id=M12.002>, Stand: 02.11.11, 17:14)

Substrat	Referenz
Cholecystokin-8	Bertenshaw <i>et al.</i> , 2001
Fibronectin	Kruse <i>et al.</i> , 2004
Glucagon	Bertenshaw <i>et al.</i> , 2001
Melanotropin α	Bertenshaw <i>et al.</i> , 2001
Nidogen-1	Kruse <i>et al.</i> , 2004
Dentin Sialophosphoprotein	Tsuchiya <i>et al.</i> , 2010

Die Validierung und Untersuchung von durch TAILS identifizierten Meprin-Substraten ermöglichte es zum Beispiel, den Regulationsmechanismus der pro-angiogenen Protease Meprin α zu entschlüsseln (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript). Die Identifikation der Meprin α -Substrate in der extrazellulären Matrix durch Kruse *et al.* und die Identifikation der Meprin-Expression in der Epidermis lieferten die ersten Hinweise, dass Meprin α an Zellmigrations-Prozessen beteiligt ist (Kruse, Becker *et al.* 2004; Becker-Pauly, Howel *et al.* 2007). Durch eine detaillierte Analyse der Expression konnte schließlich gezeigt werden, dass Meprin α exprimiert im *Stratum basale* für die Zelldifferenzierung der Keratinozyten eine Rolle spielt. Weiterführende Studien legten schließlich eine Bedeutung von Meprin α in fibrotischen Geweben offen (Kronenberg, Bruns *et al.* 2010). Nach der Identifikation von Prokollagen III als weiteres Meprin α -Substrat wird eine damit einhergehende Bedeutung der Meprine als Pro-Kollagenasen denkbar. Infolgedessen ist die Entstehung und Aufrechterhaltung einer physiologischen Morphologie der Dermis durch Meprin Gegenstand aktueller Forschung (Broder *et al.*, in Bearbeitung). Neuste Erkenntnisse zu der Spaltspezifität der Metalloprotease Meprin α , welche neben sauren Aminosäureresten auch kleine aliphatische Aminosäuren bevorzugt (Becker-Pauly, Barre *et al.* 2011), liefern weitere wichtige funktionelle

Details in der Erforschung dieser Protease, welche zu der Identifikation weiterer Meprin-Substrate beitragen können.

Die Funktion von Meprin α in der Epidermis des Darms, wird seit der Entdeckung 1988, erforscht. Hier konnte gezeigt werden, dass apikal exprimiertes Meprin am Abbau von Bakterienoberflächenproteinen, der extrazellulären Matrix oder potentiell toxischen Peptiden beteiligt ist und so zur Erhaltung der Mucosa beiträgt (Vazeille, Bringer *et al.* 2011). Im Darm wird Meprin α eine Beteiligung an pathologischen Situationen wie Darmkrebs (Lottaz, Maurer *et al.* 1999; Matters, Manni *et al.* 2005) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugesprochen (Banerjee, Oneda *et al.* 2009). Eine basolaterale Expression von Meprin α in Richtung Tumor-Stroma in Darmkrebszellen führt dort zu der Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und könnte so die Migration der Krebszellen möglich machen (Matters, Manni *et al.* 2005). Während Meprin α in *knockout* Studien als anti-inflammatorische Protease beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass mit einer reduzierten Meprin α -Expression im menschlichen Darm ein stärker ausgeprägter Krankheitsverlauf einhergeht (Bond, Banerjee *et al.* 2011). In Meprin α -*knockout* Mäusen führte die künstliche Induktion von Darmentzündungen zu deutlich stärkeren Effekten als in der Vergleichsgruppe der wildtypischen Mäuse (Bond, Banerjee *et al.* 2011). Mit der Identifikation der Expression von Meprin α in der Bürstensaummembran der Niere, welche hier 5% des Gesamtproteins ausmacht (Bond and Beynon 1986), wird Meprin α eine essentielle Beteiligung an der Immunabwehr und eine aktive Rolle bei akutem Nierenversagen zugesprochen (Bond, Matters *et al.* 2005). Eine Überexpression von Meprin α konnte auch bei Mukoviszidose festgestellt werden, welche hier zu einer Aktivierung des TGF α und damit zu einer verstärkten entzündlichen Antwort führt (Bergin, Greene *et al.* 2008).

Tab. 2: Für Meprin α beschriebene Expressionsorte und ihre physiologische Bedeutung.

physiologische Funktion	Expressionsort	Expressionsort	physiologische Funktion
Meprin α ist als pro-angiogene Protease an der extrazellulären Regulation der Angiogenese beteiligt. (Schütte <i>et al.</i> 2010, Hedrich <i>et al.</i> , Manuskript)	Endothelzellen	Dermis der Haut	Meprin α ist in der Dermis an Zellmigration und Zelldifferenzierung der Keratinozyten beteiligt (Becker-Pauly <i>et al.</i> 2007). Desweiteren spielt Meprin hier auch eine Rolle in der fibrotischen Pathogenese (Kronenberg <i>et al.</i> 2010).
Meprin α wird in der Bürstensaumregion des Darmepithels exprimiert. Im Darm wird Meprin eine Bedeutung für die Erhaltung der Mucosa und eine Rolle in chronischen Darmentzündungen zugesprochen (Banerjee <i>et al.</i> 2009). Eine erhöhte Meprin-Expression wurde auch in Darmkrebszellen beschrieben (Lottaz <i>et al.</i> 1999; Matters <i>et al.</i> 2005).	Darmepithel	Nierenepithel	Meprin α wird in der Niere in der Bürstensaumregion und proximalen Tubuluszellen exprimiert (Beynon <i>et al.</i> 1983). Hier ist Meprin α an der Degradation des Parathyroidhormons beteiligt (Yamaguchi <i>et al.</i> 1994), außerdem wird Meprin α eine Rolle bei akutem Nierenversagen zugesprochen (Bond <i>et al.</i> 2005).
Eine Überexpression von Meprin α im Lungenepithel wurde bei Mukoviszidose festgestellt, über die Aktivierung des TGF α durch Meprin α kommt es zu einer verstärkten entzündlichen Antwort (Bergin <i>et al.</i> 2008).	Lungenepithel	Leukozyten	Meprin α wird in verschiedenen Leukozyten-Populationen exprimiert. Aus diesem Grund ist eine Meprin α für die Immunantwort denkbar (Crisman <i>et al.</i> 2004; Lottaz <i>et al.</i> 2007).

Die Expression von Meprin α in Niere und Darm während der Entwicklung ab dem 12.Tag in Mäusen und die Meprin-Expression in embryonalen Stammzellen, zusammen mit den Beobachtungen des Meprin α_2 Gen-*knockdowns* im Zebrafisch deuten auf eine essentielle Bedeutung der Metalloprotease Meprin α während der Entwicklung hin (Kumar and Bond 2001; Schütte, Hedrich *et al.* 2010).

Mit den hier aufgeführten vielfältigen Funktionen der Metalloprotease Meprin α ist ihre biologische Funktion im gesamten Proteom-Netzwerk noch lange nicht erfasst (Tab. 2). Diese kann erst mit der Identifikation aller Substrate, Interaktionspartner, Aktivatoren und Inhibitoren vollständig aufgeklärt werden. Letztendlich wird die Funktion der Protease immer durch die zu dem Zeitpunkt aktuell gegenwärtigen Interaktionspartner bestimmt. Somit tritt die Vielseitigkeit der Proteasen nochmal hervor, welche je nach bereitliegenden Interaktionspartnern als multifunktional gewebes- und situationsabhängig verschiedenste Funktionen übernehmen kann. Dieser Regulationsmechanismus ist ein entscheidender Faktor für die Möglichkeit des Körpers, auf Grundlage von nur 20.000-25.000 Genen, die Vielzahl von komplexen Prozessen zu verwirklichen und das Leben zu ermöglichen.

2.5 Der Prozess der Angiogenese

Das komplexe und stark verzweigte Blutgefäßsystem ist verantwortlich für die Versorgung aller Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff. Dabei muss ein fein strukturiertes Netzwerk funktioneller Blutgefäße alle Zellen bis auf 100-200 μm , die Diffusionsgrenze von Sauerstoff, erreichen (Carmeliet and Jain 2000). Dieses Gefäßsystem entsteht durch die hochkomplexen Prozesse der Vaskulogenese und der Angiogenese. Entsprechend beschreibt "Angiogenese" den Prozess der Entstehung von neuen Blutgefäßen durch Sprossung aus schon bestehenden Blutgefäßen und "Vaskulogenese" die Entstehung von primären Blutgefäßen während der Frühphase der Embryogenese aus Angioblasten (Hillen, Melotte *et al.* 2006). Der Prozess der Angiogenese spielt somit eine essentielle Rolle während der Entwicklung, wie im adulten Gewebe für physiologisches Wachstum, bei Wundheilungsprozessen und im weiblichen Zyklus. Unter pathologischen Situationen kann die Angiogenese jedoch auch im adulten Gewebe an Bedeutung gewinnen, wie zum Beispiel in der Tumorangiogenese, bei chronischen und akuten Entzündungsprozessen, Fibrose und Psoriasis (Arroyo and Iruela-Arispe 2010).

Obwohl der Prozess der Angiogenese seit den 70ern, mit bekannt werden der Bedeutung für das Tumorwachstum (Folkman 1971), intensiv erforscht wird, ist das komplexe molekulare Zusammenspiel bis heute noch nicht vollständig verstanden. Mit dem schon bekannten Wissen über die molekularen Mechanismen wird der Prozess der Angiogenese in acht entscheidende Schritte untergliedert (Abb. 6).

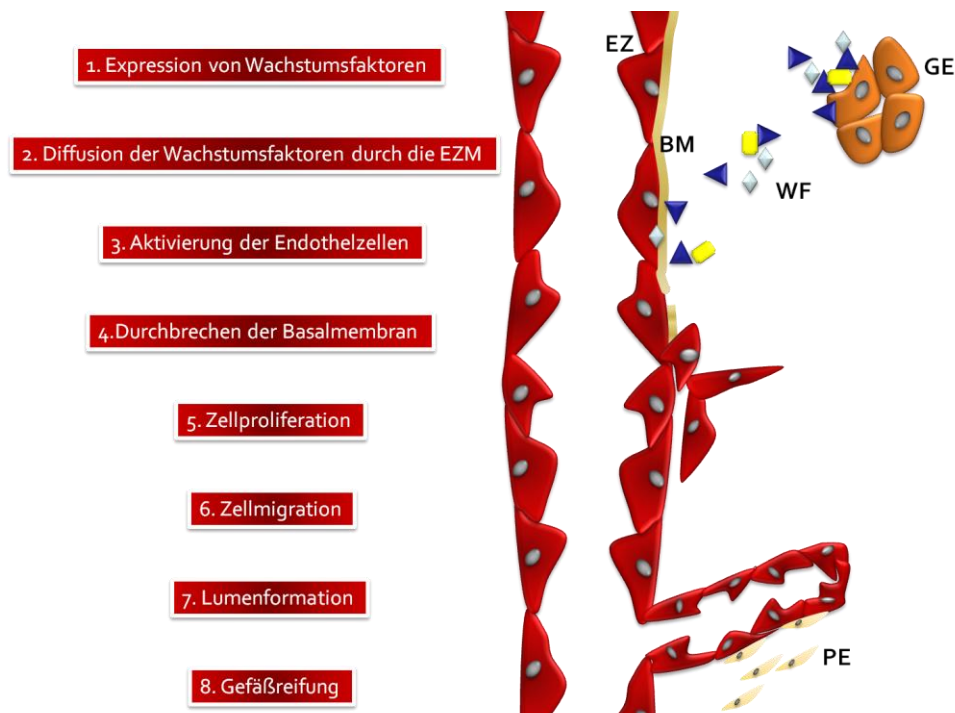


Abb. 6: Molekulare Schritte der Angiogenese.

Schematische Darstellung der molekularen Prozesse zur Entstehung von neuen Blutgefäßen aus schon bestehenden Blutgefäßen. Endothelzellen (EZ), Basalmembran (BM), Wachstumsfaktoren (WF), sauerstoffarmes Gewebe (GE), Perizyten (PE).

Initiiert wird die Angiogenese durch die Expression von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren, wie VEGF-A, aFGF, bFGF und Angiopoietin-1 (Arroyo and Iruela-Arispe 2010) in sauerstoffarmen Geweben. Die Wachstumsfaktoren gelangen durch Diffusion zu den Endothelzellen, während sie auf ihrem Weg durch die extrazelluläre Matrix aktiviert und modifiziert werden können, zum Beispiel durch Proteolyse (Yee, Yan *et al.* 1993; Ortega, Hutchings *et al.* 1999; Abounader and Larterra 2005; Lee, Jilani *et al.* 2005). Aktivierte Endothelzellen beginnen ihrerseits Proteasen zu exprimieren und zu proliferieren. Sie migrieren schließlich entlang des angiogenen Reizes zum sauerstoffarmen Gewebe. Abschließend werden durch Lumenformation und Verzweigung neue Gefäße geformt. Mit der Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen reifen die neuen Gefäße letztendlich aus. Dabei wird das angiogene Gleichgewicht durch zeitlich und räumlich fein abgestimmte pro- und anti-angiogene Faktoren bestimmt. Diese Rollen können von Wachstumsfaktoren, Inhibitoren sowie regulatorischen Peptiden aus der extrazellulären Matrix oder Proteasen übernommen werden (Arroyo and Iruela-Arispe 2010). Proteasen übernehmen an verschiedenen Stellen dieser Kaskade entscheidende Funktionen. So sind Proteasen an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt (Gogineni, Longabaugh *et al.* 2004; Hoeben, Landuyt *et al.* 2004), durch proteolytische Prozesse entstehen regulatorische extrazelluläre Peptide (Bellon, Martiny *et al.* 2004) und

Wachstumsfaktoren bedürfen proteolytischer Aktivierung (Yee, Yan *et al.* 1993; Ortega, Hutchings *et al.* 1999; Abounader and Laterra 2005; Lee, Jilani *et al.* 2005). Genauso sind Proteasen durch Spaltung von Zelladhäsionsproteinen für die Zellmigration essentiell (Woolard, Wang *et al.* 2004). Manche Proteasen zeigen auch anti-angiogene Aktivität (Koenig, Woolard *et al.* 2004; Woolard, Carty *et al.* 2004). Diese zahlreichen Protein-Interaktionen zeigen die Bedeutung der noch wenig erforschten Regulation der Angiogenese auf Proteinebene. Hier setzt auch diese Studie an, welche die Bedeutung der Metalloprotease Mepri α für die Angiogenese auf Proteinebene analysieren will.

2.5.1 CTGF als Wachstumsfaktor in der Angiogenese

Der *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) wurde als erstes Mitglied der CCN (*CTGF/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed gene*) –Familie 1991 von Bradham *et al.* als extrazelluläres Protein im Überstand von Endothelzellen beschrieben (Bradham, Igarashi *et al.* 1991). CTGF wird als 36 kDa großes Protein sekretiert und weist vier stark konservierte Domänen auf (Abb. 7). Die erste Domäne ist die *Insulin-Like Growth Factor* (IGF)-Domäne, gefolgt von der *von Willebrand Factor Type-1C*-Domäne (vWF-C). Die dritte Domäne weist Homologien zu dem Thrombospondin *Type 1* (*TSP1*) *Motiv* auf und ist mit seiner Bindungseigenschaft für die Affinität zum *LDL Receptor related Protein* (LRP) verantwortlich (Gao and Brigstock 2003). Die Cystein *Knot*-Domäne, welche die vierte Domäne bildet, verleiht CTGF seine Bindungseigenschaften zu Heparin (Brigstock, Steffen *et al.* 1997), Heparansulfat-Proteoglykanen (Chen, Chen *et al.* 2001) und der Bindung an die extrazelluläre Matrix (Kireeva, Latinkic *et al.* 1997).

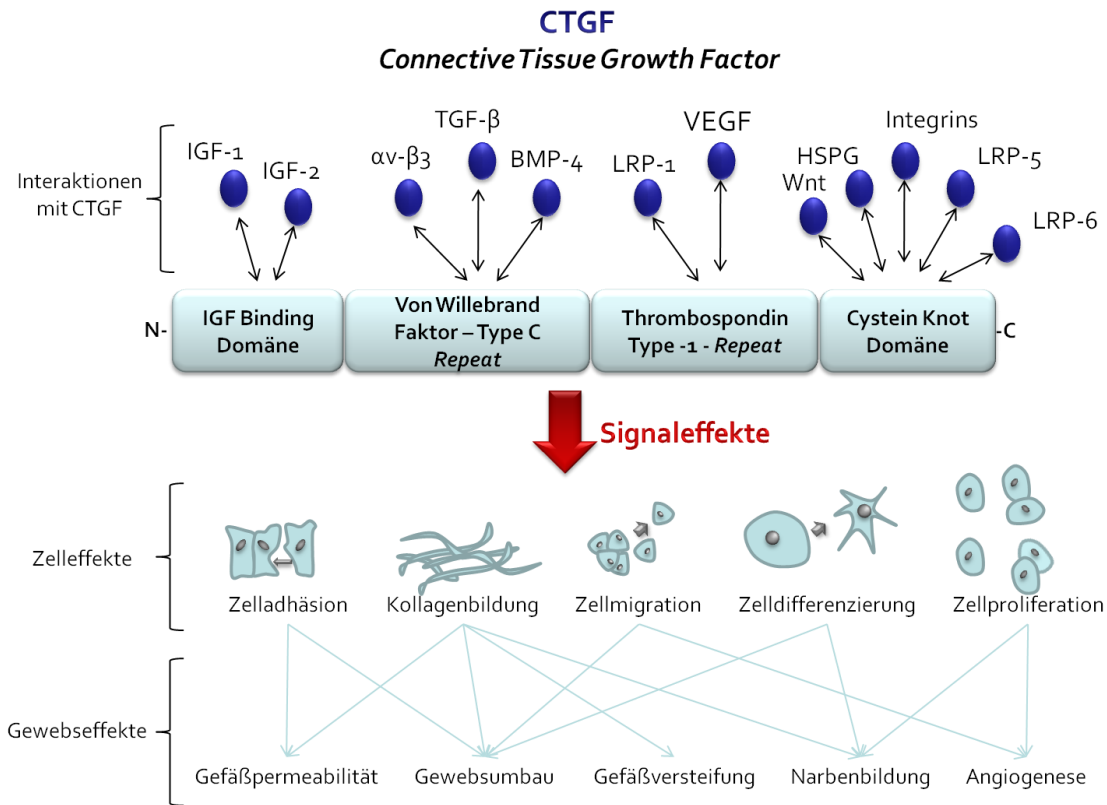


Abb. 7: Domänen und Interaktionspartner des CTGF mit der Bedeutung für Zell- und Gewebsbiologie.

Schematische Zusammenfassung der für CTGF beschriebenen Effekte auf Zellen und Gewebe. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Insulin-like growth factor 2 (IGF-2), $\alpha v\text{-}\beta_3$ Integrine ($\alpha v\text{-}\beta_3$), *transforming growth factor-beta* (TGF β), *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4), *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1/5/6* (LRP-1/5/6), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein* (HSPG).

Sezerniertes CTGF wurde seit seiner Entdeckung in verschiedensten Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen nachgewiesen. Eine hohe CTGF-Produktion ist für fibrotische Zustände, während der Reifung von Chondrozyten, in Wundheilungsprozessen und in verschiedenen Krebsarten beschrieben worden (Ivkovic, Yoon *et al.* 2003; Goppelt-Struebe and Cicha 2009).

CTGF als angiogener Wachstumsfaktor reguliert den Prozess der Angiogenese durch Interaktion mit zahlreichen Molekülen und beeinflusst so Endothelzellwachstum, Zellmigration, Zelladhäsion und Zellüberleben (Brigstock 2002). Interessanterweise wird CTGF-Expression durch VEGF-A stimuliert (King, Suzuma *et al.* 2000) und *vice versa* wird VEGF-A Expression durch CTGF stimuliert (Johnson, Schipani *et al.* 2001). Kommt es zu einer gemeinsamen Expression von VEGF-A und CTGF wie für Angiogenese, Wundheilung und Fibrose beschrieben (Hashimoto, Inoki *et al.* 2002), bindet CTGF das VEGF-A über Interaktionen an der 3. und 4. Domäne (Inoki, Shiomi *et al.* 2001). VEGF-A gebunden im Komplex mit CTGF ist somit in der extrazellulären Matrix lokalisiert (Kireeva, Latinkic *et al.* 1997; Burgess, Ge *et al.* 2006) und kann nicht mehr an seine Rezeptoren binden (Inoki, Shiomi

et al. 2001). CTGF weist zwischen der vWF-C- und TSP1-Domäne eine hohe Zugänglichkeit für proteolytische Prozessierung auf. Die nach Spaltung entstandenen biologisch aktiven Fragmente sind in vielen Körperflüssigkeiten nachweisbar. Interessanterweise weisen die 18 und 20 kDa großen Fragmente N-terminal das Asp186 auf (Ball, Surveyor *et al.* 1998), welches der mittels TAILS bestimmte N-Terminus nach Meprin-Prozessierung ist. Nach proteolytischer Spaltung des Komplexes durch MMPs und Plasmin kann der VEGF-A/CTGF-Komplex aufgelöst und die Inhibierung von VEGF-A wiederaufgehoben werden (Hashimoto, Inoki *et al.* 2002; Dean, Butler *et al.* 2007).

2.5.2 VEGF-A als Schlüsselregulator der Angiogenese

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A), welcher neben VEGF-B, -C, -D, -E und -F zu der VEGF-Familie zählt, wird seit seiner Entdeckung 1989 (Leung, Cachianes *et al.* 1989) als der wichtigste angiogene Wachstumsfaktor beschrieben (Coultas, Chawengsaksophak *et al.* 2005). Die 12 bisher beschriebenen VEGF-A Isoformen (Abb. 8, A) (Lambert, Mineur *et al.* 2007; Harper and Bates 2008) regulieren den komplexen Prozess der Angiogenese während der Entwicklung, in physiologischen, wie auch in pathologischen Zuständen. Indessen wird das pro- und anti-angiogene Gleichgewicht durch weitere Wachstumsfaktoren, Interaktionspartner und Inhibitoren bestimmt (Bergers and Benjamin 2003). VEGF-C und D sind als weitere Mitglieder der Familie für die Ausbildung des Lymphgefäßsystems von essentieller Bedeutung (Fitz, Morris *et al.* 1997; Achen, Jeltsch *et al.* 1998). VEGF-B Aktivität reguliert die Degradation der extrazellulären Matrix, Zelladhäsion und Migration (Olofsson, Korpelainen *et al.* 1998) und VEGF-E und VEGF-F sind im Proteom von Viren und Schlangengift gefunden worden. Hier dienen sie ihrem Wirt dazu die Durchlässigkeit der Gefäße seines Opfers zu steigern (Ogawa, Oku *et al.* 1998). VEGF-A induziert die Angiogenese über die Bindung an die Rezeptoren VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) und VEGFR-2 oder auch den Neuropilin-1-Rezeptor, welche spezifisch von Endothelzellen exprimiert werden (Ortega, Hutchings *et al.* 1999). Die einzelnen VEGF-A Isoformen unterscheiden sich durch ihr Molekulargewicht sowie ihre biochemischen Eigenschaften und weisen somit verschiedene Affinitäten zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie auch zu ihren Rezeptoren auf. VEGF-A_{121, 165} und ₁₈₅ werden in allen Geweben exprimiert, wobei VEGF-A₁₆₅ die am stärksten exprimierte Isoform ist. Andere VEGF-A Isoformen werden nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert (Shibuya 2008). Die höchste VEGF-A Expression wurden in der adulten Lunge, Niere, Herz und Nebenniere beschrieben (Hoeben, Landuyt *et al.* 2004). VEGF-A ist als ein über Disulfid-Brücken gebundenes Dimer mit einer molekularen Masse von 34-42 kDa aktiv. VEGF-A aktiviert Endothelzellen (Abb. 8, B), welche zu Proliferieren und zu Migrieren beginnen. Außerdem wirkt VEGF-A anti-apoptotisch und steigert die Durchlässigkeit der Blutgefäße. Die Regulation der VEGF-

A-Aktivität wird zum Einen durch die Expressionskontrolle bestimmt, zum Anderen aber auch durch das *Splicing* der Isoformen (Hoeben, Landuyt *et al.* 2004). So haben Woolard *et al.* 2004 entdeckt, dass VEGF-A_{165b} sich durch fünf C-terminale Aminosäuren von VEGF-A₁₆₅ unterscheidet, anti-angiogene Wirkung zeigt und auch die pro-angiogene Wirkung von VEGF-A₁₆₅ durch Bindung an den VEGFR-2 aufheben kann (Woolard, Wang *et al.* 2004). Inzwischen konnten noch weitere VEGF-A_{xxx}b Isoformen identifiziert werden (Perrin, Konopatskaya *et al.* 2005).

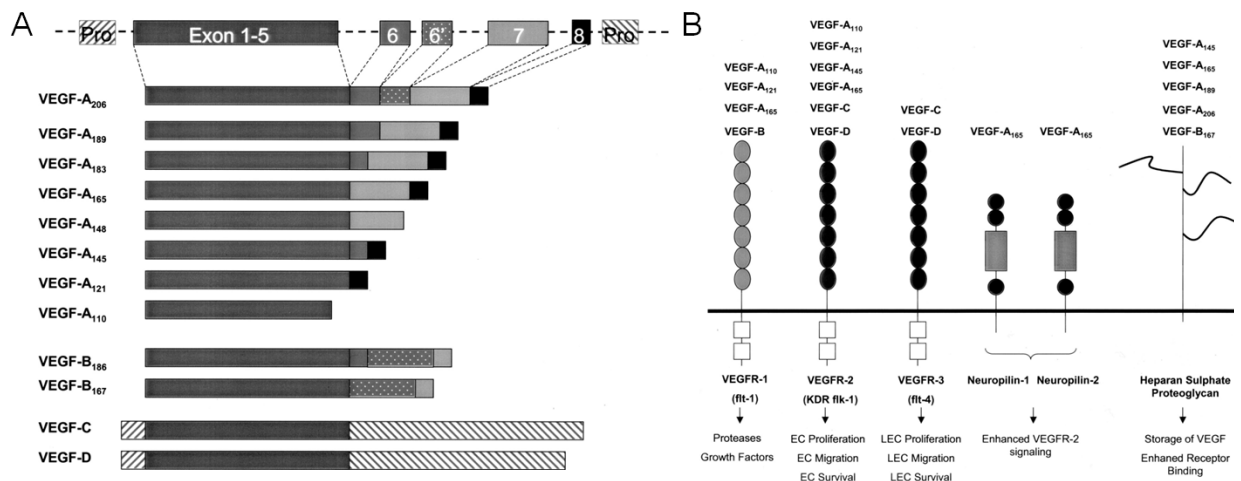


Abb. 8: Schematische Darstellung der VEGF-A Isoformen, Rezeptoren und VEGF-A Signaleffekte. (Hoeben, Landuyt *et al.* 2004)

Einmal exprimiert wird die VEGF-A-Aktivität durch die Expression der VEGF-A Rezeptoren reguliert, oder durch die Bindung an Interaktionspartner wie lösliche VEGFR-Fragmente, den *platelet factor-4* oder CTGF inhibiert (Houck, Leung *et al.* 1992; Inoki, Shiomi *et al.* 2001).

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Forschungsinteresse unserer Arbeitsgruppe liegt darin, Astacine und die dazugehörigen Metalloproteasen Meprin α und β biochemisch zu charakterisieren und ihre physiologischen Funktionen im gesamten Meprin-Netzwerk zu analysieren, um ihre (patho)physiologischen Relevanz zu verstehen. Die Intention dieser Arbeit war, die physiologische Regulation der Metalloproteasen Meprin α und β durch Inhibitoren zu untersuchen. Hier sollten endogene Inhibitoren identifiziert und diese anschließend biochemisch validiert werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war, die biologische Funktion der Metalloprotease Meprin α bezüglich ihres Einflusses auf die Angiogenese zu untersuchen. Hier sollten pro-angiogene *Targets* der Metalloprotease Meprin α validiert werden und der molekulare Mechanismus für die Regulation der Angiogenese aufgezeigt werden. Die Aktivierung der pro-angiogenen Kaskade durch Meprin α auf Proteinebene sollte mithilfe von biochemischen, molekularbiologischen, zellbiologischen und *in vivo* Modellen analysiert werden. Das neugewonnene Wissen über die physiologische Regulation und Funktion der Meprine soll Einblicke in das komplexe Proteinnetzwerk der Meprine und der Angiogenese ermöglichen. Dies soll schließlich auch dazu beitragen, die Zusammenhänge in pathologischen Prozessen wie dem Tumorwachstum oder der Fibrose besser zu verstehen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der Metalloproteasen Meprin α und β hinsichtlich ihrer endogenen Regulation untersucht werden, sowie die molekularen Interaktionen der Metalloprotease Meprin α im komplexen Prozess der Angiogenese analysiert werden. Im Laufe dieser Arbeit konnten drei endogene Meprin-Inhibitoren identifiziert und analysiert werden. Diese Ergebnisse sind in den Veröffentlichungen (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010) und (Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript) detailliert beschrieben und werden hier unter dem Punkt 3.1 dargelegt, zusammengefasst und diskutiert. Die gewonnenen Erkenntnisse zur physiologischen Bedeutung der Metalloprotease Meprin α und die Daten zur molekularen Regulation der Angiogenese durch Meprin α sind in den Veröffentlichungen (Schütte, Hedrich *et al.* 2010) und (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript) ausführlich beschrieben und werden unter Punkt 3.2 kurz dargelegt und zusammenfassend besprochen.

3.1 Endogene Regulation der Metalloproteasen Meprin α und Meprin β .

Über die endogene Regulation der Meprine ist bis zum heutigen Stand der Forschung noch wenig bekannt. Zwar weiß man, dass die Aktivierung von Meprin α und β durch verschiedene Serinproteasen sehr spezifisch erfolgt, wie jedoch die Regulation der einmal gewonnenen Protease-Aktivität *in vivo* aussieht, ist erst mit einer Identifizierung der endogenen Inhibitoren zu sagen. Im Laufe dieser Arbeit gelang es, drei endogene Meprin-Inhibitoren näher zu charakterisieren.

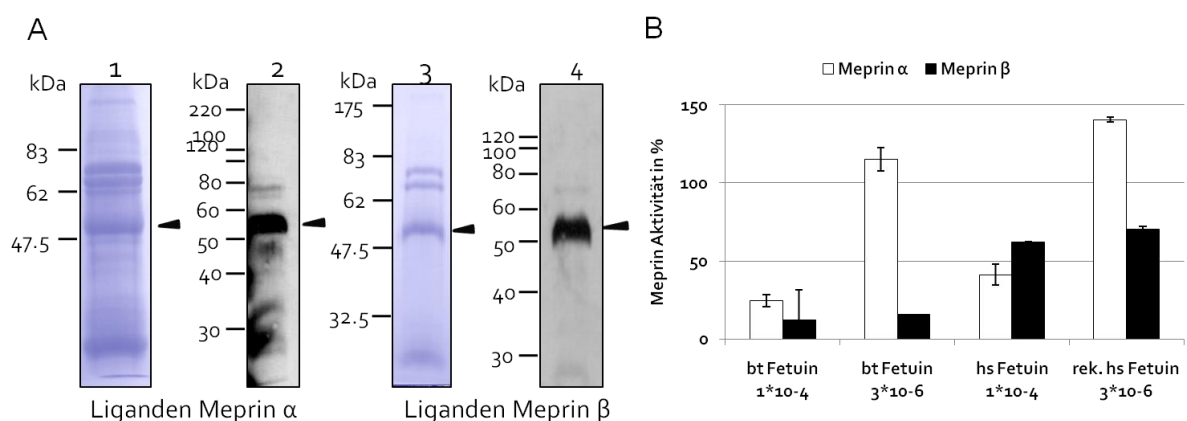


Abb. 9: Identifizierung von Fetuin-A als endogenen Meprin-Inhibitor.

(A) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Meprin α - (Lane 1) und Meprin β -Liganden (Lane 3) nach Meprin-Affinitätschromatographie von Blutplasma und Western Blot-Analyse der gleichen Auftrennung mit Fetuin-A Antikörper detektiert in Lane 2,4. (B) Inhibition von Meprin α und Meprin β in einem AktivitätsAssay mit fluorogenem Peptidsubstrat gemessen. Meprin α wurde mit 5×10^{-9} M und Meprin β mit 1×10^{-9} M eingesetzt. bovines Die Inhibition erfolgte durch bovines Fetuin-A (bt Fet.), humanes Fetuin-A (hs Fet.) oder rekombinantes humanes Fetuin-A (rek. hs Fet.). Enzymaktivität ohne Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010)

Ergebnisse und Diskussion

Der erste identifizierte endogene Meprin-Inhibitor konnte als Meprin-Ligand aus humanem Blutplasma isoliert und identifiziert werden. Mittels Meprin-Affinitätschromatographie ist es gelungen, Fetuin-A, ein hoch glykosyliertes Negativ-Akutphase-Protein, als Meprin-Interaktionspartner zu isolieren (Abb. 9). Fetuin-A kommt in sehr hohen Konzentrationen in fötalem Rinderserum vor. Da fötales Rinderserum außerdem sehr hohe Konzentrationen an Wachstumsfaktoren enthält, wird es häufig in der Zellkultur eingesetzt und wirkt hier inhibierend auf die beiden Meprine. In Kooperation mit Daniel Lottaz konnte die Inhibition von Meprin durch Fetuin-A in fötalem Rinderserum (FCS) mittels Antikörperdepletion bestätigt werden (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass weitere Astacine von Fetuin-A inhibiert werden und dass Karpfen-Fetuin ebenso in der Lage ist humanes Meprin zu inhibieren. Mit diesen Ergebnissen ist es erstmals gelungen einen endogenen Inhibitor der Meprin-Proteasen zu identifizieren.

In Inhibitionsstudien zeigte sich, dass Meprin α besser inhibiert wird, als Meprin β und mittels Inhibitionsstudien wurde der K_i für bovines Fetuin-A für Meprin α und β bestimmt (Abb. 10). Außerdem ist es gelungen den neuen N-Terminus für ein Fetuin-A Fragment mit SPDSAE₁₄₀ α ₁₄₁DVRKLXPCX nach proteolytischer Prozessierung mit Meprin β durch Edman Sequenzierung zu bestimmen.

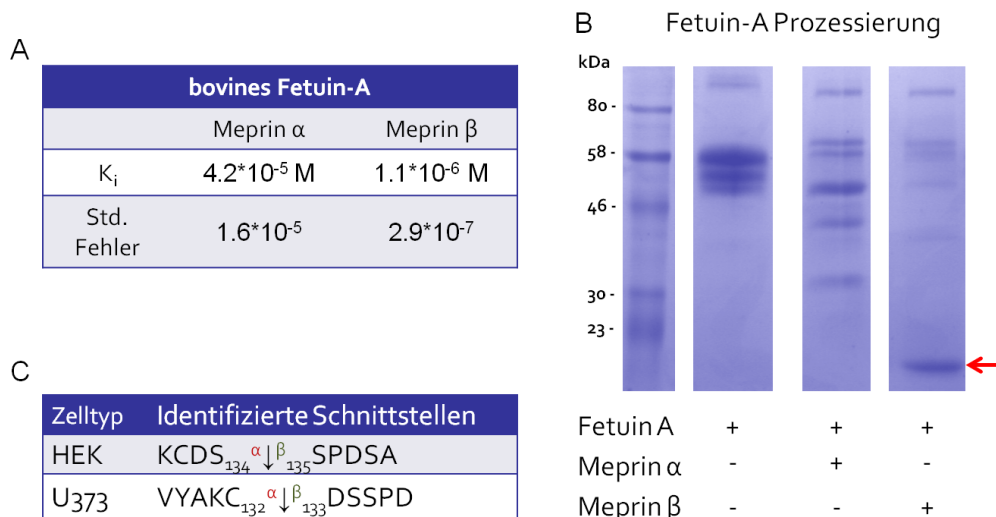


Abb. 10: Bestimmung des K_i für die Meprine mit bovinem Fetuin-A und Fetuin-A Prozessierung. (A) Inhibitions-Versuche wurden mit bovinem Fetuin-A (Konzentrationen von 1×10^{-7} M bis $3,4 \times 10^{-4}$ M) durchgeführt. Es wurde ein spezifisches fluorogenes Substrat verwendet und die Enzymaktivität ohne Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. (B) Prozessierung von 10 μ g bovinem Fetuin-A mit $1,25 \times 10^{-6}$ M Meprin α oder β , aufgetrennt durch eine SDS-PAGE und mit Coomassie-BrilliantBlau-gefärbt. Der Pfeil markiert die sequenzierte Bande. (C) Die in mittels TAILS-Methode identifizierten Schnittstellen für Meprin α und β in humanem Fetuin-A. (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010; Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript)

Fetuin-A wurde mittels der TAILS-Analyse in *Human Embryonic Kidney* (HEK)- und *glioblastoma-astrocytoma cells* (U373)- Zellen als Meprin-Substrat (Abb. 10) identifiziert. Die Unterschiede in der validierten und durch TAILS gefundenen Schnittstellen kann zum Einen in Sequenz- und Strukturunterschieden des humanen und bovinen Fetuin-A begründet sein, zum Anderen kann es *in vitro* auch durch fehlende Integrationspartner des Fetuin-A zu anderen Schnittmustern kommen. Die Schnittstellen liegen jedoch alle dicht zusammen zwischen den beiden Cystatin-Domänen, was auf eine Bedeutung dieser Position für die Meprin-Inhibition schließen lässt.

Fetuin-A wird als Plasmaprotein hauptsächlich in der Leber, aber auch von anderen epithelialen Zellen exprimiert und liegt somit auch in diesen Zellen in der extrazellulären Matrix vor. Fetuin-A kommt dadurch nicht nur im Plasma, sondern auch in anderen Geweben zellspezifisch als Meprin-Inhibitor infrage. Hier ist vor allem eine Bedeutung des Fetuin-A als Negativ-Akutphase-Protein zu diskutieren, da eine Senkung der Fetuin-A-Konzentration in pathologischen Situationen zu einer vermehrten Meprin-Aktivität führen kann. Außerdem ist ein verändertes Prozessierungsmuster von Fetuin-A unter pathologischen Situationen beschrieben worden (Nawratil, Lenzen *et al.* 1996). Tatsächlich konnten wir zeigen, dass sich Plasma von Patienten mit hohem pathologischem Hintergrund durch eine geringere Inhibition auf die Meprin Metalloproteasen auswirkt. Die verringerte Inhibition im Fall der Patienten-Plasmaproben kann durch eine veränderte Prozessierung des Fetuin-A, genauso wie durch eine verringerte Konzentration im Plasma und der Zellumgebung begründet sein. Zur Untersuchung der Bedingungen unter pathologischen Umständen sollte die Prozessierung des Fetuin-A und die Inhibition der einzelnen Fragmente in verschiedenen pathologischen Situationen mit einer großen Anzahl an Plasmaproben weiter untersucht werden.

Mit der Identifizierung von Cystatin C als Meprin α -Inhibitor, konnte ein weiterer Cystein-Inhibitor als Metalloprotease-Inhibitor beschrieben werden. Cystatin C hemmt Meprin α mit einem K_i von $8,5 \times 10^{-6}$ M, während für Meprin β keine Inhibition gezeigt werden konnte (Abb. 11, A). Meprin β ist jedoch in der Lage Cystatin C zu prozessieren (Abb. 11, B). Wie auch schon im Fall von Fetuin-A konnte Cystatin C als Meprin-Substrat mittels TAILS in *human adult low Calcium high Temperature keratinocytes* (HaCaT)-, epitheliale *Caucasian Colon adenocarcinoma cells* (CaCo-2)- und *glioblastoma-astrocytoma cells* (U373)- Zellen identifiziert werden. Hier konnte die Schnittstelle GPMD₄₁ α 42ASVEEX mittels Edman Sequenzierung validiert werden (Abb. 11, C).

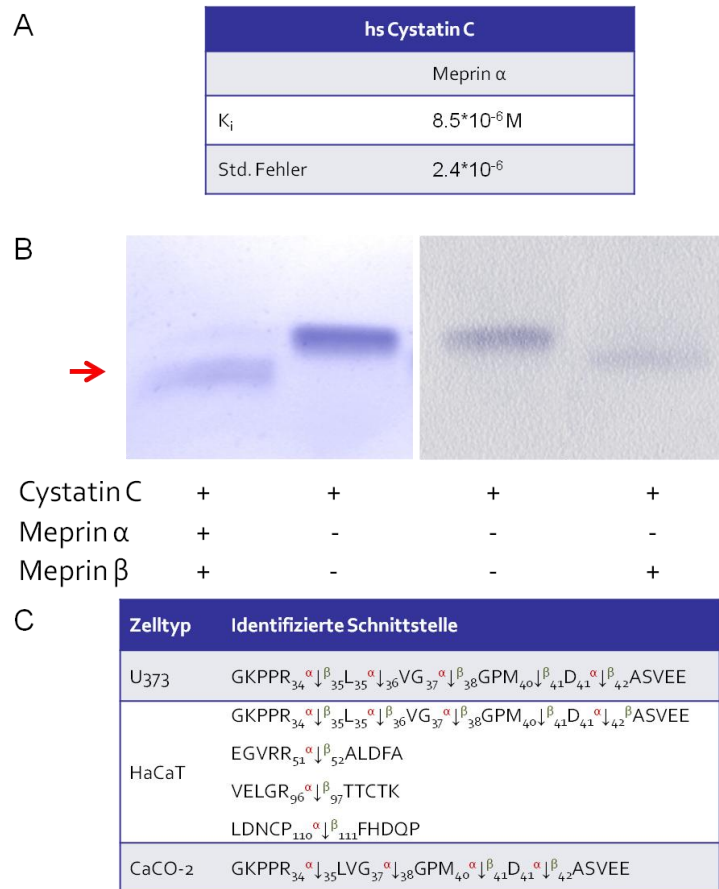


Abb. 11.: Cystatin C ist ein endogener Meprin α -Inhibitor.

(A) Der K_i Wert für rek. Cystatin C (gemessene Konzentrationen von $4,1 \times 10^{-9} \text{ M}$ bis $4,1 \times 10^{-5} \text{ M}$) wurden mit einem fluorogenen Substrat bestimmt. Meprin α wurde in einer Konzentration von $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ eingesetzt und für 10 Min. mit dem Inhibitor vorinkubiert. (B) Cystatin C ($1 \mu\text{g}$) wurde mit Meprin α/β ($8,02 \times 10^{-8} \text{ M}$) für 24 h inkubiert, anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Der rote Pfeil markiert die sequenzierte Bande. (C) In der Tabelle sind die für Cystatin C mittels der TAILS-Methode gefundenen Schnittstellen aufgelistet. (Hedrich, Lottaz *et al.* 2010; Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript)

Dass Cystatin C und Fetuin-A nach ihrer Identifikation als endogene Meprin-Inhibitoren als *in vivo* Substrate mittels TAILS in HaCaT-, CaCo-, U373- oder HEK-Zellen identifiziert wurden, unterstreicht ihre physiologische Relevanz, welche nur gegeben ist, wenn Protease und Inhibitor auch *in vivo* aufeinander treffen. Die Schnittstellen N-terminal der durch Edman Sequenzierung validierten Meprin α -Schnittstelle entstehen wahrscheinlich durch vorläufige Degradation des Cystatin C. Die terminale Prozessierung findet schließlich zwischen den Aminosäuren 41 und 42 statt. Interessanterweise liegt diese Meprin α -Schnittstelle neben der für Cysteinproteasen bekannten Bindestelle. Dieser Schnitt könnte demzufolge auch die Meprin-Inhibition bedingen. Die ausschließlich in HaCaT-Zellen weiter C-terminal gefundenen Schnittstellen konnten *in vitro* nicht beobachtet werden, hier ist es denkbar, dass diese *in vivo* durch andere *downstream*-Effekte, induziert durch erhöhte Meprin-Aktivität, zustande kommen. So könnte auch Meprin β , welches

nicht durch Cystatin C gehemmt wird, jedoch dieses Prozessieren kann, für diese Schnitte verantwortlich sein. Die Beobachtung, dass Cystatin C bei identisch identifizierten Schnittstellen in der TAILS-Analyse für Meprin α ein Inhibitor und für Meprin β lediglich ein Substrat ist, unterstreicht noch einmal die Unterschiede der Meprine untereinander und die unterschiedliche Bedeutung der Interaktionen dieser Proteine.

Nachdem das Paradigma gebrochen war, dass Protease-Inhibitoren familienspezifisch wirksam sind, konnten wir für Meprin α die Inhibition durch Elafin, einen bekannten Serinprotease-Inhibitor, zeigen (Abb. 12, A). Elafin wurde durch die Identifikation des Inhibitors als Substrat mittels der TAILS-Methode möglich. Hier konnte die für Elafin durch TAILS ermittelte Schnittstelle VKGPVS₇₀ α ₇₁TKPG durch eine Edman Sequenzierung validiert werden (Abb. 12, B und C). Für Meprin β konnte keine Prozessierung von Elafin beobachtet werden.

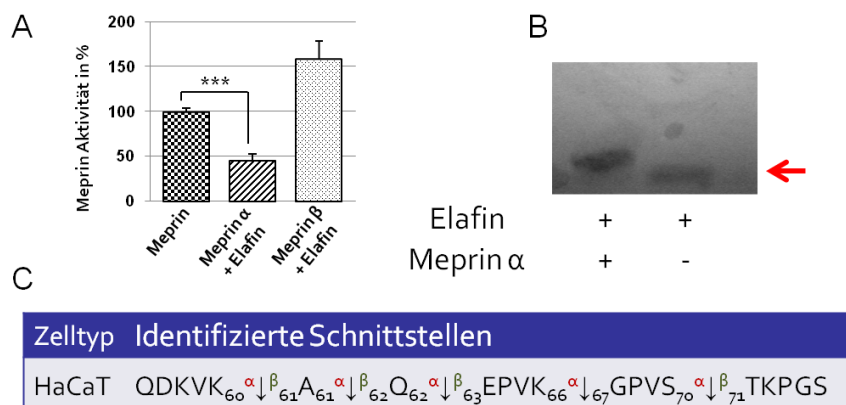


Abb. 12.: Inhibition von Meprin α durch Elafin.

(A) Rekombinantes humanes Elafin 61-117 (10 μ g) wurde mit $8,5 \times 10^{-7}$ M Meprin α über Nacht inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. (B) Meprin-Aktivität wurde mit einem fluorogenen Substrat unter Einsatz von 5×10^{-5} M rek. Elafin getestet. Meprin-Aktivität ohne Zusatz des Inhibitors wurde gleich 100 % gesetzt. Der rote Pfeil markiert die sequenzierte Bande. (C) Auflistung der durch TAILS identifizierte Schnittstellen für humanes Elafin. (Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript)

Inhibitionsstudien mit Meprin α und β zeigten, dass Meprin α , jedoch nicht Meprin β , durch Elafin bis auf 46 % der Aktivität gehemmt werden kann. Die mittels Edman Sequenzierung nach terminaler Prozessierung des Elafin validierte Schnittstelle liegt zwischen den Aminosäuren GPVS₇₀ und ₇₁TKPGSXPIIL, alle anderen durch TAILS gefundenen Schnittstellen liegen bis zu 10 Aminosäuren Richtung N-Terminus. Hier kann diskutiert werden, dass die N-terminalen Schnittstellen mehreren Prozessierungsstufen entsprechen, aber die terminale Schnittstelle liegt zwischen den Aminosäuren 70 und 71, welche auch für die Inhibition des Meprin α verantwortlich sein könnte. Interessanterweise trennt der hier durch Meprin α entstandene Schnitt die Transglutaminase-binde-

Domäne (TPTBD) von der inhibierenden WAP-Domäne. Die durch TAILS für Meprin β gefundenen Schnittstellen konnten *in vitro* nicht bestätigt werden. Diese Schnittstellen kommen deshalb vermutlich durch andere von Meprin β aktivierten Proteasen zustande.

In diesen Studien konnten Fetuin-A, Cystatin C und Elafin als drei endogene Meprin-Inhibitoren identifiziert werden. Entsprechend wurde zum ersten Mal eine Inhibition von Metallproteasen durch endogene Inhibitoren anderer Proteasefamilien beschrieben. Dies ist insofern erstaunlich, da man davon ausgeht, dass Mitglieder der Proteasefamilien sich in ihrer Struktur und Spaltmechanismen grundlegend unterscheiden und endogene Inhibitoren, wie zum Beispiel Elafin als substratähnlicher Inhibitor, familienspezifisch das aktive Zentrum blockieren (Ying and Simon 1993). Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass es für Inhibitoren verschiedene Inhibitionsmechanismen geben kann. Die Inhibitionsmechanismen aufzuklären wird Gegenstand weiterer Projekte sein. Gleichzeitig wird die Aufklärung der Struktureigenschaften der Meprine einen erheblichen Beitrag leisten zum Verständnis der Protein-Inhibitor-Interaktionen. Für Fetuin-A und Cystatin C konnten die Inhibitionskonstanten bestimmt werden, wobei Fetuin-A ein besserer Inhibitor für Meprin β ist. Cystatin C und Elafin fungieren dagegen ausschließlich als Inhibitoren für Meprin α . Für alle drei Inhibitoren konnten neue N-Termini der endogenen Substrate nach terminaler Prozessierung mit Meprin validiert werden. Ob diese neuen N-Termini oder der Prozessierungsprozess an sich für die Inhibition verantwortlich sind, bleibt in dieser Studie noch ungeklärt. Dass es sich bei den untersuchten Inhibitoren um physiologisch relevante Inhibitoren handelt, konnte durch die Identifikation dieser Inhibitoren als Meprin-Interaktionspartner in verschiedenen humanen Zelllinien mittels der TAILS-Methode bekräftigt werden.

Aus den durch TAILS identifizierten Meprin-Substraten wurden SLPI und Clusterin als weitere potentielle Meprin-Inhibitoren analysiert.

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), ein zu Elafin homologer Inhibitor der WFDC-Familie, wird wie Elafin von Meprin α , jedoch nicht von Meprin β prozessiert (Abb. 13). In Aktivitäts-Assays konnte jedoch keine Inhibition durch SLPI für die beiden Meprine gezeigt werden. Für Meprin α konnten mittels Edman Sequenzierung zwischen den Aminosäuren SAQC₄₃ und ₄₄LRYKXPEX eine Schnittstelle validiert werden.

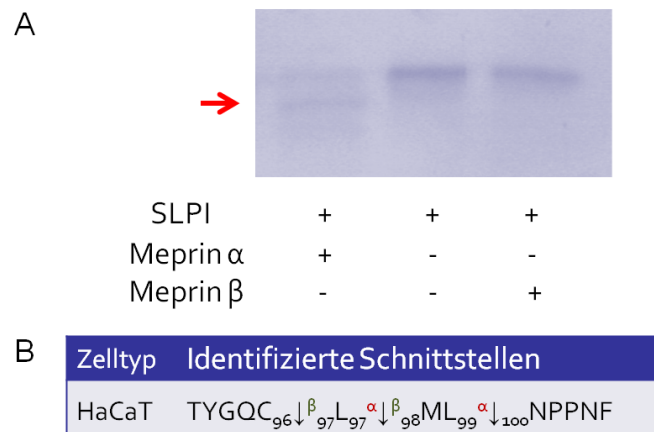


Abb. 13.: Prozessierung von SLPI durch Meprin .

(A) Rekombinantes humanes SLPI (10 μ g) wurde mit $8,5 \times 10^{-7}$ M Meprin α/β über Nacht inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Der rote Pfeil markiert die sequenzierte Bande. (B) Die mittels TAILS identifizierte Schnittstellen für humanes SLPI. (Jefferson, Keller *et al.* Manuskript)

Diese Ergebnisse zeigen, dass SLPI kein Inhibitor der Meprine ist. In weiteren Studien sollte getestet werden, ob durch die Meprin-Prozessierung des SLPI die inhibitorische Wirkung gegen Elastase-2, Chymotrypsin, Cathepsin-G und Trypsin aufgehoben werden kann und Meprin so eine regulatorische Wirkung zukommt. Die für SLPI in den TAILS-Daten gefundenen Schnittstellen konnten *in vitro* nicht bestätigt werden und sind höchst wahrscheinlich auf *downstream*-Effekte der Meprine zurückzuführen.

Clusterin, welches als Apoptoseinhibitor und Inhibitor der Membran-typ 6 Matrix Metalloproteinase (MT6-MMP) im Komplex beschrieben wird (Matsuda, Itoh *et al.* 2003), wurde als weiteres Meprin-Substrat ermittelt (Abb. 14). Eine proteolytische Prozessierung zeigt jedoch, dass Clusterin unspezifisch abgebaut wird. In Inhibitionstests konnte keine Inhibition der Meprine festgestellt werden (Abb. 14)

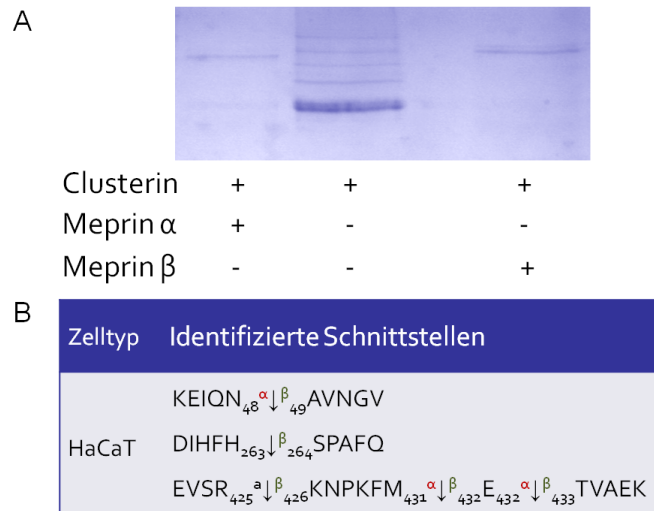


Abb. 14.: Prozessierung von Clusterin durch Meprin α und β .

(A) Rekombinantes humanes Clusterin (10 μ g) wurde mit $8,5 \times 10^{-7}$ M Meprin α/β über Nacht inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. (B) Die mittels TAILS identifizierte Schnittstellen für humanes Clusterin. (Jefferson, Keller *et al.* Manuskript)

Somit konnte Clusterin nicht als Meprin-Inhibitor bestätigt werden, die Ergebnisse deuten jedoch auf den Abbau des Clusterin durch Meprin im Proteom-Netzwerk hin. Hier müsste allerdings der *in vitro* beobachtete Abbau von Clusterin *in vivo* validiert werden, um eine Bedeutung von Meprin auf die von Clusterin regulierten zellulären Prozesse zu untersuchen.

Zusammengefasst zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Meprin-Substrate und Inhibitoren der TAILS-Ergebnisse, dass die durch diesen neuen Proteomics-Approach gewonnenen Daten einen enormen Beitrag zum Verständnis der Funktion der Metalloproteasen Meprin α und β geleistet haben. So konnten einige der gefundenen Schnittstellen validiert werden und die physiologische Bedeutung der Interaktionen gezeigt werden. Die TAILS-Methode macht Effekte der Meprine im *in vivo* Proteom-Netzwerk sichtbar, somit werden jedoch nicht nur direkte Interaktionen von Meprin sichtbar, sondern auch *downstream*-Effekte durch die Aktivierung von anderen Proteasen durch Meprin. Aus diesem Grund bedürfen die über TAILS identifizierten Substrate der weiteren Validierung *in vitro* und der Analyse der physiologischen Bedeutung *in vivo*.

3.2 Physiologische Rolle der Metalloprotease Meprin α in der Angiogenese

Die physiologische Bedeutung der Metalloprotease Meprin α wird seit ihrer Entdeckung 1981 (Beynon, Shannon *et al.* 1981; Sterchi, Green *et al.* 1982) erforscht. Es sind zahlreiche *in vitro* Substrate dieser Protease beschrieben. So sind Pro-Kollagen III, Kollagen IV, humanes Nidogen-1, Fibronektin und Laminin (Kaushal, Walker *et al.* 1994; Kruse, Becker *et al.* 2004; Kronenberg, Bruns *et al.* 2010) als Meprin α -Substrate in der extrazellulären Matrix beschrieben. TGF- α und Interleukin-1 β sind Cytokine, die als Meprin α -Substrate bekannt sind (Bergin, Greene *et al.* 2008; Herzog, Haun *et al.* 2009). Das Wissen um die Substrate lässt auf eine vielschichtige Rolle von Meprin α für die Zelldifferenzierung, Kollagen-Assemblierung, dem Immunsystem und der Beteiligung an Entzündungsprozessen schließen (Fitz, Morris *et al.* 1997; Becker-Pauly, Howel *et al.* 2007; Herzog, Haun *et al.* 2009; Kronenberg, Bruns *et al.* 2010).

In dieser Arbeit wurde die physiologische Bedeutung von Meprin α ausgehend von der Beobachtung, dass ein *Gen-knockdown* im Zebrafisch zu einer deutlichen Beeinträchtigung in der Entwicklung des Blutgefäßsystems führt (Abb. 15), weiter untersucht.

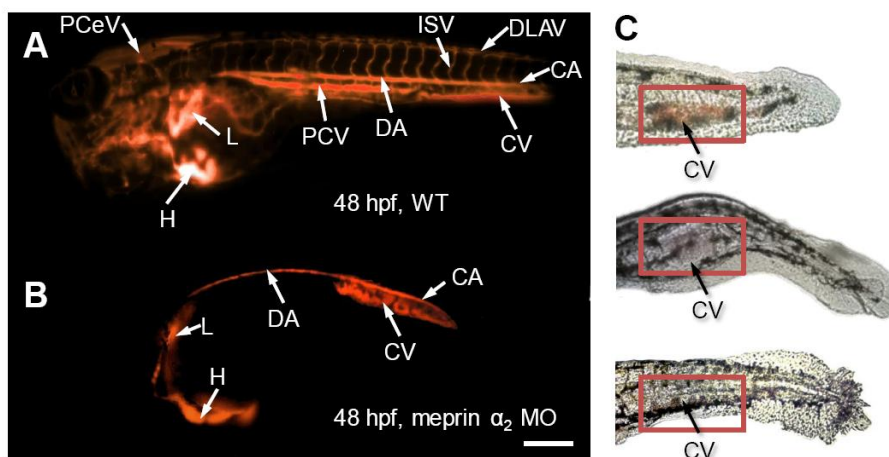


Abb. 15.: Meprin α_2 Gen-*knockdown* im Zebrafisch.

Die Meprin α_2 -Expression wurde mittels Morpholinos herunter reguliert und die Auswirkungen auf die Angiogenese wurden anschließend durch Mikroangiographie sichtbar gemacht. (A) zeigt die wildtypische Entwicklung des Blutgefäßsystems 48 h nach Befruchtung, während (B) den Meprin α_2 -Morpholino Phänotyp zeigt. (C) Nach *Gen-knockdown* konnten in der Caudalvene der Morpholinos aggregierte Erythrozyten beobachtet werden. (PCeV: Posteriore Cerebralvene; ISV: Intersegmentale Blutgefäße; DLAV: Dorsales längsverlaufendes, anastomalisches Gefäß; CA: Schwanzarterie; DA: Dorsalaorta CV: Schwanzvene; PCV: Hintere Hauptvene; L: Leber; H: Herz) (Maßstab: 250 μ m). (Schütte, Hedrich *et al.* 2010)

Embryos, die nach dem *knockdown* keine Meprin α_2 -Aktivität besitzen, weisen keine intersegmentalen Blutgefäße auf, was auf eine dramatisch eingeschränkte Organogenese schließen lässt. So wurde der Blutstrom deutlich eingeschränkt oder völlig unterbrochen. Aggregate von

Erythrozyten in der Schwanzregion des Fisches sind weitere Merkmale des Meprin α_2 *knockdowns* im Zebrafisch. Interessanterweise weist der Meprin α *knockdown* Phänotyp die gleichen Merkmale auf, die für einen VEGF-A-Morpholino *knockdown* beschrieben wurden (Nasevicius, Larson *et al.* 2000). Der Wachstumsfaktor VEGF-A als Schlüsselregulator der Angiogenese konnte tatsächlich als neues *in vitro* Substrat von Meprin identifiziert werden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die pro-angiogene Wirkung von Meprin α durch die Prozessierung von VEGF-A, dem Schlüsselregulator der Angiogenese, vermittelt wird. In einer weiterführenden Studie sollte diese Hypothese überprüft werden und der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden. Mittels TAILS gelang es, VEGF-A auch als *in vivo* Substrat in Zellüberständen von HaCaT Zellen zu identifizieren (Abb. 16.). Eine durch TAILS gefundene N-terminale Schnittstelle konnte nach proteolytischer Prozessierung *in vitro* durch Edman Sequenzierung für die VEGF-A Isoformen VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ bestätigt werden. Die Identifizierung von VEGF-A als *in vivo* Substrat unterstreicht die physiologische Bedeutung der VEGF-A Modifikation durch Meprin α . Neben der N-terminalen Prozessierung ist eine weitere C-terminale Prozessierung im Fall der VEGF-A Isoformen VEGF-A₁₆₅ und VEGF-A₁₈₉ zu beobachten (Abb. 16). Beide Isoformen weisen C-terminal eine Heparinbinde-Domäne auf.

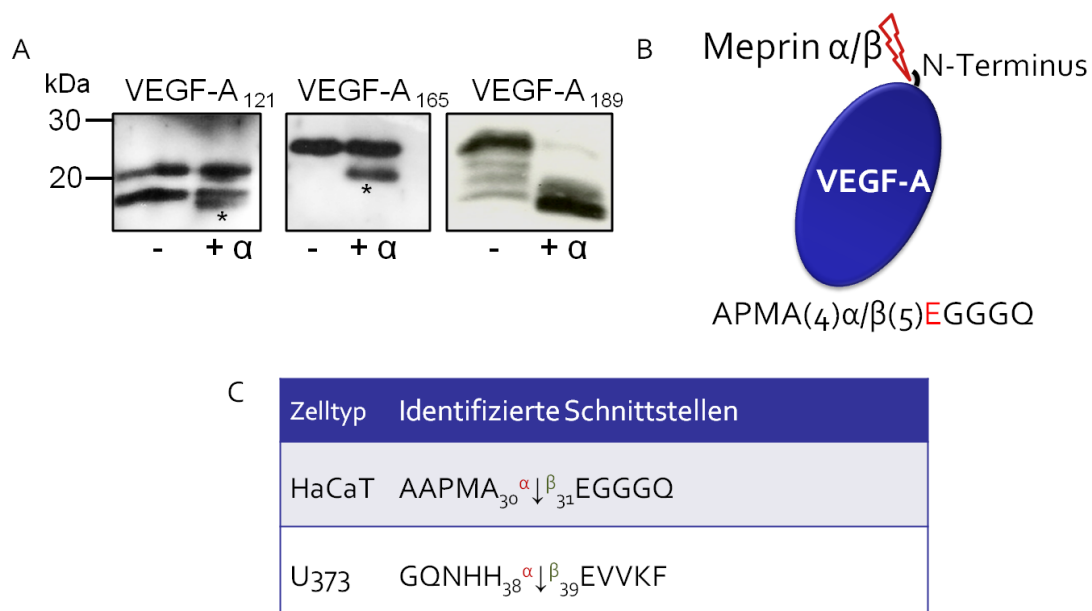


Abb. 16.: Proteolytische Prozessierung von VEGF-A durch Meprin α .

(A) Die VEGF-A Isoformen ₁₂₁, ₁₆₅ und ₁₈₉ wurden mit Meprin α proteolytisch verdaut und mittels Western Blot Analyse (VEGF-A Antikörper) untersucht. (*) N-Terminal sequenzierte Banden. (B) Mittels der TAILS-Methode wurde VEGF-A auch als *in vivo* Meprin-Substrat identifiziert. Die gefundene N-terminale Schnittstelle liegt zwischen Ala₃₀ und Glu₃₁. (C) Mittels der TAILS-Analyse identifizierte Schnittstellen für Meprin in VEGF-A. (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript; Jefferson, auf dem Keller *et al.* Manuskript)

Eine C-terminale Prozessierung von VEGF-A zwischen der N-terminalen Rezeptorbinde-Domäne und der C-terminalen Heparinbinde-Domäne wurde schon für MMPs (3,7,9 und 19) und Plasmin beschrieben (Houck, Leung *et al.* 1992; Bergers, Brekken *et al.* 2000; Lee, Jilani *et al.* 2005). Hier führt die C-terminale Prozessierung zu einer in der extrazellulären Matrix löslichen Variante, welche eine veränderte Morphologie der Blutgefäße zur Folge hat. So werden durch eine VEGF-A-Mutante, welche die prozessierte VEGF-A-Form imitiert, deutlich vergrößerte Blutgefäße mit wenig Verzweigungen gebildet. Eine prozessierungsresistente Variante induziert sehr dünne Blutgefäße mit zahlreichen Verzweigungen (Iruela-Arispe and Davis 2009). Dieser Effekt wäre auch nach Prozessierung durch Meprin α denkbar. Des Weiteren wurde eine VEGF-A aktivierende Wirkung, bedingt durch die N-terminale proteolytische Prozessierung, vorgeschlagen. Dieser Effekt konnte jedoch durch *in vitro* Studien zur Zellproliferation und Migration im *Scratch*-Wundheilungs Assay und *in vivo* durch Analysen im HET CAM Assay nicht bestätigt werden (Abb. 17).

Die N-terminale Prozessierung könnte jedoch für die Halbwertszeit und damit für die Regulation der Angiogenese eine Rolle spielen. So wäre denkbar, dass das Glutamat des neuen N-Terminus zyklisiert wird und in ein proteolytisch resistentes Pyroglutamat umgewandelt wird. Jedoch zeigt der HET CAM Assay deutlich die konzentrationsabhängige proangiogene Wirkung von Meprin α , wohingegen Meprin β keinen stimulierenden Einfluss auf die Angiogenese zeigt (Abb. 17). Dies unterstreicht noch einmal die differenzierte physiologische Relevanz der beiden Meprine, welche durch Unterschiede in der Spaltspezifität, der Expression und Lokalisation *in vivo* schon beschrieben ist (Bertenshaw, Turk *et al.* 2001; Kruse, Becker *et al.* 2004; Becker-Pauly, Howel *et al.* 2007; Becker-Pauly, Barre *et al.* 2011).

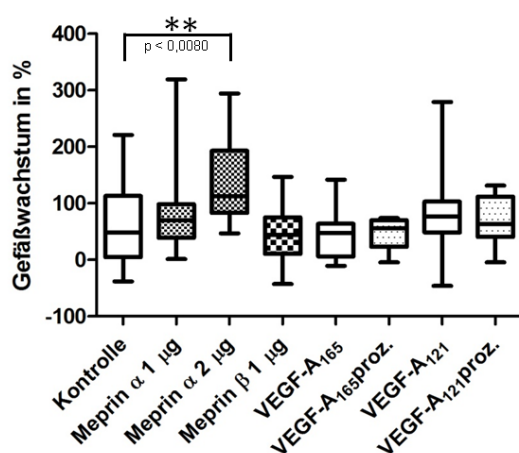


Abb. 17: HET CAM Assay zur Untersuchung der angiogenen Wirkung von Meprin und VEGF-A.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden auf die über dem Eiweiß auswachsenden Gefäße der 3 Tage bebrüteten Hühnereier appliziert. Es wurden Meprin α (1 μ g, 2 μ g), Meprin β (1 μ g), VEGF-A₁₆₅ (100 ng), VEGF-A₁₆₅ (100 ng) prozessiert mit Meprin α (85×10^{-9} M), VEGF-A₁₂₁ (100 ng), VEGF-A₁₂₁ (100 ng) prozessiert mit Meprin α (85×10^{-9} M) und 50×10^{-5} M HEPES als Kontrolle aufgetragen. Die applizierten Stellen wurde direkt und 24 h nach Behandlung fotografiert. Die Effekte auf die Entwicklung der Blutgefäße wurden mittels einer eigens entwickelten Software (Punkt 4.1.4) ausgewertet. Das Gefäßwachstum in % wurde in einem Box Plot aufgetragen. (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript)

Der proangiogene Effekt von Meprin α , welcher nach Morpholino *knockdown* sowie im HET CAM Assay beobachtet werden konnte und von Lottaz et al. (in Revision) im *Rat Aortic* gezeigt werden konnte, lässt sich somit nicht durch eine proteolytische VEGF-A Aktivierung erklären. Eine Analyse der mittels der TAILS Methode identifizierten Meprin-Substrate lieferte CTGF als ein mögliches angiogenes Target der Metalloprotease Meprin α . CTGF reguliert VEGF-A Aktivität durch Protein-Protein-Interaktionen. Infolgedessen zeigt VEGF-A gebunden im CTGF-Komplex keine proangiogene Wirkung mehr und ist somit inhibiert (Inoki, Shiomi *et al.* 2001). Der VEGF-A/CTGF-Komplex kann jedoch durch proteolytische Spaltung zwischen der zweiten und dritten CTGF-Domäne aufgelöst werden und die VEGF-A-Aktivität kann wiedergewonnen werden (Hashimoto, Inoki *et al.* 2002; Dean, Butler *et al.* 2007). Mit der identifizierten Meprin α -Schnittstelle zwischen der zweiten und dritten Domäne ist eine Freisetzung von VEGF-A durch Meprin α aus dem CTGF-Komplex denkbar. Die proteolytische Spaltung von rekombinantem CTGF konnte *in vitro* durch einen Prozessierungs-Assay bestätigt werden (Abb. 18). Und tatsächlich konnte mittels des *in vivo* HET CAM Assay diese Hypothese bestätigt werden, dass nach Prozessierung des VEGF-A/CTGF-Komplexes die VEGF-A Aktivität wieder gewonnen werden konnte (Abb. 18).

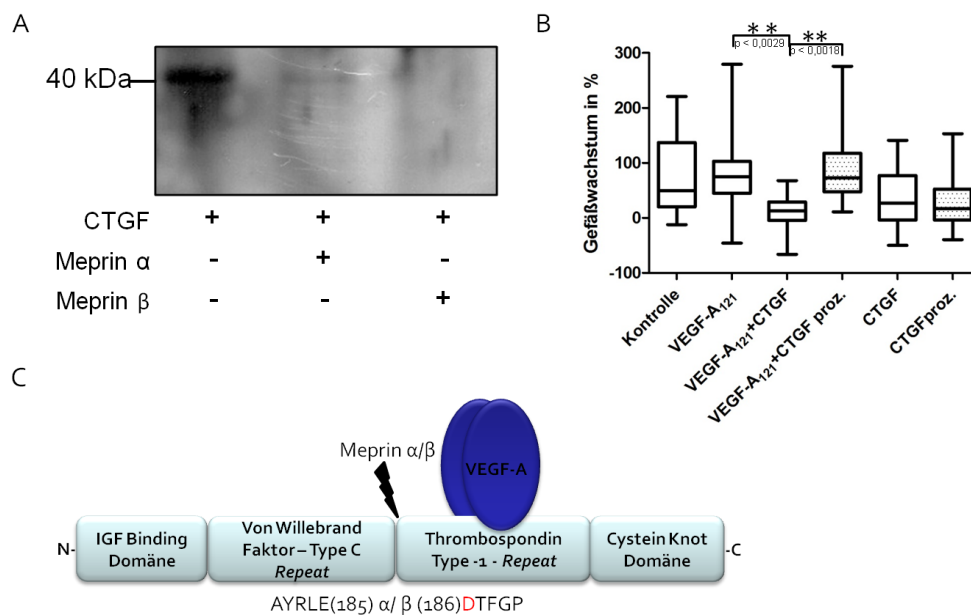


Abb. 18: Meprin α Prozessierung von CTGF reguliert die Angiogenese.

(A) Mittels der TAILS-Methode wurde CTGF als Meprin-Substrat mit einer Schnittstelle zwischen Glu185 und Asp186 identifiziert. (B) CTGF wurde mit Meprin α und β proteolytisch prozessiert und die Prozessierung wurde durch Western Blot Analyse (flag-tag Antikörper) untersucht. (C) Die Effekte der Meprin-Prozessierung des VEGF-A/CTGF-Komplexes wurden im HET CAM Assay untersucht. Die zu untersuchenden Substanzen wurden auf die über dem Eiweiß auswachsenden Gefäße der 3 Tage bebrüteten Hühnereier appliziert. Es wurden VEGF-A₁₂₁ (100 ng), CTGF (200 ng), CTGF (200 ng) prozessiert mit Meprin α (85×10^{-9} M), VEGF-A₁₂₁-CTGF (100 ng : 200 ng) im Komplex und VEGF-A₁₂₁-CTGF (100 ng : 200 ng) im Komplex prozessiert mit Meprin α (85×10^{-9} M) und 50×10^{-5} M HEPES als Kontrolle aufgetragen. Die applizierten Stellen wurden direkt und 24 h nach Behandlung fotografiert. Die Effekte auf die Entwicklung der Blutgefäße wurden mittels einer eigens entwickelten Software (Punkt 4.1.4) ausgewertet. Das Gefäßwachstum in % wurde in einem Box Plot aufgetragen. (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript)

VEGF-A im Komplex mit CTGF liegt physiologisch in der extrazellulären Matrix gebunden vor (Burgess, Ge *et al.* 2006). In Meprin α -*knockout* Mäusen wurde tatsächlich eine signifikant erhöhte Aggregation von VEGF-A in der extrazellulären Matrix um Blutgefäße beobachtet (Abb. 19). Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass VEGF-A auf Grund der fehlenden Meprin α -Aktivität nicht aus dem CTGF/VEGF-A-Komplex gelöst werden kann.

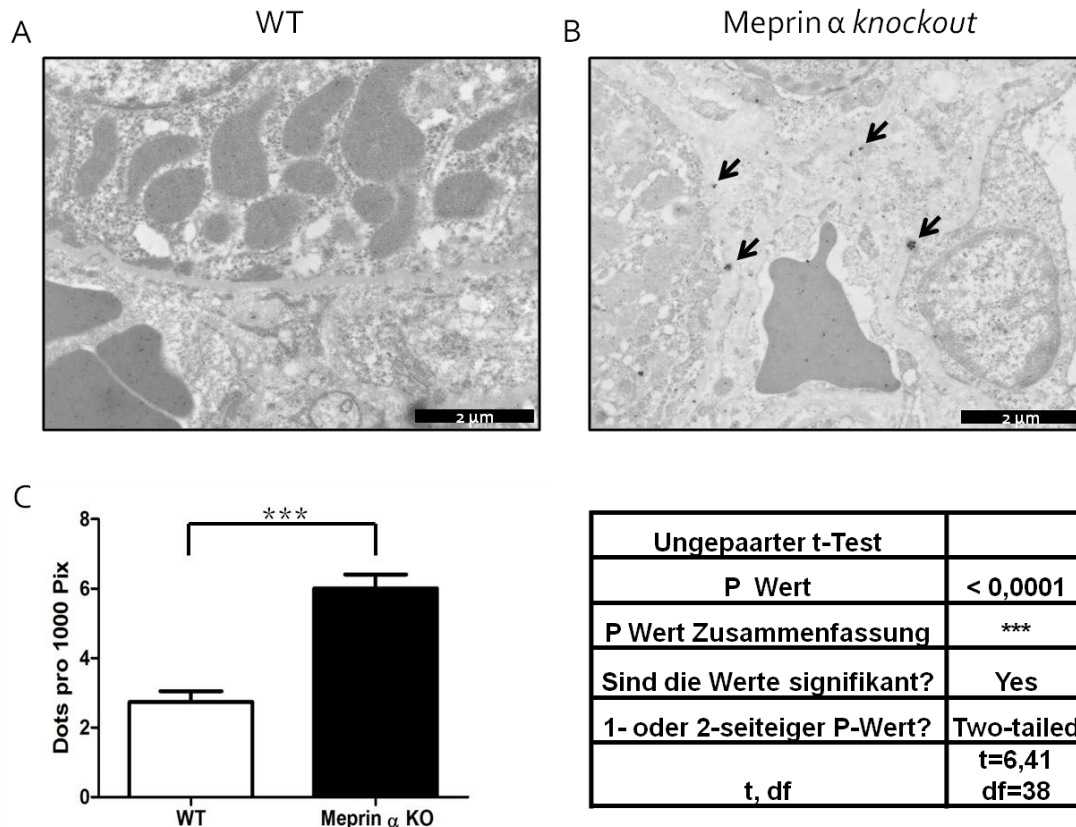


Abb. 19: Lokalisation von VEGF-A in wildtypischen und Meprin α -*knockout* Mäusen mittels Immunogoldnachweis. Immunogoldfärbung von VEGF-A in Geweben von wildtypischen (A) und Meprin α -*knockout* Mäusen (B) mittels VEGF-A- und gold-markiertem sekundären Antikörpern. Die Pfeile markieren VEGF-A Cluster in der Basalmembran von Kapillaren. (C) VEGF-A Signale in der extrazellulären Matrix wurden mit Hilfe des ImageJ Bildanalyseprogramms als Dots pro 1000 Pixel der Region der Basalmembran quantifiziert. Die Statistik wurde mit dem Statistikprogramm GraphPadPrism erstellt. (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript)

Um die physiologische Relevanz der hier beschriebenen proteolytischen Prozesse weiter zu festigen, wurde untersucht, ob Endothelzellen selbst eine Meprin-Expression aufweisen. Meprin-Expression auf mRNA Ebene konnte für Meprin α , wie auch Meprin β beobachtet werden. Auf Proteinlevel konnte eine Expression von Meprin α jedoch nicht von Meprin β nachgewiesen werden. Immunogoldfärbungen von Endothelzellen einer Nabelschnur zeigen deutlich mehr Meprin α Signale. Wobei die beobachteten Meprin α -Aggregate den bisherigen Beobachtungen entsprechen,

dass Meprin α Multimere mit bis zu 6 MDa bilden kann (Becker, Kruse *et al.* 2003; Bergers and Benjamin 2003).

In den Veröffentlichungen (Schütte, Hedrich *et al.* 2010) und (Hedrich, Nitzsche *et al.* Manuskript) konnte gezeigt werden, dass Meprin α eine bedeutende physiologische Rolle während der Angiogenese hat. Des Weiteren konnte für die mittels TAILS identifizierte neuen Meprin-Substrate VEGF-A und CTGF der molekulare Mechanismus in der Regulation der Angiogenese durch Meprin α entschlüsselt werden.

4. Material und Methode

In diesem Abschnitt möchte ich zwei von mir während meiner Doktorarbeit in unserem Labor etablierte Methoden näher beschreiben.

4.1 Untersuchung der Angiogenese im *Hen's Egg Test*, als *in vivo* Modellsystem

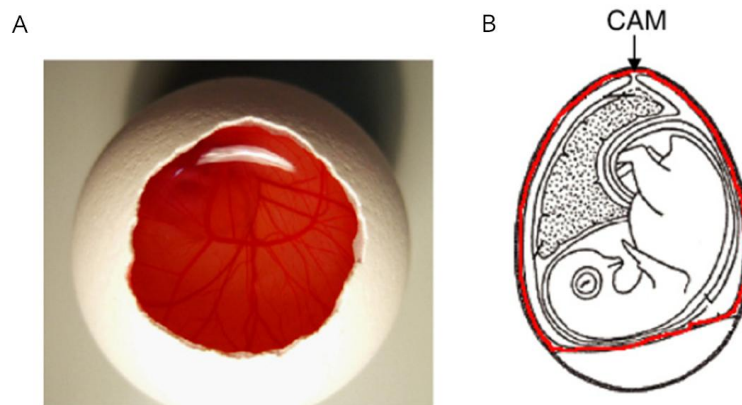


Abb. 20.: Aufsicht auf die Blutgefäße in einem Hühnerei und schematische Darstellung der Lage der CAM. (Vargas, Zeisser-Labouebe *et al.* 2007)

Der Hühnerei-Test an der Chorionallontismembran oder auch HET CAM Assay (*hen's egg test on chorionallontic membrane*) (Abb. 20) ist in historischen Aufzeichnungen von Marcello Malphigi 1671 zum ersten Mal in seinem Buch „*De formatione Pulli*“ (Über die Bildung des Kükens im Ei) dokumentiert. Malphigi nutzte diesen Assay, um die embryonale Entwicklung näher zu erforschen. Außerdem beschäftigte er sich ausführlich mit dem Blutgefäßsystem und beschrieb 1661 zum ersten Mal die Existenz von Blutkapillaren. Und auch heute noch findet der HET CAM seinen Einsatz in der Forschung der Entwicklungsbiologie. Seine größte Bedeutung kommt diesem Versuch allerdings in der Pharmaforschung zu, hier dient er als anerkannter Test zur Untersuchung der Toxizität von Wirkstoffen auf der Schleimhaut und ersetzt somit zahlreiche Tierversuche. Die Flexibilität dieses *in vivo* Tests zeigt sich in seinem weiteren Einsatz zur Erforschung der Angiogenese. So wurde der HET CAM das erste Mal 1975 von Brem und Folkman zur Untersuchung der Entwicklung von Blutgefäßen beschrieben (Brem and Folkman 1975). Seit dieser Zeit wurde dieser Versuch durch weitere Modifikationen für zahlreiche Studien zur Erforschung des komplexen Prozesses der Angiogenese herangezogen (Esch, Baird *et al.* 1985; Wilting, Christ *et al.* 1991; Ribatti, Nico *et al.* 2001).

4.1.1 Die Vorteile des HET CAM

Der Vorteil des HET CAM für die Untersuchung der Angiogenese liegt in seiner leichten und flexiblen Handhabbarkeit. So ist die Kultivierung der Eier in handelsüblichen Inkubatoren verschiedenster Größen möglich und befruchtete Eier können über den Versand bezogen werden. Die über dem Eiweiß neu auswachsenden Blutgefäße zur Versorgung des Embryos mit Nährstoffen, welche sich schließlich zur CAM ausbilden, sind entweder durch ein Öffnen der Eier durch ein kleines Fenster oder der Kultivierung der Eier in Petrischalen möglich (Abb. 20). Dadurch sind die Gefäße für eine Behandlung und anschließende Dokumentation am lebenden Organismus optimal zugänglich. Die große Anzahl an Eiern, die gleichzeitig bearbeitet werden können und eine kurze Versuchsdauer, die Eier können am 3. Tag nach Bebrütung geöffnet und behandelt werden, machen diesen Test als *in vivo* Versuchsmodell sehr attraktiv. Der sicher größte Vorteil dieses Assays liegt darin, dass er höchstens bis zum 10. Tag der Bebrütung durchgeführt wird, um sicherzustellen, dass der Embryo noch keinen Schmerz empfinden kann.

4.1.2 Probleme, die bei der Durchführung des HET CAM auftreten können

Wie alle *in vivo* Versuchsmodelle weist auch dieses Modell seine Schwächen auf. So müssen die Eier unter möglichst sauberen Bedingungen geöffnet, behandelt und fotografiert werden, um eine Kontamination und ein Absterben der Eier zu vermeiden. Jedoch muss trotzdem mit einem Verlust von ca. 20 % der Eier während des Versuchsverlaufes gerechnet werden. Da es sich hier um ein *in vivo* Assay handelt, der am sich entwickelnden Organismus durchgeführt wird, muss besonders auf die Erhaltung der gleichen Wachstumsbedingungen während des Versuches geachtet werden. So können Schwankungen in der Bebrütungstemperatur und nicht exakt eingehaltene Versuchszeiten zu Abweichungen der ermittelten Ergebnisse führen. Aus diesen Gründen sollte immer eine große Anzahl an Versuchsansätzen durchgeführt werden, um eine statistische Signifikanz der Testergebnisse zu ermöglichen.

4.1.3 Die Entwicklung des Hühnereies bis zum vierten Bebrütungstag

Die Entwicklung eines Hühnerembryos ist mit 21 Tagen (mit 46 definierten Stadien) abgeschlossen, da der hier durchgeführte HET CAM jedoch am vierten Tag abgebrochen wird, werden hier nur die Entwicklungsschritte bis zum vierten Tag beschrieben. Die Hühnereier wurden schon im Eileiter der Henne befruchtet und nach dem Legen bis zur Inkubation bei Raumtemperatur (RT) gelagert und transportiert. Schon im Eileiter der Henne beginnt die Entwicklung der Keimscheibe mit einem Durchmesser von ca. 4 mm. Diese Keimscheibe ist deutlich zu erkennen und bildet sich am dotterarmen Teil des Eigelbes. Um für die späteren Versuche zu wissen, wo sich der Embryo und die auswachsenden Blutgefäße befinden, wurde auf ein Wenden der Eier verzichtet. Bei einer

gleichseitigen Bebrütungstemperatur hatte dies keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Eier. Am zweiten Tag nach Bebrütung hat der Embryo das Stadium 14 erreicht und 22 Somiten ausgebildet (Wolpert, Beddington *et al.* 1999). Ab diesem Zeitpunkt beginnen die Gefäße im extraembryonalen Gewebe vom Embryo aus aus zu wachsen. Nach dem dritten Tag hat der Embryo das 22. Stadium erreicht, 44 Somiten und der Kopf sind ausgebildet und die Gliedmaßen beginnen sich zu entwickeln (Hamburger and Hamilton 1951).

4.1.4 Präparation der Eier für den HET CAM

Die befruchteten Eier (White Leghorn) wurden über die Firma LSL (Dieburg, Deutschland) bezogen. Die mit 70 %igem Ethanol gereinigten Eier wurden am Tag 0 bei 37°C bei gesättigter Luftfeuchtigkeit für drei Tage in einem BRUJA Inkubator (Model 3000) inkubiert. Die Eier wurden, um Kontaminationen zu vermeiden, unter einer Sterilbank präpariert. Am dritten Tag wurden den Eiern mittels einer Spritze 4 -5 ml Eiweiß entnommen, dies sorgt für ein Absinken des Eiweißes und Lösen der Schalenhaut von der Eischale, welches ein nachfolgendes Aufschneiden des Eies ermöglicht (Abb. 21). Die zu untersuchenden Substanzen wurden auf 5 x 5 mm große *Tissue Coverslip*- Stücke (Nunc, Langenselbold, Deutschland) mit einem Volumen von 5 µl pipettiert. Die *Tissue Coverslips* wurden so auf den auswachsenden Blutgefäßen platziert, dass sie zur Hälfte die Gefäße bedeckten, die Blutgefäße aber noch in Richtung der applizierten Substanzen auswachsen konnten.

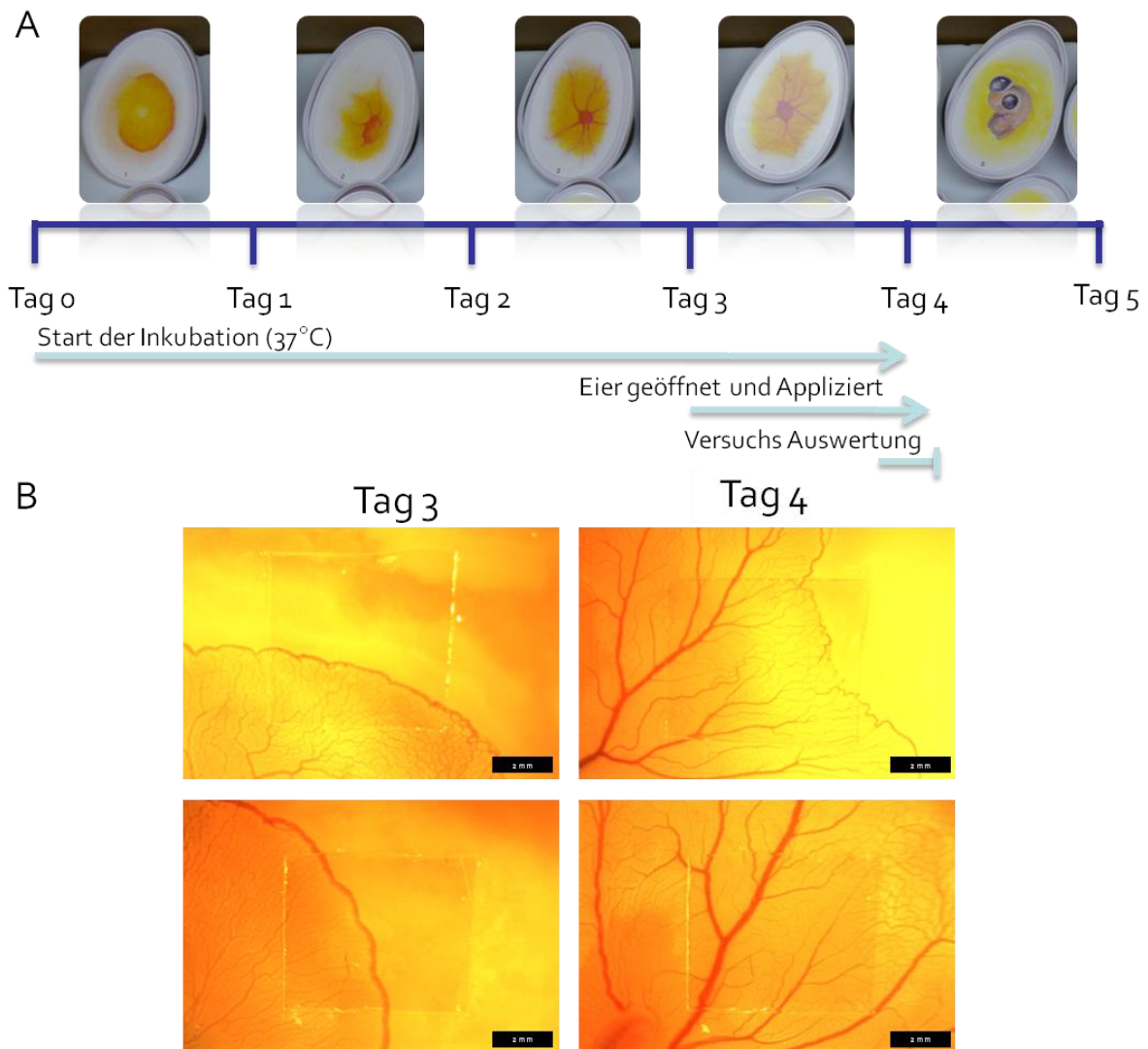


Abb. 21: Darstellung des Versuchsverlaufes und beispielhafte Fotos der applizierten Eier.

(A) Die Eier wurden am dritten Tag der Bebrütung geöffnet und die zu untersuchenden Substanzen appliziert. Die Eier wurden direkt nach Applikation der Testsubstanzen und 24 h später (vierter Tag der Bebrütung) fotografiert (B). (B) Die zu untersuchenden Substanzen wurden mittels *TissueCoverslips* aufgetragen, welche in den beispielhaft dargestellten Bildern mittig zu sehen sind.

4.1.5 Quantifizierung der Angiogenese im HET CAM

Die behandelten Bereiche wurden direkt und 24 h nach Applikation mit einer DCM300 Kamera (Auflösung 3 Megapixel) und einem Stereomikroskop (Wild M5A) unter Benutzung der ScopePhoto Software (ScopeTek, China) aufgenommen. Für die Quantifizierung der ausgewachsenen Blutgefäße wurden die digitalen Bilder zunächst in schwarz-weiße Bilder mittels der Mogrify-Software (<http://www.ImageMagick.org>) umgewandelt. Alle weiteren Umwandlungen der Bilder wurden mittels eines eigens entwickelten Skriptes (von Philipp Arnold und Mario DeJung, AG Markl, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) unter Benutzung des IMAGIC5-Programmes (vanHeel, Harauz *et al.* 1996) durchgeführt. Die Bilder wurden zur Quantifizierung des behandelten Bereiches

in 50x50 Pixel Kacheln fragmentiert, normalisiert und binarisiert (Abb. 22). Die Kacheln der behandelten Stellen wurden manuell ausgewählt und die Pixel der ausgewählten Kacheln wurden quantifiziert. Die so bestimmten Werte wurden mittels der GraphPadprim Software 5.04 (GraphPadSoftware, La Jolla, USA) ausgewertet.

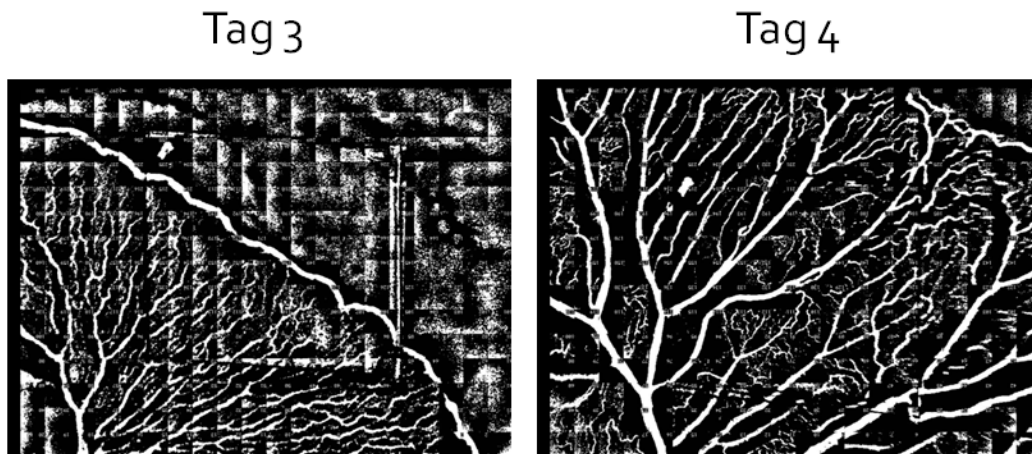


Abb. 22: Zur Quantifizierung umgewandelter Fotos des HET CAM.

Die beispielhaft ausgewählten Bilder zeigen Fotos des HET CAM direkt und 24 h nach Applikation. Für die computergestützte Analyse wurden die Bilder binarisiert und gekachelt.

4.2 Generierung von primären murinen Fibroblasten aus Meprin α - und β -*knockout* Mäusen

Knockout Mäuse finden in der Forschung ihren Einsatz, um die Funktion des Zielgens durch seinen funktionellen Verlust zu analysieren. Der gezeigte Phänotyp soll durch Fehlentwicklungen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen die Funktion des Zielproteins offenlegen. Jedoch kann es gerade im Fall von Proteasen im Modellorganismus der Maus zu Kompensationseffekten kommen, denn um das Überleben der *knockout* Tiere zu sichern, müssen essentielle biologische Funktionen von anderen Proteasen übernommen werden. Die Maus weist 80 Proteasen mehr als der Mensch auf (Quesada and López-Otín 2011). Somit werden nicht alle Funktionen einer Protease in einer *knockout* Maus sichtbar. Es bieten sich jedoch zahlreiche *in vivo* Modelle in Zellkultur an, um die Funktion einer Protease zu entschlüsseln und um Tierversuche zu vermeiden. Für diese Zellkulturmodelle kann es jedoch von großem Nutzen sein auf *knockout* Zellen zugreifen zu können. So können erste biologische und morphologische Unterschiede der *knockout* Zellen im Vergleich zu den wildtypischen Zellen *in vitro* untersucht werden und Rückschlüsse auf die Funktion der Zielprotease zulassen. Die Zellen können zum Beispiel auch in Ko-Kultur-Assays eingesetzt werden, um Interaktionen, reguliert durch die Zielprotease, zu untersuchen. Oder die Zellen können für Proteom-Analysen wie zum Beispiel der TAILS-Methode herangezogen werden. Aus diesem Grund

war ein Ziel dieser Arbeit, stabile Zelllinien aus primären murinen Fibroblastenkulturen zu entwickeln. Die Meprin α und β *knockout* Mäuse wurden uns in Kooperation mit Prof. Dr. Judith Bond zur Verfügung gestellt (Norman, Jiang *et al.* 2003; Sanjita 2008).

Die primären Zellkulturen wurden aus Ohrgewebe von wildtypischen, Meprin α - und β - *knockout* Mäusen gewonnen. Dazu wurden nach dem Töten der Mäuse durch Genickbruch die Ohren für 2 Min. in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in PBS überführt. Im PBS wurden die Haare mit einem Skalpell entfernt und das Gewebe in möglichst kleine Stücke geschnitten. Diese Gewebstücke wurden für 48 h in 0,05 % Trypsin bei 4°C inkubiert, um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Zur Kultivierung der Zellen wurden 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunclon, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit 5 ml FCS für 15 Min. beschichtet und angetrocknet, bevor die trypsinierten Gewebstücke zum Anwachsen bei 37°C in CO₂ Brutschränken mit gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Nach 48 h wurde DMEM-Medium (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), versetzt mit 1 % P/S und 10 % FCS, zugegeben. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit 0,025 %igem Trypsin behandelt, bis die ersten Zellen angewachsen waren, anschließend wurde frisches Medium zugesetzt. Nach der Anzucht der Zellen wurde für die Meprin β -*knockout*- und WT-Zellen DMEM-Medium, versetzt mit 10 % FCS und 50 µg/ml Gentamicin, verwendet, während für Meprin α -*knockout*-Zellen ein DMEM-Medium, versetzt mit 1 % P/S und 20 % FCS, verwendet wurde. Nach Auswachsen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,025 %igem Trypsin gelöst und bis Passage 12 1:2 und anschließend 1:3 gesplittet. Die Gewebstücke wurden erneut mit 0,025%igem Trypsin für 15 Min. bei 37°C inkubiert, um das Auswaschen weiterer Zellen zu induzieren. Im Fall der Meprin α -*knockout*-Zellen wurden die Platten vor dem Aussähen der Zellen, wie oben beschrieben, mit FCS beschichtet, um ein besseres Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Zellen unterschiedlicher Passagen wurden in einem Einfriermedium (50 % FCS, 10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff für eine spätere Verwendung weggefroren. Die Zellen wurden bis Passage 20 passagiert, um eine stabile Zelllinie zu generieren. Nach persönlicher Auskunft von Herrn Lenk (Dipl. Biologe, Leiter der Zellbank am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Riems, Deutschland), ist es möglich aus einer primären murinen Zelllinie mittels konstantem Passagieren der Zellen bis zu Passage 20 durch spontanes Immortalisieren der Zellen eine stabile Zelllinie zu generieren.

5. Ergebnisse der Generierung von primären murinen Fibroblasten

In diesem Abschnitt möchte ich die Ergebnisse zur Generierung der primären und stabilen murinen Fibroblasten-Zellkulturen kurz zusammenfassen und diskutieren.

Aus den präparierten Gewebstücken konnten dreimal primäre Zelllinien generiert werden (Abb. 23). Diese primären Zelllinien zeigten die typische Morphologie muriner Fibroblasten. Die Zellen weisen einen für *in vitro* kultivierte Fibroblasten-typische längliche Zellform bei niedriger Konfluenz und abgerundeten Zellen im engen Zellverband auf. Das Passagieren der Meprin α *knockout* Zellen über eine primäre Zellkultur hinaus war nur durch den Wechsel auf ein mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren angereichertes Medium (20 % FCS) möglich. Zusätzlich wurden die frischen Zellkulturplatten für Meprin α -*knockout* Zellen vor dem Aussähen mit FCS beschichtet, um eine bessere Adhäsion der Meprin α *knockout* Zellen zu erzielen.

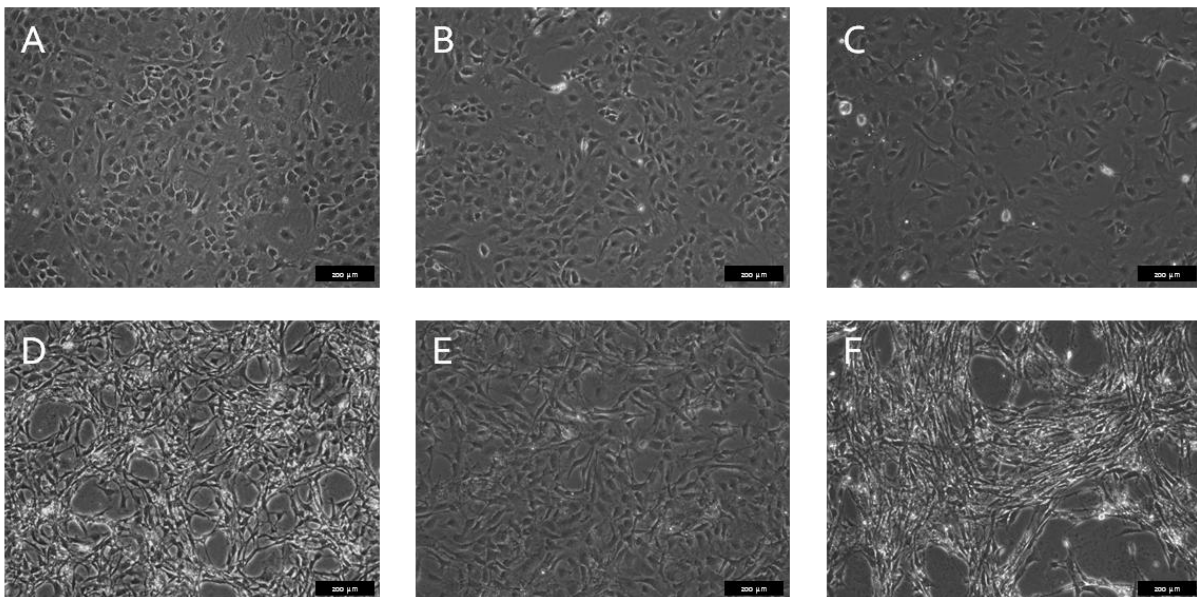


Abb. 23: Primäre und stabile Zellkulturen.

Beispielhaft ausgewählte Bilder primärer Zellkulturen (A) wildtypische Zellen, (B) Meprin α *knockout* Zellen und (C) Meprin β *knockout* Zellen. Stabile Zellkulturen der wildtypischen (D), Meprin α (E) und Meprin β *knockout* (F) Zelllinien.

Die primären murinen Fibroblastenzelllinien zeigten wie erwartet ab Passage 10-15 eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate, welche sich mit dem Erreichen der 20. Passage stabilisiert hatte und ein Kennzeichen einer stabilen murinen Zelllinie darstellt. Die Morphologie der stabilen Zelllinien (Abb. 23) hat sich durch Passagieren bis zu einer stabilen Zelllinie (Passage 20) nicht verändert. Des Weiteren wurden Zellen niedriger Passagen weggefroren und anschließend weiter kultiviert, wobei die Zellen keine Veränderungen zeigten.

6. Ausblick

Im Laufe dieser Studie ist es gelungen, endogene Meprin-Inhibitoren und die Schnittstellen der Meprine in diesen zu identifizieren. Bisher waren für die humanen Meprine noch keine endogenen Inhibitoren beschrieben und die Regulation dieser beiden Meprine nach ihrer Aktivierung war unbekannt.

Erweiternd zu diesen Erkenntnissen sollte die Regulation der Meprine in verschiedenen Geweben untersucht werden. Hier wäre es möglich mittels der TAILS-Methode aus gewebsspezifischen Ko-Kulturen weitere Inhibitoren zu identifizieren. Dieser Ansatz wäre auch für pathologische Bedingungen durchführbar, denn hier können situationsabhängig weitere Meprin-Inhibitoren von Bedeutung sein. An dieser Stelle wäre es denkbar, einen möglichen Einsatz der endogenen Inhibitoren in durch Meprin-Aktivität beeinflussten pathologischen Situationen wie Fibrose, Tumorwachstum und Angiogenese, sowie Entzündungsprozessen zu untersuchen.

Mit dem Wissen um die Schnittstellen innerhalb der endogenen Inhibitoren und der kürzlich gewonnenen Erkenntnisse zur Spaltspezifität könnten sehr spezifische „*small compound*“ Meprin-Inhibitoren designiert werden (Becker-Pauly, Barre et al. 2011). Diese Inhibitoren hätten den großen Vorteil, dass sie im Gegensatz zu den endogenen Inhibitoren mit keinen anderen Proteasen interagieren. Solche Inhibitoren bieten außerdem die Grundlage für *Activity-based-Probes*, welche es ermöglichen spezifisch Meprin-Aktivität in Zellen oder Geweben zu identifizieren, zu lokalisieren und zu quantifizieren. In der Identifizierung und Weiterentwicklung der Meprin-Inhibitoren liegt somit ein großes Potential, sich diese in pathologischen Situationen nützlich zu machen, wie auch die Funktion der Meprine *in vitro* und *vivo* aufzuschlüsseln. Hier sollte ergänzend zu der Spezifität der Inhibitoren und *Activity-based-Probes* innerhalb der Metalloproteasen diese auch für Mitglieder anderer Familien validiert werden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch Proteasen aus unterschiedlichen Familien durch gleiche Inhibitoren gehemmt werden können.

Die Identifizierung der Meprin α -Interaktionspartner CTGF und VEGF-A und der aufgezeigte Regulationsmechanismus zeigen die Bedeutung der Metalloprotease Meprin α für die Angiogenese. Interessanterweise wird Meprin α -Aktivität mit Prozessen der Fibrose in Verbindung gebracht und sowohl der Prozess der Angiogenese, wie die Regulation innerhalb des fibrotischen Gewebes durch einen *Angio-Fibrotic Switch* sind in der Literatur beschrieben (Kuiper, Van Nieuwenhoven et al. 2008; Kronenberg, Bruns et al. 2010; Farkas, Gauldie et al. 2011). An dieser Stelle könnten die Bedeutung der proteolytischen Spaltung von CTGF und VEGF-A und der Regulation der Angiogenese und die Effekte einer Meprin-Inhibition weiter untersucht werden.

Da der Prozess der Angiogenese nicht nur unter physiologischen Umständen, sondern auch in pathologischen Situationen wie Fibrose, Tumorwachstum und chronischen und akuten Entzündungen eine entscheidende Rolle spielt, wobei die Regulation durch unterschiedliche Interaktionspartner bedingt ist, könnten weitere TAILS-Analysen mit Zellen oder Geweben mit pathologischem Hintergrund zu der Entschlüsselung weiterer pro-angiogener Meprin-Substrate und Regulationsmechanismen führen. Eine TAILS-Analyse mit differenzierten Endothelzellen würde zusätzlich die Möglichkeit der Identifikation von gewebsspezifischen Proteininhibitoren der Meprine bieten.

Die Anfangs vorgeschlagene Aktivierung von VEGF-A durch eine proteolytische Prozessierung wurde im Laufe dieser Arbeit aufgehoben. Die Bedeutung dieser Prozessierung sollte in Hinblick auf ihre Auswirkungen für die Gefäßmorphologie zellbiologisch *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnte eine Analyse der Gefäßmorphologie (in Bezug auf Gefäßdichte in den Geweben, Gefäßlänge und Anzahl der Gefäßverzweigungen) des Blutgefäßnetzwerkes in Meprin α - *knockout* Mäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien Aufschluss geben.

Zur weiteren Erforschung der Meprine in der Angiogenese könnte auch der Modellorganismus des Zebrafisches in Betracht gezogen werden. Denn der Zebrafisch bietet mit seinem quasi durchsichtigen Körper ein optimales Modell, um die Entwicklung der Blutgefäße *in vivo* darzustellen.

Im Laufe meiner Arbeit ist es außerdem gelungen, Fibroblasten aus Meprin α und β *knockout* Mäusen zu generieren und stabile Zelllinien zu züchten. Diese *knockout* Zellen können für vergleichende TAILS-Studien, genauso wie in Ko-Kultur zur Untersuchung fibrotischer Bedingungen oder in Ko-Kultur mit Endothelzellen im Hinblick auf die Auswirkung der Blutgefäßentwicklung ihren Beitrag leisten.

7. Literaturverzeichnis

- Abounader, R. and J. Laterra (2005). "Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis." Neuro Oncol **7**(4): 436-451.
- Abrahamson, M., R. W. Mason, et al. (1991). "Human cystatin C. role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase." Biochemical Journal **273** (Pt 3): 621-626.
- Abrahamson, M., I. Olafsson, et al. (1990). "Structure and expression of the human cystatin C gene." Biochemical Journal **268**(2): 287-294.
- Achen, M. G., M. Jeltsch, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 548-553.
- Arroyo, A. G. and M. L. Iruela-Arispe (2010). "Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response." Cardiovasc Res **86**(2): 226-235.
- Ashida, H., K. Yamamoto, et al. (2000). "Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase." Biosci Biotechnol Biochem **64**(10): 2266-2268.
- Auberger, P., L. Falquerho, et al. (1989). "Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity." Cell **58**(4): 631-640.
- Ball, D. K., G. A. Surveyor, et al. (1998). "Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings." Biol Reprod **59**(4): 828-835.
- Banerjee, S., B. Oneda, et al. (2009). "MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease." Mucosal Immunology **2**(3): 220-231.
- Bankus, J. M. and J. S. Bond (1996). "Expression and distribution of meprin protease subunits in mouse intestine." Archives of Biochemistry and Biophysics **331**(1): 87-94.
- Becker-Pauly, C., O. Barre, et al. (2011). "Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates." Mol Cell Proteomics **10**(9): M111 009233.

- Becker-Pauly, C., B. C. Bruns, et al. (2009). "News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab." J Mol Biol **385**(1): 236-248.
- Becker-Pauly, C., M. Howel, et al. (2007). "The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation." J Invest Dermatol **127**(5): 1115-1125.
- Becker, C., M. N. Kruse, et al. (2003). "Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin." Biological Chemistry **384**(5): 825-831.
- Bellemare, A., N. Vernoux, et al. (2008). "Human pre-elafin inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media." Antimicrob Agents Chemother **52**(2): 483-490.
- Bellon, G., L. Martiny, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 203-220.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature Reviews Cancer **3**(6): 401-410.
- Bergers, G., R. Brekken, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." Nat Cell Biol **2**(10): 737-744.
- Bergin, D. A., C. M. Greene, et al. (2008). "Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloprotease pathway." J Biol Chem **283**(46): 31736-31744.
- Bertenshaw, G. P., M. T. Norcum, et al. (2003). "Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers." J Biol Chem **278**(4): 2522-2532.
- Bertenshaw, G. P., B. E. Turk, et al. (2001). "Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity." J Biol Chem **276**(16): 13248-13255.
- Beynon, R. J., J. D. Shannon, et al. (1981). "Purification and Characterization of a Metallo-Endoproteinase from Mouse Kidney." Biochemical Journal **199**(3): 591-598.
- Bode, W., F. X. Gomis-Rüth, et al. (1993). "Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'." Febs Letters **331**(1-2): 134-140.

- Bond, J. S., S. Banerjee, et al. (2011). "Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **300**(2): G273-G282.
- Bond, J. S. and R. J. Beynon (1986). "Meprin: a membrane-bound metallo-endopeptidase." Curr Top Cell Regul **28**: 263-290.
- Bond, J. S., G. L. Matters, et al. (2005). "Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer." Febs Letters **579**(15): 3317-3322.
- Bradham, D. M., A. Igarashi, et al. (1991). "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10." Journal of Cell Biology **114**(6): 1285-1294.
- Brem, H. and J. Folkman (1975). "Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage." J Exp Med **141**(2): 427-439.
- Brigstock, D. R. (2002). "Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)." Angiogenesis **5**(3): 153-165.
- Brigstock, D. R., C. L. Steffen, et al. (1997). "Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor." J Biol Chem **272**(32): 20275-20282.
- Brown, W. M. and K. M. Dziegielewska (1997). "Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution." Protein Science **6**(1): 5-12.
- Brown, W. M., K. M. Dziegielewska, et al. (1992). "The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family." European Journal of Biochemistry **205**(1): 321-331.
- Brown, W. M., N. R. Saunders, et al. (1992). "Fetuin--an old friend revisited." Bioessays **14**(11): 749-755.
- Burgess, J. K., Q. Ge, et al. (2006). "Connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor from airway smooth muscle interact with the extracellular matrix." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(1): L153-161.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.

- Chen, C. C., N. Chen, et al. (2001). "The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts." J Biol Chem **276**(13): 10443-10452.
- Cimerman, N., M. D. Kosorok, et al. (1996). "Characterization of cystatin C from bovine parotid glands: cysteine proteinase inhibition and antiviral properties." Biol Chem Hoppe Seyler **377**(1): 19-23.
- Cole, T., P. W. Dickson, et al. (1989). "The cDNA structure and expression analysis of the genes for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C and for beta 2-microglobulin in rat brain." European Journal of Biochemistry **186**(1-2): 35-42.
- Collins, F. S., E. S. Lander, et al. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-945.
- Coultas, L., K. Chawengsaksophak, et al. (2005). "Endothelial cells and VEGF in vascular development." Nature **438**(7070): 937-945.
- Crisman, J. M., B. Zhang, et al. (2004). "Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix." J Immunol **172**(7): 4510-4519.
- Crisman, J. M., B. Z. Zhang, et al. (2004). "Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix." Journal of Immunology **172**(7): 4510-4519.
- Dean, R. A., G. S. Butler, et al. (2007). "Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis." Mol Cell Biol **27**(24): 8454-8465.
- Eldering, J. A., J. Grunberg, et al. (1997). "Polarised expression of human intestinal N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin) alpha and beta subunits in Madin-Darby canine kidney cells." European Journal of Biochemistry **247**(3): 920-932.
- Ericksonlawrence, M., S. D. Zabudoff, et al. (1991). "Cyclic Protein-2, a Secretory Product of Rat Sertoli Cells, Is the Proenzyme Form of Cathepsin-L." Molecular Endocrinology **5**(12): 1789-1798.
- Esch, F., A. Baird, et al. (1985). "Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6507-6511.

- Farkas, L., J. Gaudie, et al. (2011). "Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(1): 1-15.
- Fitz, L. J., J. C. Morris, et al. (1997). "Characterization of murine Flt4 ligand/VEGF-C." Oncogene **15**(5): 613-618.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-1186.
- Gao, R. and D. R. Brigstock (2003). "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells." Hepatol Res **27**(3): 214-220.
- Gauthier, S., G. Kaur, et al. (2011). "Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 541-554.
- Gogineni, A., R. Longabaugh, et al. (2004). "Alcohol-related expectancies and assaults among injured drinkers in the emergency department setting." Subst Abus **25**(2): 5-13.
- Goppelt-Struebe, M. and I. Cicha (2009). "Connective tissue growth factor: Context-dependent functions and mechanisms of regulation." Biofactors **35**(2): 200-208.
- Goustin, A. S. and A. B. Abou-Samra (2011). "The "thrifty" gene encoding Ahsg/Fetuin-A meets the insulin receptor: Insights into the mechanism of insulin resistance." Cell Signal **23**(6): 980-990.
- Hahn, D., A. Pischitzis, et al. (2003). "Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin beta metalloprotease." J Biol Chem **278**(44): 42829-42839.
- Hall, A., K. Hakansson, et al. (1995). "Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases." J Biol Chem **270**(10): 5115-5121.
- Hall, J. L., E. E. Sterchi, et al. (1993). "Biosynthesis and degradation of meprins, kidney brush border proteinases." Archives of Biochemistry and Biophysics **307**(1): 73-77.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951). "A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo." Journal of Morphology **88**(1): 49-&.

- Harper, S. J. and D. O. Bates (2008). "VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?" Nature Reviews Cancer **8**(11): 880-887.
- Hashimoto, G., I. Inoki, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165." J Biol Chem **277**(39): 36288-36295.
- Hawkins, R. (2011). "New biomarkers of acute kidney injury and the cardio-renal syndrome." Korean J Lab Med **31**(2): 72-80.
- Hedrich, J., D. Lottaz, et al. (2010). "Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases." Biochemistry **49**(39): 8599-8607.
- Hedrich, J., E. Nitzsche, et al. (Manuskript). "The Metalloprotease Meprin α cleaves the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) thereby releasing the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and enhancing angiogenesis." Manuskript.
- Herzog, C., R. S. Haun, et al. (2009). "Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 904-908.
- Hillen, F., V. Melotte, et al. (2006). Endothelial cell biology. Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques C. A. Staton, C. Lewis and R. Bicknell. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 1-83.
- Hirano, M., B. Y. Ma, et al. (2005). "Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta." J Immunol **175**(5): 3177-3185.
- Hoeben, A., B. Landuyt, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacological Reviews **56**(4): 549-580.
- Houck, K. A., D. W. Leung, et al. (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." J Biol Chem **267**(36): 26031-26037.
- Inoki, I., T. Shiomi, et al. (2001). "Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis." Faseb Journal **15**(14): 219-+.
- Iruela-Arispe, M. L. and G. E. Davis (2009). "Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Lumen Formation." Developmental Cell **16**(2): 222-231.
- Ivkovic, S., B. S. Yoon, et al. (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." Development **130**(12): 2779-2791.

- J.F., H. (1960). "Les Globulines Sériques du Système Gamma." Brussels: Arscia.
- Jahnen-Dechent, W., A. Heiss, et al. (2011). "Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism." Circ Res **108**(12): 1494-1509.
- Janowski, R., M. Kozak, et al. (2001). "Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping." Nature Structural Biology **8**(4): 316-320.
- Jasir, A., F. Kasprzykowski, et al. (2003). "New antimicrobial cystatin C-based peptide active against gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci." APMIS **111**(11): 1004-1010.
- Jefferson, T., U. auf dem Keller, et al. (Manuskript). "From Proteomics to Biology: The Degradome of the Metalloproteases Meprin α and β at a glance: TAILS degradomics analysis reveals substrates, inhibitors, and a proteolytic cascade between meprin β and ADAM10." Manuskript.
- Jefferson, T., M. Causevic, et al. (2011). "Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo." J Biol Chem **286**(31): 27741-27750.
- Johnson, G. D. and J. S. Bond (1997). "Activation mechanism of meprins, members of the astacin metalloendopeptidase family." J Biol Chem **272**(44): 28126-28132.
- Johnson, G. D. and L. B. Hersh (1994). "Expression of meprin subunit precursors. Membrane anchoring through the beta subunit and mechanism of zymogen activation." J Biol Chem **269**(10): 7682-7688.
- Johnson, R. S., E. Schipani, et al. (2001). "Hypoxia in cartilage: HIF-1 alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival." Genes & Development **15**(21): 2865-2876.
- Kaushal, G. P., P. D. Walker, et al. (1994). "An old enzyme with a new function: purification and characterization of a distinct matrix-degrading metalloproteinase in rat kidney cortex and its identification as meprin." Journal of Cell Biology **126**(5): 1319-1327.
- King, G. L., K. Suzuma, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-dependent pathways in retinal vascular cells." Journal of Biological Chemistry **275**(52): 40725-40731.
- Kireeva, M. L., B. V. Latinkic, et al. (1997). "Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development." Experimental Cell Research **233**(1): 63-77.

- Koenig, S. C., C. Woolard, et al. (2004). "Integrated data acquisition system for medical device testing and physiology research in compliance with good laboratory practices." Biomed Instrum Technol **38**(3): 229-240.
- Kronenberg, D., B. C. Bruns, et al. (2010). "Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly?" J Invest Dermatol **130**(12): 2727-2735.
- Kruse, M. N., C. Becker, et al. (2004). "Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors." Biochemical Journal **378**(Pt 2): 383-389.
- Kuiper, E. J., F. A. Van Nieuwenhoven, et al. (2008). "The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy." Plos One **3**(7): e2675.
- Kumar, J. M. and J. S. Bond (2001). "Developmental expression of meprin metalloprotease subunits in ICR and C₃H/He mouse kidney and intestine in the embryo, postnatally and after weaning." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 106-114.
- Lambert, C. A., P. Mineur, et al. (2007). "Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF₁₁₁ is induced by genotoxic agents." Journal of Cell Biology **179**(6): 1261-1273.
- Lee, C. C., B. H. Bowman, et al. (1987). "Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(13): 4403-4407.
- Lee, S., S. M. Jilani, et al. (2005). "Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors." Journal of Cell Biology **169**(4): 681-691.
- Legrain, P., R. Aebersold, et al. (2011). "The human proteome project: Current state and future direction." Mol Cell Proteomics.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-1309.
- Lopez-Otin, C. and J. S. Bond (2008). "Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease." Journal of Biological Chemistry **283**(45): 30433-30437.
- Lottaz, D., C. Buri, et al. (2007). "Compartmentalised expression of meprin in small intestinal mucosa: enhanced expression in lamina propria in coeliac disease." Biological Chemistry **388**(3): 337-341.

- Lottaz, D., C. A. Maurer, et al. (1999). "Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma." Cancer Res **59**(5): 1127-1133.
- Marchand, P., J. Tang, et al. (1994). "Membrane Association and Oligomeric Organization of the Alpha-Subunit and Beta-Subunit of Mouse Meprin-A." Journal of Biological Chemistry **269**(21): 15388-15393.
- Marchand, P., M. Volkmann, et al. (1996). "Cysteine mutations in the MAM domain result in monomeric meprin and alter stability and activity of the proteinase." J Biol Chem **271**(39): 24236-24241.
- Matsuda, A., Y. Itoh, et al. (2003). "Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils." J Biol Chem **278**(38): 36350-36357.
- Matters, G. L., A. Manni, et al. (2005). "Inhibitors of polyamine biosynthesis decrease the expression of the metalloproteases meprin alpha and MMP-7 in hormone-independent human breast cancer cells." Clin Exp Metastasis **22**(4): 331-339.
- Mruk, D., L. J. Zhu, et al. (1997). "Interactions of proteases and protease inhibitors in Sertoli-germ cell cocultures preceding the formation of specialized Sertoli-germ cell junctions in vitro." J Androl **18**(6): 612-622.
- Nasevicius, A., J. Larson, et al. (2000). "Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant." Yeast **17**(4): 294-301.
- Nawratil, P., S. Lenzen, et al. (1996). "Limited proteolysis of human alpha2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide." J Biol Chem **271**(49): 31735-31741.
- Norman, L. P., W. Jiang, et al. (2003). "Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles." Mol Cell Biol **23**(4): 1221-1230.
- Ogawa, S., A. Oku, et al. (1998). "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain." J Biol Chem **273**(47): 31273-31282.
- Ohler, A., M. Debela, et al. (2010). "Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation." Biol Chem **391**(4): 455-460.

- Olofsson, B., E. Korpelainen, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11709-11714.
- Oneda, B., N. Lods, et al. (2008). "Metalloprotease meprin beta in rat kidney: glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis." Plos One **3**(5): e2278.
- Ordonez, G. R., X. S. Puente, et al. (2009). "Proteolytic systems: constructing degradomes." Methods Mol Biol **539**: 33-47.
- Ortega, N., H. Hutchings, et al. (1999). "Signal relays in the VEGF system." Front Biosci **4**: D141-152.
- Perrin, R. M., O. Konopatskaya, et al. (2005). "Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor." Diabetologia **48**(11): 2422-2427.
- Quesada, V. and C. López-Otín. (2011). "Human, Mouse and Rat Degradomes in Numbers." from <http://degradome.uniovi.es/numbers.html>.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett, et al. (2011). "Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes." J Biol Chem.
- Ribatti, D., B. Nico, et al. (2001). "Angiogenic activity of leptin in the chick embryo chorioallantoic membrane is in part mediated by endogenous fibroblast growth factor-2." Int J Mol Med **8**(3): 265-268.
- Rosmann, S., D. Hahn, et al. (2002). "Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system." J Biol Chem **277**(43): 40650-40658.
- Sallenave, J. M. and A. Silva (1993). "Characterization and Gene Sequence of the Precursor of Elafin, an Elastase-Specific Inhibitor in Bronchial-Secretions." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **8**(4): 439-445.
- Sanjita, B. (2008). Meprin metalloproteases modulate the intestinal host response. College of Medicine. Pennsylvania Pennsylvania State University. **Ph. D.**: 200.
- Schmid, K. and W. Burgi (1961). "Preparation and Properties of Human Plasma Ba-Alpha2-Glycoproteins." Biochimica Et Biophysica Acta **47**(3): 440-&.

- Schütte, A., J. Hedrich, et al. (2010). "Let It Flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin alpha(2)." *Plos One* **5**(1).
- Schütte, A., D. Lottaz, et al. (2007). "Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*." *Biol Chem* **388**(5): 523-531.
- Scott, A., S. Weldon, et al. (2011). "SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family." *Biochem Soc Trans* **39**(5): 1437-1440.
- Shi, G. P., G. K. Sukhova, et al. (1999). "Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms." *J Clin Invest* **104**(9): 1191-1197.
- Shibuya, M. (2008). "Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis." *Bmb Reports* **41**(4): 278-286.
- Sterchi, E. E., J. R. Green, et al. (1982). "Non-Pancreatic Hydrolysis of N-Benzoyl-L-Tyrosyl-P-Aminobenzoic Acid (Paba-Peptide) in the Human Small-Intestine." *Clinical Science* **62**(5): 557-560.
- Sterchi, E. E., H. Y. Naim, et al. (1988). "N-Benzoyl-L-Tyrosyl-P-Aminobenzoic Acid Hydrolase - a Metalloendopeptidase of the Human Intestinal Microvillus Membrane Which Degrades Biologically-Active Peptides." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **265**(1): 105-118.
- Sterchi, E. E., W. Stocker, et al. (2008). "Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases." *Mol Aspects Med* **29**(5): 309-328.
- Stöcker, W. and W. Bode (1995). "Structural Features of a Superfamily of Zinc-Endopeptidases - the Metzincins." *Current Opinion in Structural Biology* **5**(3): 383-390.
- Stöcker, W., F. Grams, et al. (1995). "The Metzincins - Topological and Sequential Relations between the Astacins, Adamalysins, Serralysins, and Matrixins (Collagenases) Define a Superfamily of Zinc-Peptidases." *Protein Science* **4**(5): 823-840.
- Szweras, M., D. Liu, et al. (2002). "alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling." *J Biol Chem* **277**(22): 19991-19997.
- Tonnelle, C., A. Colle, et al. (1979). "Partial amino acid sequence of two forms of human post-gamma-globulin." *Biochem Biophys Res Commun* **86**(3): 613-619.

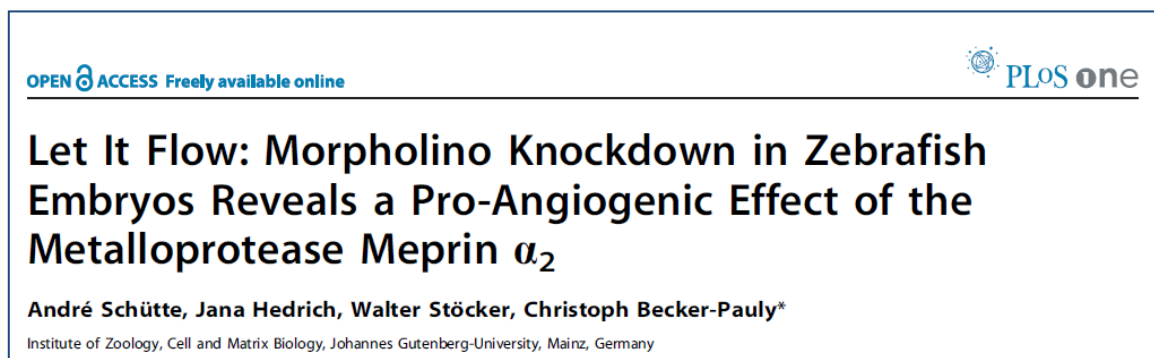
- Trachtman, H., E. Valderrama, et al. (1995). "The Role of Meprin-a in the Pathogenesis of Acute-Renal-Failure." Biochemical and Biophysical Research Communications **208**(2): 498-505.
- Tsai, P. L., C. H. Chen, et al. (2004). "Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase." J Biol Chem **279**(12): 11146-11155.
- Tsunemi, M., Y. Matsuura, et al. (1996). "Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution." Biochemistry **35**(36): 11570-11576.
- Tsuruta, J. K., D. A. O'Brien, et al. (1993). "Sertoli cell and germ cell cystatin C: stage-dependent expression of two distinct messenger ribonucleic acid transcripts in rat testes." Biol Reprod **49**(5): 1045-1054.
- van Bergen, B. H., M. P. Andriessen, et al. (1996). "Expression of SKALP/elafin during wound healing in human skin." Arch Dermatol Res **288**(8): 458-462.
- vanHeel, M., G. Harauz, et al. (1996). "A new generation of the IMAGIC image processing system." Journal of Structural Biology **116**(1): 17-24.
- Vargas, A., M. Zeisser-Labouebe, et al. (2007). "The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems." Adv Drug Deliv Rev **59**(11): 1162-1176.
- Vazeille, E., M. A. Bringer, et al. (2011). "Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive E. coli." Plos One **6**(6): e21199.
- Warren, W. C., L. W. Hillier, et al. (2008). "Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution." Nature **453**(7192): 175-183.
- Wiedow, O., J. M. Schroder, et al. (1990). "Elafin - an Elastase-Specific Inhibitor of Human Skin - Purification, Characterization, and Complete Amino-Acid-Sequence." Journal of Biological Chemistry **265**(25): 14791-14795.
- Williams, S. E., T. I. Brown, et al. (2006). "SLPI and elafin: one glove, many fingers." Clin Sci (Lond) **110**(1): 21-35.
- Wilting, J., B. Christ, et al. (1991). "A modified chorioallantoic membrane (CAM) Assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF." Anat Embryol (Berl) **183**(3): 259-271.

- Wolpert, L., R. Beddington, et al. (1999). Entwicklungsbiologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Woolard, J., W. Y. Wang, et al. (2004). "VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression." Cancer Res **64**(21): 7822-7835.
- Woolard, R. H., K. Carty, et al. (2004). "Research fundamentals: follow-up of subjects in clinical trials: addressing subject attrition." Acad Emerg Med **11**(8): 859-866.
- Yamaguchi, T., M. Fukase, et al. (1994). "Meprin Is Predominantly Involved in Parathyroid-Hormone Degradation by the Microvillar Membranes of Rat-Kidney." Life Sciences **54**(5): 381-386.
- Yee, J. A., L. Yan, et al. (1993). "Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells." J Cell Physiol **157**(3): 528-534.
- Ying, Q. L. and S. R. Simon (1993). "Kinetics of the Inhibition of Human-Leukocyte Elastase by Elafin, a 6-Kilodalton Elastase-Specific Inhibitor from Human Skin." Biochemistry **32**(7): 1866-1874.
- Ying, Q. L. and S. R. Simon (1993). "Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin." Biochemistry **32**(7): 1866-1874.
- Zani, M. L., S. M. Nobar, et al. (2004). "Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*." European Journal of Biochemistry **271**(12): 2370-2378.

8. Anhang

8.1 Veröffentlichung 1: Gen-*knockdown* enthüllt angiogene Funktion der Metalloprotease Meprin α

Schütte A., Hedrich J., Stöcker W., Becker-Pauly C.; "Let it flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin α_2 ." PLoS One. 2010 Jan 21;5(1):e8835.



<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008835>

Let It Flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin α_2

André Schütte, Jana Hedrich, Walter Stöcker, Christoph Becker-Pauly*

Institute of Zoology, Cell and Matrix Biology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Abstract

Background: Meprin metalloproteases are thought to be involved in basic physiological functions such as cell proliferation and tissue differentiation. However, the specific functions of these enzymes are still ambiguous, although a variety of growth factors and structural proteins have been identified as meprin substrates. The discovery of meprins α_1 , α_2 and β in teleost fish provided the basis for uncovering their physiological functions by gene silencing *in vivo*.

Methodology/Principal Findings: A Morpholino knockdown in zebrafish embryos targeting meprin α_1 and β mRNA caused defects in general tissue differentiation. But meprin α_2 morphants were affected more specifically and showed severe failures in the formation of the vascular system provoking the hypothesis of a pro-angiogenic effect. The blood circulation was largely diminished resulting in erythrocyte accumulation. These phenotypes mimic a previously described VEGF-A morphant, revealing a possible role of meprin α in VEGF-A activation. Indeed, human recombinant meprin α processed the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) specifically, revealing the same cleavage products detectable for VEGF from zebrafish whole lysate.

Conclusions/Significance: Our results demonstrate that meprin metalloproteases are important for cell differentiation and proliferation already during embryogenesis, predominantly by the activation of growth factors. Thus, we conclude that meprins play a significant role in VEGF-A processing, subsequently regulating angiogenesis. Therefore, meprin α might be a new therapeutic target in cardiovascular diseases or in tumor growth inhibition.

Citation: Schütte A, Hedrich J, Stöcker W, Becker-Pauly C (2010) Let It Flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin α_2 . PLoS ONE 5(1): e8835. doi:10.1371/journal.pone.0008835

Editor: Karl-Wilhelm Koch, University of Oldenburg, Germany

Received: November 23, 2009; **Accepted:** January 4, 2010; **Published:** January 21, 2010

Copyright: © 2010 Schütte et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BE-4086/1-1) to CB, the EU FP7 Health IBDase to CB and WS, a start-up grant to CB, and a PhD fellowship to AS from the Johannes Gutenberg-University of Mainz, Germany. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: beckerpa@uni-mainz.de

Introduction

Meprin α and β exhibit unique features within the astacin family of zinc endopeptidases and the metzincin superfamily [1,2]. So far they could only be identified in vertebrates like fish, platypus, rodents and humans [3,4,5,6,7]. Striking are the molecular properties, revealing meprin α as the largest secreted protease known so far, due to oligomerisation up to 6 megadalton units [8,9]. Moreover, meprin β is the only astacin that stays predominantly membrane bound [10].

Originally, meprin expression has been observed on the apical side of epithelial brush borders in kidney proximal tubules and small intestine [5,6]. In the meantime, various other tissues have been found to express meprins differentially [11,12]. Meprins are secreted as zymogens, which are activated by proteolytic removal of amino terminal propeptides. Several ways for activation have been unraveled, depending on the expressing tissue. In the gut, both human enzymes are converted to their mature forms by trypsin [8]. Outside the intestine, there is selective activation of meprin α by plasmin [13], and of meprin β by tissue kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) [11], respectively. Upon secretion into

the extracellular matrix (ECM), meprins are able to cleave a number of ECM proteins like laminin, fibronectin, collagen IV and nidogen, peptide hormones like bradykinin [10,14], as well as cytokines and growth factors like TGF- α , interleukin-1 β and interleukin-18 [12,14,15,16].

The observed activation of interleukins by meprins and their expression in leukocytes of the intestinal *lamina propria* indicate a function in the immune response. This is supported by reports on a role for meprins in inflammatory bowel disease or Crohn's disease [17,18,19]. Furthermore, meprin α is expressed in certain tumors such as colorectal cancer and, hence, might play a role in tumor cell migration and invasion, and cancer progression [13,20]. Other sites of expression are human keratinocytes, where meprin α and β are found in the *stratum basale* and in the *stratum granulosum*, respectively [11].

In zebrafish, three homologous meprins, two meprin α variants and one β , are expressed in a broad array of tissues. Besides intestine and skin, the proteases could be found in kidney, head kidney, brain, gills, heart and liver [3]. Thus, the zebrafish appeared as a well suited model for studying the physiological function of meprins *in vivo*, which is made feasible by using

morpholinos for knocking down meprin genes in zebrafish embryos.

Results and Discussion

Peptide antibodies were generated against each of the three meprin variants and used to examine cryosections of 16 weeks old zebrafish by immunofluorescence microscopy, which revealed the intestine as the main expression site for all meprins, and the epidermis for meprin α_1 and β . Within the gut, meprin α_1 as well as β could be observed only in the brush border cells of the intestinal epithelia (Figure 1A, E), whereas meprin α_2 signals were detected in the *lamina propria mucosae* (Figure 1C). The distribution of fluorescence signals implies that meprin α_2 expression could occur in close proximity to endothelial cells (Figure 1D). The distinct expression pattern of all three proteases indicates different functions *in vivo*. Recently it was shown that meprins are involved in certain intestinal pathologies like inflammatory bowel disease (IBD) or ulcerative colitis [21]. Meprin $\beta^{-/-}$ mice exhibit a diminished activation of pro-interleukin-18 (IL-18), which plays a key role in IBD [16]. Similar to IL-18, also IL-1 β is processed by meprin β to its mature form [15].

Expression of meprin α_1 and β in zebrafish epidermis (Figure 1B, F) correlates to the situation in human skin. We could show that meprin α and β are expressed in separate cell layers of human epidermis [11]. This is reflected by diverse effects of the recombinant enzymes on cultured keratinocytes (HaCaT). Here, meprin β induced a dramatic change in cell morphology and reduced the cell number, whereas meprin α seem to play a role in basal keratinocyte proliferation.

All three meprins (α_1 , α_2 and β) were identified by RT-PCR in developing zebrafish embryos starting at 4 hours post fertilization (hpf; data not shown). Thus, they are expressed at the end of the blastula stage, which is typical for zygotic genes activated during midblastula transition [22,23]. This suggests important roles for meprins in tissue formation and assembly in early embryonic

development. To elucidate the functions of the three zebrafish meprins *in vivo*, we created knockdown embryos using morpholinos targeting each protease specifically [24]. As controls, “standard morpholino oligomers” were injected, not targeting any gene in zebrafish (Figure 2A). Consequently, 98% of the injected control larvae did not show any morphant phenotype and the remaining 2% correspond to natural mortality, likewise observed for untreated embryos (Figure 2B, F). To prove the successful knockdown we compared the intensity of fluorescence signals for meprin α_2 in cryosections of injected and wild type animals (see Figure 1G, H).

Obviously, the expression of meprin α_2 in the *lamina propria* of zebrafish intestine was significantly decreased in morphant animals (Figure 1H). Meprin α_1 knockdown animals showed relatively mild, but clearly distinct alterations in comparison to wild type animals (Figure 2C, A respectively). 44% of the injected embryos revealed a dilated pericardium or a distorted trunk and tail tissue, probably due to disorders in cell differentiation (Figure 2F). By contrast, meprin β knockdown animals exhibited strikingly abnormal disorders of the whole trunk and tail in early development (Figure 2D). Overall, the tissues seemed to be unstructured lacking any normal cell differentiation. The morphant embryos are viable in the beginning, but die within 24 hours post injection. This phenotype reveals very distinct and fundamental functions for meprin β in the differentiation of cells during embryonic development.

In the case of meprin α_2 knockdowns the epidermal cell layers seem to be widely disorganized in the trunk and especially in the tail region (Figure 2E). But the most informative phenotype became visible in meprin α_2 morphants beyond the age of 48 hpf. These embryos exhibited a dramatically degenerated vascular system and the blood circulation was largely diminished or even completely interrupted (Figure 3B). Consequently, red blood cells accumulated ventrally in the caudal region of a considerable number of phenotypes (see Figure 3C). To visualize the blood vessels in living embryos, tetramethyl rhodamine isothiocyanate-

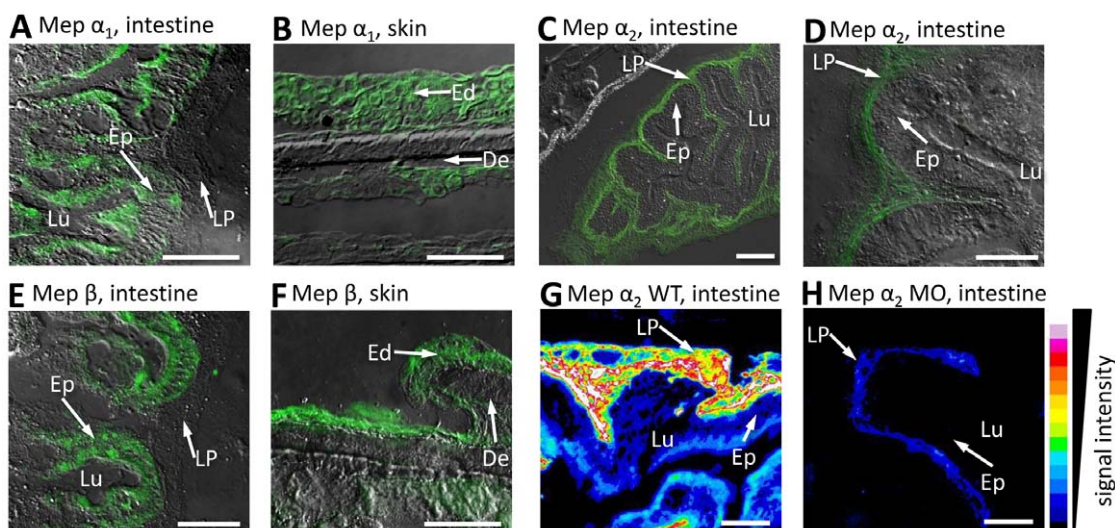


Figure 1. Distribution of meprin α_1 , α_2 and β in zebrafish tissues. Immunofluorescence microscopy of cryosections from whole mount zebrafish, using specific peptide antibodies, revealed meprin α_1 in the brush border cells of intestinal epithelia (Ep) (A) and epidermis (B), whereas meprin α_2 was observed in the *lamina propria mucosae* (LP) only (C, D). Additionally, meprin β signals could be detected in the zebrafish intestine (Ep) and epidermis (Ed) (E, F respectively). To verify the efficiency of meprin knockdowns due to morpholino injection, we compared the fluorescence signal intensity in cryosections of wild type (G) and meprin α_2 deficient embryos (H). Evidently, the expression of meprin α_2 in the *lamina propria* (LP) of the intestine is largely decreased (G, H). Similar analyses of the meprin β morphant were not possible, due to the lethality within 24 hpf. (Ep: epithelium; Lu: lumen; LP: lamina propria; Ed: epidermis; De: dermis; scale bars: 25 μ m; signal intensity was calculated with ImageJ V.1.41o). doi:10.1371/journal.pone.0008835.g001

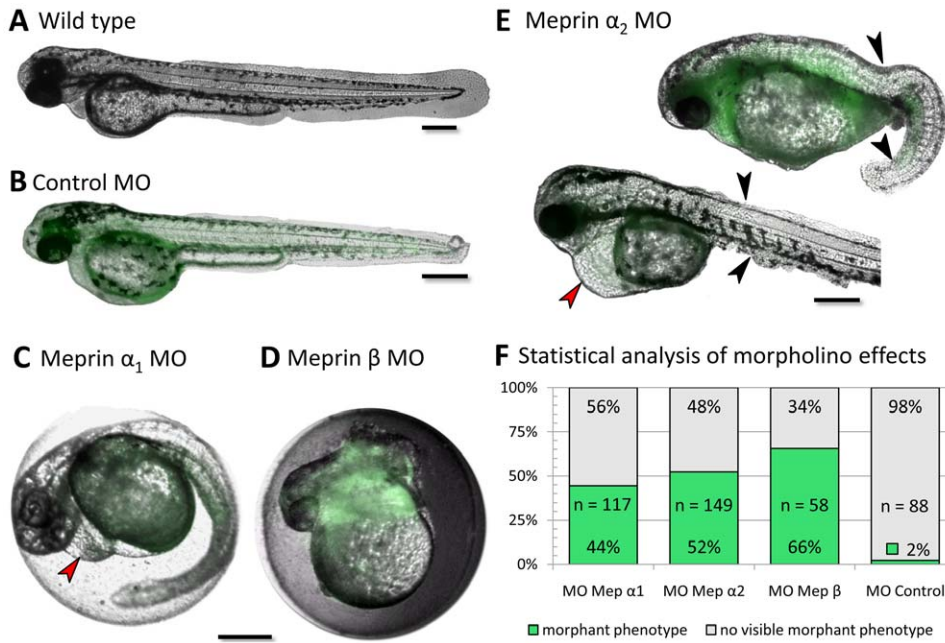


Figure 2. Morpholino knockdown in zebrafish embryos exhibit severe phenotypes of meprin α_1 , α_2 and β (C–E). Wild type (A, 60 hpf) and control fish (B, 42 hpf) did not show any defects in embryonic morphology and development. In meprin α_1 morphants (C, 32 hpf), only slight defects like the dilation of pericard (red arrow) were visible, whereas meprin β morphants (D, 22 hpf) showed striking tissue disorganization in trunk and tail, leading to early death within 24 hpf. Embryos injected with morpholinos against meprin α_2 (E, 42 hpf), likewise exhibited dilated pericards (red arrow), but also showed severe epidermal abnormalities in trunk and tail (black arrows). Statistical analyses visualize the frequency of morphant phenotypes (F). ‘n’ describes the number of injected embryos. Morpholinos were tagged with carboxyfluorescein (green fluorescence). (Scale bars: 250 μ m).
doi:10.1371/journal.pone.0008835.g002

Dextran (TRITC-Dextran) was injected at the age of 48 hpf for microangiography [25]. This method uncovered the almost complete absence of intersegmental vessels (ISV) (Figure 3B), which normally begin to sprout at the 26-somite stage (21 hpf) [26] in wild type embryos (Figure 3A). The only prominent vessel was the large dorsal aorta (DA) extending ventrally from the heart to the tail vessels (Figure 3B; supporting movie file Video S1). These

phenotypes mimic even in detail previously described VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) morphants, regarding the reduced vascular system and erythrocyte accumulation [27]. In corresponding morphants, the loss of the VEGF receptor flk-1 (VEGFR-2) resulted in the absence of angiogenic sprouting of all blood vessels as a consequence of disorganized endothelia [28]. Based on the morphant phenotypes observed here, we argued that

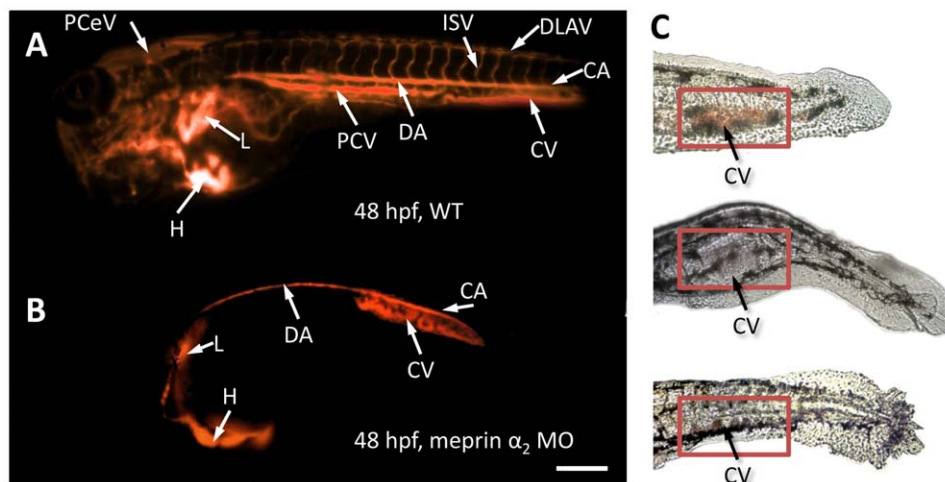


Figure 3. The vascular system of meprin α_2 knockdown embryos exhibits dramatic defects (B, C). Microangiography (with TRITC-Dextran) revealed a drastically reduced vascular system without any intersegmental blood vessels (B) in meprin α_2 morphants, compared to the non-injected wild type zebrafish (A). Additionally, erythrocytes accumulated in the ventral caudal tail region (C), possibly as a consequence of this sprouting failure. (PCeV: Posterior cerebral vein; ISV: intersegmental vessels; DLAV: dorsal longitudinal anastomotic vessel; CA: caudal artery; DA: dorsal aorta CV: caudal vein; PCV: posterior cardinal vein; L: liver; H: heart) (Scale bar: 250 μ m).
doi:10.1371/journal.pone.0008835.g003

meprin α_2 might be involved in angiogenic blood vessel formation by processing VEGF-A. To test this hypothesis, we incubated recombinant human meprin α and β with recombinant human VEGF-A₁₆₅, which is the predominant isoform in humans. By western blot analysis using a specific VEGF-A antibody, we were able to demonstrate that both human meprin α and β cleaved VEGF-A by limited proteolysis. This yielded in two distinct fragments of 19 kDa (meprin α) and 20 kDa (meprin β), derived from the 24 kDa unprocessed VEGF-A₁₆₅ monomer (Figure 4A). Moreover, by western blotting we detected zebrafish VEGF in cell lysates of wildtype fish, displaying the same cleavage pattern in accordance to the cleavage of human VEGF-A by meprin α (Figure 4A). By N-terminal sequencing, we were able to identify the cleavage site in VEGF-A₁₆₅ incubated with meprin α , between Ala4 and Glu5 (Figure 4B). Since this cleavage is not decisive for the different molecular weights of the emerging fragments, we propose, that VEGF-A is cleaved additionally within the C-terminal region. However, no distinctive bands could be observed corresponding to C-terminal fragments, probably due to multiple processing events (data not shown).

Hence, meprin metalloproteases might trigger angiogenesis in two possible ways. On the one hand, unique N-terminal processing of the growth factor could increase its potential to enhance endothelial cell proliferation. On the other hand, removal of the inhibitory C-terminal region from the anti-angiogenic factor VEGF-A_{xxx}b would likewise cause a pro-angiogenic effect [29].

The disturbed organization of the epidermal cells and the deformation of tail and trunk as seen in meprin α and β morphants could be due to the proteolytic activity of meprins on cytokines like VEGF. This assumption is supported by the co-localization of meprins and VEGF in human keratinocytes. Here, VEGF plays an important role in permeability barrier homeostasis and dermal angiogenesis [30]. It has been shown previously that meprins cleave various other cytokines, growth factors and peptides, which take part in different situations like cell migration or tissue formation. For instance, TGF- α and IL-8 are processed and thereby activated by meprin α during inflammatory disease in human lung [12].

In summary, we could demonstrate by *in vivo* knockdown studies that meprins have fundamental physiological effects in the early

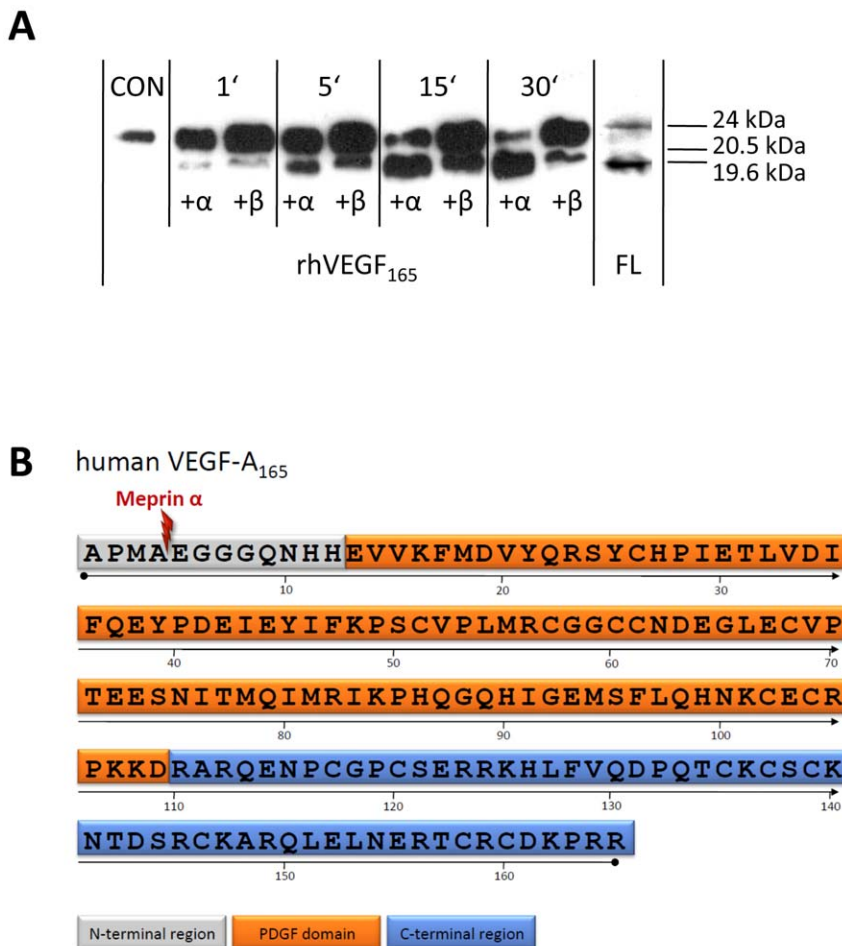


Figure 4. Human meprin α and β are capable of processing VEGF-A specifically. (A) The cleavage of recombinant human VEGF-A₁₆₅ (CON, untreated, 24 kDa) by recombinant meprin α and β (each 85 nM) for 1 to 30 min resulted in two fragments of different molecular weight (19.6 kDa in case of meprin α , 20.5 kDa by meprin β), visualized by western blot analysis. In wild type zebrafish whole lysates (FL), VEGF-A could be detected using specific antibodies indicating a fragment similar to that produced by meprin processing. (B) Domain structure of human VEGF-A₁₆₅ (P15692-4). The lightning indicates the cleavage site between Ala4 and Glu5, identified after incubation with recombinant human meprin α . PDGF (platelet-derived growth factor). In addition, the N-terminal cleavage site in human VEGF-A₁₆₅ between Ala30 and Glu31 due to recombinant human meprin α activity could be identified by N-terminal sequencing. doi:10.1371/journal.pone.0008835.g004

embryonic development of zebrafish. The data shows that meprin metalloproteases are involved in general tissue differentiation. Moreover, we conclude that meprin α_2 is required to process VEGF-A, thereby triggering angiogenesis in the zebrafish.

Methods

Fish Maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) were bred and kept under constant conditions at a temperature of 28°C and a schedule of 14 h light and 10 h darkness. From embryonic stadium, fish were fed daily with dry food and weekly with living food (*Artemia salina*). Embryos were staged according to morphological criteria [23].

Morpholino Sequences

Antisense-morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides were designed against following sequences (GeneTools, Philomath, USA).

meprin α_1 : 5'- AGA TGA GCA GTC TCT GTA AAA GCA T -3'

meprin α_2 : 5'- GGC TGA TTC TCC ACA TGG AGT CCA T -3'

meprin β : 5'- AGA GAT AGG AAC AAG CAG ACG CCA T -3'.

Each oligo was tagged with 3' fluorescein to visualize the distribution in the injected cells. As control, a standard morpholino oligo targeted against a mutation in the human beta-globin pre-mRNA was used (5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3').

Morpholino Microinjection

Morpholino oligonucleotides were diluted with Danieuf buffer to a concentration of 0.3 mM. (Danieuf buffer: 58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES, pH 7.6). Zebrafish eggs were fixed in appropriate furrows on a 1.5% agarose plate. 4 ng of Morpholinos were then injected into the one- or two-cell stages by using a micromanipulator (Märzhäuser, Wetzlar, Germany) and microinjector (Transjector 5246, Eppendorf, Hamburg, Germany). Injected embryos were raised in 96-well-plates with embryo medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄). To avoid fungal growth; 0.1% methylene blue was added to the medium.

Microangiography

Embryos of the age of 2 days post fertilization (dpf) were anesthetized using tricaine (MS-222, 40 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Then, TRITC (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate, 20 mg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) was injected into the circular system through the posterior cardinal vein using the microinjection system described above [25]. The injected embryos were then examined by fluorescence microscopy, using a DM IRBE microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Tissue Lysis and Western Blot Analysis

Homogenized adult fish were incubated in lysis buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1% Triton X-100, pH 7.4) overnight at 4°C. After separation from cell debris by centrifugation at 13.200 \times g for 5 min., the lysate was concentrated using Amicon centrifugal filter units with an exclusion size of 50 kDa (Millipore, Eschborn, Germany). For immunoblot analysis proteins were subjected to 14% SDS-PAGE under reducing conditions and afterwards transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF)-membrane (Immobilon P, Milli-

pore, Eschborn, Germany) by electro blotting (80 mA, 75 min). For blocking, the membrane was saturated with 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature (RT), incubated with the primary monoclonal anti-zebrafish VEGF-A antibody (1:200; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) for 1 h and afterwards with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:6250) for 45 min at room temperature. Between all these steps, the membrane was washed with TBS-T (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.2% Triton-X-100) and TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl). Detection was performed using Rotilumin (Roth, Karlsruhe, Germany) following the manufacturer's instructions using X-ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). MagicMark XP (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as a molecular weight marker.

VEGF-A Substrate Assay

500 ng of recombinant human VEGF-A₁₆₅ (Immunotools, Friesoythe, Germany) was incubated with 85 nM meprin α or meprin β , respectively, for different times (1, 5, 15 and 30 minutes) at 37°C. By western blotting, the resulting fragments were identified using an anti-human VEGF-A antibody (1:200, VEGF(C-1) sc7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Recombinant human meprin α and β were expressed, purified and activated as described before [8,11]. For N-terminal sequencing, proteins were blotted onto PVDF membranes, stained with Coomassie Brilliant Blue and sequenced at the protein microsequencing center of the Institut Fédératif de Recherche (IFR) 128 (Lyon, France). In zebrafish whole lysate (from adult fish), VEGF was detected by western blotting using a monoclonal anti-zebrafish VEGF antibody (R&D Systems, Wiesbaden, Germany).

Immunofluorescence Analysis

Cryosections of unfixed 4 weeks old zebrafish were generated with the cryostat HM 560 (Microm, Walldorf, Germany) and incubated with 5% goat serum in phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) to block non-specific binding. Afterwards the samples were incubated for 2 h at 4°C with polyclonal anti-zebrafish meprin antibodies (1:200 in 0.5% goat serum/PBS). The polyclonal antisera from rabbit and guinea pig were generated against the following peptides. IgG fractions were purified by a sepharose-6B-column (Pineda, Berlin, Germany):

meprin α_1 : NH₂-CTLDPSDGFWRGPKS-CONH₂

meprin α_2 : NH₂-CHDAKVQSERFYNSEGYAY-CONH₂

meprin β : NH₂-CVREYTAENPKGDLRL-CONH₂

After removal of unbound primary antibody by washing with PBS, the samples were incubated with Alexa 568 goat anti-rabbit IgG or Alexa 488 goat anti-guinea pig IgG fluorescent antibody, respectively (1:400 in 0.5% goat serum/PBS; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 90 min. Moreover, 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) was added to label the nuclei. Immunofluorescence detection was carried out using a DM IRBE microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with fluorescence facility. The fluorescence intensity was compared on cryosections from intestine of wild type zebrafish and meprin α_2 morphants. The software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used to measure and visualize the grade of intensity.

Accession Numbers

Proteins described in this work are deposited in the uniprot/TrEMBL database: Q5RHM1 (meprin α_1), B3DKP9 (meprin α_2), Q08CC4 (meprin β), Q16819 (human meprin α), Q16820 (human meprin β), P15692 (human VEGF-A).

Supporting Information

Video S1 The movie shows the phenotype of the living meprin α_2 knockdown zebrafish. First scene displays the embryo in bright field microscopy, with the visible heart beating. This is followed by fluorescence microscopy, revealing a degenerated vascular system compared to the wildtype fish, visualized by microangiography. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008835.s001 (3.15 MB MOV)

References

- Bond JS, Beynon RJ (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4: 1247–1261.
- Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, et al. (1995) The metzincins—topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4: 823–840.
- Schütte A, Lottaz D, Sterchi EE, Stöcker W, Becker-Pauly C (2007) Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*. *Biological chemistry* 388: 523–531.
- Warren WC, Hillier LW, Marshall Graves JA, Birney E, Ponting CP, et al. (2008) Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453: 175–183.
- Beynon RJ, Shannon JD, Bond JS (1981) Purification and characterization of a metallo-endopeptinase from mouse kidney. *The Biochemical journal* 199: 591–598.
- Sterchi EE, Green JR, Lentze MJ (1982) Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clinical science (London, England: 1979)* 62: 557–560.
- Oneda B, Lods N, Lottaz D, Becker-Pauly C, Stöcker W, et al. (2008) Metalloprotease meprin beta in rat kidney: glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis. *PLoS ONE* 3: e2278.
- Becker C, Kruse M-N, Slotty KA, Köhler D, Harris JR, et al. (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biological chemistry* 384: 825–831.
- Ishmael FT, Norcum MT, Benkovic SJ, Bond JS (2001) Multimeric structure of the secreted meprin A metalloproteinase and characterization of the functional protomer. *The Journal of biological chemistry* 276: 23207–23211.
- Bertenshaw GP, Norcum MT, Bond JS (2003) Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *The Journal of biological chemistry* 278: 2522–2532.
- Becker-Pauly C, Höwel M, Walker T, Vlad A, Aufenvenne K, et al. (2007) The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 127: 1115–1125.
- Bergin DA, Greene CM, Sterchi EE, Kenna C, Geraghty P, et al. (2008) Activation of EGFR by a novel metalloprotease pathway. *The Journal of biological chemistry* 277: 40650–40658.
- Rösmann S, Hahn D, Lottaz D, Kruse M-N, Stöcker W, et al. (2002) Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *The Journal of biological chemistry* 277: 40650–40658.
- Kounnas MZ, Wolz RL, Gorbea CM, Bond JS (1991) Meprin-A and -B. Cell surface endopeptidases of the mouse kidney. *The Journal of biological chemistry* 266: 17350–17357.
- Herzog C, Kaushal GP, Haun RS (2005) Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. *Cytokine* 31: 394–403.
- Banerjee S, Bond JS (2008) Proinflammatory interleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *The Journal of biological chemistry* 283: 31371–31377.
- Lottaz D, Hahn D, Müller S, Müller C, Sterchi EE (1999) Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the alpha and beta subunits. *European journal of biochemistry/FEBS* 259: 496–504.
- Lottaz D, Buri C, Monteleone G, Rösmann S, Macdonald TT, et al. (2007) Compartmentalised expression of meprin in small intestinal mucosa: enhanced expression in lamina propria in coeliac disease. *Biological chemistry* 388: 337–341.
- Crisman JM, Zhang B, Norman LP, Bond JS (2004) Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J Immunol* 172: 4510–4519.
- Matters GL, Manni A, Bond JS (2005) Inhibitors of polyamine biosynthesis decrease the expression of the metalloproteases meprin alpha and MMP-7 in hormone-independent human breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* 22: 331–339.
- Banerjee S, Oneda B, Yap LM, Jewell DP, Matters GL, et al. (2009) MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal immunology*.
- Kane DA, Kimmel CB (1993) The zebrafish midblastula transition. *Development (Cambridge, England)* 119: 447–456.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 203: 253–310.
- Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26: 216–220.
- Weinstein BM, Stemple DL, Driever W, Fishman MC (1995) Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nature medicine* 1: 1143–1147.
- Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, Fishman MC (1997) Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Developmental biology* 183: 37–48.
- Nasevicius A, Larson J, Ekker SC (2000) Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant. *Yeast (Chichester, England)* 17: 294–301.
- Habeck H, Odenthal J, Walderich B, Maischein H, Schulte-Merker S (2002) Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis. *Current biology: CB* 12: 1405–1412.
- Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews Cancer* 8: 880–887.
- Elias PM, Arbiser J, Brown BE, Rossiter H, Man M-Q, et al. (2008) Epidermal vascular endothelial growth factor production is required for permeability barrier homeostasis, dermal angiogenesis, and the development of epidermal hyperplasia: implications for the pathogenesis of psoriasis. *The American journal of pathology* 173: 689–699.

Acknowledgments

We thank Dominique Mazzocut of the Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université de Lyon UMR for N-terminal sequencing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS CBP. Performed the experiments: AS JH. Analyzed the data: AS WS CBP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS WS CBP. Wrote the paper: AS CBP.

8.2 Veröffentlichung 2: Fetuin-A und Cystatin C sind endogene Meprin Inhibitoren

Hedrich, J., Lottaz D., Meyer K., Yiallourous I., Jahnen-Dechent W., Stöcker W. and Becker-Pauly C.; „Fetuin-A and Cystatin C are Endogenous Inhibitors of human Meprin Metalloproteases“, *Biochemistry*. 2010 Oct 5;49(39):8599-607.

BIOCHEMISTRY
including biophysical chemistry & molecular biology
Article

Biochemistry **2010**, 49, 8599–8607 8599
DOI: 10.1021/bi1004238

Fetuin-A and Cystatin C Are Endogenous Inhibitors of Human Meprin Metalloproteases[†]

Jana Hedrich,[‡] Daniel Lottaz,[§] Katharina Meyer,[‡] Irene Yiallourous,[‡] Willi Jahnen-Dechent,^{||} Walter Stöcker,[‡] and Christoph Becker-Pauly^{*‡}

[‡]*Institute of Zoology, Cell and Matrix Biology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, 55128 Mainz, Germany,* [§]*Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergology Inselspital, University of Bern, 3010 Bern, Switzerland,* and ^{||}*Department of Biomedical Engineering, Biointerface Laboratory, RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany*

Received March 19, 2010; Revised Manuscript Received August 31, 2010

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi1004238>

Fetuin-A and Cystatin C Are Endogenous Inhibitors of Human Meprin Metalloproteases[†]

Jana Hedrich,[‡] Daniel Lottaz,[§] Katharina Meyer,[‡] Irene Yiallourou,[‡] Willi Jahnen-Dechent,^{||} Walter Stöcker,[‡] and Christoph Becker-Pauly^{*:‡}

[‡]*Institute of Zoology, Cell and Matrix Biology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, 55128 Mainz, Germany*, [§]*Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergology Inselspital, University of Bern, 3010 Bern, Switzerland*, and ^{||}*Department of Biomedical Engineering, Biointerface Laboratory, RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany*

Received March 19, 2010; Revised Manuscript Received August 31, 2010

ABSTRACT: Meprin α and β , zinc metalloproteinases, play significant roles in inflammation, including inflammatory bowel disease (IBD), possibly by activating cytokines, like interleukin 1 β , interleukin 18, or tumor growth factor α . Although a number of potential activators for meprins are known, no endogenous inhibitors have been identified. In this work, we analyzed the inhibitory potential of human plasma and identified bovine fetuin-A as an endogenous meprin inhibitor with a K_i (inhibition constant) of 4.2×10^{-5} M for meprin α and a K_i of 1.1×10^{-6} M meprin β . This correlated with data obtained for a fetuin-A homologue from carp (nephrosin inhibitor) that revealed a potent meprin α and β inhibition (residual activities of 27 and 22%, respectively) at a carp fetuin concentration of 1.5×10^{-6} M. Human fetuin-A is a negative acute phase protein involved in inflammatory diseases, thus being a potential physiological regulator of meprin activity. We report kinetic studies of fetuin-A with the proteolytic enzymes astacin, LAST, LAST_MAM, trypsin, and chymotrypsin, indeed demonstrating that fetuin-A is a broad-range protease inhibitor. Fetuin-A inhibition of meprin α activity was 40 times weaker than that of meprin β activity. Therefore, we tested cystatin C, a protein structurally closely related to fetuin-A. Indeed, cystatin C was an inhibitor for human meprin α ($K_i = 8.5 \times 10^{-6}$ M) but, interestingly, not for meprin β . Thus, the identification of fetuin-A and cystatin C as endogenous proteolytic regulators of meprin activity broadens our understanding of the proteolytic network in plasma.

Human meprin α and β are zinc metalloendopeptidases of the astacin family and metzincin superfamily (1, 2). Although meprin α and β have 44% identical amino acid sequences, they exhibit striking differences in activation, substrate specificity, and quaternary structure (3). Meprin α forms chain and ring superstructures up to the megadalton range, and therefore, it is the largest known secreted protease (4, 5). In contrast, meprin β is dimeric and remains predominantly membrane-bound due to a C-terminal transmembrane region. However, proteolytic shedding may release active meprin β from the cell surface (6).

Meprins are abundantly expressed in several tissues, including kidney, intestinal epithelial cells, skin, and certain populations of leukocytes (7–11). Because of their ability to cleave a wide range of biologically active proteins, as well as proteins of the extracellular matrix [such as collagen type IV, laminin-1, nidogen-1, and fibronectin (3)], they are thought to be involved in cell migration, differentiation, and proliferation. The cell-adhesion molecule E-cadherin, for example, is processed by meprin β , resulting in the loss of cell–cell contacts (12). Similarly, incubation of cultured keratinocytes with recombinant human meprin β induced dramatic changes in cell morphology and viability (9).

Recently, the activation of tumor growth factor α (TGF- α) (13), interleukin 18 (IL-18) (7), interleukin 1 β (IL-1 β) (14), and the vascular endothelial growth factor (VEGF-A) (15) could be attributed to meprin activity, thereby revealing functions in immunology and angiogenesis. With regard to pathological conditions, it was shown that meprins are involved in inflammatory disorders like morbus Crohn or inflammatory bowel disease (16). Moreover, in colon cancer, meprin α is expressed not only apically but also basolaterally (17). Thus, the protease is facing the basement membrane and may therefore promote cancer cell evasion through this barrier by virtue of its proteolytic activity. Some of these proteins are grossly degraded by meprins, while others are specifically processed. Meprin α and β differ in their substrate specificity (3) largely because of binding preferences around the active site. Meprin α prefers neutral aliphatic and aromatic side chains in the P1' position, while meprin β prefers negatively charged amino acid residues (18, 19). Despite the fact that a considerable number of potential substrates and molecular features are known, many questions regarding the (patho)physiological roles of meprins remain open.

To understand the proteolytic network, it is especially important to understand the regulatory interaction among enzymes, substrates, and inhibitors. In skin, we could identify human tissue kallikrein-related peptidase 4 (klk4), klk5, and klk8 as activators for meprins, whereas meprin α is activated by klk 5 only (9, 20). In contrast, meprin α is specifically transformed to its mature form by plasmin (5, 21). Once proteases are proteolytically active, inhibitors are necessary for their physiological regulation. In the

[†]This work was supported by the DFG (BE-4086/1-1) and a start-up grant from the Johannes Gutenberg-University of Mainz (both to C.B.-P.). The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7) under Grant 200931 (Project IBDase).

*To whom correspondence should be addressed. Phone: 0049-6131-3926656. Fax: 0049-6131-3923835. E-mail: beckerpa@uni-mainz.de.

case of human meprins, no endogenous inhibitors have been identified. Although the mannan binding protein was found to inhibit rat meprins (22), such evidence is lacking for the human enzymes. Several synthetic inhibitors developed as therapeutics targeting other metalloproteases exhibited inhibitory capacity against meprins (19). To date, the most effective compound in this respect is the naturally occurring hydroxamate actinonin, which inhibits meprin α 100 times better than meprin β (19). However, the physiological relevance of this molecule is doubtful.

In this work, we provide evidence of the inhibition of meprins by extracellular members of the cystatin superfamily of protease inhibitors. The cystatins are subdivided into three groups by structural similarity, with type I cystatins being intracellular proteins. The extracellular type II cystatins comprise, for example, cystatin C (23), which consists of a single 120-amino acid chain, known to inhibit papain-like proteases, such as cathepsin B, H, and L, and papain (24, 25). Cystatin C is expressed in many human tissues such as epididymis, vas deferens, brain, thymus, and ovary but can also be found in various body fluids such as plasma and cerebrospinal fluid (26, 27). Fetuin-A (α -2HS-glycoprotein) and its homologue from carp, the nephrosin inhibitor, are members of the fetuin family, consisting of type 3 cystatins. Fetuins are plasma proteins with three characteristic domains: two N-terminal cystatin-like domains (D1 and D2) and an unrelated C-terminal domain (D3). Fetuins undergo proteolytic processing. The processing was studied in detail in human fetuin-A, which is cleaved from a single-chain precursor into a mature circulating two-chain form connected by a disulfide bond (28–30).

Fetuin-A is predominantly expressed in the liver and constitutively secreted into the blood throughout life (29). During development, fetuin-A expression in various tissues has also been reported (31, 32). Fetuin-A serum levels drop after trauma and infection, and therefore, fetuin-A is a negative acute phase plasma protein (33).

Human fetuin-A has many purported biological functions. Wang et al. (34) reported that fetuin-A may play a role in epithelial differentiation, because it is strongly expressed in the developing epithelial cell layer and can promote scar-free wound healing. Fetuin-A is foremost known to inhibit pathological calcification and is highly enriched in the mineralized bone matrix (35, 36). Another major role is its involvement in the immune response (37). Fetuin-A was shown to be an inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase (38) and trypsin (39, 40).

The nephrosin inhibitor from carp is likewise expressed in liver tissue and circulates in inhibition complexes with the astacin protease nephrosin (28). Zebrafish nephrosin is specifically expressed in granulocytes (41), suggesting a role in the inflammatory response like that of fetuin-A.

Thus, the goal of this work was the identification of an endogenous inhibitor of meprin α and β . Because meprins are expressed in circulating leukocytes, we analyzed human plasma, which is rich in protease inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Human Plasma Samples. The plasma samples used in this study were provided by the University Hospital of Mainz (Mainz, Germany). Control samples were voluntary blood donations from healthy persons. The Declaration of Helsinki Principles was followed, and all patients gave their written, informed consent.

Chemicals and Enzymes. All chemicals were of analytical grade and, if not stated otherwise, were obtained from

Amersham Bioscience (Freiburg, Germany), Applichem (Darmstadt, Germany), Bio-Rad (Munich, Germany), Sigma/Aldrich (Deisenhofen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), or R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Bovine fetuin-A isolated from bovine serum (catalog no. F-2379), human fetuin-A isolated from human plasma (catalog no. G0516), and fetuin-A antibody (rabbit, polyclonal; catalog no. HPA001524) were purchased from Sigma/Aldrich. Recombinant human fetuin-A was obtained from R&D Systems. Recombinantly expressed cystatin C (*Escherichia coli*; catalog no. RD172009100-H) was obtained from BioVendor (Heidelberg, Germany) and the penta-His antibody from Qiagen (Hilden, Germany).

Recombinant Protein Expression, Purification, and Activation. Recombinant meprin α (Q16819), recombinant meprin β (Q16820), recombinant LAST (B4F319), and recombinant LAST_MAM (B4F320) were expressed, purified, and activated as described previously (5, 9, 42). Astacin was isolated from the digestive tract of the crayfish *Astacus astacus* (43).

The cDNA for the recombinant nephrosin inhibitor was provided by F. Xavier Gomis-Rüth (Barcelona, Spain).

Inhibition Assay. The activity assay using azocasein as the substrate was used for inhibition studies. Enzymes at concentrations at least 10-fold below inhibitor concentrations were incubated with plasma [fetuin concentration in plasma of $1.02\text{--}2.54 \times 10^{-5}$ M (29, 44)], FCS¹ (fetal calf serum; fetuin concentration in FCS of 1.1×10^{-4} M) (36), or potential inhibitors at 37 °C for 10 min. Afterward, the enzymes were incubated with 11 mg/mL azocasein in 20 mM ethanolamine (pH 9.5) at 37 °C overnight. The protein was precipitated via addition of TCA (trichloroacetic acid) to a final concentration of 3.5% (w/v) and centrifuged at 13000g for 10 min. Concentrations of cleaved azo dye in the supernatant were determined photometrically at 340 nm, which correlates to the proteolytic activity. The exact enzyme concentrations used in different inhibition assays are given in the figure legends.

The proteolytic activity and inhibition by bovine and human fetuin-A and cystatin C were also tested with the fluorogenic peptide substrate Mca-YVADAPK(Dnp)-OH (R&D Systems). The enzymatic activity was recorded with a Varioskan Flash fluorescence spectrophotometer (Thermo Scientific). Data were analyzed using SkanIt version 2.4 for Varioskan Flash. Meprin α [5 nM in 50 mM HEPES (pH 7.5)] and meprin β [1 nM in 50 mM HEPES (pH 7.5)] were incubated with an inhibitor at 37 °C for 10 min. After the assay had been started via addition of the fluorogenic peptide substrate [final concentration of 10 μ M in 50 mM HEPES (pH 7.5)], upon excitation at 320 nm the fluorescence emission at 405 nm was monitored for 10–60 min. The proteolytic activity was related to the emission at 405 nm. The activity was determined by the slope of the initial linear range of the curve.

Fetuin Depletion. All incubations were conducted in 1.5 mL microtubes at 4 °C on a rotating wheel; 600 μ g of immunoglobulin of a rabbit anti-bovine fetuin antiserum and a control normal rabbit serum (Dako Schweiz AG, Baar, Switzerland) were coupled with 100 μ L of protein A Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare Life Sciences, Glattbrugg, Switzerland) in phosphate-buffered saline for 3 h and subsequently washed three times with phosphate-buffered saline. Two hundred microliters of 1% inactivated FCS (57 °C for 20 min) in phosphate-buffered saline was precleared with 100 μ L of protein A Sepharose beads

¹Abbreviations: FCS, fetal calf serum; K_i , inhibition constant.

for 2 h and subsequently co-incubated overnight with the protein A-coupled immunoglobulins of the anti-bovine fetuin antiserum and control normal rabbit serum. The inhibitory capacity of the depleted FCS supernatants was assessed using recombinant human meprin β as outlined above.

Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE). Protein samples were separated under reducing conditions via SDS–PAGE (10%). Proteins were visualized with Coomassie staining [0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (w/v) aluminum sulfate hydrate, 10% ethanol (99%), 2% *o*-phosphoric acid, and 83% Milli-Q water]. Prestained protein marker (ColorPlus P7-ladder prestained protein marker, Broad Range; New England Bio Laboratories, Frankfurt, Germany) was used to determine the molecular mass.

Western Blot Analysis. For Western blot analysis, proteins were subjected to SDS–PAGE and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) (Immobilon P; Millipore, Eschborn, Germany). For specific protein detection with the anti-human fetuin-A antibody, the membrane was blocked with 5% (w/v) dry milk in a TBS buffer for 1 h at room temperature and incubated with the first antibody [polyclonal, rabbit human fetuin-A antibody, 1:1000 in 5% (w/v) dry milk Tris saline] for 1 h and afterward for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG [HRP; 1:10000 in 10% (w/v) dry milk saline]. For protein detection via His tag by penta-His antibodies (Qiagen), the membrane was blocked with a 3% (w/v) BSA/TBS solution for 1 h. The penta-His antibody [1:1000 in a 3% (w/v) BSA/TBS solution] was incubated for 1 h followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG [1:10000 in 10% (w/v) dry milk TBS]. Detection on X-ray film was achieved using the ECL Plus substrate (GE Healthcare, Freiburg, Germany) or Rothi-Lumin substrate (Roth, Karlsruhe, Germany), following the manufacturer's instructions (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany).

Inhibition Kinetics. Determination of the inhibition constant K_i was performed by nonlinear regression analysis using GraFit version 4.0 (Erihtacus Software) by plotting the ratio of the inhibited and uninhibited enzyme activities against the inhibitor concentration and fitting the data to the following equation (45):

$$\frac{v_i}{v_o} = 1 - \left[E_o + I_o + K_i - \sqrt{(E_o + I_o + K_i)^2 - 4E_o I_o} \right] / (2E_o)$$

Inhibition kinetics were performed using the fluorogenic peptide substrate Mca-YVADAPK(Dnp)-OH (R&D Systems). Bovine fetuin was used at concentrations ranging from 1.9×10^{-7} to 3.4×10^{-4} M and cystatin C at concentrations ranging from 4.1×10^{-9} to 4.1×10^{-5} M. The final concentration of meprin α was 5 nM and that of meprin β 1 nM.

Proteolytic Processing of Bovine and Human Fetuin. Recombinant meprin α and meprin β at a final concentration of 9.4×10^{-8} M were incubated overnight with bovine or recombinant human fetuin-A at a final concentration of 1.07×10^{-5} M at 37 °C in a total volume of 20 μ L. Afterward, samples were subjected to 10% SDS–PAGE. Proteins were visualized by Coomassie staining or blotted to polyvinylidene fluoride membranes. Blots were probed with the rabbit anti-human fetuin-A antibody. Signals could be detected because of the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

Meprin Affinity Chromatography. Meprin affinity chromatography was performed to isolate specific ligands from human plasma. For that purpose, we expressed, purified, and

activated human meprin α and β . Immobilization of the active enzymes on CH Sepharose 4BTM-Matrix was conducted using the manufacturer's instructions. Residual active groups were blocked with a 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 1 h. To ensure that no free ligands remained bound electrostatically, the material was washed with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.5 M NaCl. Sepharose prepared for affinity chromatography was packed into Bio-Rad columns, and 2.5 mL of plasma was applied to 1.5–3.0 mL of Sepharose matrix. Unbound substances were removed when the column was washed with HEPES/NaOH buffer (50 mM, pH 7.5). Eventually, meprin ligands were identified by SDS–PAGE and Western blot analysis; 500 μ L of Sepharose matrix with a coupled ligand was boiled for 10 min under reducing and denaturing conditions and centrifuged (1 min at 15000g), and the supernatant was loaded on an SDS gel.

Plasma Preparation. Control plasma was obtained from healthy volunteers. Blood taken from Vena mediana cubiti was caught in serum tubes [(Z) Gel 7.5 mL; KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Germany], centrifuged for 2 h (4000g and 4 °C), and stored at –20 °C.

Amino Acid Sequence Alignment. Sequences were aligned using ClustalX version 2.0 (46) via adjustment of opening GAP penalties to 5.0; other settings were default settings. Sequence alignments were edited with GeneDoc version 2.6.0241 and comprised complete sequences or single domains.

RESULTS

Cell Culture Medium Inhibits Meprin Activity. The presence of potential inhibitors in plasma was inferred from the use of FCS-containing medium in cell culture experiments, revealing reduced meprin activity (data not shown).

We first tested if α 2-macroglobulin, a broad-spectrum protease inhibitor abundant in plasma, would inhibit meprin activity. Despite the fact that many astacin proteases are effectively inhibited by α 2-macroglobulin (43, 47–49), meprins were not (19). One reason might be that meprin dimers and oligomers are too bulky for caging inhibition by α 2-macroglobulin because of the cage mechanism.

Human Plasma Inhibits the Proteolytic Activity of Meprin α and β . Inhibition assays with four different plasma samples from two female and two male adults revealed strong inhibition of human meprins (Figure 1A). Using azocasein as a substrate, recombinant meprin α exhibited a residual activity of 52–66% after plasma incubation, whereas recombinant meprin β was more strongly inhibited, with 2–15% remaining activity, by a final plasma concentration of 18%. Obviously, the individual plasma samples differed in their inhibitory capacity, indicating varying levels of endogenous inhibitors. Moreover, separation of human plasma proteins by gel filtration revealed molecular masses between 30 and 60 kDa for the main inhibiting molecules (data not shown).

Isolation and Identification of Human Fetuin-A as an Inhibitor of Meprin α and β . A recently described endogenous inhibitor of nephrosin, another astacin metalloprotease from the carp *Cyprinus carpio*, had been identified previously as a homologue of human fetuin-A (28). Prompted by the fact that the molecular mass of the meprin inhibitor detected by analytical gel filtration was in the fetuin-A range of 50–60 kDa, we performed immunoassays with a fetuin-A specific antibody, as well as inhibition assays with purified fetuin-A. To isolate binding

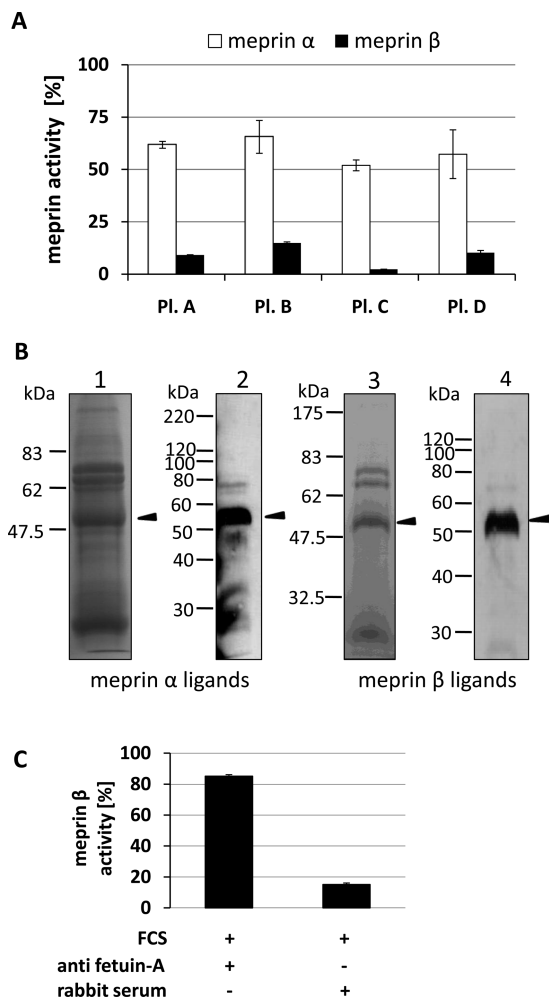


FIGURE 1: Inhibition of recombinant human meprin α and β by human plasma and identification of fetuin-A as a meprin binding molecule. (A) Recombinant active meprin α or β (each at 9.4×10^{-8} M) was incubated with four different human blood plasma samples from healthy subjects for 10 min (18% plasma) and afterward tested for azocasein cleaving activity in an end point (24 h) assay. The optical density at 340 nm correlates to proteolytic activity. The data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). The full enzyme activity without plasma incubation is 100%. Pl. denotes plasma samples. (B) Recombinantly expressed and activated meprin α or β was coupled to an activated Sepharose matrix. Plasma from healthy subjects was applied to the affinity column, washed with 50 mM HEPES/NaOH buffer (pH 7.5). Because of the strong interaction of the ligands withstanding different pH values and ionic strengths, part of the column was heat denatured under reducing conditions. The supernatant from meprin α (lanes 1 and 2) and meprin β affinity columns (lanes 3 and 4) was separated by SDS-PAGE (10%). Proteins were visualized either by Coomassie blue staining (lanes 1 and 3) or by immunodetection (lanes 2 and 4). Western blots were probed with the rabbit anti-human fetuin-A antibody. (C) Recombinant active meprin β was incubated with 1% FCS preincubated with specific fetuin-A antibodies or rabbit serum. Afterward, samples were tested for azocasein cleaving activity corresponding to the optical density at 340 nm. The data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). The enzyme activity is 100% without FCS.

partners of human meprin α and β , we coupled both enzymes covalently to a Sepharose matrix, loaded plasma samples, and analyzed the bound proteins. In Coomassie-stained gels, we observed several bands isolated from meprin α and β columns (Figure 1B, lanes 1 and 3). In both cases, Western blot assays with an anti fetuin-A antibody revealed a strong band at \sim 55 kDa, corresponding to proteolytically processed fetuin (30) and weaker

bands in the range of 70–75 kDa (Figure 1B, lanes 2 and 4). Additionally, fetuin-A depletion of FCS samples with a specific fetuin-A antibody resulted in a strongly decreased level of inhibition of meprin β activity (Figure 1C).

Kinetic Characterization of Fetuin-A Inhibition. For obtaining kinetic parameters, a fluorogenic meprin substrate was used in assays with purified bovine fetuin-A, as well as with purified and recombinant human fetuin-A. The strongest inhibition of meprin β (12% residual activity) could be observed with bovine fetuin-A (final concentration of 1×10^{-4} M) (Figure 2A), which is 62% identical in amino acid sequence with the human homologue (Figure 4A). Recombinant meprin α was slightly less inhibited by the bovine fetuin-A (25% residual activity), but interestingly, at a final concentration of 1×10^{-4} M, purified human fetuin-A exhibited less residual activity (41%) than meprin β (62%). Surprisingly, a 3×10^{-6} M solution of recombinant human fetuin-A revealed an increased activity of meprin α (141%), while meprin β was still inhibited, with 70% residual activity (Figure 2A). Likewise, bovine fetuin-A at the lower concentration of 3×10^{-6} M increased the activity of meprin α to 115% but strongly inhibited recombinant meprin β , with 16% activity. Data from inhibition kinetics with bovine fetuin-A at a range of concentrations from 1×10^{-7} to 4×10^{-4} M allowed the calculation of the inhibition constant (K_i) for recombinant meprin α (4.2×10^{-5} M) and meprin β (1.1×10^{-6} M) (Figure 2B). To demonstrate that the inhibition was not merely due to substrate effects, we incubated recombinant meprin α and β with gelatin, which is a known substrate of these enzymes (5). During a 32 h digestion, no inhibitory effect was detected (data not shown).

Proteolytic Processing of Fetuin-A. To investigate if proteolytic cleavage of the inhibitor by the target protease occurs or if it is even required for the reactivity of fetuin-A against meprins, the interaction between the two proteins was further analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Digests of bovine fetuin-A or recombinant human fetuin-A and recombinant meprins suggested limited proteolysis of fetuin-A in that cleavage was complete after incubation for 24 h (Figure 2C,D). Bovine fetuin-A incubated with meprin α resulted in a major band at 60 kDa and secondary bands at 55 and 50 kDa. These signals could also be observed in the fetuin-A control, albeit at a lower intensity. Upon incubation with meprin β , cleavage products at 50, 45, 40, and 30 kDa were generated in addition to the major band at 60 kDa (Figure 2C,D).

Inhibitory Capacity in Patient Plasma. The analysis of plasma from four randomly selected patients suffering from various diseases showed strong differences. While the inhibitory effect of samples from patients with cephalaea myalgica and psoriasis showed inhibition of meprin α and β , inhibition was weak or absent in plasma samples from two multimorbid patients (patient 3, alcoholic cirrhosis, renal failure, diabetes mellitus type 2, esophagus varices bleeding, hepatic encephalopathy, and atrial fibrillation; patient 4, Crohn's disease, pulmonary embolism, intestinal inflammatory disease, gastrointestinal bleeding, and hypertension) (Figure 3A). Moreover, immunoblot detection of fetuin-A (Figure 3B) in plasma samples from healthy controls (lanes 1 and 2) compared to those from diseased patients (lanes 3 and 4) revealed slightly higher serum levels as well as an additionally contained proteolytic fragment of \sim 25 kDa (lanes 1 and 2, arrowhead).

Broad-Range Inhibition of Metalloprotease and Serine Proteases by Fetuin-A. To investigate whether fetuin-A acts like a broad-range inhibitor in plasma or is specific for meprins,

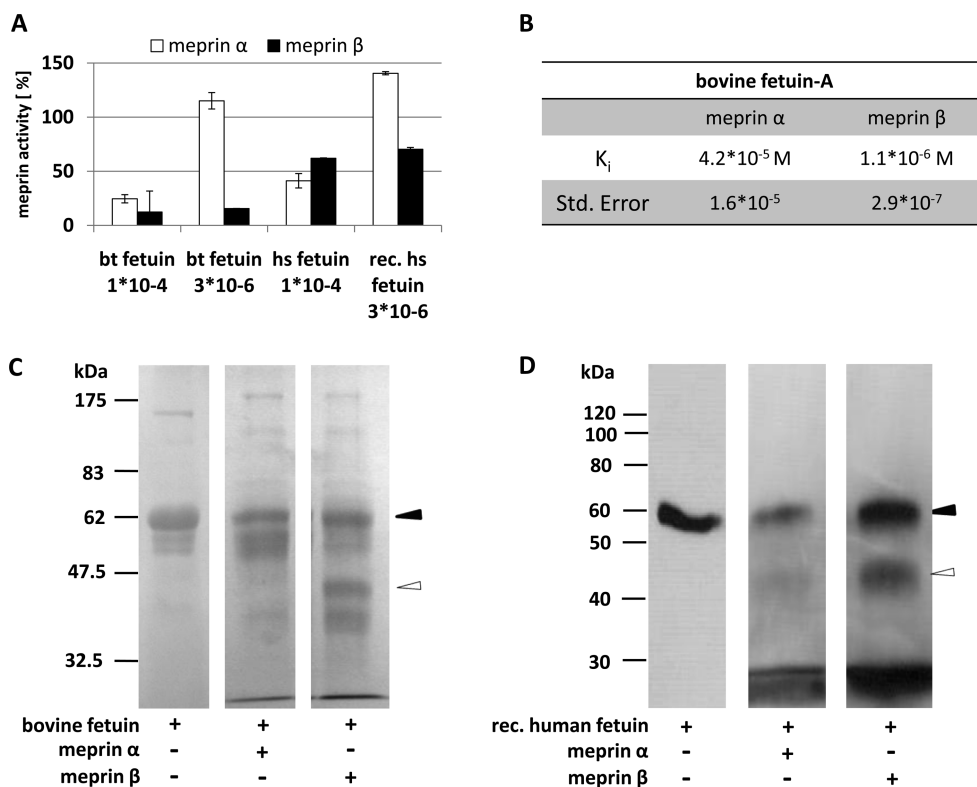


FIGURE 2: Inhibition of recombinant human meprin α and β by fetuin-A. (A) Recombinant activated meprin α or β (meprin α at 5×10^{-9} M or meprin β at 1×10^{-9} M) was incubated with different fetuin-A samples for 10 min and later tested for proteolytic activity with a meprin specific fluorogenic peptide substrate. Concentrations: purified bovine fetuin (bt fetuin), 1.0×10^{-4} or 3×10^{-6} M; purified human fetuin-A (hs fetuin), 1×10^{-4} M; recombinantly expressed human fetuin-A (rec. hs Fetuin), 3×10^{-6} M. Emission at 405 nm correlates with proteolytic activity. The enzyme activity without an inhibitor is 100%. The data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). (B) K_i values of bovine fetuin. Inhibitor profiles with bovine fetuin (concentration of 1×10^{-7} to 3.4×10^{-4} M) were assessed in determining inhibition constants (K_i). The K_i observed for meprin α was 4.2×10^{-5} M and for meprin β 1.1×10^{-6} M. (C and D) Proteolytic processing of bovine and human fetuin by meprin α and β . Bovine (C) or recombinant human fetuin-A (D) was incubated with active recombinant meprin α or β overnight at 37 °C. Proteins were separated by SDS-PAGE (10%). Bovine fetuin was stained with Coomassie brilliant blue, and human fetuin was visualized by Western blotting using the mouse anti-His antibody. The filled arrowheads denote the fetuin-A full-length protein, while the empty arrowheads denote the main processed fragment.

we performed activity assays with astacin metalloproteases from crayfish (*A. astacus*) and recombinant LAST and LAST_MAM from the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) (Figure 4B). At a fetuin-A concentration of 2×10^{-5} M, LAST and LAST_MAM exhibited 16 and 11% residual activity, respectively, while astacin exhibited a remaining proteolytic activity of 28%. In addition, we tested the inhibitory potential of bovine fetuin-A against trypsin and chymotrypsin, resulting in residual activities of 32 and 45%, respectively, as described previously (40). Both serine proteases are thought to be responsible for the processing of human fetuin-A to the mature form (30), a fact we could not observe for recombinant human fetuin-A (data not shown).

Fetuin from Carp (nephrosin inhibitor) Inhibits Astacin Metalloproteases. Recombinant nephrosin inhibitor from carp (1.5×10^{-6} M) revealed strong inhibitory potency against recombinant human meprin α and β (residual activities of 27 and 22%, respectively), much weaker inhibition of recombinant LAST and LAST_LAM (residual activities of 89 and 64%, respectively), but no inhibitory effect against crayfish astacin (residual activity of 112%) (Figure 4C). Comparable to that of fetuin-A, incubation of the recombinant nephrosin inhibitor (42 kDa) with recombinant meprin α and β revealed a truncated form of \sim 37 kDa, whereas astacin had almost no effect (Figure 4D). The nephrosin inhibitor precursor is expressed in the liver and is proteolytically processed in head kidney, kidney, and spleen to become an active inhibitor, comparable to the

human protein. The sequence of recombinant carp fetuin-A contains amino acids 17–282, representing the active form of carp fetuin described by Tsai (28).

Human Cystatin C Inhibits Recombinant Meprin α but Not Meprin β . We reasoned that the fetuin-A-related protein cystatin C, which is present at high concentrations in plasma, might be another potential endogenous meprin inhibitor. Indeed, an activity assay revealed cystatin C to be a potent meprin α inhibitor (Figure 5A) whereas meprin β was not inhibited. The K_i of 8.5×10^{-6} M for the inhibition of recombinant human meprin α by recombinant human cystatin C was calculated from kinetic data yielding cystatin C concentrations ranging from 4.1×10^{-9} to 4.1×10^{-5} M (Figure 5A,B). As a control experiment, the known inhibitory activity of recombinant cystatin C toward papain was verified (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we identified and characterized fetuin-A and cystatin C from human plasma as endogenous inhibitors of meprin metalloproteinases.

Isolation of Fetuin-A from Meprin Affinity Columns. Fetuin-A reversibly bound to affinity columns with immobilized recombinant human meprins. Fetuin-A antibodies detected a major proteolytically processed fetuin-A fragment, at 55 kDa, which corresponds to the processed fetuin-A (chain A). It is

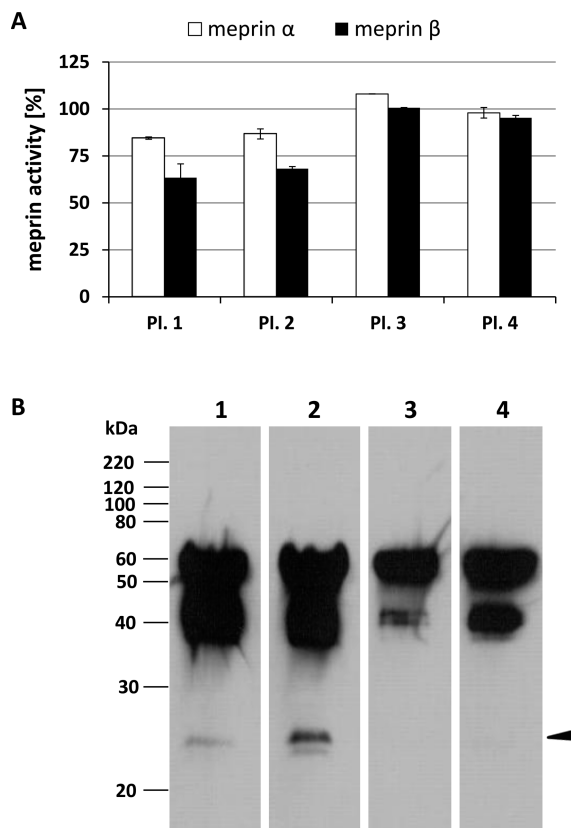


FIGURE 3: Plasma samples from patients exhibited strong differences in meprin inhibition and fetuin processing. (A) Recombinant active meprin α or β (each at 9.4×10^{-8} M) was incubated for 10 min with four different human plasma samples from patients suffering from various diseases (18% plasma). Afterward, samples were tested for azocasein cleaving activity corresponding to the optical density at 340 nm. The data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). The enzyme activity without plasma incubation is 100%. Diseases: plasma 1 (Pl. 1), cephalaea myalgica; plasma 2 (Pl. 2), psoriasis; plasma 3 (Pl. 3), alcoholic cirrhosis, renal failure, diabetes mellitus type 2, esophagusvarices bleeding, hepatic encephalopathy, and atrial fibrillation; plasma 4 (Pl. 4), morbus Crohn, pulmonary embolism, acute intestinal inflammatory disease, gastrointestinal bleeding, and hypertension. (B) Detection of fetuin-A in plasma samples. Plasma proteins from two healthy and two diseased persons, corresponding to panel A, were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane. Blots were probed with the rabbit anti-human fetuin-A antibody. Lane 1 contained plasma from a healthy subject (Figure 1A, plasma C). Lane 2 contained plasma from a healthy subject (Figure 1A, plasma A). Lane 3 contained plasma from a diseased subject (plasma 3). Lane 4 contained plasma from a diseased subject (plasma 4).

known that human fetuin-A with a theoretical mass of 39 kDa appears in a range of 60 kDa upon reduced SDS-PAGE, due to glycosylation. Subsequently, inhibition assays with fetuin-A from different sources (Figure 2A) and fetuin-A depletion (Figure 1C) confirmed the inhibitory potential against meprin α and β .

Inhibition Constants of Fetuin-A. Fetuin-A purified from bovine plasma, which is 62% identical to the human homologue, appeared to be a stronger inhibitor for recombinant meprin β ($K_i = 1.1 \times 10^{-6}$ M) than for recombinant meprin α ($K_i = 4.2 \times 10^{-5}$ M). Purified human fetuin-A revealed a reduced inhibitory efficiency for both meprins, while recombinant human fetuin-A (unprocessed one-chain form), at micromolar concentrations, exhibited an enhancing effect of meprin α activity. The reason might be due to the lack of processing of the recombinant fetuin.

The calculated K_i values for recombinant meprin α and meprin β with bovine fetuin-A were 4.2×10^{-5} and 1.1×10^{-6} M, respectively (Figure 2B). The K_i of meprin α is higher than that of meprin β , and this correlates with observations that fetuin-A at low concentrations leads to slightly increased meprin α activity. At an inhibitor concentration of 9×10^{-6} M, meprin α activity is 85% while it is at least 47% at a bovine fetuin-A concentration of 1.8×10^{-5} M. Although the inhibition capacity of human fetuin-A is weaker than that of the bovine homologue, the concentration in human adult plasma (1.02 – 2.54×10^{-5} M) (29) is striking in its physiological relevance for meprin inhibition.

Processing of Fetuin-A by Meprin. The observed difference in recombinant meprin α or β inhibition by plasma proteins is most likely due to the molecular variations within their active site clefts. Previously, we demonstrated the inhibitory capacity of several synthetic components with striking differences against human meprins, probably based on the accessibility of the active site (19).

A conceivable inhibition mechanism could be based on proteolytic cleavage of the inhibitor as a substrate with slow dissociation due to strong enzyme–product interaction. Indeed, incubation of fetuin-A with meprin β revealed proteolytic fragmentation (Figures 1B and 2C,D). Most likely, the protein fragment of 55 kDa of fetuin-A is the inhibiting protein, while the cleavage products observed after meprin incubation are not. It is remarkable that bovine as well as human recombinant fetuin-A exhibited strictly limited proteolysis even after 24 h, still exhibiting the 55 kDa fragment. Additionally, we observed proteolytic cleavage of the recombinant nephrosin inhibitor by recombinant meprin α and β , but not by crayfish astacin. Although only astacin was not affected by the inhibitor, it is still unclear whether proteolytic processing is essential for inhibition. Inhibiting cleavage and proteolytic cleavage by the free enzyme in parallel might be a result of reversible inhibition. Hence, several questions arise. (i) Is proteolytic cleavage of the inhibitor (Figures 1B and 2C,D) involved in the inhibition of meprin by fetuin? (ii) Is this processing due to the action of meprin itself or to other proteases (30)? (iii) Does it exhibit only the virgin inhibitor, only the processed inhibitor, or both inhibitory capacities? Further investigations are necessary, and the most promising approach would be the crystallization of an enzyme–inhibitor complex.

To determine if the reduced activity of meprins against azocasein in the presence of fetuin-A was caused by the presence of another substrate and not by inhibition, we analyzed gelatin, a known substrate (5), under the same conditions over a range of 32 h. Such an effect could be excluded (data not shown), which is further supported by the depletion of fetuin-A, which resulted in the loss of inhibitory capacity (Figure 1C).

Clinical Data. Plasma samples from four healthy subjects (two female and two male, 25–32 years old) compared to those from four patients revealed significant differences in inhibitory potency, which suggest complex and highly coordinated regulatory mechanisms, adapted to physiological and pathophysiological conditions.

It is known that meprins are involved in inflammatory diseases, like inflammatory bowel disease or Crohn's disease (16, 50), and in cancer progression (17). These proteases are directly in contact with plasma, because they are expressed in leukocytes and secreted by metastasizing cells. Hence, meprin inhibition by fetuin-A seems to be pathophysiological relevant. Results with fetuin-A deficient mice showed strongly increased or diminished tumor incidence and progression depending on the

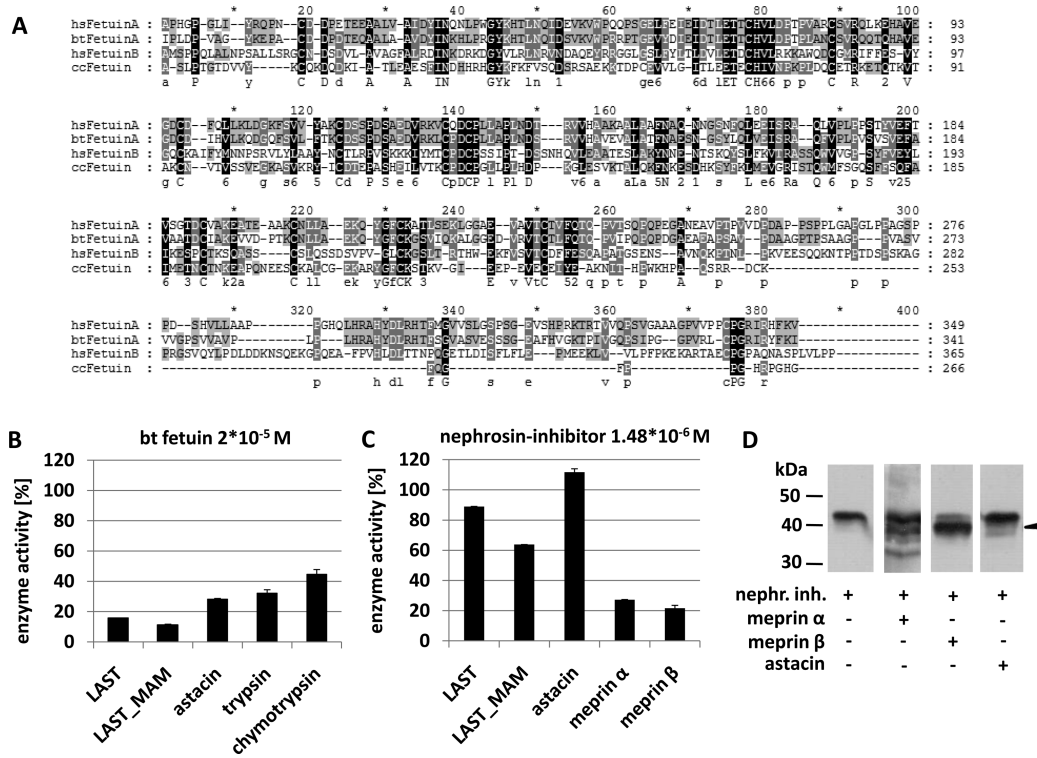


FIGURE 4: Multiple-amino acid sequence alignment of human, bovine, and carp fetuin-A and human fetuin-B. Protease inhibition by bovine and carp fetuin. (A) The sequence alignment was generated with ClustalX version 2.0 and edited with GeneDoc version 2.6.02. Species are noted at the left. Identical or similar residues in all sequences have a black background. A truncated sequence of carp fetuin-A is displayed, which was used for recombinant expression. Bovine fetuin-A shows a level of sequence identity with the human homologue of 62%, and levels of 24 and 23% with carp fetuin-A and human fetuin-B, respectively. (B) Astacin proteases (9.4×10^{-8} M) were incubated with purified bovine fetuin-A (2×10^{-5} M) for 10 min and were then tested for azocasein cleaving activity. Abbreviations: LAST, limulus astacin (B4F319); LAST_MAM, limulus astacin with the MAM domain (B4F320); astacin, crayfish astacin (P07584). Trypsin (P00761) and chymotrypsin (Q7M325) were from porcine pancreas. (C) Inhibition of astacin metalloproteases (each at 9.4×10^{-8} M) by the recombinant carp fetuin (1.5×10^{-6} M). Enzymes were incubated for 10 min with carp fetuin and then tested for azocasein degrading activity. Absorption of the azo dye at 340 nm correlates with proteolytic activity. All data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). The full enzyme activity without inhibitor is 100%. (D) Processing of the recombinant nephrosin inhibitor by astacin metalloproteases. The inhibitor ($1.5 \mu\text{M}$) was incubated with 13 nM enzyme at 37°C for 6 h. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and detected with an anti-strep tag antibody. The arrowhead denotes proteolytic fragments.

tumor model (51, 52). These results were partially attributed to different protease activities in the tumor stroma. In view of the novel findings presented here, the mouse models should be revisited with a strong emphasis on meprin activity. Intriguingly, the weakened inhibition capacity of plasma was present in two multimorbid patients (patients 3 and 4).

Differences in physiological fetuin-A processing were observed under pathological conditions (30). Western blot analysis of plasma samples from healthy controls and diseased patients confirmed a different concentration and band pattern of fetuin-A for the tested samples (Figure 3B). Different processing of fetuin-A might finally result in altered meprin inhibition. Deregulated meprin activity was observed in several inflammatory disorders, and further investigations are necessary to understand the correlation between fetuin-A processing and meprin regulation under pathological conditions.

Cystatin C Is an Inhibitor for Meprin α . Because fetuin-A was not efficient in inhibiting meprin α , in a physiological manner, further reactive components must exist in plasma. Therefore, cystatin C, another member of the cystatin superfamily of protease inhibitors (53), was positively identified as an additional inhibitor of meprin α ($K_i = 8.5 \times 10^{-6}$ M) but not for meprin β . These findings are further proof of variance in the inhibitor susceptibility of both meprins, subsequently revealing a different physiological regulation of both enzymes. Although the concentration of cystatin C in plasma (0.64–0.84 mg/L, $2.9\text{--}3.8 \times 10^{-8}$ M) and the

concentration in cerebrospinal fluid 5 times higher (27, 54) are not within the range of the inhibition constant, local aggregates may well influence meprin α activity under certain conditions (55).

The described inhibition mechanism of cystatin C depends on a tight complex in which a binding region of the polypeptide chain interacts with the proteinase active site cleft. Further studies showed that cystatin C binds to pig legumain without cleaving and even with a completely disrupted peptidase-binding site (23). Additional analysis of latexin, a structural homologue of cystatin and an endogenous inhibitor for metalloproteases, also revealed that strictly conserved reactive sites are not essential for inhibition effects (56). A different situation has been observed for inhibition of cathepsin B by cystatin C, which proceeds in two steps, involving an initial weak interaction followed by a conformational change (57). Therefore, the N-terminus of cystatin C is important, but not in all cases, as shown for the inhibition of ficin (58). The involvement of the N-terminus of chicken egg white cystatin was also described by Bode et al. (59). There, the inhibitor's N-terminus enters the active site cleft without any covalent interactions or proteolysis and substrate cleaving, resulting in inhibition. These findings indicate that the cystatin C inhibition mechanism may vary depending on the target protease.

Fetuin-A Is a Broad-Range Protease Inhibitor. Analyzing further astacin metalloproteases and serine proteases (Figure 4B)

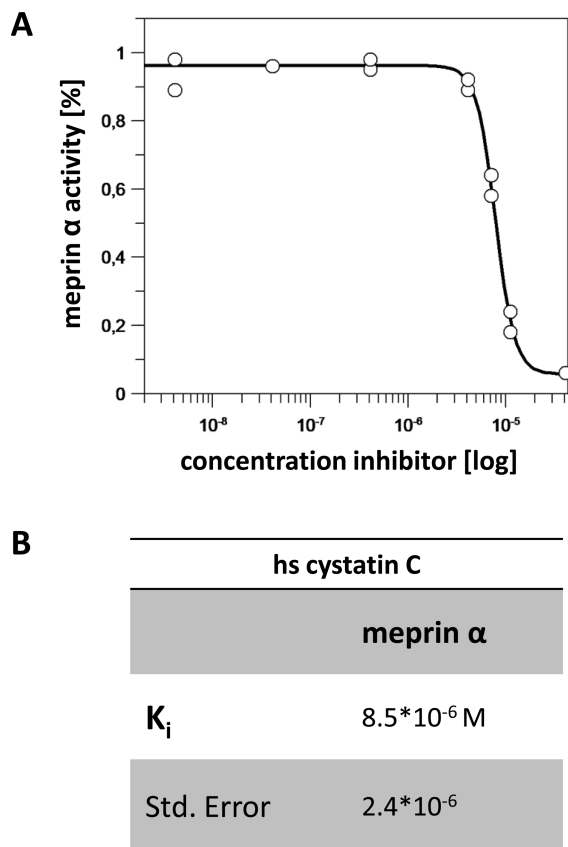


FIGURE 5: Inhibition of human meprin α by cystatin C. (A) Inhibitor profiles with recombinant human cystatin C using a meprin specific fluorogenic peptide substrate were performed. A meprin α inhibition kinetic with cystatin C concentrations from 4.1×10^{-9} to 4.1×10^{-5} M and a meprin α concentration of 5×10^{-9} M was calculated. Emission at 405 nm correlates to proteolytic activity. The enzyme activity without inhibitor is 100%. The log of inhibitor concentration is given on the x-axes. The data represent averages of two independent activity assays (\pm maximum/minimum). (B) The inhibitor constant ($9K_i$) for meprin α was calculated to be 8.5×10^{-6} M.

led to the assumption that fetuin-A might be a broad-range protease inhibitor. Trypsin and chymotrypsin are described in the literature as processors of fetuin-A in vitro (30), and fetuin-A is described as a trypsin inhibitor (39, 40). We could demonstrate that the recombinantly expressed nephrosin inhibitor from carp also inhibits several astacin proteases (Figure 4C). Recombinant meprin α and β were especially effectively inhibited (27 and 22% residual activity, respectively), while astacin and recombinant LAST were almost unaffected. Thus, fetuin-A has the general regulatory function of controlling proteolytic activity in plasma. This is important because the known broad-spectrum inhibitor α 2-macroglobulin does not inhibit human meprins. Because fetuin is known as a negative acute phase protein, involved in inflammatory diseases, further studies of fetuin-A regulation with regard to common protease activity are warranted.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Dirk Peetz from the clinical hospital in Mainz for providing us with plasma samples.

REFERENCES

- Bond, J. S., and Beynon, R. J. (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 4, 1247–1261.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B., and Bode, W. (1995) The metzincins: Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc peptidases. *Protein Sci.* 4, 823–840.
- Sterchi, E. E., Stocker, W., and Bond, J. S. (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 309–328.
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T., and Bond, J. S. (2003) Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteinases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* 278, 2522–2532.
- Becker, C., Kruse, M. N., Sloty, K. A., Kohler, D., Harris, J. R., Rosmann, S., Sterchi, E. E., and Stocker, W. (2003) Differences in the activation mechanism between the α and β subunits of human meprin. *Biol. Chem.* 384, 825–831.
- Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M. K., Leuenberger, B., Luginbuehl, U., and Sterchi, E. E. (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin β metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 278, 42829–42839.
- Banerjee, S., and Bond, J. S. (2008) Prointerleukin-18 is activated by meprin β in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J. Biol. Chem.* 283, 31371–31377.
- Oneda, B., Lods, N., Lottaz, D., Becker-Pauly, C., Stocker, W., Pippin, J., Huguenin, M., Ambort, D., Marti, H. P., and Sterchi, E. E. (2008) Metalloproteinase meprin β in rat kidney: Glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis. *PLoS One* 3, e2278.
- Becker-Pauly, C., Howel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E. E., Debela, M., Magdolen, V., Traupe, H., and Stocker, W. (2007) The α and β subunits of the metalloproteinase meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1115–1125.
- Lottaz, D., Hahn, D., Muller, S., Muller, C., and Sterchi, E. E. (1999) Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the α and β subunits. *Eur. J. Biochem.* 259, 496–504.
- Crisman, J. M., Zhang, B., Norman, L. P., and Bond, J. S. (2004) Deletion of the mouse meprin β metalloproteinase gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J. Immunol.* 172, 4510–4519.
- Huguenin, M., Muller, E. J., Trachsel-Rosmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E. E., and Lottaz, D. (2008) The metalloproteinase meprin β processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion. *PLoS One* 3, e2153.
- Bergin, D. A., Greene, C. M., Sterchi, E. E., Kenna, C., Geraghty, P., Belaouaj, A., Taggart, C. C., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2008) Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloproteinase pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 31736–31744.
- Herzog, C., Haun, R. S., Kaushal, V., Mayeux, P. R., Shah, S. V., and Kaushal, G. P. (2009) Meprin A and meprin α generate biologically functional IL-1 β from pro-IL-1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 904–908.
- Schütte, A., Hedrich, J., Stöcker, W., and Becker-Pauly, C. (2010) Let It Flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloproteinase Meprin α 2. *PLoS One* 5, No. e8835.
- Banerjee, S., Oneda, B., Yap, L. M., Jewell, D. P., Matters, G. L., Fitzpatrick, L. R., Seibold, F., Sterchi, E. E., Ahmad, T., Lottaz, D., and Bond, J. S. (2009) MEPIA allele for meprin A metalloproteinase is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* 2, 220–231.
- Lottaz, D., Maurer, C. A., Hahn, D., Buchler, M. W., and Sterchi, E. E. (1999) Nonpolarized secretion of human meprin α in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res.* 59, 1127–1133.
- Villa, J. P., Bertenshaw, G. P., and Bond, J. S. (2003) Critical amino acids in the active site of meprin metalloproteinases for substrate and peptide bond specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 42545–42550.
- Kruse, M. N., Becker, C., Lottaz, D., Kohler, D., Yiallourous, I., Krell, H. W., Sterchi, E. E., and Stocker, W. (2004) Human meprin α and β homo-oligomers: Cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloproteinase inhibitors. *Biochem. J.* 378, 383–389.
- Ohler, A., Debela, M., Wagner, S., Magdolen, V., and Becker-Pauly, C. (2010) Analyzing the protease web in skin: Meprin metalloproteinases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol. Chem.* 391, 455–460.
- Rosmann, S., Hahn, D., Lottaz, D., Kruse, M. N., Stocker, W., and Sterchi, E. E. (2002) Activation of human meprin- α in a cell culture

- model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J. Biol. Chem.* 277, 40650–40658.
22. Hirano, M., Ma, B. Y., Kawasaki, N., Okimura, K., Baba, M., Nakagawa, T., Miwa, K., Kawasaki, N., Oka, S., and Kawasaki, T. (2005) Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteinases mepirin α and β . *J. Immunol.* 175, 3177–3185.
23. Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., and Nathanson, C. M. (2003) Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, 179–199.
24. Brzin, J., Popovic, T., Turk, V., Borchart, U., and Machleidt, W. (1984) Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 103–109.
25. Barrett, A. J., Davies, M. E., and Grubb, A. (1984) The place of human γ -trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 631–636.
26. Abrahamson, M., Olafsson, I., Palsdottir, A., Ulvback, M., Lundwall, A., Jansson, O., and Grubb, A. (1990) Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem. J.* 268, 287–294.
27. Abrahamson, M., Barrett, A. J., Salvesen, G., and Grubb, A. (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 261, 11282–11289.
28. Tsai, P. L., Chen, C. H., Huang, C. J., Chou, C. M., and Chang, G. D. (2004) Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 279, 11146–11155.
29. Lee, C., Bongcam-Rudloff, E., Sollner, C., Jahnen-Dechent, W., and Claesson-Welsh, L. (2009) Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front. Biosci.* 14, 2911–2922.
30. Nawratil, P., Lenzen, S., Kellermann, J., Haupt, H., Schinke, T., Muller-Esterl, W., and Jahnen-Dechent, W. (1996) Limited proteolysis of human α 2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 31735–31741.
31. Terkelsen, O. B., Jahnen-Dechent, W., Nielsen, H., Moos, T., Fink, E., Nawratil, P., Muller-Esterl, W., and Mollgard, K. (1998) Rat fetuin: Distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anat. Embryol.* 197, 125–133.
32. Dziegielewska, K. M., Andersen, N. A., Lovell, D., Nicol, S. C., Muller-Esterl, W., and Saunders, N. R. (1992) Fetuin: A new acute phase protein in the adult and in the fetus. *Folia Histochem. Cytobiol.* 30, 187–189.
33. Lebreton, J. P., Joisel, F., Raoult, J. P., Lannuzel, B., Rogez, J. P., and Humbert, G. (1979) Serum concentration of human α 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: Evidence that α 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J. Clin. Invest.* 64, 1118–1129.
34. Wang, X. Q., Hayes, M. T., Kempf, M., Fraser, J. F., Liu, P. Y., Cuttle, L., Friend, L. R., Rothnagel, J. A., Saunders, N. A., and Kimble, R. M. (2008) Fetuin-A: A major fetal serum protein that promotes “wound closure” and scarless healing. *J. Invest. Dermatol.* 128, 753–757.
35. Schafer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T., and Jahnen-Dechent, W. (2003) The serum protein α 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* 112, 357–366.
36. Dziegielewska, K. M., Andersen, N. A., and Saunders, N. R. (1998) Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol. Lett.* 60, 31–35.
37. Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., Sama, A., and Tracey, K. J. (1998) Fetuin (α 2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14429–14434.
38. Srinivas, P. R., Wagner, A. S., Reddy, L. V., Deutsch, D. D., Leon, M. A., Goustin, A. S., and Grunberger, G. (1993) Serum α 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol. Endocrinol.* 7, 1445–1455.
39. Galembeck, F., and Cann, J. R. (1974) Fetuin as a trypsin inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 326–331.
40. Ashida, H., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2000) Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo- α -N-acetyl-galactosaminidase. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 64, 2266–2268.
41. Song, H. D., Sun, X. J., Deng, M., Zhang, G. W., Zhou, Y., Wu, X. Y., Sheng, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Jiang, C. L., Fan, H. Y., Zon, L. I., Kanki, J. P., Liu, T. X., Look, A. T., and Chen, Z. (2004) Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16240–16245.
42. Becker-Pauly, C., Bruns, B. C., Damm, O., Schutte, A., Hammouti, K., Burmester, T., and Stocker, W. (2009) News from an ancient world: Two novel astacin metalloproteinases from the horseshoe crab. *J. Mol. Biol.* 385, 236–248.
43. Stocker, W., Sauer, B., and Zwilling, R. (1991) Kinetics of nitroanilide cleavage by astacin. *Biol. Chem.* 372, 385–392.
44. Ketteler, M., Wanner, C., Metzger, T., Bongartz, P., Westenfeld, R., Gladziwa, U., Schurgers, L. J., Vermeer, C., Jahnen-Dechent, W., and Floege, J. (2003) Deficiencies of calcium-regulatory proteins in dialysis patients: A novel concept of cardiovascular calcification in uremia. *Kidney Int., Suppl.*, S84–S87.
45. Bieth, J. G. (1984) In vivo significance of kinetic constants of protein proteinase inhibitors. *Biochem. Med.* 32, 387–397.
46. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
47. Meier, U. C., Boetzel, J., Kellermann, J., Mann, K., Billich, A., Stocker, W., and Schramm, H. J. (1994) The cleavage of the bait region of α 2-macroglobulin by human immunodeficiency virus proteinases and by astacin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 737, 431–433.
48. Chau, P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2007) Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) cleaves human proapolipoprotein A1 and regulates its activation for lipid binding. *Biochemistry* 46, 8445–8450.
49. Zhang, Y., Ge, G., and Greenspan, D. S. (2006) Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 281, 39096–39104.
50. Bond, J. S., Matters, G. L., Banerjee, S., and Dusheck, R. E. (2005) Mepirin metalloproteinase expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett.* 579, 3317–3322.
51. Swallow, C. J., Partridge, E. A., Macmillan, J. C., Tajirian, T., DiGuglielmo, G. M., Hay, K., Szwera, M., Jahnen-Dechent, W., Wrana, J. L., Redston, M., Gallinger, S., and Dennis, J. W. (2004) α 2HS-glycoprotein, an antagonist of transforming growth factor beta in vivo, inhibits intestinal tumor progression. *Cancer Res.* 64, 6402–6409.
52. Kundranda, M. N., Henderson, M., Carter, K. J., Gorden, L., Binhabazim, A., Ray, S., Baptiste, T., Shokrani, M., Leite-Browning, M. L., Jahnen-Dechent, W., Matrisian, L. M., and Ochieng, J. (2005) The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer Res.* 65, 499–506.
53. Turk, V., Stoka, V., and Turk, D. (2008) Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front. Biosci.* 13, 5406–5420.
54. Galteau, M. M., Guyon, M., Gueguen, R., and Siest, G. (2001) Determination of serum cystatin C: Biological variation and reference values. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39, 850–857.
55. Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., and Jaskolski, M. (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol.* 8, 316–320.
56. Pallares, I., Bonet, R., Garcia-Castellanos, R., Ventura, S., Aviles, F. X., Vendrell, J., and Gomis-Ruth, F. X. (2005) Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3978–3983.
57. Nycander, M., Estrada, S., Mort, J. S., Abrahamson, M., and Bjork, I. (1998) Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett.* 422, 61–64.
58. Bjork, I., Pol, E., Raub-Segall, E., Abrahamson, M., Rowan, A. D., and Mort, J. S. (1994) Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. *Biochem. J.* 299 (Part 1), 219–225.
59. Bode, W., Engh, R., Musil, D., Laber, B., Stubbs, M., Huber, R., and Turk, V. (1990) Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction. *Biol. Chem.* 371 (Suppl.), 111–118.

8.3 Veröffentlichung 3: Regulation der Angiogenese durch die Metalloprotease Meprin α

Hedrich J., Nitzsche E., Jefferson T., Arnold P, Dejung M., Sterchi E., Bond J., Brieger J., Becker-Pauly C.;“ The Metalloprotease Meprin α cleaves the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) thereby releasing the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and enhancing angiogenesis.“ (Manuskript)

8.4 Veröffentlichung 4: Analyse von Meprin-Substraten und potentialen Meprin-Inhibitoren

Jefferson T., Auf dem Keller U., Bellac C., Metz V. V., Broder C., Hedrich J., Ohler A., Maier W., Magdolen V., Sterchi E., Bond J. S., Jayakumar A., Traupe H., Pietrzik C., Postina R., Overall C. M., Becker-Pauly C.; "From Proteomics to Biology: The Degradome of the Metalloproteases Meprin α and β at a glance: TAILS degradomics analysis reveals substrates, inhibitors, and a proteolytic cascade between Meprin β and ADAM10" (Manuskript)

8.5 Abkürzungen

AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
BM	Basalmembran
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bt. Fet	bovines Fetuin
C	C-terminale Domäne
CaCo-2	<i>epitheliale Caucasian Colon adenocarcinoma cells</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor rezeptor</i>
EZ	Endothelzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälber Serum
GE	sauerstoffarmes Gewebe
HaCat	<i>human adult low calcium high tempertaure keratinocytes</i>
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-ethansulfonsäure
hpf	<i>hours post fertilization</i>
hs	<i>homo sapiens</i>
hs Fet	humanes Fetuin
HSPG	<i>basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein</i>
HUVEC	<i>human umbilical vain endothelial cells</i>
I	<i>inserted Domäne</i>

IGF	Insulin-like growth factor
IL-8	Interleukin-8
kDa	kiloDalton
KLK	<i>kallikrein-related-peptidase</i>
LAST	<i>Limulus Astacin</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
MAM	<i>mepirin A5 protein tyrosin phosphatase μ</i>
MBP	<i>maltose binding protein</i>
Mepirin	<i>metallo-endopeptidase from renal tissue</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-Terminus	Aminotermius
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Perizyten
PRO	Propeptide
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
S	Signalpeptide
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TGFα	<i>transforming growth factor α</i>
TM	transmembrarn Domäne
TRAF	<i>tumor neccrosis factor receptor associated factor</i>
U373-Zellen	<i>glioblastoma-astrocytoma cells</i>
Ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
WF	Wachstumsfaktoren
X	beliebige Aminosäure

8.6 Symbole für Aminosäuren

Tab. 3: Einbuchstaben- und Dreibuchstabenkode der Aminosäuren mit ihrer molaren Masse und der Einteilung

Gruppen	Aminosäuren	Dreibuchstabencode	Einsbuchstabencode	molare Masse
unpolare, aliphatische Aminosäuren	Glycin	Gly	G	57
	Alanin	Ala	A	89
	Valin	Val	V	99
	Leucin	Leu	L	103
	Isoleucin	Ile	I	113
unpolare, ungeladene Aminosäuren	Phenylalanin	Phe	F	147
	Tyrosin	Try	Y	163
	Tryptophan	Trp	W	186
	Prolin	Pro	P	97
polare, ungeladene Aminosäuren	Serin	Ser	S	87
	Threonin	Thr	T	101
	Cystein	Cys	C	121
	Methionin	Met	M	131
	Asparagin	Asn	N	114
	Glutamin	Gln	O	128
positiv geladene Aminosäuren	Lysin	Lys	K	128
	Arginin	Arg	R	156
	Histidin	His	H	137
negativ geladene Aminosäuren	Aspartat	Asp	D	115
	Glutamat	Glu	E	129

Danksagung

DANKS.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Eltville, 07.11.2011 _____

Jana Hedrich