



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

FUNKTIONELLE UND STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG
DES OVASTACINS *IN VIVO* UND *IN VITRO*

Dissertation

zur Erlangung des Grades ‚Doktor der Naturwissenschaften‘

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von André Hildebrand
geboren am 16.01.1979 in München
Mainz, März 2013

Gutachter:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2013

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Proteasen.....	2
2.2	Serinproteasen.....	4
2.2.1	Elastase	5
2.2.2	Trypsin	6
2.3	Metalloproteasen.....	7
2.3.1	MMPs.....	7
2.3.2	Astacine	9
2.3.3	Ovastacin	10
2.4	Inhibitoren	13
2.4.1	Fetuline	13
2.5	Oogenese und Reifung der Eizellen	14
2.5.1	Aufbau der Oocyten und Spermien	15
2.5.2	Fertilisation von Oocyten.....	16
2.5.3	Embryonalentwicklung von <i>Mus musculus</i>	17
2.6	Ziele der Arbeit.....	18
3.	Material und Methoden	19
3.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	19
3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.4	Restriktion	23
3.5	Ligation	24
3.6	Transformation - Einschleusung fremder DNA in Bakterien.....	25
3.7	Eukaryotische Zellkultur	27
3.7.1	Baculovirus-Expressionssystem.....	27
3.7.2	Sf9-Zellen.....	30
3.7.3	<i>HighFive</i> -Zellen	30
3.7.4	<i>CHO</i> -Zellen zur Expression von Pro-Ovastacin-Strep	31
3.7.5	<i>HEK-293</i> -Zellen zur Expression von Pro-Ovastacin-Strep.....	32
3.7.6	Transfektion	32
3.8	Antikörperherstellung	33
3.9	Ermittlung der Proteinkonzentration	34
3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.11	Western-Blot (<i>Semi-dry</i> Verfahren)	36

INHALTSVERZEICHNIS

3.12	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Chemilumineszenz	37
3.13	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.14	Zymographie-Gelelektrophorese	42
3.15	Native Zymographie-Gelelektrophorese	42
3.16	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	42
3.17	Reinigung	44
3.17.1	Ammoniumsulfat-Fällung	44
3.17.2	Dialyse	44
3.17.3	Affinitätschromatographie über Strep-Tactin	44
3.17.4	Gelchromatographie über Hema Bio 1000	45
3.18	Herstellen von Zelllysaten	46
3.19	Herstellung von Organlysaten	47
3.20	Limitierte Proteolyse	48
3.21	FRET-Assay	49
3.22	pH Abhängigkeit der Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep	51
3.23	Sequenz-Alignments und Modellierung von Pro-Ovastacin	52
3.24	Superovulation von Mäuseeizellen	52
3.25	Präparation der Eileiter aus <i>FVB</i> Mäusen	52
3.26	Entnahme der Zygoten	53
3.27	Vorbereitung der Zygoten für die Kultivierung	54
3.28	<i>In vitro</i> -Kultivierung der Zygoten	55
3.29	Immunhistochemischer Antikörpertest mit <i>Sf9</i> -Zellen	55
3.30	Antikörperbehandlung und Fixierung von Embryonen	56
3.31	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	58
4.	Ergebnisse	59
4.1	Herstellung der DNA-Konstrukte für die Expression	59
4.1.1	Ovastacin-Strep	59
4.1.2	Ovastacin-Kat-Strep	62
4.1.3	Zusammenfassung der Klonierung der 3 Ovastacin-Varianten	65
4.2	Nachweis der Ovastacin mRNA in <i>HUVEC</i> Zellen	65
4.3	Herstellung eines polyklonalen Anti-Pro-Ovastacin Antiserums	67
4.4	Expression und Reinigung von Ovastacin-Strep	67
4.5	Expression und Reinigung von Ovastacin-Kat-Strep	69
4.6	Expression und Reinigung von Pro-Ovastacin-Strep	71
4.7	Massenspektrometrische Analyse und N-terminale Sequenzierung	73
4.8	Untersuchung der Oligomerisierung von Pro-Ovastacin	74
4.9	Stabilität des Pro-Ovastacins in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur	77

INHALTSVERZEICHNIS

4.10	Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep.....	81
4.10.1	Sequenzalignment und Homologiemodellierung zur Identifizierung der potenziellen Aktivierungsschnittstelle des Pro-Ovastacins.....	81
4.10.2	Aktivierung von Pro-Ovastacin mit MMP-2	86
4.10.3	Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep mit Trypsin	87
4.10.4	Aktivierung von Pro-Ovastacin mit neutrophiler Elastase	89
4.10.5	Interaktion von Pro-Ovastacin mit Proteaseninhibitoren	94
4.10.6	Massenspektrometrische Analyse und N-terminale Sequenzierung des aktivierten Ovastacins.....	95
4.11	Nachweis von Ovastacin in Geweben	96
4.12	Expression von Pro-Ovastacin in <i>Cho-K1</i> -Zellen.....	97
4.13	Nachweis von Ovastacin in Embryonen	98
4.13.1	Immundetektion von Ovastacin in Embryonen mit dem Anti-Propeptid-Antiserum	99
4.13.2	Immundetektion von Ovastacin in Embryonen mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper.....	101
5.	Diskussion	104
6.	Ausblick	113
7.	Literaturverzeichnis	114
8.	Anhang:	125
8.1	Abkürzungsverzeichnis:	125
8.2	Vektorkarten.....	128
8.3	Verwendete Marker	129
8.5	Ergebnisse der Sequenzierung	130
8.5	Alignment <i>Humanes</i> und <i>Murides</i> Ovastacin.....	132
8.6	Sequenzen der Ovastacin-Varianten.....	133
8.6.1	Die Sequenz von Pro-Ovastacin-Strep	133
8.6.2	Die Sequenz von Ovastacin-Strep (1183 bp)	134
8.6.3	Die Sequenz von Ovastacin-Kat-Strep (732 bp)	135
8.7	Symbole für Aminosäuren	136
9.	Curriculum Vitae	137
10.	Danksagung	139
11.	Eidesstattliche Erklärung	140

Abbildungverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Systematik der Proteasen.....	3
Abbildung 2: Mechanismus der Spaltung einer Peptidbindung durch eine Serinprotease....	4
Abbildung 3: Modell der Kristallstruktur der katalytischen Domäne der humanen neutrophilen Elastase.	6
Abbildung 4: Modell der Kristallstruktur von Pro-MMP-2.....	8
Abbildung 5: Modell des katalytischen Zentrums des Astacins (<i>Astacus astacus</i>).....	10
Abbildung 6: Domänenstruktur von Ovastacin.	11
Abbildung 7: Computerbasiertes Homologie-Modell der Protease-Domäne des Ovastacins (<i>Mus musculus</i>).	11
Abbildung 8: Schematische Entwicklung des Wirbeltier-Embryos beginnend mit der Ovulation bis zur Implantation.....	15
Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Oocyte (A) und eines Spermiums (B).	16
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Baculovirus-Expressionssystems.	29
Abbildung 11: Aufbau eines Western-Blots im <i>Semi-dry</i> Verfahren.	37
Abbildung 12: Wechselwirkung einer Immunodetektion mittels Chemilumineszenz.	38
Abbildung 13: Präparation der Zygoten.	53
Abbildung 14: Herstellung der aktiven Ovastacin-Variante Ovastacin-Strep aus dem <i>full-length</i> Ovastacin-Strep.	60
Abbildung 15: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der PCR 1 zur Herstellung von Ovastacin-Strep.	60
Abbildung 16: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der Arbeitsschritte zur Herstellung von Ovastacin-Strep Bacmiden.	61
Abbildung 17: Herstellung der aktiven Ovastacin-Variante Ovastacin-Kat-Strep aus Ovastacin-Strep.	63
Abbildung 18: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der PCR3 zur Herstellung des Ovastacin-Kat-Strep Klons.	64
Abbildung 19: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der Arbeitsschritte zur Herstellung von Ovastacin-Kat-Strep.	64
Abbildung 20: 1%iges analytisches Agarosegel als Gesamtübersicht der durchgeführten PCRs zur Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten.	65
Abbildung 21: 1%iges analytisches Agarosegel zur Überprüfung der <i>Huvec</i> -PCR.	66
Abbildung 22: Western-Blot zur Überprüfung des Pro-Anti-Pro-Ovastacin-Antiserums hinsichtlich Kreuzreaktion mit verwandten Proteinen.	67
Abbildung 23: Immunodetektion von Ovastacin-Strep in <i>Sf9</i> -Zellen.....	68

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 24: Western-Blot zur Überprüfung der Expression von Ovastacin-Strep in <i>HighFive</i> -Zellen.	68
Abbildung 25: Immunedektion von Ovastacin-Kat-Strep in <i>Sf9</i> -Zellen.	69
Abbildung 26: Western-Blot zur Überprüfung der Expression und Reinigung von Ovastacin-Kat-Strep in <i>HighFive</i> -Zellen.	70
Abbildung 27: Immunedektion von Pro-Ovastacin in <i>Sf9</i> -Zellen.	71
Abbildung 28: Elutionsprofil und Western-Blot zur Überprüfung der Expression von Pro-Ovastacin-Strep in <i>HighFive</i> -Zellen.	72
Abbildung 29: Western-Blot zur Überprüfung der Reinigung bei pH 8,0 im Vergleich zu pH 7,3.	72
Abbildung 30: Acrylamidgele zur Analyse der Oligomerisierung von Ovastacin.	74
Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von gereinigtem Pro-Ovastacin.	75
Abbildung 32: Gelfiltration von Pro-Ovastacin-Strep und Größenbestimmung.	76
Abbildung 33: Western-Blot zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration.	77
Abbildung 34: Western-Blot zur Überprüfung der Stabilität von Pro-Ovastacin.	78
Abbildung 35: Western-Blots zur Überprüfung der Stabilität von Pro-Ovastacin-Strep.	78
Abbildung 36: Western-Blot zur Überprüfung der pH-Stabilität von Ovastacin-Strep.	79
Abbildung 37: Western-Blot zur Überprüfung einer Zeitreihe der pH-Stabilität von Ovastacin-Strep bei 37°C.	80
Abbildung 38: pH-Abhängige Aktivierung des Pro-Ovastacins.	80
Abbildung 39: Alignment der Aminosäuresequenzen von Pro-Ovastacin (<i>Mus musculus</i>) mit Pro-Astacin (<i>Astacus astacus</i>).	82
Abbildung 40: Modell der katalytischen Domäne und der Prodomäne des Ovastacins im Vergleich zur Kristallstruktur des Pro-Astacins.	83
Abbildung 41: Homologie-Modell der katalytischen Domäne und der Prodomäne des Pro-Ovastacins.	83
Abbildung 42: Modell der Kristallstruktur des Pro-Astacins mit der Aktivierungsschnittstelle (AR/VGA).	84
Abbildung 43: Modell der Aktivierungsschnittstelle (FR/LLSVT) des Pro-Ovastacins.	85
Abbildung 44: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch humanes MMP-2.	86
Abbildung 45: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch humanes MMP-2.	87
Abbildung 46: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch Trypsin.	88
Abbildung 47: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin-Strep nach Inkubation mit Trypsin.	89

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 48: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch neutrophile Elastase.	90
Abbildung 49: Coomassie-Gel zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch neutrophile Elastase.	90
Abbildung 50: Vergleich zwischen reduzierten und nicht reduzierten Ovastacin Proben.....	91
Abbildung 51: Native Casein Zymographie.....	91
Abbildung 52: Substrattest von Pro-Ovastacin aktiviert mit Elastase.	92
Abbildung 53: Inhibitionstest von Elastase-aktiviertem Ovastacin.....	94
Abbildung 54: Inhibitionstest von aktiviertem Pro-Ovastacin-Strep.	95
Abbildung 55: Western-Blot zur Immundetektion der Expression von Ovastacin in Gewebelysaten in FVB-Mäusen.....	96
Abbildung 56: Western-Blot zur Immundetektion der Expression von Ovastacin im Zellmedium von <i>CHO-K1</i> Zellen.	97
Abbildung 57: Western-Blot zur Detektion von Ovastacin in FVB-Embryonen.	98
Abbildung 58: Immundetektion von Ovastacin in 2-Zell Mausembryonen.	99
Abbildung 59: Immundetektion von Pro-Ovastacin in Mausembryonen.	100
Abbildung 60: Immundetektion von Pro-Ovastacin in Mausembryonen.	101
Abbildung 61: Immundetektion von Ovastacin in Mausembryonen.	102
Abbildung 62: Immundetektion von Ovastacin in einem Mausembryo.	103
Abbildung 63: Vektorkarte des pGEM®-T-Vektors.....	128
Abbildung 64: Vektorkarte des pFASTBac1.....	128
Abbildung 65: Verwendete DNA-Marker.....	129
Abbildung 66: Verwendete Protein-Marker.	129
Abbildung 67: Ergebnis der Sequenzierung des verwendeten Ovastacin-Strep.....	131
Abbildung 68: Ergebnis der Sequenzierung des verwendeten Ovastacin-Kat-Strep	132
Abbildung 69: Alignment von <i>Muriden</i> Pro-Ovastacin und <i>Humanem</i> Pro-Ovastacin	132
Abbildung 70: Sequenz von Pro-Ovastacin-Strep.....	133
Abbildung 71: Sequenz von Ovastacin-Strep.	134
Abbildung 72: Sequenz von Ovastacin-Kat-Strep.....	135

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze	20
Tabelle 2: PCR-Programm zur Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten.....	20
Tabelle 3: <i>Primer</i> -Sequenzen für das Erstellen der aktiven Ovastacin Varianten.....	21
Tabelle 4: <i>Primer</i> -Sequenzen für die Bacmid-PCR.....	21
Tabelle 5: <i>Primer</i> -Sequenzen für die <i>Huvec</i> -PCR.....	22
Tabelle 6: Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese.....	22
Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Restriktionssequenz	23
Tabelle 8: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.....	23
Tabelle 9: Ligationsansatz für die Ligation in pGem-T und pFastBac	24
Tabelle 10: Verwendetes Material zur Bakterienkultivierung.....	25
Tabelle 11: Kulturmedium für die Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen.....	30
Tabelle 12: Kulturmedium für die Kultivierung von <i>HighFive</i> -Zellen	31
Tabelle 13: Medien zur Kultivierung von <i>CHO-X1</i> und <i>HEK-293</i> Zellen.....	32
Tabelle 14: Benötigte Formeln zur Berechnung der Massenkonzentration	34
Tabelle 15: Gebrauchslösungen für die reduzierende SDS-Gelelektrophorese	35
Tabelle 16: Pipettierschema für zwei 12%ige SDS-PAGE-Gele	36
Tabelle 17: Materialien und Lösungen zur Durchführung eines Western-Blots	36
Tabelle 18: Ponceaurot-Färbelösung.....	37
Tabelle 19: Verwendete Antikörper für die Immundetektion mittels Chemilumineszenz.....	39
Tabelle 20: Verwendete Lösungen und Materialien für die Immundetektion mittels Chemilumineszenz	40
Tabelle 21: Zusammensetzung des <i>Stripping-Puffers</i>	41
Tabelle 22: Gebrauchslösungen für eine native Gelelektrophorese.....	41
Tabelle 23: Puffer für eine Zymographie-Gelelektrophorese.....	42
Tabelle 24: Zusammensetzung der hintergrundfrei färbenden Coomassie-Lösung und der TCA-Lösung	43
Tabelle 25: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung und Entfärber nach Kang.....	43
Tabelle 26: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung für die Strep-Tactin- Affinitätschromatographie.....	45
Tabelle 27: Verwendete Eichproteine für den Eichlauf der Gelfiltration mit zugehörigen Molekulargewicht	46
Tabelle 28: Für die Zellyse verwendete Puffer und deren Zusammensetzung	47
Tabelle 29: Lysispuffer zur Herstellung der Organlysate.....	47
Tabelle 30: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit Elastase.....	48
Tabelle 31: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit Trypsin.....	48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 32: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit MMP-2.....	48
Tabelle 33: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin mit Elastase	49
Tabelle 34: Inhibitionsversuch von aktiviertem Ovastacin durch Fetuin B	50
Tabelle 35: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin mit Trypsin	50
Tabelle 36: pH-Abhängigkeit der Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep	51
Tabelle 37: Aktivitätsmessung von Pro-Ovastacin	51
Tabelle 38: Zeittafel der verschiedenen Zellstadien bei <i>Mus musculus</i> bei der Entwicklung.	55
Tabelle 39: Puffer, die für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wurden	57
Tabelle 40: Massenspektroskopie von Pro-Ovastacin-Strep.....	73
Tabelle 41: Verwendete Substrate für den FRET-Assay.....	93
Tabelle 42: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der 38 kDa Bande.	96
Tabelle 43: Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	136

VORWORT

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Stöcker am Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt. Die erzielten Ergebnisse sind in zwei Manuskripte und in eine Erfindungsmeldung eingeflossen.

Dietzel E., Wessling J., Floehr J., Schäfer C., Ensslen S., Denecke B., Rösing B., Neulen J., Veitinger T., Spehr M., Tropartz T., Tolba R., Renné T., Egert A., Schorle H., Gottenbusch Y., Hildebrand A., Yiallourous I., Stöcker W., Weißkirchen, R., Jahnen-Dechent W. (2012) *“Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein is Essential for Fertilization”*, akzeptiert zur Veröffentlichung bei *Developmental Cell*

Hildebrand A., Karmilin K., Gottenbusch Y., Friedrich S., Yiallourous I., Stöcker W.; *“Activation of Ovastacin”*, in Vorbereitung.

Erfindungsmeldung: „Fetuin B zur Steuerung der Oocyten Fruchtbarkeit“ (2012).

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloprotease Ovastacin, ein Vertreter der Astacin-Familie, wurde erstmals 2004 beschrieben. Im Ovar von Säugetieren ist Ovastacin-mRNA im Zeitfenster vom Stadium der Sekundärfollikel bis kurz nach der Befruchtung der Eizelle zu finden. Der Expressionsort und -zeitpunkt sowie die Sequenzähnlichkeit von über 60% mit sogenannten „Schlüpfenzymen“ (engl. *hatching enzymes*), die man in den Eizellen und Zygoten niederer Wirbeltiere und Wirbelloser gefunden hatte, ließen die Vermutung aufkommen, es könnte sich hier um das Säugerhomolog dieser Proteasen handeln. Generell lösen *hatching* Enzyme die derben embryonalen Hüllstrukturen (bei Säugern die *Zona pellucida*, ZP) beim Schlüpfvorgang auf. Die essentielle Bedeutung des Ovastacins für die Befruchtung wird durch die um ca. 30% reduzierte Fruchtbarkeit von Ovastacin defizienten Mäusen belegt. Hochinteressant war in diesem Zusammenhang die Entdeckung des Ovastacins in den Cortikalgranula der Oocyten sowie seine Fähigkeit, das *Zona pellucida* Protein 2 zu schneiden. Die dadurch bewirkte Verhärtung der *Zona pellucida* verhindert das Eindringen weiterer Spermien, das heißt sie baut eine Barriere gegen Polyspermie auf.

Ziel dieser Arbeit war es, Belege für die physiologische Funktion des Ovastacins zu finden. Vor allem galt es, potentielle Aktivatoren zu identifizieren, da das Enzym wie alle Astacine als inaktive Vorstufe gebildet wird, die proteolytisch aktiviert werden muss. Zu diesem Zweck exprimierte ich rekombinantes Pro-Ovastacin in Insektenzellen. Aktivierungsstudien *in vitro* zeigten, dass ein saures Milieu zu einer Aktivierung führt, ohne die Abspaltung des Propeptids zu bewirken. Sequenzalignments und ein homologes Strukturmodell des Ovastacins wiesen auf Trypsin- oder Elastase-ähnliche Serinproteasen als potentielle Aktivierungsenzyme hin. Tatsächlich konnte mit diesen beiden Proteasetypen zum ersten Mal aktives Ovastacin aus Pro-Ovastacin erzeugt werden. Trypsin kommt als physiologischer Aktivator allerdings nicht in Betracht, da es bisher in keinem der Gewebe nachgewiesen werden konnte, in dem Ovastacin exprimiert wird. Die neutrophile Elastase dagegen konnte in der Leber, im Herz sowie im Blutplasma nachgewiesen werden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnte das Herz als Expressionsort für Ovastacin bestätigt werden. Somit wäre Elastase ein potentieller physiologischer Aktivator von Ovastacin. Die Identifikation des Ovastacins in Geweben wie Leber, Herz, Nabelschnur und im Blutplasma weist auf eine Rolle der Protease in proteolytischen Netzwerken außerhalb der Spermien-Ei-Interaktion hin. Die Bedeutung der biologischen Kontrolle des Ovastacins bei der Befruchtung der Säugereizelle wird durch die Beobachtung untermauert, dass das Leberprotein Fetuin B als physiologischer Ovastacininhibitor fungiert und dadurch eine vorzeitige Verhärtung der *Zona pellucida* verhindert, die andernfalls die Penetration von Spermien prinzipiell verhindern würde.

2. EINLEITUNG

2.1 Proteasen

Die hydrolytische Wirkung von Proteasen bei der Eiweißverdauung ist hinreichend bekannt, weniger jedoch ihre Fähigkeit, durch limitierte Proteolyse die Aktivität anderer Proteine spezifisch zu regulieren und dadurch physiologische Prozesse zu steuern. Beispiele hierfür sind die Blutgerinnungskaskade (Munk 2011) oder die Aktivierung der Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin (Neurath und Dixon 1957). Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms konnten im Menschen 578 und in der Maus 664 verschiedene Proteasen identifiziert werden (Ordonez et al. 2009). Sie machen 2% der Gene des menschlichen Genoms aus.

Eine grobe Einteilung erfolgt nach Wirkungsort der Protease, so unterscheidet man zwischen intrazellulären und extrazellulären Proteasen (Overall und Blobel 2007). Proteasen sind funktionell extrem vielseitig. Extrazelluläre Proteasen kommen unter anderem im Verdauungstrakt (z.B. Pepsin im Magen) oder im Blut (Thrombin zur Blutgerinnung) vor. Intrazelluläre Proteasen sind beispielsweise für den Abbau nicht mehr benötigter Proteine (Cathepsine im Lysosom) oder für die Abtrennung des Signalpeptids (Signalpeptidasen) verantwortlich. Je nachdem an welcher Stelle sie ein Protein schneiden, bezeichnet man sie als Endopeptidasen oder als Exopeptidasen. Endopeptidasen schneiden ein Protein innerhalb der Peptidkette, Exopeptidasen schneiden dagegen am N- (Aminopeptidasen) oder C-Terminus (Carboxypeptidasen). Proteasen werden weiterhin anhand ihres Katalysemechanismus in fünf Hauptgruppen unterteilt: Aspartat-, Thiol-, Cystein-, Metallo- und Serinproteasen (siehe Abbildung 1) (Barrett 2001; Rawlings und Salvesen 2012). Diese Hauptgruppen spalten sich weiter in zahlreiche Familien und Unterfamilien auf. Im Folgenden wird auf zwei Familien aus der Proteinsuperfamilie der Metzinkine näher eingegangen, die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und die Astacine. Die Astacinprotease Ovastacin steht im Fokus dieser Arbeit. Auch die Serinproteasen und deren von den Metalloproteasen abweichendes katalytisches Zentrum werden kurz erläutert, weil sie im proteolytischen Netzwerk der Ovastacinregulation eingebunden sind.

EINLEITUNG

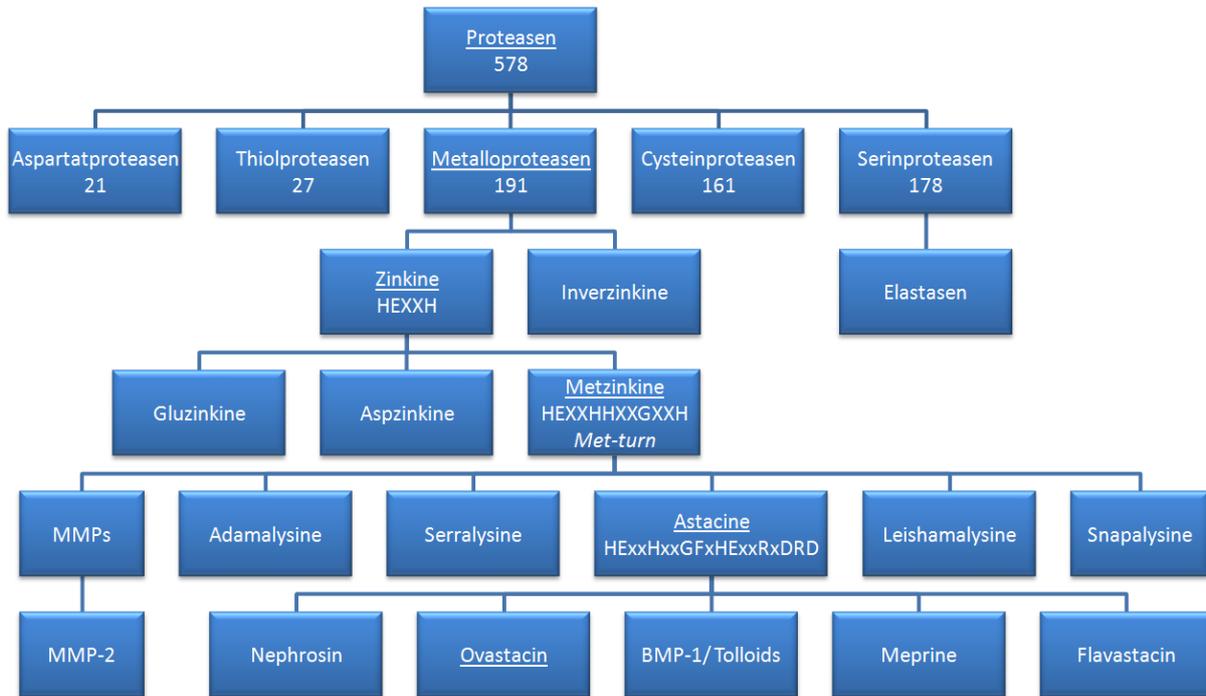


Abbildung 1: Überblick über die Systematik der Proteasen.

Die Metalloprotease Ovastacin ist ein Mitglied der Astacin-Familie und bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Anzahl der identifizierten Proteasen bezieht sich auf den Menschen. Die in dieser Arbeit behandelte Serinprotease Elastase und die Metalloprotease MMP-2 sind ebenfalls eingeordnet (Gomis-Rüth 2003).

2.2 Serinproteasen

Wie auch bei anderen Enzymgruppen ist ein charakteristisches Merkmal des aktiven Zentrums hier namensgebend. Dieses besteht bei Serinproteasen aus einer konservierten katalytischen Triade. Diese katalytische Triade enthält einen aktiven Serinrest, der entscheidend für den katalytischen Mechanismus ist (Berg 2005). Zudem gehören die Aminosäuren Aspartat und Histidin zur katalytischen Triade. Das Aspartat stabilisiert die Ladung des Histidins, so dass dieses die Hydroxylgruppe des Serins polarisieren und sich für den nukleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung des Substrates positionieren kann (siehe Abbildung 2). Bei der Reaktion wird ein Wassermolekül zur Peptidspaltung deprotoniert. Die Substratspezifität der Serinproteasen wird durch die Eigenschaften der Aminosäurereste und des Peptidrückgrats im Substraterkennungsbereich des aktiven Zentrums festgelegt. Bei Serinproteasen ist vor allem die erste Position, die S1-Tasche von Bedeutung. Dadurch kommt es zu einer hohen Substratspezifität innerhalb der Serinproteasen.

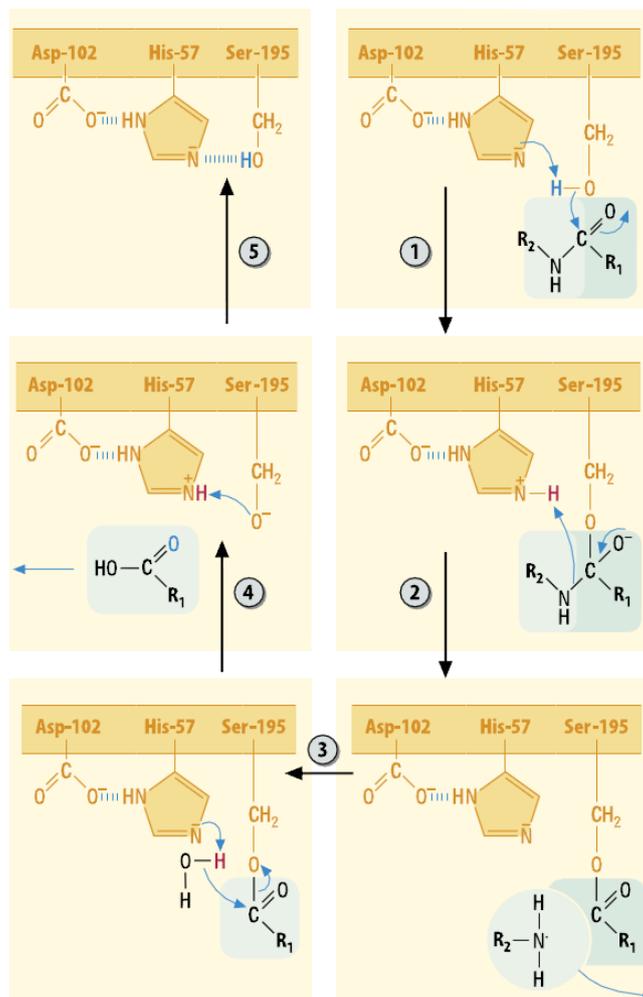


Abbildung 2: Mechanismus der Spaltung einer Peptidbindung durch eine Serinprotease.

Durch einen nukleophilen Angriff des nukleophilen Serins 195 auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung wird die Peptidspaltung eingeleitet (1). Es bildet sich aus dem Übergangszustand durch Deprotonierung des Histidins 57 ein Acetyl-Enzym Zwischenprodukt (2). Die Regeneration erfolgt durch die Deprotonierung eines Wassermoleküls (3) und das Anfügen der Hydroxylgruppe (4) an den Carbonylkohlenstoff (Löffler 2008).

2.2.1 Elastase

Die Serinprotease Elastase besitzt unter anderem die Fähigkeit, das körpereigene Bindegewebsprotein Elastin zu schneiden. Neben der neutrophilen Elastase, die im Knochenmark exprimiert wird, gibt es noch die pankreatische Elastase, die vom azinären Pankreas sezerniert wird. Im Unterschied zu der anderen großen Gruppe der Strukturproteine, den Kollagenen, ist Elastin dehnbar. Die Quervernetzung von Elastin erfolgt über Lysinreste, die wie im Desmosin verknüpft sind. Aufgrund seiner Elastizität vermittelnden Eigenschaften ist Elastin besonders in der Lunge, der Haut, sowie in Blutgefäßen sehr häufig zu finden. Während die pankreatische Elastase der Eiweißverdauung dient, ist die neutrophile Elastase besonders bei der Immunabwehr wichtig (Eggers et al. 2004). Sie ist ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Elastase besitzt die familientypische katalytische Triade mit dem reaktiven Serinrest (Abbildung 3). Die im Rahmen dieser Arbeit relevante humane neutrophile Elastase wird als inaktive Pro-Elastase sezerniert und besteht fast nur aus der Protease-Domäne mit einer Länge von 238 Aminosäuren und einem kurzen aminoterminalen Propeptid. Das Propeptid besteht lediglich aus zwei Aminosäuren. Elastase ist unter sauren Bedingungen in der Proform relativ stabil. Sie wird durch einen neutralen bis leicht alkalischen pH-Wert autokatalytisch aktiviert. Neutrophile Elastase schneidet bevorzugt nach einem Valin in P1 Position (Harris et al. 2000). Dabei steht P1 für die Aminosäure nach der die Spaltung erfolgt. Folglich steht P1' für den neuen N-Terminus (Schechter und Berger 1967). Inhibiert werden kann Elastase durch typische synthetische Serinproteaseninhibitoren wie PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Gold und Fahrney 1964). Als natürliche Regulatoren der Elastaseaktivität wirken die Serumproteine α_1 -Antitrypsin (Enewold et al. 2012) und α_2 -Makroglobulin (Abe et al. 1989).

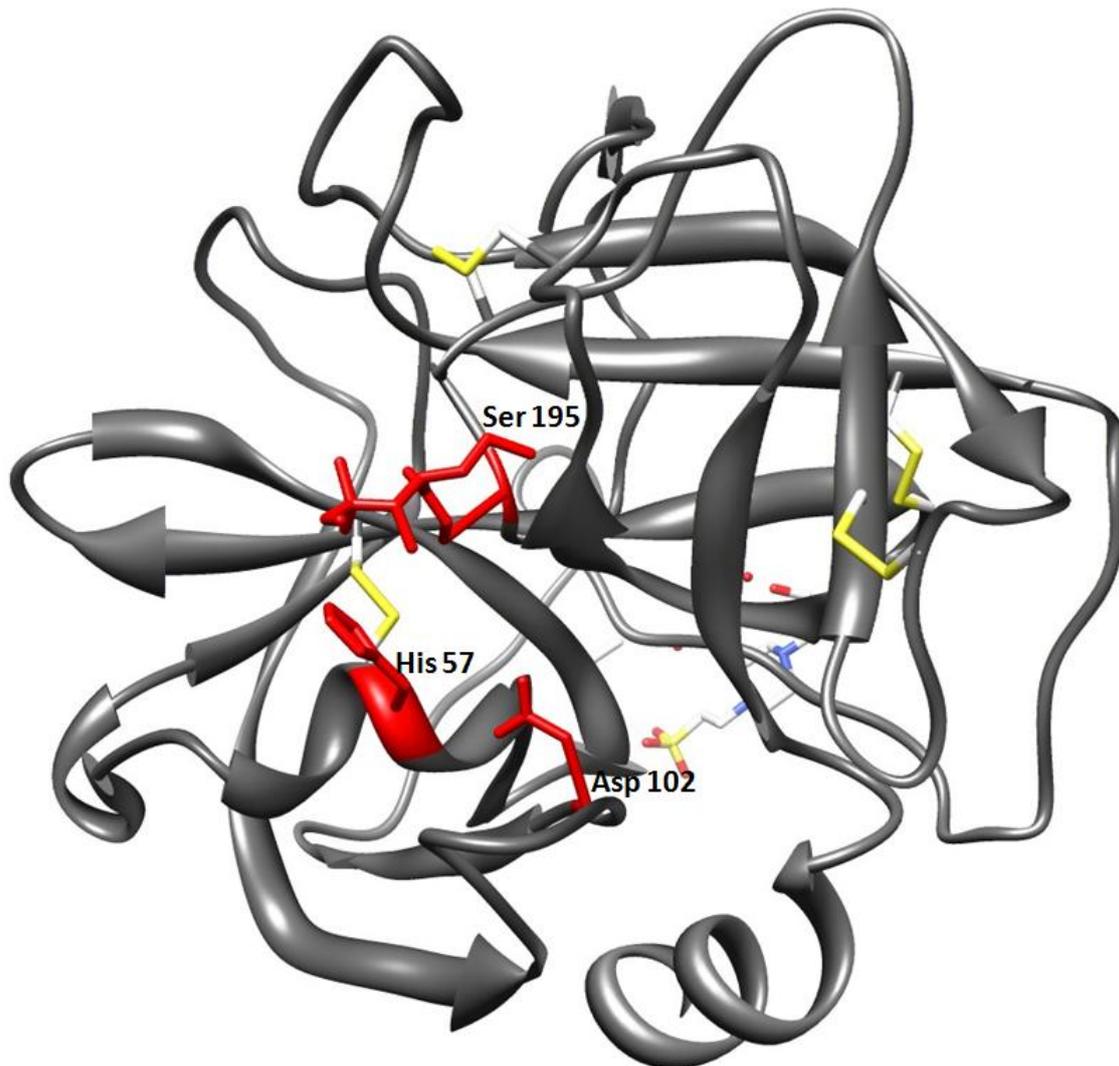


Abbildung 3: Modell der Kristallstruktur der katalytischen Domäne der humanen neutrophilen Elastase. Die katalytische Triade bestehend aus His57, Asp102 und Ser195 (rot markiert). Die vier Disulfidbrücken sind gelb markiert. Am Serin 195 ist der Inhibitor 1,2,5-thiadiazolidin-1,1-dioxid gebunden [(Huang et al. 2008); pdb code 2vg3].

2.2.2 Trypsin

Wie Elastase gehört Trypsin zu den Serinproteasen und bildet eine eigene Untergruppe. Trypsin ist als ein Verdauungsenzym bekannt und wird von dem Pankreas als Trypsinogen sezerniert. Die Aktivierung von Trypsin erfolgt durch die Enteropeptidase im Dünndarm. Aktiviertes Trypsin kann daraufhin weiteres Trypsinogen und alle anderen Zymogene des Pankreas aktivieren. Trypsin schneidet ausschließlich carboxyterminal von Lysin- oder Argininresten (Harris et al. 2000).

2.3 Metalloproteasen

Namensgebend für die Metalloproteasen ist das Vorhandensein eines Metall-Ions (in der Regel Zink) im aktiven Zentrum, das für den katalytischen Mechanismus verantwortlich ist. Die Metalloproteasen werden in 12 Superfamilien eingeteilt (Rawlings et al. 2004). Zinkproteasen mit dem Konsensusmotiv HExxH werden Zinkine genannt (McKerrow 1987; Vogt et al. 1989), das Konsensusmotiv der Inverzinkine lautet dagegen HxxEH (Hooper 1994). Das Zink-Ion der Zinkine polarisiert ein Wassermolekül für die Hydrolyse der Peptidbindung. Charakteristisch für diesen katalytischen Mechanismus sind die weiteren Zink-bindenden Liganden sowie der Glutamatrest der das Wassermolekül stabilisiert (Grams et al. 1996). Die Einteilung der Zinkine erfolgt anhand des dritten Zink-bindenden Liganden. Bei den Aspzinkinen handelt es sich um Proteasen, die einen Aspartatrest als dritten Zink-Liganden aufweisen. Dieser ist bei den Gluzinkinen durch einen Glutamatrest und bei den Metzinkinen durch einen Histidinrest ersetzt. Die Metzinkine weisen zudem einen sogenannten *Met-turn* auf. Dieser *Met-turn* ist ein konserviertes Aminosäuremotiv mit einem strukturell wichtigen Methioninrest. Das erweiterte Zink-bindende Motiv und der *Met-turn* definieren die Superfamilie der Metzinkine zu denen die Astacine, Serralysine, Adamalysine, Matrixine/ MMPs (Matrix-Metalloproteasen), Leishmanolysine und die Snapalysine (Gomis-Rüth 2003) gehören.

2.3.1 MMPs

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie die Reproduktion, Embryonalentwicklung und Morphogenese zuständig (Nagase und Woessner 1999). Sie werden meist als Zymogene sezerniert und besitzen die konservierte Sequenz PRCxxPD in ihrem Propeptid. Eine besondere Rolle wird dabei dem Cystein zuteil, das eine Bindung zum Zink-Ion herstellt und damit das polarisierte Wassermolekül verdrängt (Van Wart und Birkedal-Hansen 1990). Diese Art der Inaktivierung wird auch als "Cystein-Switch" bezeichnet. Die Aktivierung der MMPs erfolgt durch das Abspalten des Propeptids. Dies kann durch andere MMPs erfolgen. Bemerkenswert ist, dass das Propeptid in manchen Fällen nur teilweise entfernt wird und anschließend durch Autokatalyse die vollständige Entfernung des Propeptids durch die Protease selbst erfolgt. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass Matrix-Metalloproteasen ein zweites strukturelles Zink-Ion besitzen (Bode und Huber 2000). Aufgrund ihrer Funktionsvielfalt ist eine strikte Regulation der Aktivität der MMPs erforderlich. Die Regulation der MMPs erfolgt durch die TIMPs (*tissue inhibitors of metallo proteinases*). Diese werden zudem für die Aktivierung und Stabilisierung von MMPs benötigt (Egeblad und Werb 2002). Als Beispiel für das Zusammenspiel von MMPs und TIMPs ist MMP-2 zu nennen. Durch die Anlagerung von TIMP-2 an MMP-14 bindet dieser Komplex an Pro-MMP-2 und ermöglicht so die Aktivierung von MMP-2 durch ein aktives

MMP-14 (Nagase und Woessner 1999). Sinkt die TIMP-Konzentration oder ist sie zu hoch, so senkt dies die Aktivität der zugehörigen MMP, da aktive MMPs ohne einen Inhibitor oder ein Substrat instabil werden und ihre katalytische Fähigkeit verlieren oder gar nicht erst aktiviert werden. Ein weiterer physiologischer Inhibitor der MMPs ist das α_2 -Makroglobulin. Eine Disregulation der MMPs hat meist gravierende Auswirkungen auf den Organismus, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen (Vihinen und Kahari 2002). Aus diesem Grund wird als potentielle Therapie von Karzinomen eine gezielte Inhibition von MMPs erforscht. Die Gelatinase MMP-2 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (Nagase et al. 2006). Zur Zeit sind 25 humane MMPs bekannt, die alle bis auf Matrilysin (MMP-7) aus mindestens vier Domänen bestehen (Overall 2002). Als extrazelluläre Proteasen besitzen sie ein Signal-Peptid, ein Propeptid, die Protease-Domäne, sowie eine C-terminale Hämopexin-Domäne (siehe Abbildung 4). Der katalytische Mechanismus ist mit dem der Astacine zu vergleichen (siehe unten).

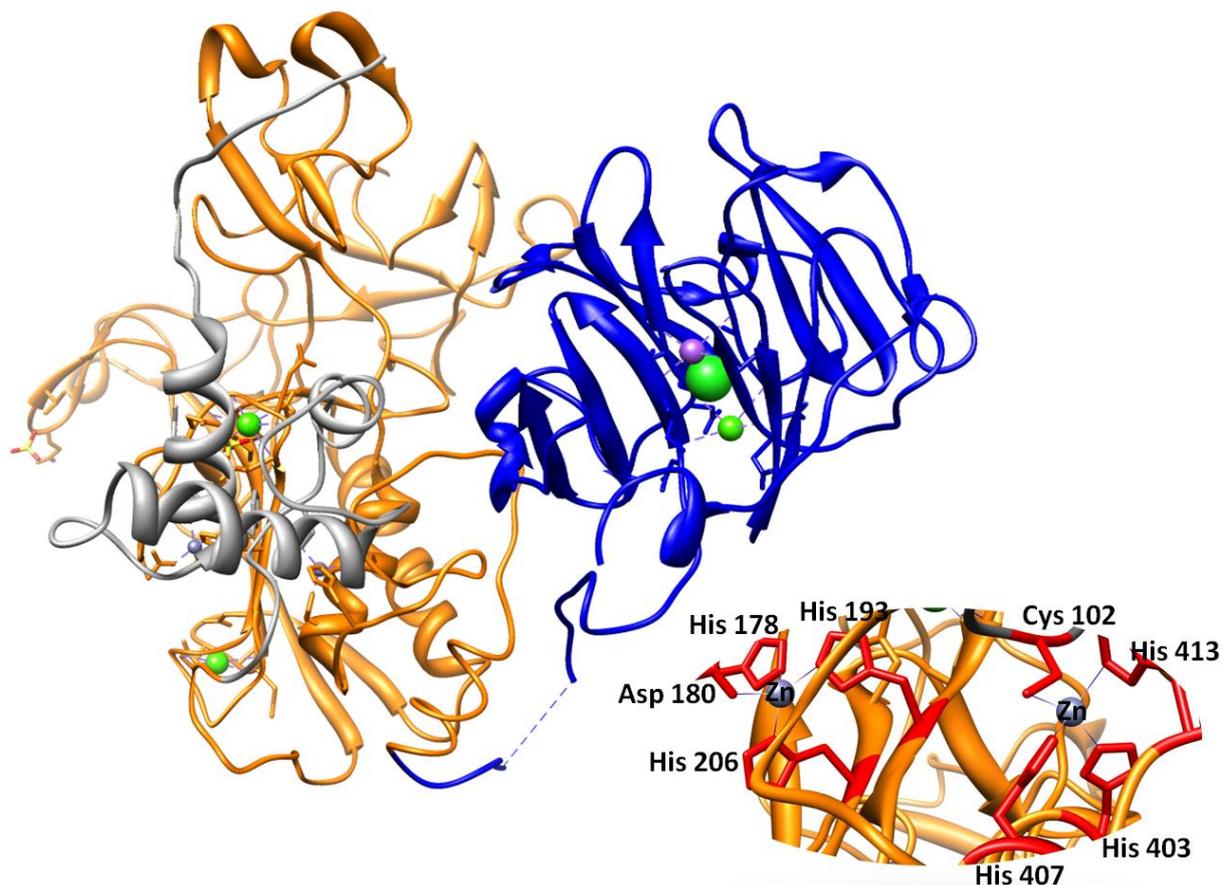


Abbildung 4: Modell der Kristallstruktur von Pro-MMP-2.

Das Propeptid ist grau gefärbt, die Protease-Domäne orange und die C-terminale Hämopexin-Domäne blau. Das katalytische Zentrum ist vergrößert dargestellt. Das Zink ist grau gefärbt, umgeben von drei Histidinresten und einem Cystein. Durch die Abspaltung des Propeptids wird das Cystein 102 (*Cystein-Switch-Motiv*) entfernt und die Protease aktiviert [(Morgunova et al. 1999); pdb code 1CK7].

2.3.2 Astacine

Namensgebend für diese Metzinkine ist das Verdauungsenzym Astacin aus dem Kaumagen des Flusskrebsses *Astacus astacus* (Pfleiderer et al. 1967). Astacin wird in den F-Zellen des Hepatopankreas als Zymogen hergestellt und durch limitierte Proteolyse aktiviert. Es wird in seiner aktiven Form im Kaumagen gespeichert (Vogt et al. 1989). Astacine sind durch die Konsensussequenz HExxHxxGFxHExxRxDRD (Dumermuth et al. 1991) gekennzeichnet. Die Funktionsvielfalt der Astacine reicht von der Verdauung (Astacin aus *Astacus astacus*), der limitierten Proteolyse bei der Differenzierung von Geweben, zum Beispiel durch BMP-1 und Meprin (Sterchi et al. 2008; Schütte et al. 2010; Becker-Pauly et al. 2011), bis zur Induktion des Schlüpfvorgangs von Embryonen (*hatching*) (Yasumasu et al. 1989). Zu den *hatching* Enzymen gehören LCE (*low choriolytic enzyme*) und HCE (*high choriolytic enzyme*). Die Astacine lassen sich evolutiv auf das prokaryotische Niveau zurückverfolgen (Tarentino et al. 1995).

Das katalytische Zink-Ion wird von fünf Liganden trigonal bipyramidal koordiniert (Abbildung 5). Die Basis der Pyramide wird von den Histidinresten His92 und His102 sowie dem katalytisch aktiven Wassermolekül gebildet, das auch mit dem Glu93 verbunden ist. Die beiden Pyramidenspitzen werden durch das His96 und Tyr149 gebildet (Bode et al. 1992; Yiallourous et al. 2000). Tyr149 ist auch Bestandteil des *Met-turns*.

Bei den Astacinen erfolgt der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung des Substrats durch das Wassermolekül (Sol 300), welches durch das Zink-Ion und Glu93 aktiviert wurde. Dadurch entsteht ein Oxyanion, das durch Tyr149 stabilisiert wird. Die Spaltung ist abgeschlossen, nachdem ein Protonentransfer vom Glu93 zum Stickstoff der Peptidbindung stattgefunden hat (Grams et al. 1996).

Die Astacine bestehen aus mindestens zwei Domänen (Protease-Domäne und Propeptid), an die sich N-terminal an das Propeptid ein Signalpeptid anfügt. Das Signalpeptid ist verantwortlich für die Sekretion des Proteins, da es für den Eintritt in das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt. Für die Regulation der Aktivität ist das Propeptid zuständig. Es wird entweder durch Autokatalyse oder durch andere Proteasen, z.B. *in vivo* durch Trypsin bei Astacin (Yiallourous et al., 2002), Kallikrein 5 (KLK-5) (Ohler et al. 2010) oder Trypsin bei Meprin α und β (Becker et al. 2003), Plasmin bei Meprin α (Becker et al. 2003) von der Proteasedomäne abgetrennt. Erst dann liegt das Protein in seiner aktiven Form vor. Einige Vertreter der Astacin-Familie werden auch im Menschen exprimiert. Dazu gehören die beiden Meprine α und β (Sterchi et al. 1988; Sterchi et al. 1988), BMP 1, Mammalian Tolloid-Like 1 und Mammalian Tolloid-Like 2 (Muir und Greenspan 2011) sowie das Ovastacin (Quesada et al. 2004), auf das im Folgenden näher eingegangen wird.

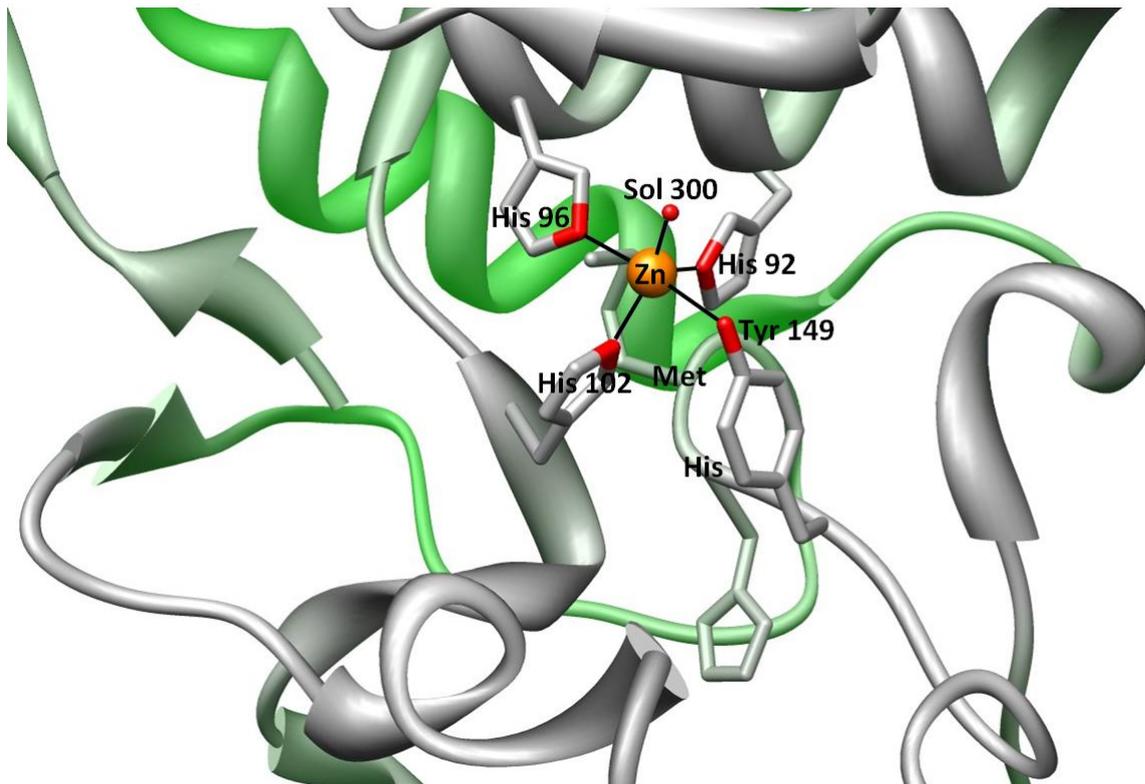


Abbildung 5: Modell des katalytischen Zentrums des Astacins (*Astacus astacus*).

Das Zink (orange) mit seinen drei Histidinliganden aus der Konsensussequenz (HExxHxxGxxH) His92, His96, His102 und dem Tyrosinrest Tyr149 aus dem Met-turn (MHY) bilden mit dem Sol 300 das trigonalbipyramidale zinkbindende Zentrum des Astacins [(Bode et al. 1992);pdb code 1AST].

2.3.3 Ovastacin

Die Entdeckung des Ovastacins geht auf Datenbankanalysen bei Mensch, Maus und Ratte (Möhrlen 2002) zurück. Ovastacin wurde aufgrund der enthaltenen Konsensussequenz der Astacine als Mitglied der Astacin-Familie identifiziert. Daraus ergibt sich eine ähnliche Struktur der aktiven Zentren (siehe Abbildung 7), die bei allen Astacinen durch die Konsensussequenz vorgegeben ist. Die Sequenzidentität von Ovastacin und Astacin beträgt 45% (Rattmann 2002). Die codierenden Gene liegen bei Wirbeltieren auf dem zweiten Chromosom. Daher wurden sie vorläufig als Hs2 (*Homo sapiens*) und Mm2 (*Mus musculus*) in den Datenbanken geführt. Beide Protease-Domänen weisen eine Sequenzidentität von 80% auf. Die Bezeichnung Ovastacin wurde durch die erste Publikation über Ovastacin von Quesada (Quesada et al. 2004) etabliert. Dieser Name wurde aufgrund des zu dieser Zeit nachgewiesenen Expressionsgewebes, nämlich des Ovars, gewählt. Ovastacin besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer zinkabhängigen katalytischen Domäne und einer C-terminalen Region (siehe Abbildung 6). Diese aus 152 Aminosäuren bestehende Verlängerung weist bisher keine Homologie zu anderen bekannten Proteinen auf und wird im Folgenden deshalb einfach als C-terminale Domäne bezeichnet. Die katalytische Domäne umfasst 194 Aminosäuren und zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit (55 bis 64%) zu äquivalenten Domänen bereits bekannter *hatching* Enzyme der Astacin-Familie.

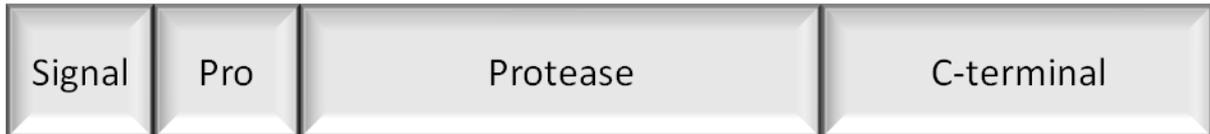


Abbildung 6: Domänenstruktur von Ovastacin.

Signalpeptid (23 AS), Propeptid (66 AS), Protease-Domäne (194 AS) und C-terminale Domäne (152 AS).

Die Expression des Ovastacins konnte in Ovarien und Eizellen auf mRNA-Ebene bis ins Zweizellstadium nachgewiesen werden (Gornik 2004; Quesada et al. 2004). Da dieser Nachweis auch bei unbefruchteten Eizellen gelang, ist davon auszugehen, dass es sich um ein maternal exprimiertes Protein handelt. Ferner konnte Ovastacin auf Proteinebene in heranreifenden Oocyten von Primärfollikeln bis ins Blastozysten-Stadium, nicht aber in Primordialfollikeln und in implantierten Embryonen nachgewiesen werden (Duhig 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde angenommen, dass Ovastacin eine Rolle beim Schlüpfen der Blastocyste aus der *Zona pellucida* spielt.

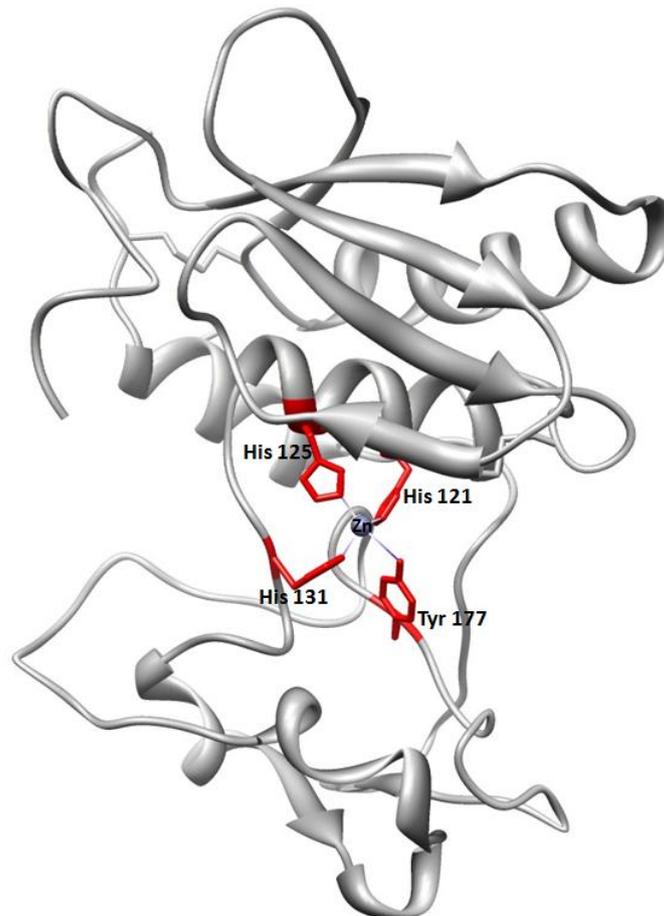


Abbildung 7: Computerbasiertes Homologie-Modell der Protease-Domäne des Ovastacins (*Mus musculus*).

Erstellt anhand der Kristallstruktur des Astacins [(Bode et al. 1992); pdb code 1AST]. Die vier zinkbindenden Liganden sind rot markiert. Das Zink (grau) mit seinen drei Histidinliganden aus der Konsensussequenz (HExxHxxGxxH) His121, His125, His131 und dem Tyrosinrest Tyr177 aus dem Met-*turn* (SXMHY) bilden das aktive Zentrum von Ovastacin.

EINLEITUNG

Die wichtigste Funktion des Ovastacins besteht vermutlich darin, ZP2 (*Zona pellucida*-Protein 2) zu schneiden (Burkart et al. 2012). Dadurch verdichtet sich die *Zona pellucida*, wodurch das Eindringen weiterer Spermien (Polyspermie) verhindert wird. Darüber hinaus spielt Ovastacin als Interaktionspartner von SLLP1 (*sperm lysozyme like protein*) im weiblichen Organismus eine Rolle (Sachdev et al. 2012). Dabei wurde Ovastacin als *SAS1B* (*sperm acrosomal SLLP1 binding*) bezeichnet. Ovastacin defiziente Mäuse zeigten eine Abnahme der Fruchtbarkeit um ca. 30%. Diese neuen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Ovastacin eine entscheidende Rolle bei der Reproduktion spielt. Recherchen in den Proteomen von Maus und Mensch ergaben Hinweise auf weitere Expressionsorte von Ovastacin in der Leber (Zgoda et al. 2009), in Herzzellen (Yin et al. 2010), im Nabelschnurepithel (Tunica et al. 2009) und im Blutplasma. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass Ovastacin weitere physiologische Funktionen besitzt.

2.4 Inhibitoren

Für eine physiologisch kontrollierte Funktion von Proteasen ist die zielgerichtete Aktivierung und die Regulation aktivierter Proteasen von entscheidender Bedeutung. Eine Möglichkeit die Aktivität von Proteasen zu steuern, ist die gewebespezifische Expression entsprechender Inhibitoren. Enzyme können reversibel oder irreversibel gehemmt werden. Bei einer irreversiblen Hemmung kommt es zur kovalenten Bindung des Inhibitors an das Enzym. Bei der reversiblen Hemmung dagegen kann der Inhibitor wieder verdrängt werden. Dies kann zum einen durch das Substrat selbst geschehen, zum anderen durch eine sinkende Inhibitor-Konzentration. Diese Hemmungen haben eine regulatorische Funktion und spielen eine große Rolle bei der Steuerung von Stoffwechselwegen. Einige Inhibitoren können nur eine bestimmte Klasse von Proteasen hemmen. Zum Beispiel schützt der Trypsininhibitor Ovomuroid, ein Bestandteil des Hühnereiklars, das Eiklar vor proteolytischem Abbau (Kato et al. 1987; Semenova et al. 2008). Andere Inhibitoren wie das Plasmaprotein α_2 -Makroglobulin hemmen unspezifisch Proteasen verschiedener mechanistischer Klassen (Abe et al. 1989). Es bietet Proteasen eine Ködersequenz als Substrat an. Erfolgt dort eine proteolytische Spaltung, so kommt es durch eine Konformationsänderung zum Einschluss der aktiven Protease wie in einem Käfig (Sottrup-Jensen 1989). Limitierend für die Inhibition ist die Größe der Protease. Viele Inhibitoren steuern das proteolytische Netzwerk auf diese Weise effizient und fein regulierend.

2.4.1 Fetuine

Fetuine sind Plasmaproteine der Cystatin-Superfamilie (Brown und Dziegielewska 1997). Da im fötalen Blut mehr Fetuin vorkommt als bei adulten Lebewesen, ergab sich daraus der Name Fetuin. Exprimiert wird Fetuin A in der Leber und gelangt von dort aus in das Blut. Fetuine bestehen aus zwei Cystatin-ähnlichen Domänen und einer Fetuin-spezifischen dritten Domäne. Fetuin A und B bilden mit dem HSF (Habu Serum Faktor, v. Heremans-Schmidt Glykoprotein) eine eigene Gruppe innerhalb der Cystatin-Superfamilie. Ein Mangel an Fetuin A hat eine Kalzifizierung der Organe zur Folge (Schäfer et al. 2003; Jahnen-Dechent et al. 2011). Dagegen hat eine Überexpression von Fetuin A eine Erhöhung von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) zur Folge. TNF α hat eine inflammatorische Wirkung auf das kardiovaskuläre System und erhöht somit das Risiko eines Infarktes signifikant (Weikert et al. 2008). Bisher ist belegt, dass humanes Fetuin A Trypsin (Ashida et al. 2000) und Mepri (Hedrich et al. 2010) inhibiert.

2.5 Oogenese und Reifung der Eizellen

Die menschliche Oogenese setzt bereits im frühen Embryonalstadium ein und führt zu einer Einwanderung von Urkeimzellen in das Ovar. Diese Urkeimzellen werden damit zu Oogonien, den Vorläufern der Eizelle. Die Oogonien vermehren sich durch mitotische Zellteilungen. Es können bei einer Frau einmalig bis zu zwei Millionen Oogonien gebildet werden. Die Produktion der Oogonien ist nach der Geburt beendet. Nach dem Ende der mitotischen Teilungen wachsen die Oogonien und ihre Hülle wird mehrschichtig. Die äußeren Schichten nennt man Follikelzellen; sie versorgen die Oogonie. Diese verfügt über einen vollständigen diploiden Chromosomensatz, der durch die erste Reifeteilung halbiert wird. Dabei verbleiben allerdings die Oogonien im Diplotän der Prophase. Erst mit Beginn der Geschlechtsreife entwickeln sie sich weiter. So entstehen Primordialfollikel, Sekundärfollikel und Tertiärfollikel. Die *Zona pellucida* wird im Stadium der Sekundärfollikel gebildet. Während des weiteren Wachstums nimmt die Eizelle an Größe zu und verliert schließlich die Follikelzellen. Reste dieser Follikelzellen werden später als Cumuluszellen bezeichnet. Durch die Freisetzung von luteinisierendem Hormon wird die Ovulation eingeleitet. Erst jetzt wird die erste Reifeteilung abgeschlossen und die zweite wird eingeleitet. Die Zellteilungen der Reifeteilungen erfolgen ungleich. Dies bedeutet, dass eine der neuen Zellen größer ist und sich weiterentwickelt, während die andere Zelle sich auflöst oder zu einem sogenannten Polkörperchen wird. Die befruchtungsfähige Eizelle gelangt nun in das *Infundibulum* des Ovidukts (Abbildung 8). Nur ca. 500 Eizellen gelangen während der Geschlechtsreife in dieses Stadium, der Großteil der Oogonien geht bereits vorher zugrunde. Die Befruchtung der Eizelle findet in der *Ampulla tubulae* statt. Im Anschluss durchquert der Embryo den Ovidukt und durchläuft die ersten Zellteilungen (Schenkel 1995; Wolpert 1999).

EINLEITUNG

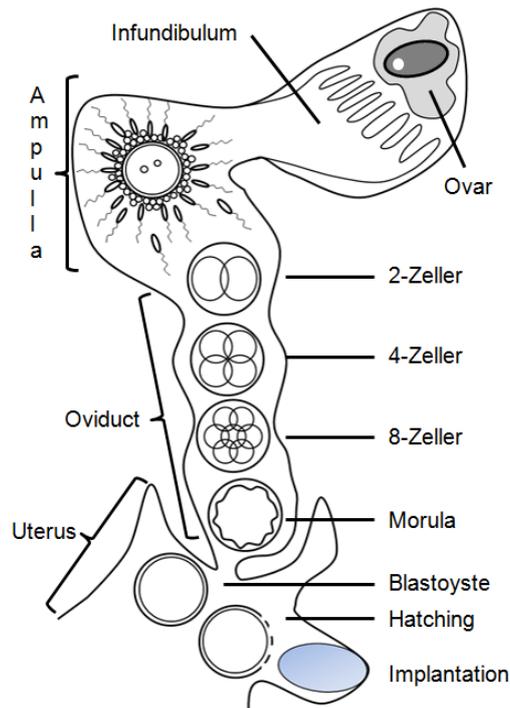


Abbildung 8: Schematische Entwicklung des Wirbeltier-Embryos beginnend mit der Ovulation bis zur Implantation.

Nach der Ovulation und der Befruchtung der Oocyte durchläuft die Zygote (der junge Embryo) verschiedene Zellstadien bis der Embryo sich nach dem Abstreifen der *Zona pellucida* durch die Implantation mit dem Uterus zur Nährstoffversorgung verbindet.

2.5.1 Aufbau der Oocyten und Spermien

Eine reife Oocyte (siehe Abbildung 9A) besteht aus einer Zelle, die sich in der ersten Reifeteilung befindet, umgeben von einer Cytoplasmamembran (*Oolemma*). Unter dieser Membran liegen die Cortikalgranula. Nach außen folgt der Perivitellinraum, um den sich die *Zona pellucida* legt. Diese Schutzhülle besteht im Wesentlichen aus den drei Glykoproteinen ZP1 (200 kDa), ZP2 (120 kDa) und ZP3 (83 kDa). Dabei handelt es sich beim ZP3 um den Spermienrezeptor, der mit dem ZP2 Filamente bildet, die durch ZP1-Dimere miteinander verbunden sind. In diesem Perivitellinraum befinden sich die Polkörperchen. Die *Zona pellucida* wird von der *Corona radiata* umgeben, welche aus Granulosazellen besteht, die während der Follikelreifung gebildet wurden. Es handelt sich hierbei um Epithelgewebe. Erst bei der Befruchtung wird diese Zellschicht durch Enzyme (Hyaluronidasen) abgelöst, die sich im Akrosom (Kopfkappe) des Spermiums befinden.

Das Spermium (Abbildung 9B) besteht aus einem Kopfteil mit Akrosom, einem Mittelstück, und einer Schwanzregion. Das Akrosom enthält für die Befruchtung essentielle Enzyme wie die Hyaluronidase und das Akrosin (Munk 2011). Des Weiteren befindet sich der männliche haploide Vorkern in der Kopfregion des Spermiums. Anschließend kommt das Mittelstück, welches die Mitochondrien und den Ansatz der Geißel enthält.

Bevor das Spermium eine Eizelle befruchten kann, muss es aktiviert werden. Diesen Vorgang nennt man Kapazitation. Hierbei wird die Plasmamembran des Akrosoms durch Proteolyse von Glykoproteinen und Seminalplasmae Proteinen befreit. Dies erhöht die Aktivität der Spermien. Spermien sind sehr viel kleiner als eine Oocyte, da sie fast kein Zytoplasma besitzen, und können sich mit Hilfe der Geißel bewegen (Munk 2011).

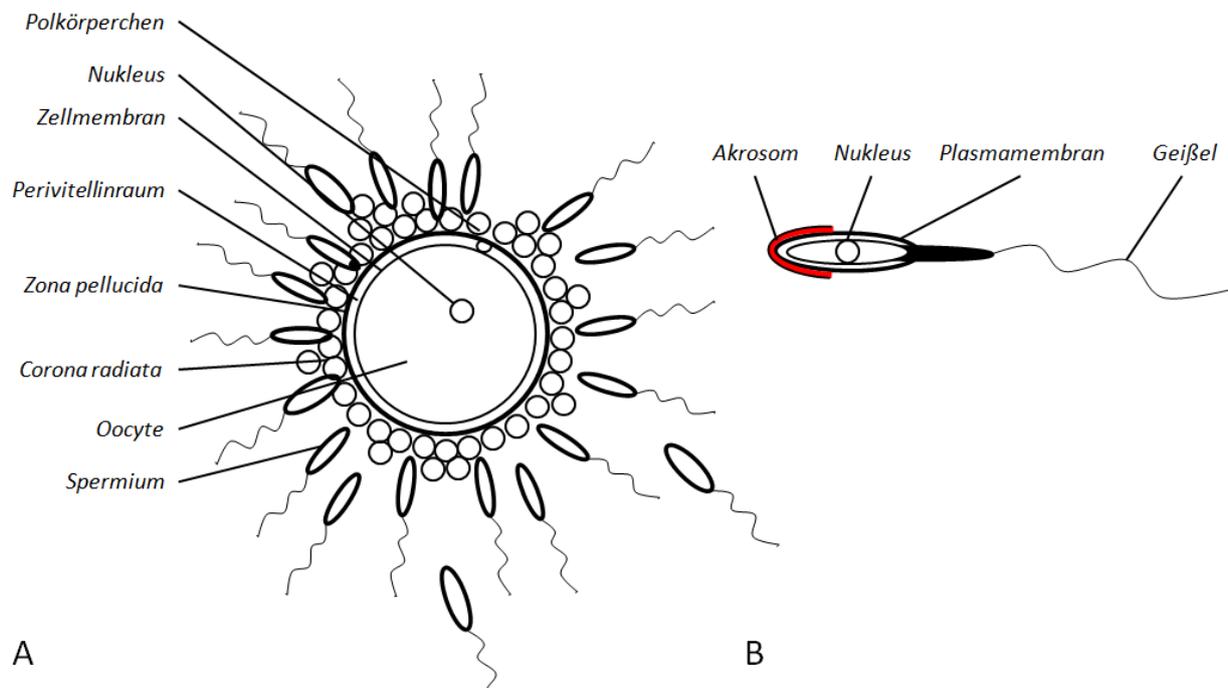


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Oocyte (A) und eines Spermiums (B).

2.5.2 Fertilisation von Oocyten

Die Fertilisation der Eizelle beginnt mit dem Ablösen der *Corona radiata* durch proteolytische Enzyme und glykosidische Hyaluronidasen aus dem Akrosom des Spermiums (Munk 2011). Dabei kommt es zur Verschmelzung des Spermiums mit der *Zona pellucida* der Oocyte. Das Spermium bindet zuerst an den Spermienrezeptor ZP3. Proteasen wie die Serinprotease Akrosin bewirken die punktuelle Auflösung der *Zona pellucida* an dieser Stelle. Erst durch diesen Schritt kann das Spermium zum Oolemma der Oocyte vordringen, wobei es mit ZP2 interagiert. Letztlich dringen nur der Spermienkern und das Centrosom des Spermiums in die Oocyte ein. Durch diese Akrosomreaktion wird in der Eizelle die Entleerung der Cortikalgranula in den perivitellinen Spalt ausgelöst (Cortikalreaktion). Dies führt zur limitierten Proteolyse des ZP2 mit der Konsequenz, dass die *Zona pellucida* verhärtet und impermeabel für weitere Spermien wird (Bleil et al. 1981), weshalb weitere Spermien nicht mehr in die Oocyte gelangen können (Liu 2011). Durch die Cortikalreaktion wird Polyspermie verhindert. Nur in Ausnahmefällen kann es vorkommen, dass mehrere Spermien die *Zona pellucida* durchdringen. Normalerweise führt dies zum Abort des

Embryos. Mit dem Eindringen des Spermiums schließt die Eizelle die zweite Reifeteilung ab und der Zellkern wird zum weiblichen Vorkern. Der Spermienkopf wird zum männlichen Vorkern. Erst dann kann es zum Verschmelzen der Vorkerne kommen. Damit ist die Fertilisation der Eizelle abgeschlossen.

2.5.3 Embryonalentwicklung von *Mus musculus*

Die Entwicklung eines Mausembryos verläuft im Vergleich zu vielen Invertebraten deutlich langsamer ab. So ist bei *Drosophila* bereits einen Tag nach der Befruchtung (*day post coitum*, dpc) das 60.000-Zellstadium erreicht (Schenkel 1995). Im Gegensatz dazu befindet sich ein Mausembryo zu diesem Zeitpunkt gerade am Beginn des Zweizellstadiums. Erst am Tag 17 besteht ein Embryo aus 60.000 Zellen, welcher aber noch nicht selbstständig lebensfähig ist (Schenkel 1995). Von der Teilung der Zygote bis zur Blastozyste nimmt ein Mausembryo nicht an Masse zu. Er wandert während dieser Zeit durch das Ovidukt in den Uterus. Erst nachdem die Blastozyste von der sie bis dahin umschließenden *Zona pellucida* befreit ist (4,0 - 4,5 dpc), kann die Einnistung des Embryos in den Uterus erfolgen. Bei unbefruchteten Eizellen kommt es nicht zu diesem Schlüpfvorgang und die Eizelle kann sich nicht einnisten. Nach der Implantation des Embryos, die nach 4,5 - 6,5 dpc abgeschlossen ist, kann die Nährstoffversorgung des Embryos über die Plazenta der Mutter erfolgen. Erst ab jetzt beginnt der Embryo an Masse zuzunehmen. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung ist die Ausbildung der Körperachse nach 6,5 dpc sowie die Ausbildung des Herz-Kreislaufsystems, welche mit der Entstehung des Herzens nach 8,5 Tagen beginnt. Fehler in diesem frühen Stadium haben gravierenden Einfluss auf die Vitalität des sich entwickelnden Fötus. Die sexuelle Differenzierung erfolgt nach ca. 12 Tagen. Nach 19 Tagen ist die Entwicklung des Embryos abgeschlossen und er verlässt den Uterus (Schenkel 1995). Bei einem Wurf werden zwischen drei und acht Junge geboren.

2.6 Ziele der Arbeit

Ein Fokus dieser Arbeit war die Charakterisierung und funktionelle Analyse des rekombinanten Pro-Ovastacins. Dazu sollten außer dem Pro-Ovastacin noch zusätzlich zwei aktive Varianten des Ovastacins hergestellt werden, zum einen die isolierte Protease-Domäne, zum anderen die Protease-Domäne mit anschließender C-terminaler Domäne. Mit der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus, durch Substrat- und Inhibitoranalysen sollten neue Erkenntnisse über die Rolle des Ovastacins im proteolytischen Netzwerk gewonnen werden, durch welches die Befruchtung und die frühe Embryogenese reguliert werden. Ein weiteres Ziel des Promotionsvorhabens war die Identifizierung von weiteren Expressionsorten außerhalb des Reproduktionstraktes sowie immunhistologische Analysen betreffend des Expressionsmusters des Ovastacins während der Entwicklung des Mausembryos bis kurz vor der Implantation in den Uterus. Durch die sehr hohe Sequenzidentität von 80% zwischen der humanen und der murinen Protease-Domäne des Ovastacins war zu erwarten, dass Erkenntnisse aus der Untersuchung des Mausmodells auf den Menschen übertragbar sind.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Die PCR-Ansätze wurden im Thermocycler TGradient oder TPersonal (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Zur DNA-Auftrennung wurden Horizontalapparaturen (Harnischmacher, Kassel) verwendet. Die Geldokumentation erfolgte auf dem Biometra UVstar WL Leuchttisch (Biometra, Göttingen) mit der zugehörigen Software BioDoc Analyse 2.0 DBA U-464. Als Kamera diente das CCD Videomodul Kaiser RA 1. Mit dem UV/Visible Spectrometer (Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, Freiburg) wurden die DNA- und Proteinkonzentrationen gemessen. Für die SDS-PAGE wurden die Vertikalkammern von Bio-Rad Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad, München) verwendet. Zum Durchführen von Western-Blots kam eine Horizontalapparatur von Biotec Fischer zum Einsatz (Biotec Fischer, Reiskirchen). Die Aktivitätsmessungen für den FRET-Assay wurden am Varioskan Flash Multifunktionsspektrolreader (Thermo Scientific, Dreieich) durchgeführt. Für Eppendorf Zentrifugegefäße mit einem Volumen von 0,5 bis 2,0 ml wurde die Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg) mit dem Rotor F45-24-11 verwendet. Mit der Eppendorf Centrifuge 5804R wurden mit dem Rotor F34-6-38 15 ml und 50 ml Zentrifugegefäße zentrifugiert. Beide Eppendorf Zentrifugen sind temperierbar. Zum Zentrifugieren großer Mengen (bis zu 300 ml) wurde die Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B (Sorvall, Bad Homburg) mit dem Rotor SLA 3000 verwendet. Zum Einstellen aller verwendeten Puffer und Lösungen wurde das Knick pH-Meter 765 Calimatic verwendet (Knick, Berlin). Das Reinstwasser wurde mit einem Milli Q Water Purification System MQ UF Millipore (Millipore, Bad Schwalbach) hergestellt. In der Zellkultur kam die Kühlzentrifuge Hettich Rotanta/RP (Hettich, Wiesbaden) zum Einsatz. Des Weiteren wurde die LaminAir-Sterilbank von Holten (Allerød, Dänemark) und Brutschränke von WTB Binder Labortechnik in Tuttlingen, die Multitron (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) und der CO₂-Inkubator New Brunswick (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Als Mikroskop kam in der Zellkultur das Leica DM IBRE TCS (Leica, Wetzlar) zum Einsatz. Die Präparation der Mausembryonen erfolgte an dem Binokular Leica Wild M3C (Leica, Wetzlar). Die Fluoreszenzaufnahmen der Mausembryonen wurden an dem Mikroskop Leica DM 6000 B (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien stammen in Analysequalität, falls nicht anders erwähnt, von AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*) ist eine Technik zur Amplifikation einer DNA-Sequenz außerhalb eines lebenden Organismus mit Hilfe spezifischer *Primer*sequenzen (Mullis et al. 1986). Zur Überprüfung der Bacmide sowie zur Herstellung der aktiven Ovastacin Konstrukte wurden PCRs durchgeführt. Die verwendeten Mengen sind in Tabelle 1 und das Programm in Tabelle 2 aufgeführt. Die Sequenzen der *Primer* zur Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten sind in der Tabelle 3, die der *Huvec*-PCR in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Komponenten	Eingesetzte Volumina [μ l]
Master Mix 1:	
<i>Primer forward</i> (10 pM)	1
<i>Primer reverse</i> (10 pM)	1
<i>Template</i>	2
steriles H ₂ O	ad 12,5
Master Mix 2:	
dNTP-Mix (NEB)	0,5
10x Reaktionspuffer(NEB)	2,5
<i>Taq</i> -Polymerase (NEB)	1
steriles H ₂ O	ad 12,5

Tabelle 2: PCR-Programm zur Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten

Stadium	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
1. Einleitende Denaturierung	94	60
2. Denaturierung	94	60
3. <i>Annealing</i>	62	60
4. Elongation	72	90
40 Zyklen von Schritt 4 zu Schritt 2		

Tabelle 3: Primer-Sequenzen für das Erstellen der aktiven Ovastacin Varianten

Bezeichnung	Primer-Sequenz
PCR-Start-S Mm22006_1s	5' ATA CTG GCA TGC GTC GAC ACT AGT CCA CCA TGG GTA TCA TGG GAA GCC TG 3'
PCR-Start-AS Mm22006_1as	5' ATT AGA GAG GTG CCC AGA GAC AGA TCT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA TAA GCT TAA CAT A 3'
PCR 1-S Ova2008_1si	5' ATA TTA ACT ATG CTC TCC TTG CTA GGT TTG AGC ATG GGA TTG TTG TCA GTG ACC AAT AAT AAA TGG 3'
PCR 1-AS Mm22006_1as	5' TAT GTT GGA TCC AAG CTT ATT ATT TTT CGA ACT GCG GGA G 3'
PCR 2- SOva2008_2sa	5' ATA CTG GAA TTC ATG GGT ATC ATG GGA AGC CTG TGG CCT TGG ATA TTA ACT ATG CTC TCC TTG CTA GGT 3'
PCR 2-AS Mm22006_1as	5' TAT GTT GGA TCC AAG CTT A TTA TTT TTC GAA CTG CGG GAG 3'
PCR 3-S Ova2008_2sa	5' ATA CTG GAA TTC ATG GGT ATC ATG GGA AGC CTG TGG CCT TGG ATA TTA ACT ATG CTC TCC TTG CTA GGT 3'
PCR 3-AS Mm22009_1as	5' GTA TAA CTG CAG CCG GAG TGT CAG ATC TAT A 3'
PCR 4-S Ova2008_2sa	5' ATA CTG GAA TTC ATG GGT ATC ATG GGA AGC CTG TGG CCT TGG ATA TTA ACT ATG CTC TCC TTG CTA GGT 3'
PCR 4-AS Mm2catstrep_8/2010	5' TTA AGC TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA TGC TCC TAT AGA TCT GAC ACT CCG GCT GC 3'

Tabelle 4: Primer-Sequenzen für die Bacmid-PCR

Bezeichnung	Primer-Sequenz
<i>Sense Primer</i> pUC/M13	5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'
<i>Antisense Primer</i> pUC/M13	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'

Tabelle 5: Primer-Sequenzen für die *Huvec*-PCR

Bezeichnung	Primer-Sequenz
<i>Human Ovastacin ForPrimer</i>	5' ACC CCT GAG GGA ACC CAG GC 3'
<i>Human Ovastacin RevPrimer</i>	5' TGC CTC CAA AAG CCG CTG CA 3'
<i>Homo sapiens Short-S</i>	5' CAA CAA ATG GCC CAT GGG TGG TA 3'
<i>Homo sapiens Short-AS</i>	5' GGC AGG ATC TCG TTC CAG TTG ACA C 3'

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA nach ihrer Größe zu trennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Es wurden hauptsächlich 1%-ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Spannung betrug 100 mV. Es wurden zwei verschiedene Arten von Agarose-Gelen verwendet: Analytische Gele, welche lediglich zur Kontrolle von z.B. Restriktionen oder PCR-Ergebnissen genutzt wurden, und präparative Gele, welche zur gezielten Auftrennung und der Präparation von größeren DNA-Mengen genutzt wurden. Die Zusammensetzung der Puffer für eine Agarose-Gelelektrophorese sind in Tabelle 6 zu finden. Für ein analytisches Gel wurden 0,4 g Agarose in 40 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen gelöst. Zum Markieren der DNA wurden 2 µl 1%-ige (w/v) wässrige Ethidiumbromid-Lösung zugegeben (Adkins und Burmeister 1996). Anschließend wurde das Gel in einen vorbereiteten Gelgießstand gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Abkühlen auf RT war das Gel verwendbar.

Tabelle 6: Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien	Zusammensetzung
1x TAE-Puffer	4 mM Tris 1 mM EDTA Mit Eisessig auf pH 8 einstellen
10x DNA-Probenpuffer	1% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	2 µl 1% (w/v) Ethidiumbromid- Stammlösung in 60 ml Agarose-Lösung

3.4 Restriktion

Durch die Verwendung geeigneter Restriktionsendonucleasen ist es möglich, einen DNA-Abschnitt aus einem Plasmid herauszuschneiden, um seine Orientierung zu kontrollieren, oder um ihn in ein anderes Plasmid zu integrieren. Die Nomenklatur erfolgt nach Smith und Nathans von 1973 (Smith und Nathans 1973) und gibt die Gattung und den Stamm an, aus dem das Enzym isoliert wurde. Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie deren Sequenz sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes ist in

Tabelle 8 zu finden. Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 2 µl DNA eingesetzt, in einem präparativen Restriktionsansatz bis zu 7 µl. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 3 h. Alle verwendeten Puffer und Enzyme stammen von NEB (*New England BioLabs*; Frankfurt a. M.).

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Restriktionssequenz

Enzym	Schnittstelle
<i>Eco RI</i>	5'-G-----AATTC-3' 3'-CTTAA-----G-5'
<i>Hind III</i>	5'-A-----AGCTT-3' 3'-TTCGA-----A-5'
<i>BamHI</i>	5'-G-----GATCC-3' 3'-CCTAG-----G-5'
<i>Bgl II</i>	5'-A-----GATCT -3' 3'-TCTAG-----A -5'

Tabelle 8: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes

Reagenzien	Linearisiert	Doppelrestriktion
<i>Template DNA</i>	2-7,5 µl	2-7 µl
<i>5 x Puffer</i>	2 µl	2 µl
<i>Enzym 1</i>	0,5 µl	0,5 µl
Enzym 2	0 µl	0,5 µl
<i>DEPC H₂O</i>	ad 10 µl	ad 10 µl

3.5 Ligation

Bei der Ligation kommt es zur Verbindung von zwei DNA-Fragmenten. Meist handelt es sich um ein Insert und einen Vektor. Mindestens ein Fragment muss dafür ein endständiges 5'-Phosphat aufweisen. Die Ligation kann spontan ablaufen, wird aber durch die Zugabe der T4 DNA-Ligase extrem beschleunigt. Die T4 DNA-Ligase benötigt für ihre Funktion Adenosin-Triphosphat (ATP). Bei der Ligation von PCR-Produkten, die durch eine *Taq*-Polymerase hergestellt wurden tragen die Enden der Amplifikate T-Überhänge. Der Klonierungsvektor pGem-T beinhaltet daher die zugehörigen A-Überhänge in der MCS (*multiple cloning site*). Für die Ligation in den pGem-T sowie in den pFastbac1-Vektor wurde das pGEM[®]-T Vector System I (Promega, D-Mannheim) verwendet. Bei dem pGem-T-Vektor wurden je Restriktionsansatz 50 ng DNA eingesetzt, ebenso bei dem pFastBac1-Vektor. Die Berechnung der einzusetzenden Insertmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis von } \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng Insert}$$

Es wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 gewählt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die Transformation der *E. coli Jm 109* wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

Tabelle 9: Ligationsansatz für die Ligation in pGem-T und pFastBac

Reagenzien	pGem-T	pFastBac1
<i>Template DNA</i>	X µl	X µl
<i>Vektor DNA (50 ng/µl)</i>	1 µl	X µl
<i>2 x Puffer</i>	5	5 µl
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 µl	1 µl
<i>DEPC H₂O</i>	ad 10 µl	ad 10 µl

3.6 Transformation - Einschleusung fremder DNA in Bakterien

Alle dafür verwendeten Medien und Antibiotika sind in Tabelle 10 zu finden. Zur Transformation wurden 50 bis 100 µl kompetente *E. coli Jm109* (Promega, Mannheim) oder *E. coli DH10Bac* (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis aufgetaut. Es wurden 5 µl Plasmid-DNA (aus Ligationsansatz) dazugegeben und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die eigentliche Hitzeschocktransformation erfolgte durch eine 1-2 minütige Inkubation bei 42°C im Wasserbad. Zum Schutz der Zellen wurden diese danach sofort für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Durch Zugabe von 1 ml SOC-Medium (*Super Optimal Broth*) wurde ausreichend Nährmedium für das Bakterienwachstum bereitgestellt. *E. coli JM 109* Zellen wurden anschließend für drei Stunden bei 37°C auf einem Schüttler bei 225 rpm inkubiert. *E. coli DH10Bac*-Zellen dagegen wurden für mindestens vier Stunden bei 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 2000 rpm für 2 Minuten von dem SOC-Medium getrennt. Das Zellpellet wurde in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Agarplatte, die das zugehörige Antibiotikum enthielt, ausplattiert. Bei einer Transformation des pGem-T-Vektors beispielsweise enthielt der Agar Ampicillin. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Brutschrank. Die Inkubationsdauer betrug bei den *E. coli Jm109* 24 Stunden, dagegen bei den *E. coli DH10Bac* 48 Stunden. Die längere Inkubationsdauer resultiert aus dem Bacmid welches sich in den *E. coli DH10Bacs* befindet.

Tabelle 10: Verwendetes Material zur Bakterienkultivierung

Medien & Antibiotika	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 950 ml Milli-Q- H ₂ O pH 7 einstellen mit 5 N NaOH ad 1l Reinstwasser autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium +15 g Agar Autoklavieren, im Wasserbad auf 55°C abkühlen lassen, in Petrischalen gießen
LB-Kan/Tet/Gen/X-Gal/IPTG-Agar	LB-Agar + 1 ml Kanamycin [50 mg/ml] hinzufügen (Endkonz. 50 µg/ml) 1 ml Tetracyclin [10 mg/ml] hinzufügen

MATERIAL UND METHODEN

	<p style="text-align: center;">(Endkonz. 10 µg/ml)</p> <p style="text-align: center;">1 ml Gentamycin [7 mg/ml] hinzufügen (Endkonz. 7 µg/ml)</p> <p style="text-align: center;">X-Gal hinzufügen (Endkonz. 100 µg/ml)</p> <p style="text-align: center;">IPTG hinzufügen (Endkonz. 40 µg/ml)</p> <p style="text-align: center;">in Petrischalen gießen</p>
Ampicillin [100 mg/ml]	100 mg Ampicillin/ ml H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm Filter)
Kanamycin [50 mg/ml]	50 mg Kanamycin/ ml H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm Filter)
Tetracyclin [10 mg/ml]	10 mg Tetracyclin / ml H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm Filter)
Gentamycin [7 mg/ml]	7 mg Gentamycin / ml H ₂ O lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm Filter)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-I-D-galactosid)	50 mg/ml in DMF (Dimethylformamid)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	40 mg/ml in Milli-Q-H ₂ O
SOB-Medium	Zugabe von 1 ml 2 M Glucoselösung und 1 ml 1 M MgCl ₂ , sterilfiltriert Filtermembran mit 0,22 µm Porendurchmesser (Fa Sarstedt, D-Nümbrecht) ad 100 ml Milli-Q-H ₂ O

3.7 Eukaryotische Zellkultur

3.7.1 Baculovirus-Expressionssystem

Um einen klonierten eukaryotischen DNA-Abschnitt (Insert) aus einem Bakterium (Prokaryoten) in einen Eukaryoten zu transferieren, bedient man sich häufig der Viren. Diese haben die Eigenschaft ihre DNA in Wirtszellen zu übertragen. Der lytische Zyklus führt zur Expression der Virus-DNA, bis der Tod der Zelle eintritt. Im Anschluss wird die Zelle lysiert und die Viren werden freigesetzt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Virus handelt es sich um den *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV), ein stäbchenförmiges Virus, dessen doppelsträngiges Genom eine Größe von ca. 130 kb besitzt und von einer Polyhedrinkapsel umgeben ist. Diese Kapsel dient zum Schutz des Viruspartikels und zur Erkennung der Wirtszelle. Dieses Virus ist ein natürliches Pathogen der *Lepidoptera* und daher zur Infektion der *Sf9* (*Spodoptera frugiper*) und *HighFive*-Zellen (*Trichoplusia ni*) geeignet (Vaughn et al. 1977; Saarinen et al. 1999). Es ist einfach, das Genom des Virus zu modifizieren, so dass es eine Expressionskassette aufweist, in welcher sich das gewünschte Insert befindet. Diese Modifikation geschieht durch die Transposition eines prokaryotischen Transposons, welches in diesem Fall aus dem pFastBac-Vektor stammt. Die Tn7-Sequenzen begrenzen die Expressionskassette und befinden sich sowohl im pFastBac-Vektor als auch im Bacmid. Sie helfen der Transposase, die sich mit der Antibiotikaresistenz gegen Tetracyclin auf einem Plasmid in den *E. coli DH10 Bacs* befindet, die Expressionskassette an die richtige Stelle des Bacmids einzubauen. An dieser Stelle befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (MCS), in der sich der Leseraster für das *LacZ*-Gen befindet. Wird das Transposon an der richtigen Stelle eingebaut, wird der Leseraster unterbrochen und die Expression des *LacZ*-Gens kann nicht erfolgen. Zudem besitzt das Bacmid ein Resistenzgen gegen Kanamycin, der pFastBac-Vektor ein Resistenzgen gegen Gentamycin. So kann man durch Zugabe der drei Antibiotika (Tetracyclin, Kanamycin, Gentamycin) sowie von X-Gal und IPTG kontrollieren, ob die Transformation und Transposition erfolgreich waren. Das *LacZ*-Gen kodiert für die β -Galaktosidase. Ohne dieses Enzym kann das im Nährmedium enthaltene X-Gal (5-Brom-4-chlorindolyl- β -D-galactosid) nicht mehr zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt werden und die Kolonien sind weiß. Das exprimierte Gen unterliegt der Kontrolle eines Polyhedrin-Promotors, der für den Zyklus des Virus nicht essentiell ist. Die Bacmide sind mittels Minipräparation zu isolieren und für die Transfektion von Insektenzellen (*Sf9*) verwendbar. Die Viren werden in den *Sf9*-Zellen amplifiziert, bis ihr Titer hoch genug ist und sie sich für die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen (Ovastacin) eignen. Der Arbeitsablauf ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

Für die Expression des Ovastacins wurden Insektenzellen der Gattungen *Spodoptera frugiper* (*Sf9*) (CCLV-RIE 203, Riems) und *Trichoplusia ni* (*HighFive*) (CCLV-RIE 305,

Riems) verwendet. Die genaue Bezeichnung der *HighFive*-Zellen lautet BTI-TN-5B1-4/*High Five*. Ein großer Vorteil dieser beiden Zelllinien ist, dass sie als eukaryotische Zellen die Fähigkeit besitzen, posttranslationale Modifikationen an Proteinen durchzuführen. Dazu gehören z.B. die Glykosylierung und die korrekte Faltung der Proteine. Bei prokaryotischen Zellen muss die korrekte Faltung nach der Expression durch spezielle Puffersysteme sichergestellt werden. Die Zellen werden aus den Ovarien der Nachtfalter gewonnen und können als Monolayerkulturen in Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) gehalten werden. Die *HighFive*-Zellen werden zudem in Kolben als Suspensionskultur gehalten. Wir verwenden die *Sf9*-Zellen vor allem zur Transfektion und zur Virenamplifikation. Sie weisen nur eine geringe Größe auf und haften auf dem Boden der Zellkulturflaschen als Monolayer. Ihre Expressionsrate ist allerdings beim Ovastacin im Vergleich zu *HighFive*-Zellen nicht sehr hoch, so dass man bestimmte Proteine erst in höheren Amplifikationsstufen nachweisen kann. *HighFive*-Zellen dagegen weisen eine 5-10 fach höhere Expressionsrate auf. Zudem ist es möglich, sie in einem Kolben zu kultivieren, in dem sie als Suspensionskultur in großer Anzahl wachsen können. Das betreffende Protein ist in Zellkulturflaschen mit *HighFive*-Zellen deutlich leichter nachzuweisen, als in *Sf9*-Zellkulturflaschen. Zudem enthalten Medienproben von *HighFive*-Zellen kein störendes *Fetal Calf Serum* (FCS), da die Expression in FCS-freiem Medium erfolgt.

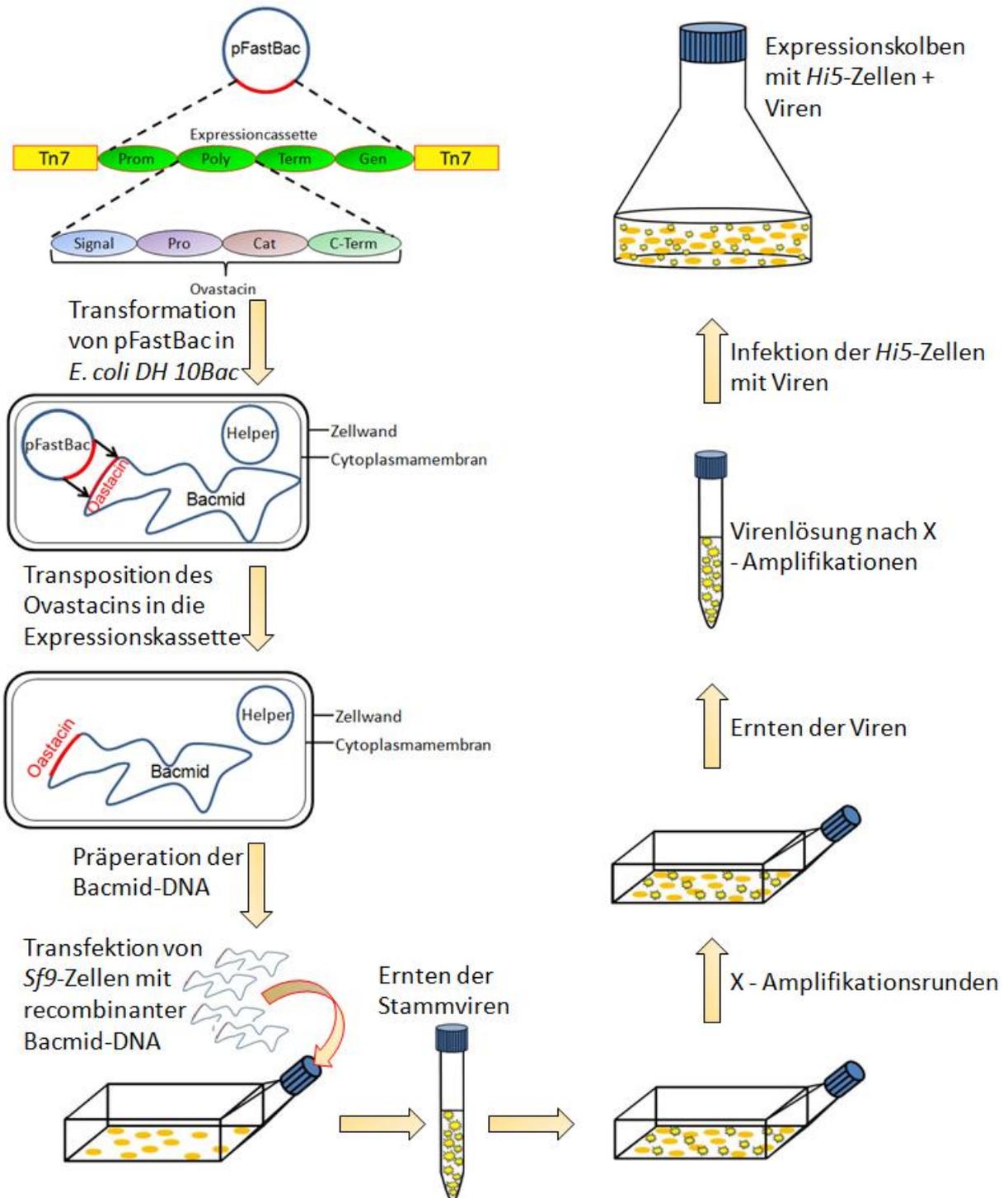


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Baculovirus-Expressionssystems.

Zuerst muss die cDNA (Ovastacin) in den Vektor pFastBac kloniert werden. Durch eine Transposition der Expressionscassette in das Bacmid des *Autographa californica* nukleären polyhedrosis Virus (AcNPV) wird die cDNA integriert. Diese Bacmide werden zur Transfektion von Insektenzellen eingesetzt. Anschließend erfolgt die Virenamplifikation. Ist der Virentiter hoch genug, werden sie zur Infektion von *HighFive*-Zellen genutzt. Die Abkürzungen bedeuten: Prom= Polyhedrin-Promotor; Poly= Polylinker für cDNA; Term= Terminationssignal; Gen= Gentamycin-Resistenz; Tn7= Transposon Erkennungssequenz.

3.7.2 Sf9-Zellen

Für die Kultivierung in Zellkulturflaschen werden Flaschen mit einer Grundfläche von 25 cm², 75 cm² bzw. 175 cm² und einem Medienvolumen von 5 ml, 12 ml bzw. 25 ml verwendet (Sarstedt, Nümbrecht). Die kleinen Flaschen dienen der Erzeugung der Stammviren, die mittleren der Produktion von Primär- und Sekundärviren und die großen der Amplifikation höherer Virenchargen. Hatten die Zellen eine Dichte (Konfluenz) von ca. 80% erreicht, sind sie bereit zur Infektion mit Viren oder zur weiteren Vermehrung durch Aufteilung auf neue Flaschen (Passagieren). Beim Passagieren wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Im Anschluss gibt man ca. die Hälfte des Ausgangsvolumens in die Flasche und spült die Zellen vom Flaschenboden ab. Danach überträgt man das Medium mit den Zellen entweder auf zwei neue Flaschen der gleichen Größe oder auf eine Flasche der darüber liegenden Größe. Zuvor muss so viel Medium in der neuen Flasche vorgelegt worden sein, dass nach Zugabe der Zellsuspension das Volumen seinen Sollwert erreicht. Schließlich sind die Platten noch leicht zu schwenken, damit sich die Zellen gleichmäßig am neuen Boden verteilen. Zur Kultivierung werden sie in den 27°C-Brutschrank gestellt. Das verwendete Nährmedium und dessen Zusätze sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Kulturmedium für die Kultivierung von Sf9-Zellen

Medium	Zusätze
Sf-Vollmedium <i>Grace's Insect</i> Medium (Invitrogen)	2,5 bis 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

3.7.3 HighFive-Zellen

Zum Ansetzen eines Fernbach-Kolbens für die Proteinexpression musste die Anzahl der *HighFive*-Zellen mittels Spinner-Flasche erhöht werden. Dazu wurde HF-Vollmedium in die Spinnerflasche gegeben und mit *HighFive*-Zellsuspension komplementiert, so dass die Zellzahl bei einem Gesamtvolumen von 100 ml bei 2×10^5 liegt. Die Flasche wird bei 27°C unter ständigem Rühren inkubiert, bis sie eine Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ erreicht hat. Der Fernbachkolben wird ähnlich angesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt hier allerdings 400 ml. Der Kolben ist für die Expression zu verwenden, wenn er eine Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ erreicht hat. Dazu benötigten die Zellen zwischen zwei und drei Tage. Die Infektion des Kolbens erfolgt generell durch Zugabe von 45 ml Virensuspension. Das verwendete Nährmedium und dessen Zusätze sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Kulturmedium für die Kultivierung von *HighFive*-Zellen

Medium	Zusätze
<i>HF</i> -Vollmedium	100 U/ml Penicillin
<i>Express Five</i> ® SFM	100 µg/ml Streptomycin
	16,5 mM Glutamin

3.7.4 CHO-Zellen zur Expression von Pro-Ovastacin-Strep

CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) sind eukaryotische immortalisierte Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*), der zur Überfamilie der *Muroidea* gehört. Die Zelllinie eignet sich sehr gut zur Expression von rekombinanten Proteinen, da ihre posttranslationalen Modifikationen denjenigen der Maus am nächsten kommen. Dabei wird, da es sich hierbei um Säugerzellen handelt, ein Säugerzellvektor mit dem gewünschten Insert und einer Antibiotikaresistenz in die Zelle durch Transfektion eingeschleust. Anschließend werden die Zellen durch Antibiotikazugabe selektioniert. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer in den Zellkulturflaschen. Dabei handelte es sich um Zellkulturflaschen, wie sie auch bei den Insektenzellen verwendet werden. Die Kultivierung erfolgte jedoch in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) Vollmedium bei 37°C und 5% CO₂. Beim Passagieren ließen sich die Zellen jedoch nicht einfach abspülen. Sie mußten durch eine Trypsinbehandlung abgelöst werden. Zuerst wurde das alte Zellmedium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit einem Waschpuffer gewaschen, um noch Reste des alten Zellmediums zu entfernen. Dieses enthält noch störendes FCS, welches die Aktivität von Trypsin hemmt. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und 2 ml Trypsinlösung (0,05%ige Trypsin/EDTA-Lösung) wurden auf die Zellen gegeben und mit frischem Waschpuffer aufgefüllt bis der Zellrasen bedeckt war. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für zehn Minuten. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Wenn die Zellen sich abgelöst hatten, konnten sie auf neue Platten verteilt werden. Die Aufteilung der Zellen erfolgte meist im Verhältnis 1:4, abhängig von der Zellzahl. Die neuen Zellkulturflaschen wurden anschließend mit DMEM-Vollmedium wieder aufgefüllt. Durch das FCS wurde das noch enthaltene Trypsin inhibiert. Alle benötigten Medien und deren Zusätze sind in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13: Medien zur Kultivierung von *CHO-X1* und *HEK-293* Zellen

Medium	Zusätze
Waschpuffer	Phosphatpuffer (DPBS-Puffer)
DMEM-Vollmedium <i>CHO-X1</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml), 10% FCS, 1:100 Stocklösung NEA (Nicht-essenzielle Aminosäuren)
DMEM-Vollmedium <i>HEK-293</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml), 10% FCS
Trypsin-Lösung	0,05%ige wässrige Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung

3.7.5 *HEK-293*-Zellen zur Expression von Pro-Ovastacin-Strep

HEK-Zellen (*Human Embryonic Kidney Cell*) sind menschliche embryonale Nierenzellen mit Teilen des humanen Adenovirus 5. Durch die Transformation des Virus in die Zellen zeigen sie Charakteristika von Krebszellen (Graham und van der Eb 1973). Wie auch die *CHO*-Zellen wachsen sie adhärent als Monolayer. Die Kultivierung sowie das Passagieren der Zellen erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den *CHO*-Zellen.

3.7.6 Transfektion

Unter Transfektion versteht man die Integration von DNA in einen Wirtsorganismus. In unserem Fall verwendeten wir Bacmid-DNA aus den *E. coli DH10bac*, welche das gewünschte Insert *Ovastacin* trugen und isolierten es mithilfe des Minipräparationskits E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen). Für die Transfektion der Säugerzellen mit Pro-Ovastacin wurden das isolierte Plasmid pBK-cmv-Mm2-His (Mertens 2004) verwendet. Die Transfektion erfolgte analog zur Transfektion von Insektenzellen mit den Bacmiden. Diese isolierte Plasmid-DNA wurde mit NaCl-Lösung (Komponente des PAANanofectin-Kits) gemischt. Dies führte zur Ausfällung der DNA. Das im Anschluss zugegebene Nanofectin ist ein positiv geladenes Polymer, welches in der Lage ist, die negativ geladene Bacmid-DNA zu binden. Dieser DNA-Nanofectin-Komplex schützt die DNA vor Degradation. Außerdem kann die Bacmid-DNA so von der Zelle endozytiert werden [Handbuch von PAA (Pasching, Austria)]. Als Wirtsorganismus wurden *Sf9*-Zellen verwendet. Zur Proteinexpression wurden die *HighFive*-Zellen infiziert. Aufgrund seiner

Größe wird das Bacmid ausschließlich mit weiten Pipettenspitzen (10-100µl) zur Verminderung der Scherkräfte pipettiert.

Zur Transfektion wurde zuerst das Bacmid (1-2 µg) mit NaCl-Lösung ad 250 µl vermischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 16 µl Nanofectin mit 234 µl NaCl-Lösung vermischt. Anschließend wurde die Nanofectin-Lösung zu der Bacmid-Lösung gegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach diesen Vorbereitungen erfolgte die eigentliche Transfektion der Zellen. Zu der Bacmid-Nanofectin-Lösung wurde 1,5 ml Zellmedium ohne Zusätze gegeben. Nachdem das alte Medium von den Zellen abgenommen war wurde diese Bacmid-Nanofectin-Lösung auf die Zellen gegeben. Die eigentliche Transfektion erfolgte in den folgenden 4-12 Stunden während der Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch Vollmedium mit allen Zusätzen ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen wurde das Medium von den Zellen getrennt. Die so erhaltenen Stammviren dienten zur Infektion von weiteren Zellen. Bei den Säugerzellen erfolgte anschließend eine Selektion mit 300 bis 500 µg/ml Geneticin G418 (Invitrogen, Karlsruhe).

3.8 Antikörperherstellung

Um in immunhistologischen Präparaten natives Ovastacin zu detektieren und die zymogene Form von Ovastacin von der aktiven zu unterscheiden, wurde die Herstellung zweier polyklonaler Antikörper bei der Firma Pineda (Pineda; Berlin) in Auftrag gegeben. Dabei handelte es sich zum einen um den Propeptid-Antikörper der im Folgenden als Anti-Propeptid-Antikörper bezeichnet wird. Dieser Antikörper ist gegen ein 20 Aminosäuren langes Fragment gerichtet welches ein Bestandteil des Propeptids ist. Die Sequenz des synthetisch hergestellten Peptids lautet: CSTSVPEGFTPEGSPVFQDK. Das Propeptid-Antiserum wurde affinitätschromatographisch über eine Peptidsäule gereinigt. Zum anderen handelt es sich bei dem zweiten Antikörper der generiert wurde, um einen Antikörper der gegen das gesamte Pro-Ovastacin-Strep gerichtet ist. Er wird im Folgenden als Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper bezeichnet. Für diesen Antikörper wurde rekombinant exprimiertes Pro-Ovastacin-Strep mittels einer Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt und zur Firma Pineda zur Immunisierung von Kaninchen geschickt. Für die Auswahl geeigneter Tiere für die Immunisierungen wurden Tiere verwendet, in deren Seren weder Pro-Ovastacin noch Ovastacin mittels Immundetektion detektiert werden konnte. Nach dem 110. Tag wurden die Immunisierungen gegen beide Antigene beendet und das Antiserum extrahiert.

3.9 Ermittlung der Proteinkonzentration

Der theoretische molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm wurde anhand der Anzahl der im Ovastacin enthaltenen Tyrosin- und Tryptophan-Reste ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach Cantor & Schimmel (Cantor und Schimmel 1980). Pro-Ovastacin-Strep besitzt acht Tryptophane und sieben Tyrosine. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt für das Pro-Ovastacin-Strep $54700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das theoretische Molekulargewicht des Pro-Ovastacin-Strep beträgt 48 kDa. Alle benötigten Formeln sind in Tabelle 14 zu finden.

Tabelle 14: Benötigte Formeln zur Berechnung der Massenkonzentration

Formeln	
Cantor & Schimmel, 1980	$\epsilon_{280} = 5700 \times aW + 1300 \times bY \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ $aW = \text{Anzahl der Tryptophanreste}$ $bY = \text{Anzahl der Tyrosinreste}$ Pro-Ovastacin-Strep $\epsilon_{280} = 54700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Lambert-Beer'sche-Gesetz	$E = \epsilon \times c \times d$
Konzentration c	$c = E / \epsilon \times d$

3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen wurde die diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Die benötigten Reagenzien sind in der Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Gebrauchslösungen für die reduzierende SDS-Gelelektrophorese

Reagenzien	Zusammensetzung
Trenngel-Puffer	18,17 g Tris in ca. 75 ml Milli-Q-H ₂ O lösen mit HCl konz. auf pH 8,8 0,4 g SDS ad 100 ml
Sammelgel-Puffer	6,05 g TRIS in 50 ml Milli-Q-H ₂ O lösen mit HCl konz. auf pH 6,8 einstellen 0,4 g SDS ad 100 ml
H ₂ O	Millipore gefilltertes H ₂ O
Rothiphoresgel 30 (Roth,Karlsruhe)	30%ige, wässrige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid, gebrauchsfertig, gasstabilisiert
TEMED (Tetramethyldiamin)	10% - 100 µl TEMED ad 1 ml Milli-Q-H ₂ O
APS (Ammoniumperoxodisulfat),	10% - 1g APS ad 10 ml Milli-Q-H ₂ O
Elektroden-Puffer	7,55 g Tris 35,5 g Glycin in 1 l Milli-Q-H ₂ O unter Erwärmen lösen (pH 8,3-8,4) 5 g SDS, ad 2,5 l
3 X Probenpuffer	2,28 g Tris, pH 6,8, mit konz. HCl 9 g SDS 30 ml Glycerin 1 mg Bromphenolblau ad 85 ml Milli-Q-H ₂ O
Dithiothreitol (DTT)	0,8 M DTT-Lösung

Für Proben die unter reduzierenden Bedingungen analysiert werden sollten, wurde dem 3 X Probenpuffer (850 µl) vor dem Gebrauch das Reduktionsmittel Dithiothreitol (150 µl) (DTT) zugegeben.

Tabelle 16: Pipettierschema für zwei 12%ige SDS-PAGE-Gele

Material	5% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel	3,8% Sammelgel
Puffer	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	1 ml
Milli-Q-H ₂ O	4,54 ml	3,21 ml	2,68 ml	2,44 ml
Acrylamid 30%	2,66 ml	1,33 ml	3,2 ml	506 µl
TEMED 10%	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl
APS 10%	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl

3.11 Western-Blot (Semi-dry Verfahren)

Um das Ovastacin spezifisch nachzuweisen, erfolgte ein Semi-dry Transfer [verändert nach Kyhse-Anderson (Kyhse-Andersen 1984)] der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran. Die hierfür benötigten Materialien und deren Zusammensetzung sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Materialien und Lösungen zur Durchführung eines Western-Blots

Material	Zusammensetzung
Kathoden-Puffer (KP)	25 mM Tris/HCl, 40 mM Glycin, pH 8 mit 20% Ethanol
Anoden-Puffer (AP)	300 mM Tris/HCl, pH 10,4 mit 20% Ethanol
PVDF-Membran Immobilion P, Millipore (Eschborn)	Porengröße: 0,45 µm
Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel)	3MM Chromatographiepapier

Es wurden vier in Kathodenpuffer getränkte und auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Papiere auf die Graphitplatte der Blot-Apparatur (Biotec-Fischer GmbH) gelegt, darauf dann das in Kathodenpuffer äquilibrierte SDS-Trenngel. Auf das Gel wurde die aktivierte PVDF-Membran drapiert. Die Aktivierung erfolgte durch Einlegen der Membran für

15 Sekunden in 98% (v/v) vergälltem Ethanol. Im Anschluss wurde die Membran in Milli-Q-H₂O gewaschen und für kurze Zeit in Anodenpuffer gelegt. Auf die Membran folgten vier Whatmann-Papiere, die in Anodenpuffer getränkt wurden. Alle Lagen wurden übereinander geschichtet (siehe Abbildung 11).

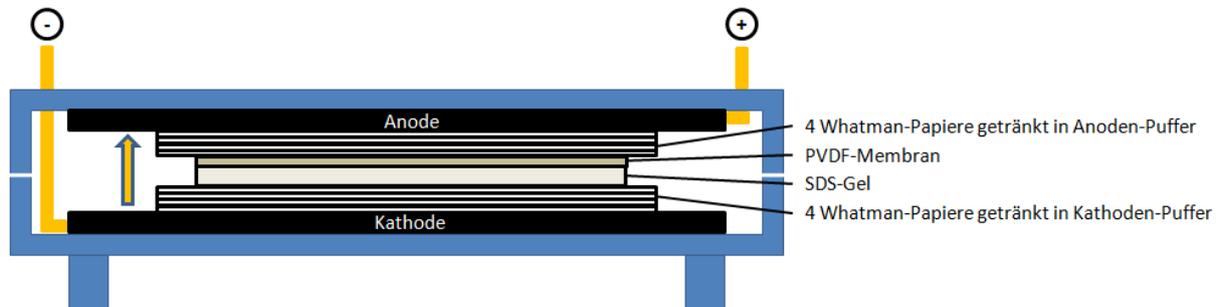


Abbildung 11: Aufbau eines Western-Blots im *Semi-dry* Verfahren.

Nach dem Western-Blot (80 mA pro Gel für 75 Minuten) wurde das Gel zur Kontrolle des Proteintransfers mit Coomassie, die PVDF-Membran gegebenenfalls reversibel mit Ponceaurot (Tabelle 18) gefärbt. Die Ponceaurot-Färbung kann mit PBS-Puffer (siehe Tabelle 20) wieder entfernt werden.

Tabelle 18: Ponceaurot-Färbelösung

Lösung	Zusammensetzung
Ponceaurot	0, 2% (w/v) Ponceau-S 3% (v/v) Trichloressigsäure 3% (v/v) Schwefelsalicylsäure

3.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Mit dem immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz wurden Proteine auf einer PVDF-Membran spezifisch nachgewiesen. Es wurden drei verschiedene primäre Antikörper verwendet: Der primäre monoklonale Antikörper aus der Maus (IBA, Göttingen) erkannte spezifisch den Strep-tag, der polyklonale Anti-Propeptid-Antikörper das Propeptid und der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper das gesamte Ovastacin. Die beiden letzteren genannten Antikörper stammen aus dem Kaninchen. Der sekundäre polyklonale Antikörper (anti-Maus, Amersham oder anti-Kaninchen, Amersham) detektiert den primären Antikörper und erkennt außerdem den Proteinmarker Magic Mark XP. Zudem ist der sekundäre AK mit der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, die in der Lage ist, Substrate mit Hilfe von H₂O₂ zu oxidieren (Abbildung 12). Als Substrat wurde Rotilumin

(Roth, Karlsruhe) verwendet. Zum Belichten wurden Röntgenfilme verwendet (GE Healthcare, Freiburg).

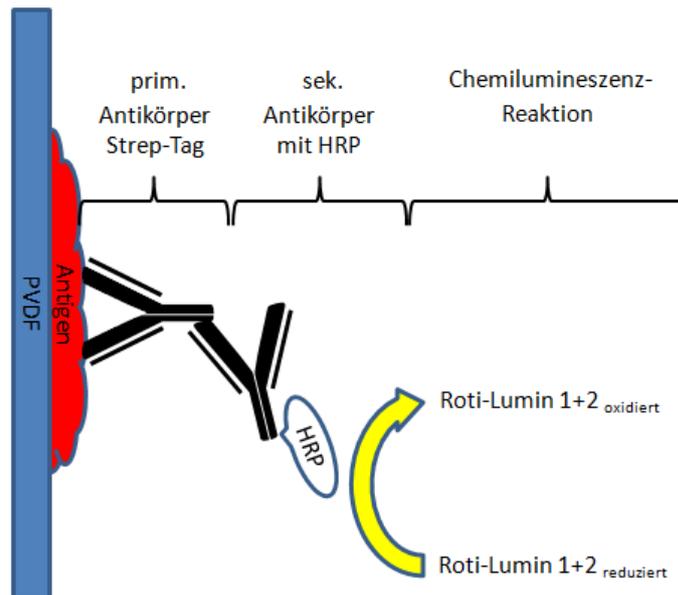


Abbildung 12: Wechselwirkung einer Immunodetektion mittels Chemilumineszenz.

Der primäre Antikörper tritt mit dem Protein in Kontakt. Das Protein besitzt als Antigen einen Strep-tag. Der sekundäre Antikörper mit der horseradish peroxidase (HRP) kann an den primären Antikörper binden. HRP reagiert mit dem eingesetzten Substrat (Rotilumin) und versetzt es in einen angeregten Zustand. Somit kommt es zur Chemilumineszenz.

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur. Die Membran lag stets mit der Proteinseite nach oben. Die verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 20 zu finden. Nach dem Blotten wurde die Membran zweimal für zehn Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wird sie über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer geschwenkt oder eine Stunde bei RT auf dem Schüttler gerüttelt. Durch diese Behandlung der Membran sollten unspezifische Bindungsstellen gesättigt werden damit an diese kein Antikörper mehr binden konnte. Anschließend wurde die PVDF-Membran zweimal mit TBS-T/T und einmal mit TBS für je 10 Minuten gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde in den primären Antikörper (siehe Tabelle 19) gelegt. Nach der Inkubationszeit wiederholte sich der Waschgang mit zweimal TBS-T/T und einmal TBS für die gleiche Zeitdauer. Nun wurde der Magermilch enthaltende sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 19) auf die Membran gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurden Reste des sekundären Antikörpers und des Magermilchpuffers durch viermaliges zehninütiges Waschen mit TBS-T/T entfernt. Im Anschluss wurde die Membran bis zur Detektion in TBS gelagert.

Tabelle 19: Verwendete Antikörper für die Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Monoklonaler Antikörper	
<i>mouse-anti- Strep-tag II</i> (Primärantikörper) (Qiagen, Hilden)	Verdünnung: 1:1000 In 3% BSA-Lösung in TBS
<i>goat-anti-mouse</i> -Antikörper mit Meerretich gekoppelter Peroxidase (Sekundärantikörper) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)	Verdünnung: 1:5000 In 10% Magermilchpulver Lösung in TBS
Polyklonaler Antikörper	
<i>rabbit</i> Pro-Ovastacin-Antikörper (Primärantikörper): „Anti-Pro-Ovastacin“	Verdünnung: 1:10000 In 7,5% Magermilchpulver Lösung in TBS
<i>rabbit</i> Propeptid -Antikörper (Primärantikörper): „Propeptid“	Verdünnung: 1:10000 In 7,5% Magermilchpulver Lösung in TBS
<i>goat anti-rabbit</i> -Antikörper mit Meerretich- Peroxidase (Sekundärantikörper) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)	Verdünnung: 1:5000 In 5% Magermilchpulver Lösung in TBS

Für die Substratreaktion wurde das vorgewärmte Substratgemisch (Rotilumin 1 und 2, siehe Tabelle 20) auf die Membran pipettiert. Die Membran musste stets mit dem Substratgemisch bedeckt sein. Nach drei Minuten wurde das Substrat entfernt. Die PVDF-Membran wurde in eine Frischhaltefolie gepackt und in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Die Expositionszeit des Films betrug meist ein bis drei Minuten. Längere Expositionszeiten brachten keine wesentliche Verbesserung. Anschließend wurde der Film in ein Entwicklerbad mit einem anschließenden Fixierbad gelegt.

Tabelle 20: Verwendete Lösungen und Materialien für die Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Lösungen	Zusammensetzung
TBS-Puffer (TBS)	10 mM Tris/ HCl 150 mM NaCl pH 7,5
TBS-Tween-Triton-Puffer (TBS-T/T)	20mM Tris/ HCl 500mM NaCl 0,05% Tween 20 0,2% Triton X-100 pH 7,5
Blockierungspuffer (Strep-tag)	3% BSA-Lösung in TBS
Blockierungspuffer (Anti-Pro-Ovastacin und Anti-Propeptid Antikörper)	10% Magermilchpulver In TBS-Puffer
Magermilchpulver-Lösung für prim. und sek. Antikörper	5-7,5% Magermilchpulver In TBS-Puffer
Rotilumin 1 und 2 (Roth, Karlsruhe)	Chemilumineszenzsubstrat je 750 µl von beiden Lösungen
Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Freiburg)	Chemilumineszenzfilm

Um die Antikörper nach einer Immundetektion wieder von der PVDF-Membran zu entfernen, benötigte man einen Puffer mit einem starken Detergens. Der verwendete Puffer enthielt aus diesem Grund 7 M Guanidinhydrochlorid. Die Inkubation der PVDF-Membran im *Stripping-Puffer* erfolgte bei RT für fünf Minuten. Im Anschluss wurde die Membran mit PBS-T gewaschen. Nach dem Waschen konnte eine erneute Immundetektion durch das Blockieren der Membran gestartet werden. Die Zusammensetzung des *Stripping-Puffers* ist in Tabelle 21 zu finden.

Tabelle 21: Zusammensetzung des *Stripping-Puffers*

Puffer	Zusammensetzung
<i>Stripping-Puffer</i>	7 M Guanidinhydrochlorid 50 mM Glycin, pH 10,8 0,05 mM EDTA 0,1 M KCl 20 mM β -Mercaptoethanol

3.13 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Native PAGE wurde im Laemmli (1979) System ohne SDS und reduzierende Agenzien durchgeführt. In diesem Fall aber wanderten die anionische Proteine (IP unter Sammelgel und Trenngel pH) durch ihre Eigenladung und entsprechend ihrer Größe zum Pluspol. Die verwendeten Puffer sind der Tabelle 22 zu entnehmen. Zum Abschluss wurde das Gel mit hintergrundfrei färbender Coomassie Brilliant Blue G250-Lösung gefärbt.

Tabelle 22: Gebrauchslösungen für eine native Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
4X Trenngel-Puffer	18,2 g Tris/ HCl pH 9 ad 100 ml
7X Sammelgel-Puffer	5,7 g Tris/ HCl pH 6,7 ad 100 ml
50X Elektroden-Puffer	7,5 g Tris/ HCl 36 g Glycerin ad 250 ml
3X Probenpuffer	3 ml Glycerin 0,6 ml Elektrodenpuffer ad 10 ml

3.14 Zymographie-Gelelektrophorese

Es ist möglich, mit Hilfe der Zymographie-Gelelektrophorese die proteolytische Aktivität eines Enzyms nachzuweisen. Hierbei wurde dem SDS-Gel ein Substrat (z.B. Casein) beigemischt. Das Casein wurde in dem Trenngelpuffer durch Erhitzen gelöst. Erst nach dem Abkühlen wurde die Acrylamidlösung zugegeben, um ein vorzeitiges Gelieren zu verhindern. Der Probenpuffer enthält kein DDT und die Proben wurden nicht gekocht. Nach dem Lauf des Gels wurde das SDS ausgewaschen und bei 37°C über Nacht in Aktivierungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine mit 12%iger TCA-Lösung für 1 Stunde fixiert. Zum Abschluss wurde das Gel mit hintergrundfrei färbender Coomassie Brillant Blue G250-Lösung (siehe Tabelle 24) gefärbt. Helle, nicht gefärbte Stellen im Gel waren ein Zeichen für Enzymaktivität. An diesen Stellen wurde das Substrat (Casein) abgebaut. Die Zusammensetzung der Komponenten zur Zymographie ist in Tabelle 16, die verwendeten Puffer sind in Tabelle 15 und Tabelle 23 zu finden.

Tabelle 23: Puffer für eine Zymographie-Gelelektrophorese

Reagenzien	Zusammensetzung
Waschpuffer	2,5% Triton
Aktivierungspuffer	0,05 M Tris/HCl 0,15 M NaCl pH 7,3

3.15 Native Zymographie-Gelelektrophorese

Die native Zymographie ist eine Zymographie-Gelelektrophorese ohne SDS. Die Zusammensetzung der Puffer (Tabelle 22) und benötigten Mengen (Tabelle 16) sind wie die bei einem nativen Gel. Das Gel konnte nach der Gelelektrophorese direkt in den Aktivierungspuffer gelegt werden. Auch hier erfolgte nach der Inkubation die hintergrundfreie Färbung mit einer Coomassie-Brillant-Blue G250 Lösung.

3.16 Coomassie Brillant Blue-Färbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden mit der hintergrundfrei färbenden Coomassie Brilliant Blue G250) (CBB)-Färbung nach Neuhoff gefärbt (Neuhoff et al. 1990). Mit dieser Methode lassen sich Proteinbanden bis zu einer Nachweisgrenze von 0,1-1 µg nachweisen. Im Vergleich zu anderen Färbemethoden bleibt das SDS-Gel selbst ungefärbt. Dies wird durch die Zugabe von Ammoniumsulfat erreicht, welche mit dem Farbstoff in der CBB unlösliche Kolloide erzeugen, die nicht in der Lage sind in das Gel einzudringen. Sie dienen nach der Zugabe

von 20%igem Ethanol als Farbstoffspeicher. Der Triphenylmethan-Farbstoff kann jedoch durch das Gel diffundieren und lagert sich dort an die basischen Aminosäurereste der Proteine an. Vor der Behandlung mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 24) wird das Gel für mindestens 1 Stunde in eine 12%ige TCA-Lösung gelegt. Danach wird die TCA-Lösung entfernt und die Coomassie-Färbelösung auf das Gel gegeben und auf dem Schwenker bei RT über Nacht inkubiert. Alternativ wurden die Gele auch mit der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 25) nach Kang (Kang et al. 2002) gefärbt. Bei diesem System ist die Sensitivität zum Anfärben von Protein höher. Am nächsten Tag konnte die Färbelösung entfernt werden und das Gel mit Wasser gewaschen werden. Mit 100% Ethanol konnte man das Gel wieder entfärben, um z.B. andere Nachweismethoden anzuwenden.

Tabelle 24: Zusammensetzung der hintergrundfrei färbenden Coomassie-Lösung und der TCA-Lösung verändert nach Neuhoff (1990).

Lösungen	Zusammensetzung
TCA-Lösung	12% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) in Milli-Q-H ₂ O
Stammlösung 1	5 g Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G-250-Lösung (CBB G-250) in 20 ml dH ₂ O
Stammlösung 2	2 % (v/v) Phosphorsäure 10 % Ammoniumsulfat ad 980 ml MilliQ- H ₂ O
Stammlösung 3	20 ml Stammlsg. 1 + 980 ml Stammlsg. 2
Coomassie-Färbelösung	40 ml Stammlösung 3 + 10 ml 100% Ethanol

Tabelle 25: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung und Entfärber nach Kang (2002)

Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung nach Kang	0,02% (w/v) Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G-250 5% (w/v) Aluminiumsulfat-Hydrat 10% (v/v) Ethanol (99%) 2% (v/v) o-Phosphorsäure 83% MilliQ- H ₂ O
Entfärber nach Kang	10% (v/v) Ethanol (99%) 2% (v/v) o-Phosphorsäure 88% MilliQ

3.17 Reinigung

3.17.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Um die Proteine aus dem Zellkulturmedium zu gewinnen, wurden sie mit Ammoniumsulfat ausgesalzt. Als optimale Ammoniumsulfatkonzentration für Pro-Ovastacin-Strep wurde eine 60%-ige Sättigung (390 g/l) ermittelt. Bei Ovastacin-Strep reichte eine 20%ige Ammoniumsulfat-Sättigung (114 g/l) aus. Vor der Zugabe des Ammoniumsulfats wurden die Zellen vom Medium durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 2500 rpm getrennt. Nach der stufenweisen Zugabe des Ammoniumsulfats wurde der Ansatz über Nacht bei 6°C gerührt. Das ausgefallene Protein wurde am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 9000 rpm und 4°C für 120 Minuten vom Medium getrennt. Der Rest des Mediums wurde anschließend nochmals für 30 Minuten zentrifugiert, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Das Pellet wurde auf Eis in einem Volumen Dialysepuffer (Tabelle 26) resuspendiert, das etwa 1/10 bis 1/20 des Ausgangsvolumens entsprach.

3.17.2 Dialyse

Nach der Ammoniumsulfat-Fällung musste das in hoher Konzentration vorliegende Ammoniumsulfat durch eine Dialyse entfernt werden. In diesem Fall wurde der Visking-Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg) mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa verwendet. Zur Vorbereitung wurde der Schlauch für ca. 2 Stunden in 70°C heißes Reinstwasser gelegt um noch vorhandenes Glycerin, Keime und unerwünschte Ionen aus dem Schlauch zu lösen. In den 2 Stunden wurde das Wasser mehrfach gewechselt. Es wurde gegen einen Dialysepuffer 50 mM Tris/HCl, pH 7,3, 150 mM NaCl für mind. 3 Stunden im Kühlraum bei 6°C unter Rühren dialysiert. Dabei wurde der Dialysepuffer (900 ml) mind. einmal pro Stunde gewechselt. Nach der Dialyse wurde das Dialysat für 15 Minuten bei 9000 rpm (4°C) zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

3.17.3 Affinitätschromatographie über Strep-Tactin

Alle Ovastacin-Konstrukte trugen einem Strep-tag am C-terminalen Ende. Dabei handelt es sich um eine Sequenz aus 8 Aminosäuren (NH₂-WSHPQFEK-COOH). Dadurch konnte die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie angewendet werden (Voss und Skerra 1997; Schmidt und Skerra 2007). Das Protein wurde durch ein kontinuierliches Auftragen auf die Säule [(10 ml Volumen); Bio-Rad, München] über Nacht bei 4°C an das Säulenmaterial Strep-Tactin® Sepharose® (IBA, Göttingen) gebunden. Nach dem Waschen mit dem zehnfachen Säulenvolumen wurde durch Zugabe von D-Desthiobiotin eluiert. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen betrug je 1,5 ml. Alle Arbeiten waren bei 4°C durchzuführen. Die

verwendeten Puffer sind in Tabelle 26 zu finden. Zur Regeneration der Säule wurde diese mit dem Regenerationspuffer mit dem 10-fachen Volumen der Säule gewaschen. Das in dem Puffer enthaltene HABA entfernt das D-Desthiobiotin von der Säule. Vor der erneuten Nutzung der Säule wird der Regenerationspuffer durch Waschen wieder entfernt. Die Reinigung der aktiven Ovastacin-Varianten Pro-Ovastacin-Strep und Ovastacin-Kat-Strep erfolgte während der Betreuung der Diplomarbeit von Konstantin Karmilin (Karmilin 2012).

Tabelle 26: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung für die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer/ Dialysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/ HCl pH 7,3
Elutionspuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/ HCl 2,5 mM Desthiobiotin pH 7,3
10X Regenerationspuffer (IBA, Göttingen)	1 m Tris / HCl, pH 8 1,5 M NaCl 10 mM EDTA 10 mM HABA <i>(hydroxy-azophenyl-benzoic acid)</i>

3.17.4 Gelchromatographie über Hema Bio 1000

Die vorgereinigten Proteine wurden nach ihrer Größe durch Gelfiltration über eine Hema Bio 1000 Säule der Firma MZ Columns (Mainz) mit einem Binären Niederdruck-Gradientensystem (Kontron Instruments, Rossdorf) getrennt. Die Anlage bestand aus der Pumpe 422, dem HPLC Detektor 430 sowie dem Autosampler 360. Gesteuert wurde die Anlage mit der Chromeleon V.6.04 (Dionex GmbH, Idstein) Software. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die für den Eichlauf verwendeten Proteine (je 200 µg) sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Sie wurden in einzelnen Läufen getrennt analysiert. Es wurde 44 µg Pro-Ovastacin in die Säule injiziert. Der Laufpuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl und war filtriert und entgast. Die Umrechnung der am Detektor gemessenen mV in die OD_{280nm} erfolgte durch die Vorgabe: 1 V = 1 OD_{280nm}.

Tabelle 27: Verwendete Eichproteine für den Eichlauf der Gelfiltration mit zugehörigen Molekulargewicht

Protein	Molekulargewicht in kDa
<i>Biomphalaria</i> Hämocyanin	1800
Thyroglobulin	669
Katalase	232
Aldolase	158
BSA	67
DNase	31
α -Chymotrypsinogen	25
Lysozym	14

3.18 Herstellen von Zelllysaten

Um die infizierten Zellen auf Anwesenheit von Ovastacin mittels Western-Blot-Analyse zu untersuchen, war es nötig, die Zellen aufzuschließen. Alle Arbeitsschritte erfolgten soweit nicht anders erwähnt bei 4°C. Dazu wurde das Zellmedium durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1500 rpm entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet dreimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Zur Zelllyse wurde 1 Volumen Lysispuffer (Tabelle 28) auf das Zellpellet gegeben und anschließend gevortext. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 0,5 bis eine Stunde. Alternativ wurden die Zellen durch Einfrieren (-20°C) lysiert und bei 13200 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3x Probenpuffer versetzt und als Zelllysate weiterverwendet. Die Zellreste wurden in PBS-Puffer resuspendiert und gewaschen, um Reste der Zelllysate zu entfernen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 13200 rpm sedimentiert und der PBS-Puffer verworfen. Abschließend wurden die Zellreste resuspendiert und mit 3x Probenpuffer versetzt.

Tabelle 28: Für die Zelllyse verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ /HCl 2,68 mM KCl 1,76 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5
Lysispuffer	PBS + 1% (v/v) Triton X-100

3.19 Herstellung von Organlysaten

Die Spendermäuse wurden für die Organentnahme durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Die isolierten Organe wurden in 1,5 ml Zentrifugengefäße separiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im weiteren Verlauf wurden diese Organe in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser und Pistill homogenisiert. Das Gewicht des Homogenats wurde bestimmt und Lysispuffer (Tabelle 29) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde auf Eis. Anschließend wurde das Lysat für 10 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand ein weiteres Mal bei 13200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um sicherzustellen das alle Zellreste entfernt sind.

Tabelle 29: Lysispuffer zur Herstellung der Organlysate

Puffer	Zusammensetzung
PBS-T	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 9,2 mM Na ₂ HPO ₄ / HCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 1% (v/v) Triton X-100 ad 1 l Milli-Q-H ₂ O pH 7,4

3.20 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse von Pro-Ovastacin-Strep durch die proteolytischen Enzyme Trypsin, Elastase und MMP-2 wurden *in vitro* stets bei 37°C durchgeführt. Der Inkubationsansatz lag in dem Pro-Ovastacin-Puffer (50 mM Tris/ 150 mM NaCl) bei pH 7,3 vor. Diesem Ansatz wurden die benötigten Enzyme in entsprechender Menge zugesetzt (Tabelle 30 bis Tabelle 32). Dem Ansatz wurde zu den vorgegebenen Zeiten 20 µl entnommen und die Reaktion mit 10 µl kochendem (100°C) 3x Probenpuffer gestoppt. Bei den Ansätzen die mittels Zymographie untersucht wurden, wurden die Proben mit nativem 3x Probenpuffer ohne DTT versetzt. Bei der eingesetzten Elastase (EPC; Elastin Products Company) handelt es sich um die Pro-Form, die sich selbst bei einem leicht alkalischen pH-Wert aktiviert (Viscarello et al. 1983). Gelöst wurde sie in 50% Glycerin/ 50% NaOAc bei pH 5 (10 mg/ml). Das humane Pro-MMP-2 (Enzo Life Science, Lörrach) wurde mit APMA (Amino-Phenyl-Mercuric-Acetate) aktiviert. Das Pro-MMP-2 (0,2 mg/ml) war in 50 mM Tris/ 200 mM NaCl/ 5 mM CaCl₂, 0,05% Brij-35 bei pH 7 gelöst. Zur Aktivierung von Pro-MMP-2 wurde eine 40 mM APMA-Lösung in DMSO angesetzt und anschließend in einer Verdünnung von 1:40 mit Pro-MMP-2 bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Tabelle 30: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit Elastase

Enzym	Konzentration	Eingesetzte Mengen
Pro-Ovastacin	3,5 µM	20 µl
Elastase	39,1 µM	1 µl

Tabelle 31: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit Trypsin

Enzym	Konzentration	Eingesetzte Mengen
Pro-Ovastacin	3,6 µM	16 µl
Trypsin	0,06 µM	1 µl

Tabelle 32: Aktivierungsansatz von Pro-Ovastacin mit MMP-2

Enzym	Konzentration	Eingesetzte Mengen
Pro-Ovastacin	3,5 µM	113 µl
MMP-2	2,7 µM	12 µl

3.21 FRET-Assay

Um die Aktivität von Proteasen zu bestimmen wurde der FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) verwendet. Diese Methode beruht auf dem von Theodor Förster (Förster 1948) entdeckten strahlungsfreien Energieübergang von einem Donor zu einem Akzeptor (Sun et al. 2007). Im Fall des hier benutzten Peptidsubstrats sind Donor und Empfänger fluoreszierende Seitenketten in einer Peptidkette. Die Fluoreszenzemission des Donors wurde im intakten Peptid vom Akzeptor absorbiert. Bei der Spaltung des Peptids wurde die Donoremission stärker und war ein Maß für die Enzymaktivität. Diese erfolgte durch die Berechnung von $\Delta t = t_x - t_0$. Dabei handelte es sich bei t_0 um die Anfangsintensität und bei t_x um die Intensität zum Zeitpunkt x . Es wurden jeweils Mittelwerte von Doppelansätzen berechnet. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Substrate ist in Tabelle 41 zu finden. Die Anregung erfolgte bei 328 nm (350 nm bei Substrat 12) und die Emission wurde bei 393 nm gemessen (520 nm bei Substrat 12). Die Donor-Gruppe bei diesem Substrat ist 7-Methyloxy coumarin-4-yl acetyl. Bei dem Akzeptor (Quencher) handelte es sich um die DNP-Gruppe (2,4-Dinitrophenyl). Das Substrat wurde in 100% DMSO gelöst (Stammlösungskonzentration 1 mM) und anschließend mit Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,3) verdünnt. Die DMSO-Konzentration sollte maximal 1% im Messansatz betragen, da DMSO die Enzymaktivität beeinflusst. Gemessen wurde bei 37°C mit einem heizbaren Thermo Varioscan® Flash Multifunktions-Spectralreader in 96-Well-Platten.

Tabelle 33: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin mit Elastase

Reagenzien	Konzentration	Menge
Pro-Ovastacin	2 μ M	20 μ l
(Pro)-Elastase	39 μ M	1 μ l
Pefabloc	100 mM	1 μ l
Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7,3	77 μ l
Substrat 1-10	1 mM	1 μ l

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 34: Inhibitionsversuch von aktiviertem Ovastacin durch Fetuin B

Reagenzien	Konzentration
Pro-Ovastacin	2,5 μM
(Pro)-Elastase	0,1 μM
Pefabloc	20 mM
Fetuin B	6,43 μM
Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7,3
Substrat 12	10 μM

Tabelle 35: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin mit Trypsin

Enzym	Konzentration	Eingesetzte Mengen
Pro-Ovastacin	1,3 μM	39 μl
Trypsin	0,4 μM	1 μl
Pefabloc	44 μM	5 μl
Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7,4	54 μl
Substrat 12	1 mM	1 μl

3.22 pH Abhängigkeit der Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep

Die pH-Abhängigkeit der Aktivierung von Pro-Ovastacin wurde in verschiedenen Puffersystemen analysiert. Die verwendeten Puffer und Mengen sind in Tabelle 36 und Tabelle 37 zu finden.

Tabelle 36: pH-Abhängigkeit der Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep

Reagenzien	Zusammensetzung
Pro-Ovastacin-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 7,0
Davis Puffer	25 mM 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure 25 mM KH ₂ PO ₄ 25 mM Tris 25 mM KCl 12,5 mM Tetraborat mit HCl bzw. NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Tabelle 37: Aktivitätsmessung von Pro-Ovastacin

Reagenzien	Konzentration	Versuchsansatz	Kontrollansatz
saure pH-Werte			
pH-Puffer	50 mM NaOAc pH 2-6,5	79 µl	79 µl
Pro-Ovastacin-Strep pH 7,3	2,3 µM	20 µl	-
Substrat 11	1 mM	1 µl	1 µl
Leer-Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7,3	-	20 µl
alkalische pH-Werte			
pH-Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7-10	79 µl	79 µl

Pro-Ovastacin-Strep pH 7,3	2,3 μ M	20 μ l	-
Substrat 11	1 mM	1 μ l	1 μ l
Leer-Puffer	150 mM NaCl/ 50 mM Tris pH 7,3	-	20 μ l

3.23 Sequenz-Alignments und Modellierung von Pro-Ovastacin

Alignments wurden mit dem Programm CLUSTAL W (Goujon et al. 2010; Sievers et al. 2011) erstellt (Default Einstellung). Die für eine Aktivierung möglichen Schnittstellen wurden mithilfe der Merops Datenbank (Rawlings et al. 2008) analysiert. Sven Friedrich modellierte dankenswerterweise mit Hilfe des Programms MODELLER (Marti-Renom et al. 2000) die Pro-Ovastacin-Struktur. Als Strukturvorlage diente die Kristallstruktur des Pro-Astacins (pdb-Code: P07584), (Guevara et al. 2010). Die Visualisierung erfolgte mit CHIMERA (Pettersen et al. 2004).

3.24 Superovulation von Mäuseeizellen

Da die Anzahl an reifen Eizellen bei Mäusen normalerweise nicht sehr hoch und zudem asynchron ist, wurde eine Hormonbehandlung mit PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) und hCG (*human chorionic Gonadotropin*) durchgeführt. Bei der dadurch bedingten Superovulation konnten bis zu 18 reife Eizellen je Eierstock den Eileiter erreichen. Die Spendertiere wurden ca. 57 Stunden vor der Paarung am späten Vormittag mit PMSG (10 U/200 μ l) behandelt. 48 Stunden später wurde hCG verabreicht. Beide Hormone wurden mittels Injektion in den Bauchraum verabreicht. Die Paarung der Tiere erfolgte ca. 3 Stunden vor Beginn der Nachtruhe und wird als Zeitpunkt 0 dpc (*days post coitum*) bezeichnet. Bei den Spendertieren handelte es sich um den Stamm FVB von *Mus musculus*. Die Hormonbehandlung sowie die Paarungen wurden von Tierpflegern der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz durchgeführt. Von dieser Einrichtung stammen auch die Spendertiere.

3.25 Präparation der Eileiter aus FVB Mäusen

FVB Mäuse sind ein Modellorganismus für die Reproduktionsforschung. Der Name geht auf ihre Sensibilität gegenüber Friend Virus B zurück. Bemerkenswert ist die Beschaffenheit ihrer *Zona pellucida*. Diese ist besonders stabil ausgebildet, was den Embryonen eine relativ hohe Unempfindlichkeit gegenüber mechanischem Druck verleiht. Deshalb eignen sie sich

besonders gut für die *in vitro*-Kultivierung. Sie lassen sich problemlos bis ins Blastozystenstadium kultivieren.

Um gepaarte Tiere von ungepaarten zu unterscheiden, untersuchte man die betreffenden Mäuse auf Anwesenheit eines Vaginalpfropfs. Bei Vaginalpfropfen handelt es sich um koagulierte Proteine der Samenflüssigkeit, welche sich bis zu 12 Stunden nach der Paarung in der Vagina befinden und danach herausfallen. Zur Entnahme des Ovars und des Ovidukts wurden die gepaarten Tiere durch Genickbruch getötet. Die Bauchdecke wurde geöffnet (Abbildung 13A) und die darüber liegenden Organe (Dünn- und Dickdarm) wurden zur Seite geschoben. Im Anschluss waren das Ovar und das Ovidukt vom umliegenden Fettgewebe zu trennen. Dies war durch Anheben des Ovidukts mit einer Pinzette und durch einen Schnitt durch das darunterliegende Gewebe möglich. Die präparierten Eileiter (Abbildung 13B) wurden in gekühltem 4°C kaltem M2-Medium (Sigma) aufbewahrt, vorzugsweise in 100 µl großen Tropfen pro Eileiter. Alle Arbeitsschritte in M2-Medium wurden bei ca. 4°C durchgeführt. Das Medium diente nur der kurzfristigen Lagerung der Eizellen und die niedrige Temperatur verzögerte die Weiterentwicklung der Eizellen. Ungepaarte Tiere wurden für zwei Wochen unbehandelt gehalten. Danach standen sie wieder für eine weitere Hormonbehandlung zur Verfügung.

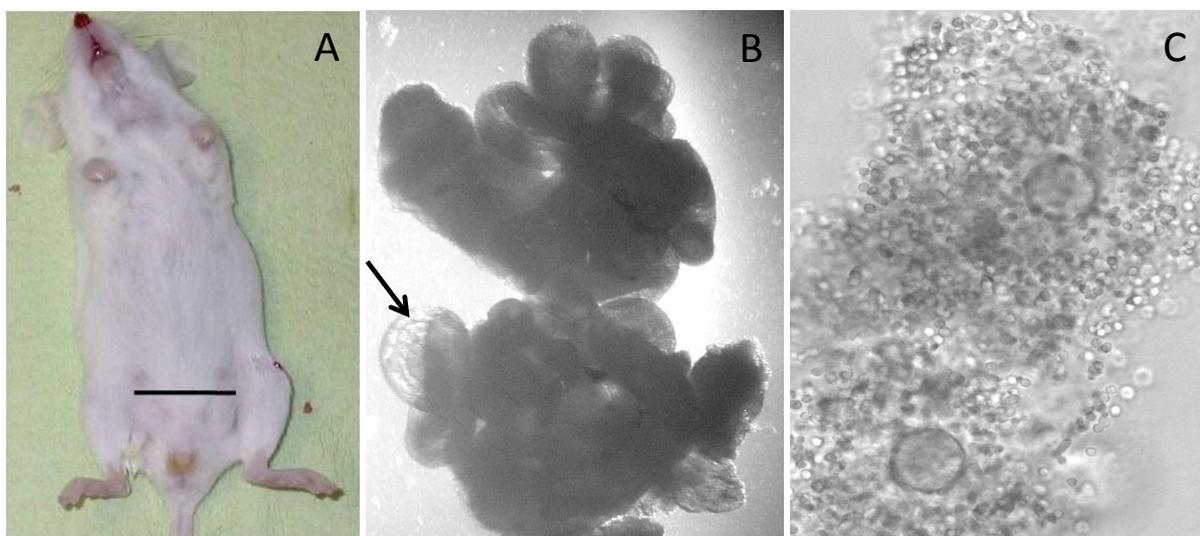


Abbildung 13: Präparation der Zygoten.

A: Schnittrichtung zum Öffnen des Bauchraums einer FVB-Maus; B: Präparierter Eileiter zur Entnahme der Embryonen (0,5 dpc); C: Oocyten mit Cumuluszellen vor der Behandlung mit Hyaluronidase

3.26 Entnahme der Zygoten

Die Zygoten wurden unter einem Binokular bei 40-facher Vergrößerung entnommen. Dies gelang durch Festhalten des präparierten Eileiters mit einer feinen Pinzette. Anschließend suchte man eine Stelle (meist kurz nach dem Übergang vom Ovar zum Eileiter) an welcher der Eileiter leicht angeschwollen wirkte. An dieser Stelle war die Ampulle mit den Eizellen zu

finden. Die Ampulle war leicht durchsichtig und bei genauerem Hinsehen konnte man die Umrisse der Eizellen erkennen. An dieser Stelle setzte man nun einen Schnitt, um die Ampulle zu öffnen. Hierfür hat sich eine Injektionsnadel als besonders geeignet erwiesen. An dem Riss in der Ampulle trat ein kleines netzartiges Gebilde aus, in dem sich die Eizellen befanden. Bei dem netzartigen Gebilde handelte es sich um die Cumuluszellen, welche die Eizellen umgeben und diese zusammenhalten. Die Eizellen mit den Cumuluszellen wurden in einen neuen gekühlten Tropfen M2-Medium (ca. 50 μ l) mit einer Transferkapillare oder einer 10 μ l Pipette überführt. In den folgenden Schritten wurde zum Umbetten der Eizellen stets eine der beiden Methoden verwendet. Der Vorteil der Transferkapillare ist ihre Eigenschaft, dass die Zygoten in dieser sichtbar bleiben und dass beim Transfer nur wenig des Ausgangsmediums mit überführt wird. Der Nachteil ist ihr hoher Preis, die Zerbrechlichkeit der Spitze und ihr Kontaminationsrisiko, da es nötig ist, mit dem Mund zu pipettieren. Zudem musste die Konstruktion vor jedem Gebrauch autoklaviert werden. Im Vergleich dazu überführte die Pipette relativ viel des umgebenden Mediums der Eizellen und es war nicht möglich, die Eizellen in der Pipettenspitze zu lokalisieren. Als Vorteil sind die einfache Austauschbarkeit durch neue kostengünstige sterile Spitzen, ihre Robustheit, ihre Fähigkeit große Mengen an Eizellen aufzunehmen und ihre einfache Handhabung mit einem wesentlich geringeren Kontaminationsrisiko zu nennen.

3.27 Vorbereitung der Zygoten für die Kultivierung

Die Zygoten welche sich noch in den Cumuluszellen befanden, wurden aus diesen herausgelöst. Dies gelang mit Hilfe des Enzyms Hyaluronidase (300 μ g Hyaluronidase/ml M2-Medium). Man gibt zu den sich im M2-Medium befindenden Cumulus-Eizellennetzen das zuvor auf Eis gelagerte Enzym. Eine geringere Konzentration an Hyaluronidase (200-300 μ g) verhindert eine Schädigung der Eizellen. Eine zu niedrige Konzentration (< 100 μ g) verlängert lediglich die Inkubationszeit der Hyaluronidase. Es wurde in unseren Versuchen eine Konzentration von 150 bis 250 μ g/ml verwendet. Die Hyaluronidase löste die Cumuluszellen von den Eizellen. Dieser Vorgang dauerte ca. zwei bis vier Minuten und war gut unter dem Binokular zu verfolgen. Lagen die Eizellen frei gelöst vor, so waren sie zügig in frisches gekühltes M2-Medium (1 ml) zu überführen. Diesen Ablauf wiederholte man noch zweimal, sodass die Eizellen nach der Enzymbehandlung dreimal in M2-Medium gewaschen wurden. Anschließend waren die Eizellen bereit für die Mikroinjektion in M2-Medium oder für die Kultivierung in M16-Medium (Sigma).

3.28 *In vitro*-Kultivierung der Zygoten

Zur Kultivierung der Zygoten wurden diese in 37°C warmes M16-Medium gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das M16-Medium befand sich in einer Petrischale mit einem inneren Rand, welcher ca. 1 ml Medium fassen kann. Zudem lag der Deckel der Petrischale auf kleinen Noppen, sodass ein Gasaustausch möglich ist. Das M16-Medium konnte mit Mineralöl (Sigma) überschichtet werden, um ein Austrocknen des Mediums zu verhindern. Erfahrungen zeigten jedoch, dass dies nicht nötig ist. In einer Schale befanden sich normalerweise mindestens 10 Zygoten, da sich erfahrungsgemäß nicht alle Zygoten weiterentwickeln. Zu Beginn der Kultivierung lagen die Zygoten im Einzellstadium vor (Zygote). Dies ist der Zeitpunkt 0,5 dpc. In Tabelle 38 sind die verschiedenen Entwicklungsstadien der Embryonen und deren Zeitpunkt aufgeführt.

Tabelle 38: Zeittafel der verschiedenen Zellstadien bei *Mus musculus* bei der Entwicklung.

Zeitpunkt dpc	Stadium
0,5 (12 h)	Einzeller (Zygote)
1,5 (36 h)	Zweizeller
2 (48 h)	Vierzeller
2,5 (60 h)	Achttzeller (Morula)
3 (72 h)	16-Zeller (Morula)
3,5 (84 h)	Blastocyste

3.29 Immunhistochemischer Antikörpertest mit *Sf9*-Zellen

Zur Überprüfung der Transfektion wurden *Sf9*-Zellen auf 24-Well-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden zum Anheften der Zellen an den Boden wurden die Zellen mit der Virensuspension infiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch -20°C kalten 99% Ethanol für 20 Minuten bei -20°C im Gefrierschrank auf den 24-Well-Platten fixiert. Anschließend wurde der Ethanol abgenommen und die Zellen mit PBS-T für 10 Minuten gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen nach der Abnahme des PBS-T mit einer 2%igen PFA-Lösung für 30 Minuten fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-T wurden die Zellen mit einer 50 mM NH₄Cl-Lösung für 10 Minuten zum Absättigen der unspezifischen Bindungen durch das PFA inkubiert. Die Ammoniumchloridreste wurden mit einem Waschschrift mit PBS-T entfernt. Die Blockierung der unspezifischen Proteine erfolgte durch eine einstündige Inkubation in 10%igen Ziegen Serum. Das Ziegen Serum wurde durch

zweimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Diesem Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:10 000 Anti-Pro-Ovastacin/ Anti-Propeptid) für eine Stunde. Der Primärantikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Der Sekundärantikörper Alexa 488 wurde für 1 Stunde, geschützt vor Licht, inkubiert. Der Alexa 488 Antikörper wurde nach der Inkubation verworfen und durch zweimaliges Waschen von den Zellen mit PBS-T wurde der restliche ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit DAPCO-Glycerin überschichtet. Der DAPCO-Glycerin-Puffer enthielt den Farbstoff DAPI zum Anfärben der Zellkerne. Die so vorbehandelten Platten wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert bis die Aufnahmen bei einer 20-fachen Vergrößerung mit dem Leica DM IRBE TCS Mikroskop durchgeführt wurden. Die Waschschriffe erfolgten bei RT für eine Dauer von 10 Minuten. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 39 zu finden.

3.30 Antikörperbehandlung und Fixierung von Embryonen

Die in M16-Medium inkubierten Embryonen wurden, nachdem sie das gewünschte Zellstadium erreicht hatten, für die Immundetektion zum Nachweis von Ovastacin vorbereitet. Dazu wurden die Embryonen in TBS-T gewaschen um Reste des M16-Mediums zu entfernen. Alle Waschschriffe erfolgten bei RT für eine Dauer von 10 Minuten. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 39 zu finden. Bei allen Inkubationsschriffen wurden die Embryonen mithilfe einer 10 µl Pipette umgesetzt. Die Fixierung der Embryonen erfolgte in 2%-iger PFA-Lösung für 30 Minuten. Überschüssiges PFA wurde mit PBS-T-Puffer entfernt. Mit der NH₄Cl-Lösung wurde das PFA gesättigt und anschließend wurden die Embryonen in PBS-T-Puffer gewaschen. Die Blockierung der unspezifischen Proteine erfolgte durch eine einstündige Inkubation in 10%-igen Ziegenserum. Das Ziegenserum wurde durch zweimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Diesem Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:10 000 Anti-Pro-Ovastacin/ Anti-Propeptid) für eine Stunde. Der Primärantikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Der Sekundärantikörper Alexa 488 wurde für 1 Stunde, geschützt vor Licht, inkubiert. Der Alexa 488 Antikörper wurde nach der Inkubation verworfen. Durch zweimaliges Waschen mit PBS-T wurde der restliche ungebundene Antikörper von den Zellen entfernt. Anschließend wurden die Embryonen auf Objektträger pipettiert auf dem sich 80 µl DAPI-DABCO-Glycerin befinden. Zum Schutz der Embryonen wurde um das DAPI-DAPCO-Glycerin ein Glassteg als Distanzhalter gelegt. Der Glassteg wurde aus Deckgläschen hergestellt. Im Folgenden wurde ein Deckgläschen auf den Glassteg gelegt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte im Dunkeln bei 4°C, bis die Stapelaufnahmen (ca. 100 Stück) bei einer 40-fachen Vergrößerung mit dem Leica DM 6000 B Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wurden. Die Aufnahmen wurden anschließend dekonvoliert, so daß eine Maximalprojektion entstand.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 39: Puffer, die für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wurden

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	4 mM KH ₂ PO ₄ /HCl 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl pH 7,4
PBS-T-Puffer	wie PBS jedoch mit 0,4% Tween 20
NH ₄ Cl-Lösung	wie PBS jedoch mit 50 mM NH ₄ Cl
PFA-Lösung	2% (w/v) PFA in PBS pH 7,3
<i>Anti-Pro-Ovastacin</i> Primärantikörper	1:1000 bzw. 1:10000 in 1% BSA (PBS-T)
Pro-Ovastacin Primärantikörper	1:1000 in 1%(w/v) BSA (PBS-T)
Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper	1:400 in 1% (w/v) BSA (TBS-T)
Ziegenerum	10% in TBS-T gelöst
DABCO-Glycerin	2,5 mg/ml 1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2) octan (DABCO) 90% (v/v) Glycerin
DABCO-Puffer	50% DABCO-Puffer, 50% Milli-Q-H ₂ O, 0,5 mg/ml DAPI-Farbstoff

3.31 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Zur Überprüfung der Oligomerisierung wurde eine Präparation von Pro-Ovastacin mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (FEI Tecnai 12 TEM) untersucht (Harris 2007). Die Aufnahmen wurden mit einer TVIPS F416 Kamera erstellt. Zur Probenvorbereitung wurde das (10µl) Pro-Ovastacin mit 10 µl einer 2%-igen (w/v) Uranylacetat-Lösung (pH 4,5) vermischt. Dabei handelt es sich um eine schwermetallsalzhaltige Lösung. Anschließend wird ein beschichtetes Kupfernetz (*Grid*) das zuvor bei 25 mV für 90 Sekunden ionisiert wurde mit 5µl des Pro-Ovastacin-Uranylacetat-Gemischs benetzt. Durch die Ionisierung des *Grids* kommt es zu einer verbesserten Haftung. Nach 30 Sekunden wurde der *Grid* dreimal mit Milli-Q-H₂O gewaschen um überschüssige Salze zu entfernen. Abschließend wird das verbliebene Milli-Q-H₂O mit einem Filterpapier vom Rand abgesaugt. Sichtbar werden in den Aufnahmen die Schwermetallionen, die einen Teil des Elektronenstrahls absorbieren. Diese Teile sind in den Aufnahmen besonders dunkel. Da sich das Kontrastmittel um die Proteine legt ist es somit möglich die Umrissse eines Proteins zu visualisieren.

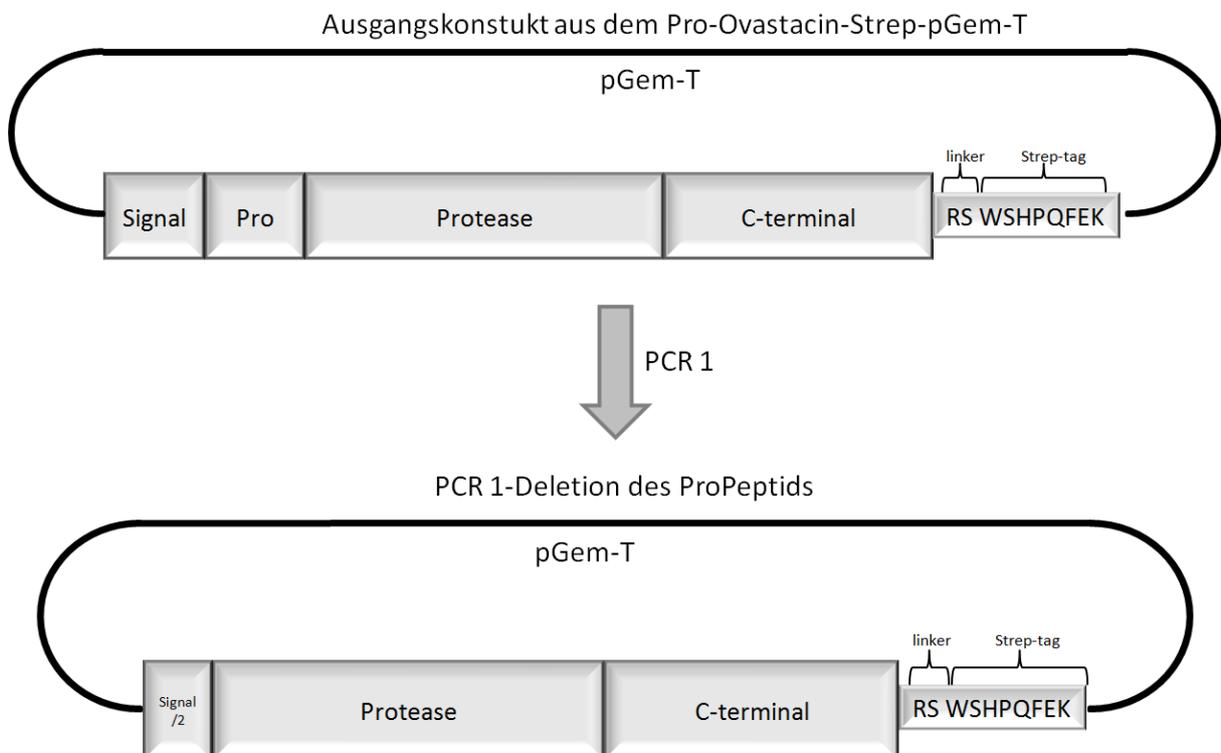
4. ERGEBNISSE

Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Astacin-Metalloprotease Ovastacin. Zu diesem Zweck sollten außer dem *full-length* Pro-Ovastacin auch die aktiven Ovastacin Varianten Pro-Ovastacin-Strep und Ovastacin-Kat-Strep exprimiert und gereinigt werden. Außerdem erwarteten wir neue Erkenntnisse über die physiologische Funktion des Ovastacins durch die Identifizierung potentieller Ovastacin Aktivatoren und von der Analyse alternativer Expressionsorte des Enzyms außerhalb des Ovars.

4.1 Herstellung der DNA-Konstrukte für die Expression

4.1.1 Ovastacin-Strep

Als *Template* für die Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten stand ein Pro-Ovastacin-Strep-Klon in einem pGem-T Plasmidvektor zur Verfügung (Hildebrand 2008). Dieser Klon enthielt die komplette Nukleotidsequenz des Ovastacins mit dem Signalpeptid, dem Propeptid, der katalytischen und der C-terminalen Domäne sowie einem C-terminalen Strep-tag. Im ersten Schritt wurde durch eine PCR (PCR 1), die Propeptid-kodierende Sequenz entfernt und ein Teil der Signalsequenz wieder angefügt (Abbildung 14).



ERGEBNISSE

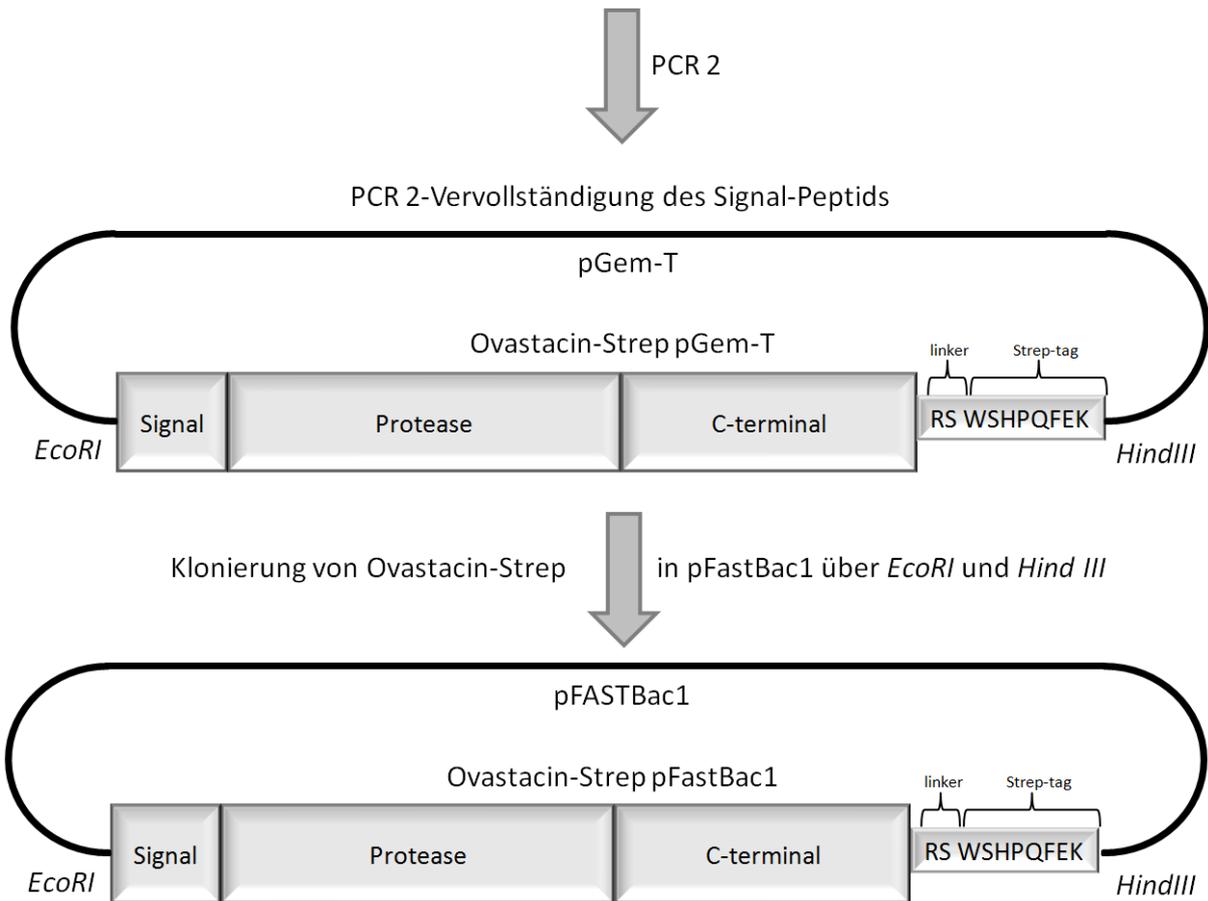


Abbildung 14: Herstellung der aktiven Ovastacin-Variante Ovastacin-Strep aus dem *full-length* Ovastacin-Strep.

Die Gesamtlänge des fertigen PCR 1 Amplifikats betrug die erwarteten 1143 bp (siehe Abbildung 15).

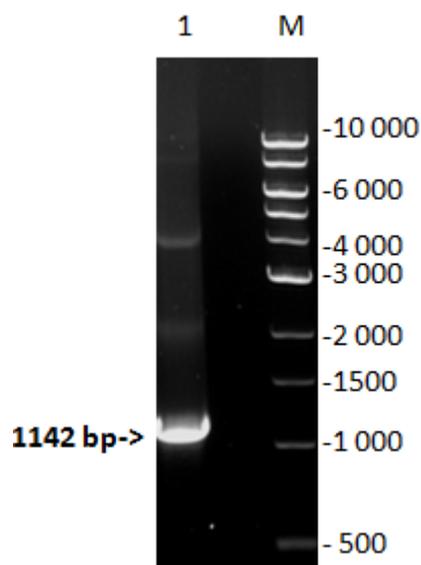


Abbildung 15: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der PCR 1 zur Herstellung von Ovastacin-Strep.

Verwendete *Primer* der PCR 1: *sense Primer* 2si, *antisense Primer* Mm22006 1as. Als Marker wurde die 1kb – DNA-ladder von NEB verwendet. Das PCR-Produkt 1 ist mit dem Pfeil markiert. Alle verwendeten Marker finden sich im Anhang wieder.

ERGEBNISSE

In einer zweiten PCR (PCR 2) wurde im Amplifikat der PCR 1 die Signalsequenz vervollständigt und eine *Eco RI*-Schnittstelle am 5'-Ende angefügt. Das fertige PCR 2-Produkt wurde als Ovastacin-Strep bezeichnet und hatte eine Länge von 1183 bp (Abbildung 16). Die beiden PCR-Produkte wurden jeweils in den Vektor pGem-T ligiert (Abbildung 14), da sich in diesen Vektor PCR-Amplifikate direkt ligieren und überprüfen lassen. Die zur Transfektion benötigten Bacmide wurden mittels PCR überprüft. Das gewünschte Ovastacin-Strep pFastBac1 Bacmid besaß die erwartete Größe von 3483 bp.

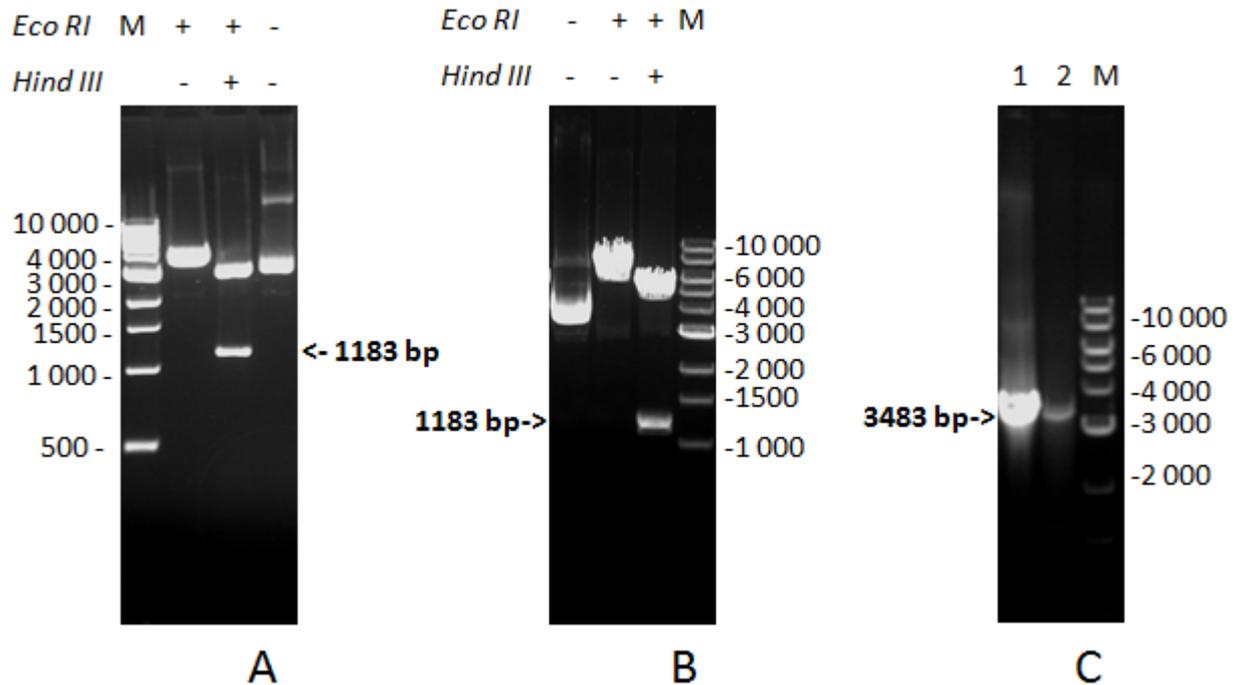


Abbildung 16: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der Arbeitsschritte zur Herstellung von Ovastacin-Strep Bacmiden.

Verwendete *Primer* der PCR 2: *sense Primer* 2sa, *antisense Primer* Mm22006 1as. A: Restriktionsanalyse eines Ovastacin-Strep pGem-T Klon mit *Eco RI* und *Hind III*. B: Restriktionsanalyse eines Ovastacin-Strep pFastBac1 Klon mit *Eco RI* und *Hind III*. C: PCR zur Überprüfung der hergestellten Bacmide. Als Marker wurde bei allen drei Analysen die 1kb-DNA-ladder von NEB verwendet.

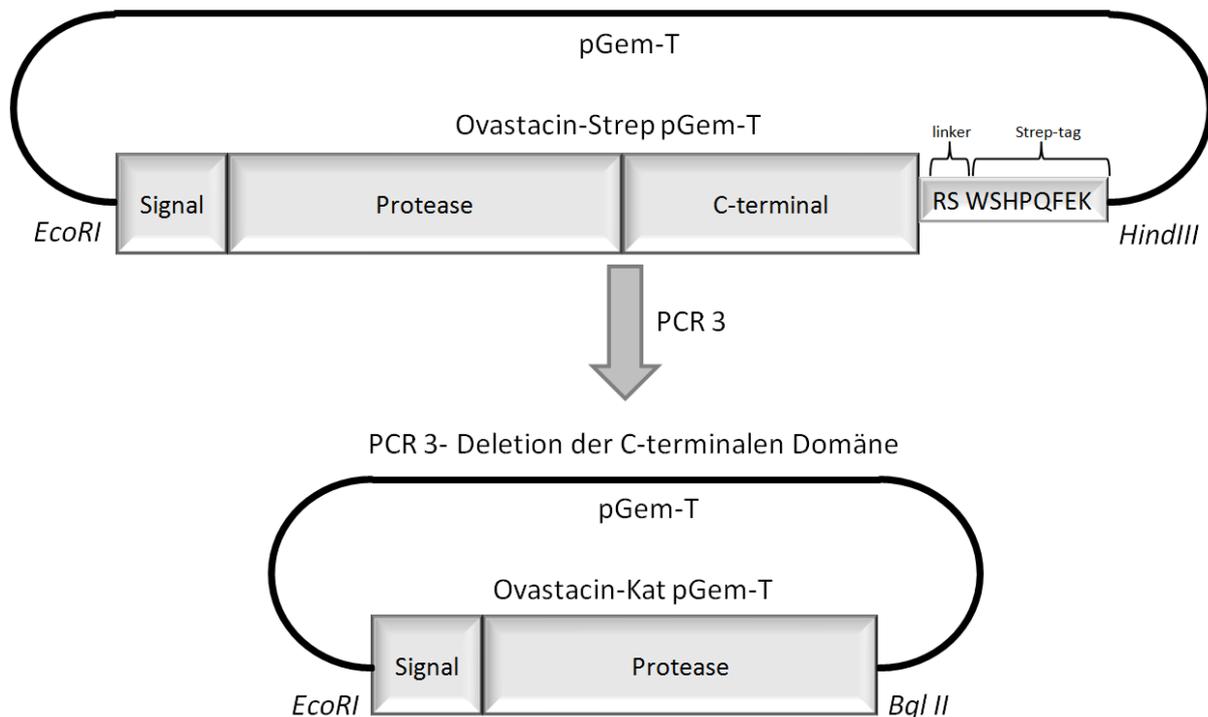
Abbildung 16A zeigt die Restriktionsanalyse des Ovastacin-Strep nach der Ligation in den pGem-T Vektor. Durch die Restriktion mit *Eco RI* wurde das Plasmid linearisiert; es hatte die erwartete Größe von 4183 bp. Durch die Doppelrestriktion von Ovastacin-Strep mit *Eco RI* und *Hind III* entstanden Banden entsprechend 3000 bp sowie 1183 bp. Bei dem 3000 bp Fragment handelte es sich um den pGem-T Leervektor und bei der 1183 bp Bande um das Ovastacin-Strep *insert*. Zwei durch die Restriktionsanalyse ermittelten positive Klone wurden sequenziert. Ein Klon kodierte für die korrekte Aminosäureabfolge und wurde weiter verwendet.

Das durch eine Doppelrestriktion isolierte Ovastacin-Strep Fragment wurde in einen pFastBac-Vektor ligiert, der auch mit *Eco RI* und *Hind III* geöffnet worden war (Abbildung 16B). Linearisiert wies das in den pFastBac ligierte Ovastacin-Strep eine Größe von 5958 bp auf. Nach der Doppelrestriktion wanderte das Insert oberhalb der 1000 bp Markerbande und

der Vektor bei 5000 bp. Der Klon wurde sequenziert und entsprach der zu erwartenden Sequenz. Mit dem Ovastacin-Strep-pFastBac-Vektor wurden *E. coli DH10* Bac Zellen transformiert, um Bacmide durch eine Transposition für die Transfektion herzustellen. Die Überprüfung dieser Transposition erfolgte mittels Bacmid-PCR (Abbildung 16C). Die Bande oberhalb der 3000 bp Markerbande entspricht der zu erwarteten Größe des Bacmids von 3483 bp. Bacmide mit diesem positiven PCR Ergebnis wurden zur Transfektion von *Sf9*-Zellen verwendet.

4.1.2 Ovastacin-Kat-Strep

Der Klon 3 aus der PCR 2 (Abbildung 16A) mit einem positiven Sequenzierungsergebnis diente als *template* für die PCR 3. Bei dieser PCR wurde der C-Terminus des Ovastacins entfernt, so dass nur noch das Signalpeptid und die katalytische Domäne vorhanden waren (Abbildung 17). Abschließend wurde das Ovastacin-Kat-Strep Konstrukt durch das Anfügen des Strep-tags mithilfe der PCR 4 fertiggestellt und durch Restriktionsanalysen und Agaroseelektrophorese überprüft (Abbildung 18 + Abbildung 19).



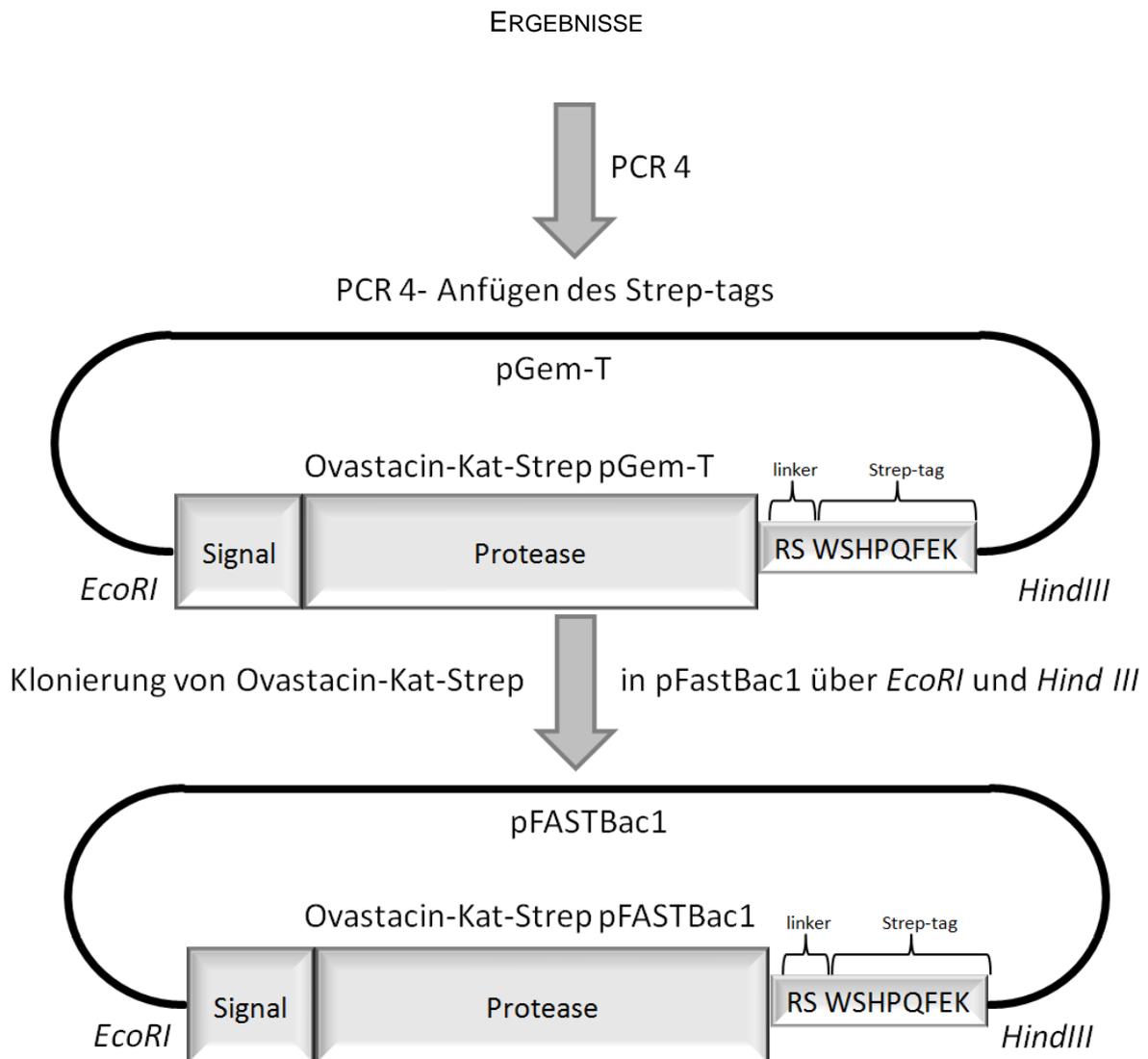


Abbildung 17: Herstellung der aktiven Ovastacin-Variante Ovastacin-Kat-Strep aus Ovastacin-Strep. Abgeschlossen wurde das Konstrukt der PCR 3 am 3'-Ende durch eine *Bgl II*-Schnittstelle, die durch den verwendeten antisense *Primer* (Mm22009 1as) angefügt wurde. Das fertige PCR 3 Produkt wurde in den pGem-T Vektor kloniert. Die PCR 4 diente dem Anfügen des Strep-tags am 3'-Ende. Der *antisense Primer* war so gewählt, dass an die *Bgl II* Schnittstelle noch ein Strep-tag angefügt wurde, an den sich eine *Hind III* Schnittstelle anschloss. Das PCR 4 Produkt wurde in einem pGem-T Vektor ligiert. Das PCR 4 Amplifikat sollte 732 bp umfassen.

ERGEBNISSE

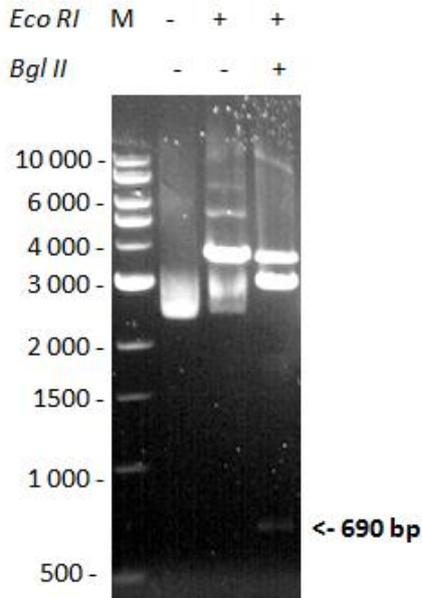


Abbildung 18: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der PCR3 zur Herstellung des Ovastacin-Kat-Strep Klons.

Restriktionsanalyse des Ovastacin-Kat pGem-T Klons mit *Eco RI* und *Bgl II*. Als Marker wurde die 1kb-DNA-ladder von NEB verwendet.

Die Restriktionsanalyse des Ovastacin-Kat Klons nach der PCR 3 zeigte die zu erwartende Größe des Insert von 690 bp und konnte somit als *Template* für die PCR4 verwendet werden (Abbildung 18).

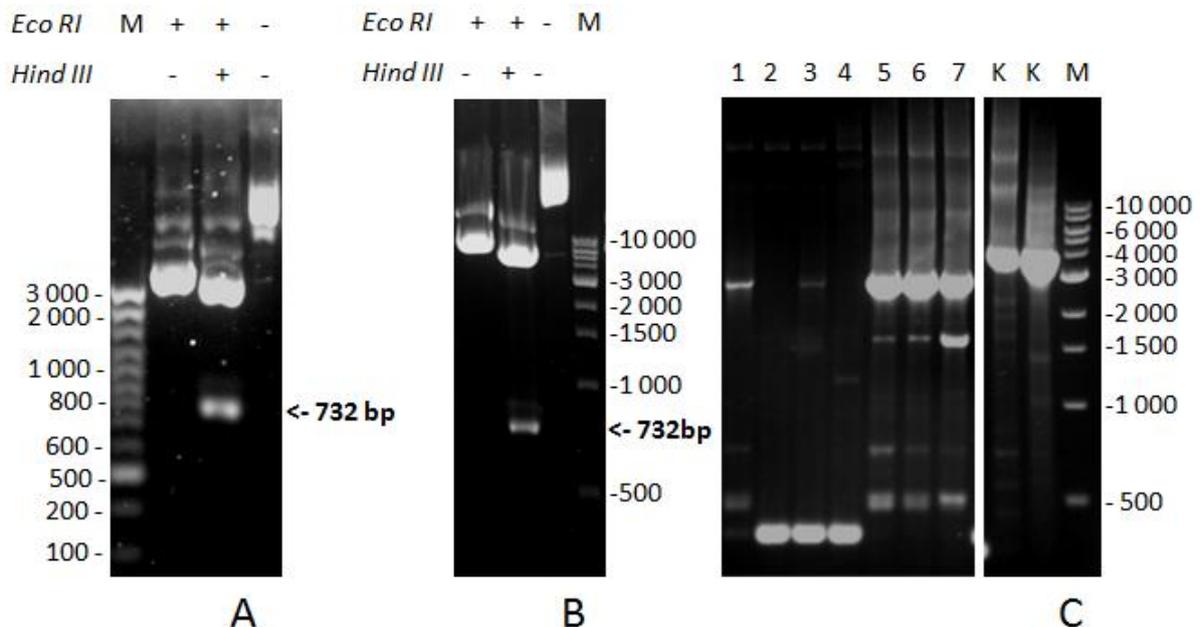


Abbildung 19: Analytisches 1% Agarosegel zur Überprüfung der Arbeitsschritte zur Herstellung von Ovastacin-Kat-Strep.

A: Restriktionsanalyse eines Ovastacin-Kat-Strep pGem-T Klons mit *Eco RI* und *Hind III*. B: Restriktionsanalyse eines Ovastacin-Kat-Strep pFastBac1 Klons mit *Eco RI* und *Hind III*. C: PCR zur Überprüfung der hergestellten Bacmide. K: Kontroll-PCR mit Ovastacin *full-length* Bacmid. Als Marker wurde bei B und C die 1kb-DNA-ladder von NEB verwendet. In A wurde die 100bp-DNA-ladder von Fermentas zur Größenbestimmung benutzt.

ERGEBNISSE

Bei einer Doppelrestriktion mit *Eco RI* und *Hind III* ergab ein Fragment die erwartete Größe von 732 bp. Zwei Klone mit dem Insert wurden sequenziert. Ein Klon enthielt die richtige Sequenz und konnte weiterverwendet werden. Es erfolgte eine Umklonierung in den pFastBac-Vektor. Das mit *Eco RI* und *HindIII* erhaltene Fragment hatte wiederum die erwartete Größe (732bp) und die korrekte Sequenz (Abbildung 19B). Der Klon wurde für die Transformation von *E. coli DH10 Bac* Zellen verwendet, um die Expressionskassette des pFastBac-Vektors in die Bacmide zu transponieren. Die Überprüfung dieser Transposition war positiv (Abbildung 19C). Die Banden in der Höhe von 300 bp (Bahnen 2 bis 4) entsprechen der leeren Expressionskassette. Diese Bacmide wurden nicht zur Transfektion verwendet. In den folgenden Bahnen 5 bis 7 waren die weiterverwendbaren Bacmide mit 3032 bp vorhanden (300 bp + 2000 bp + 732 bp).

4.1.3 Zusammenfassung der Klonierung der 3 Ovastacin-Varianten

Zum Überblick über die hergestellten aktiven Ovastacin-Varianten wurde eine PCR durchgeführt, in der alle PCR-Amplifikate bei 62°C *annealing* Temperatur mit ihren zugehörigen *Primer*paaren amplifiziert wurden (Abbildung 20).

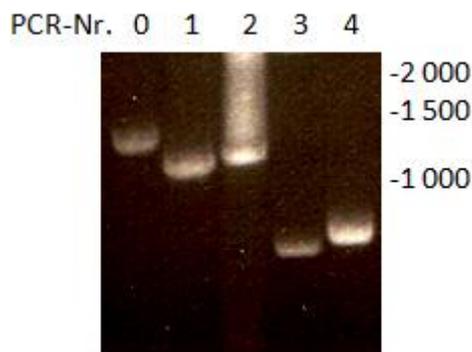


Abbildung 20: 1%iges analytisches Agarosegel als Gesamtübersicht der durchgeführten PCRs zur Herstellung der aktiven Ovastacin-Varianten.

PCR 0 entspricht dem Pro-Ovastacin *full-length*. PCR 1 führte zur Deletion des Propeptids. PCR 2 vervollständigte das Signalpeptid. PCR3 zeigen die katalytische Domäne ohne Strep-tag und PCR 4 mit Strep-tag. Als Marker wurde die 1kb-DNA-ladder von NEB verwendet.

4.2 Nachweis der Ovastacin mRNA in HUVEC Zellen

Durch Datenbankrecherchen stießen wir auf einen Hinweis auf Ovastacin-Expression in *HUVEC*-Zellen (Tunica et al. 2009). *HUVEC* steht für *human umbilical vein endothelial cells*, die aus der Nabelschnur gewonnen werden können. Um diesen Hinweis, der auf massenspektrometrischen Daten beruhte, zu verifizieren, wurde eine von Jana Hedrich aus Nabelschnur-RNA hergestellte cDNA Bibliothek (Hedrich 2011) verwendet. Diese cDNA wurde mit humanen Ovastacin-*Primern* mittels PCR analysiert (Abbildung 21).

ERGEBNISSE

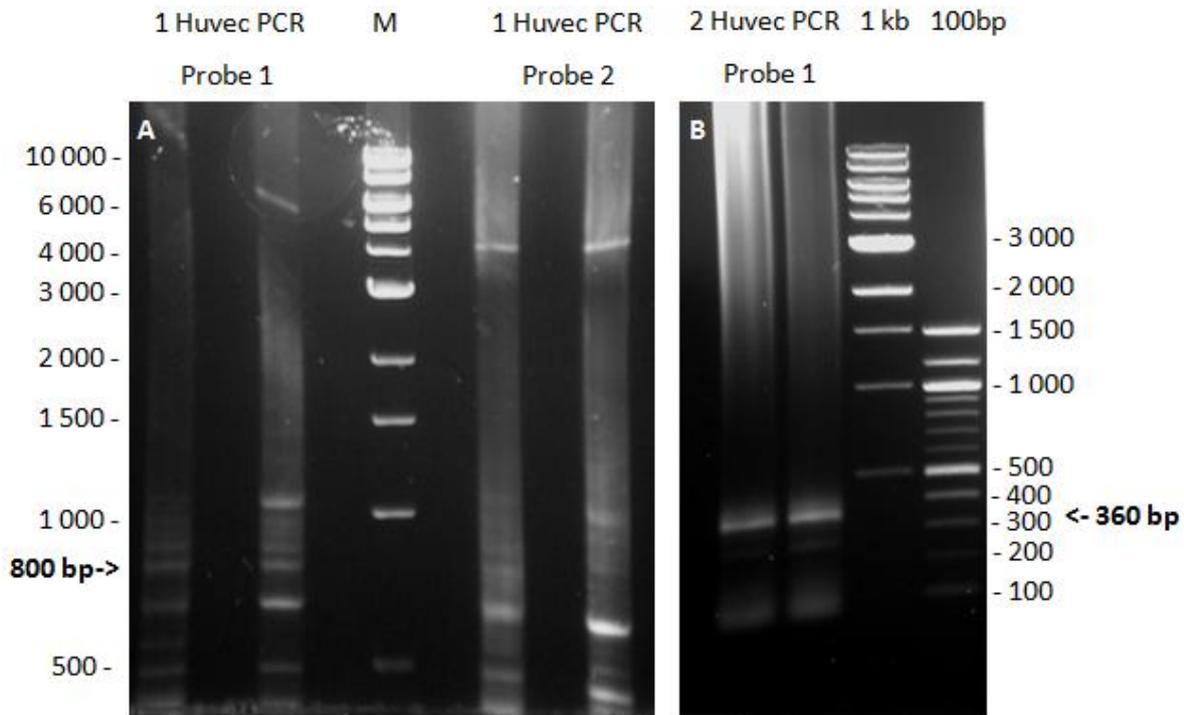


Abbildung 21: 1%iges analytisches Agarosegel zur Überprüfung der Huvec-PCR.

A: PCR mit den *Primern* Human Ovastacin For. *Primer*/Human Ovastacin Rev. *Primer* (Tabelle 5), Bahn 1 + 3 Probe 1 (1,0 µg/µl); Bahn 7+9 Probe 2 (1,3 µg/µl); B: PCR mit den *Primern* Homo sapiens Short Sense und Short Antisense. Als Marker wurde bei A und B der 1kb-DNA-ladder von NEB verwendet. In B wurde zusätzlich der 100bp-DNA-ladder von Fermentas zu Größenbestimmung benutzt.

Es wurden zwei *HUVEC*-cDNA Proben untersucht, die aus zwei unterschiedlichen Präparationen stammen. Beide Proben ergaben Banden im erwarteten Größenbereich von ca. 800 bp (Abbildung 21A). Die Proben der ersten PCR dienen als Amplifikat für eine *nested* PCR mit intern bindenden *Primern*. Auch dieses PCR-Produkt, das eine Größe von 360 bp besitzen sollte, war nachweisbar (Abbildung 21B). Damit konnte gezeigt werden, dass *HUVEC*-Zellen Ovastacin mRNA exprimieren.

4.3 Herstellung eines polyklonalen Anti-Pro-Ovastacin Antiserums

Rekombinantes exprimiertes Pro-Ovastacin-Strep wurde mittels einer Strep-Tactin-Säule gereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die Qualität dieses Antiserums wurde mit verschiedenen anderen Astacinen und deren Inhibitor Fetuin A im Western-Blot mittels Immundetektion untersucht (Abbildung 22).

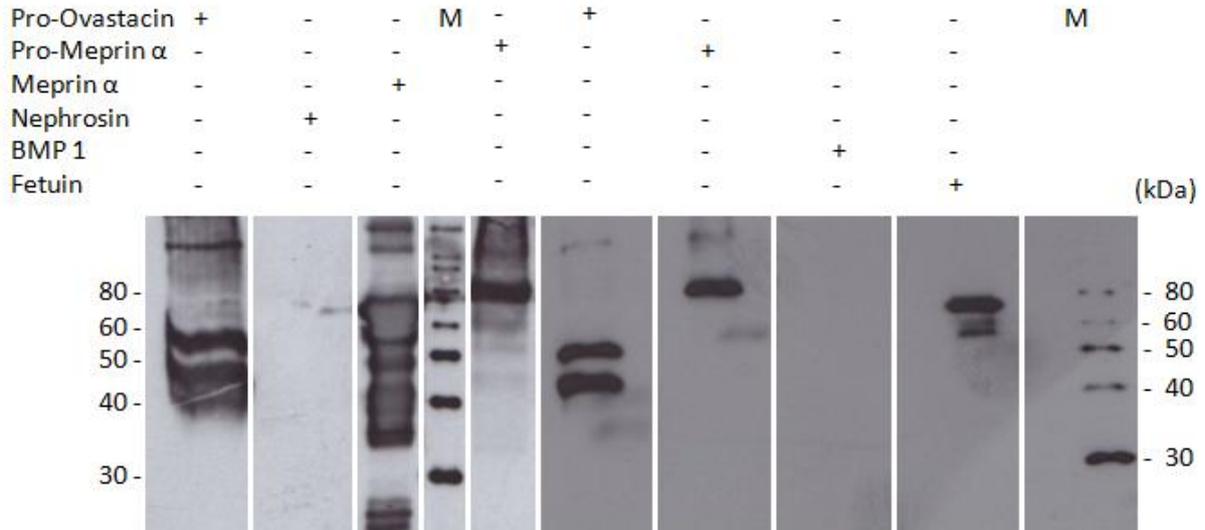


Abbildung 22: Western-Blot zur Überprüfung des Pro-Anti-Pro-Ovastacin-Antiserums hinsichtlich Kreuzreaktion mit verwandten Proteinen.

Nach Auftrennen der Proteine in einer 12%igen SDS-PA-Gelelektrophorese (+DTT) wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen (2 μ M Pro-Ovastacin, 0,4 μ M Pro-Meprin α , 0,2 μ M Meprin α , 0,5 μ M Nephrosin). Als Marker wurde der Magic Mark XP (Invitrogen) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000).

Isoliertes Pro-Ovastacin-Strep zeigte im reduzierten SDS-PA-Gel in der Regel zwei Banden, denen eine relative Molekülmassen von 58 kDa und 48 kDa zugeordnet werden konnte. Das 58 kDa Protein entspricht dem *full length* Pro-Ovastacin-Strep. Die kleinere Bande beruht auf einer C-terminal proteolytisch verkürzten Form. Sie war mit dem Anti-Strep-tag-Antikörper nicht detektierbar. Der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper bindet auch humanes Meprin α (bereitgestellt von Christoph Becker-Pauly) sowie Fetuin A. Die weiteren Astacine, humanes BMP-1 (*bone morphogenetic protein 1*, bereitgestellt von Lydia Tome) und Nephrosin (aus dem Karpfen *Cyprinus carpio*, bereitgestellt von Katharina Meyer) konnten mit diesem Antikörper nicht detektiert werden.

4.4 Expression und Reinigung von Ovastacin-Strep

Für die Expression von Ovastacin-Strep wurden *Sf9*-Zellen mit den Ovastacin-Strep kodierenden Bacmiden transfiziert. Die Transfektion wurde mittels Immundetektion mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum überprüft (Abbildung 23-2). Als Kontrolle dienten nichttransfizierte *Sf9*-Zellen (Abbildung 23-1).

ERGEBNISSE

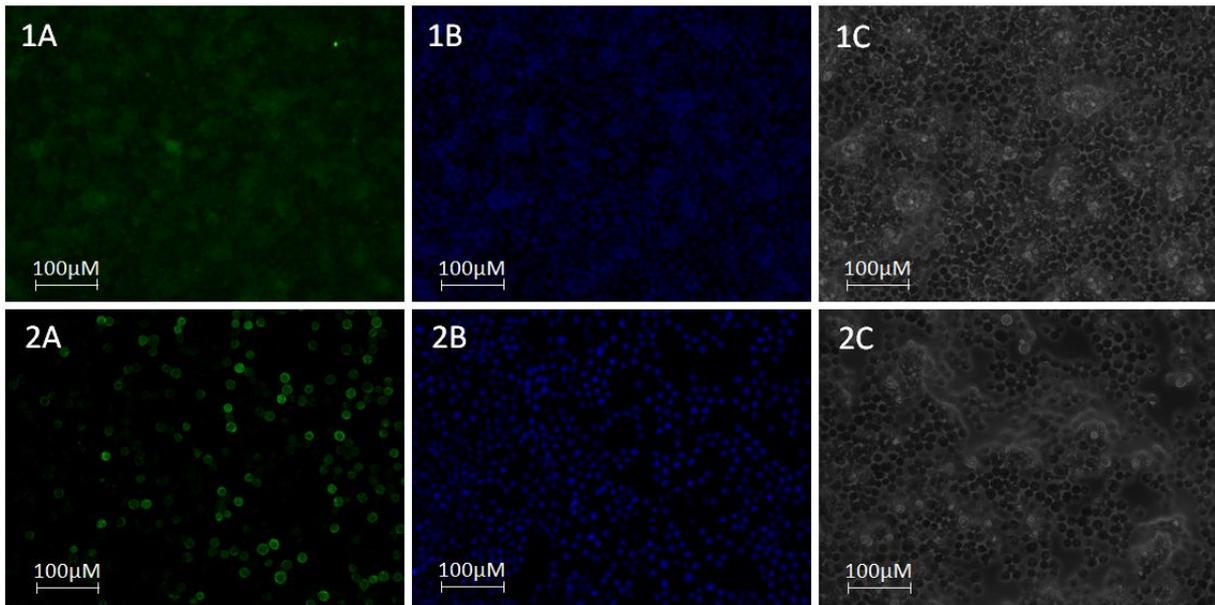


Abbildung 23: Immunodetektion von Ovastacin-Strep in Sf9-Zellen.

Das Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:8000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Die Aufnahmen wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt. 1: Zellkontrolle, 2: mit Ovastacin-Strep transfizierte Zellen; A: Alexa 488-Kanal, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht

In den mit Ovastacin-Strep Bacmiden transfizierten Sf9-Zellen (Abbildung 23-2A) war mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen, die in der Kontrolle (Abbildung 23-1A) fehlte. Beide Ansätze wurden mit den gleichen Antikörpern behandelt. Mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum konnte in nicht transfizierten Zellen kein Protein detektiert werden. Die Zellzahl der beiden Ansätze war vor der Transfektion gleich (siehe Abbildung 23-1/2B/C) und blieb es bis zum Ende der Expression. Diese Viren wurden zur Infektion von *HighFive*-Zellen verwendet (Abbildung 24).

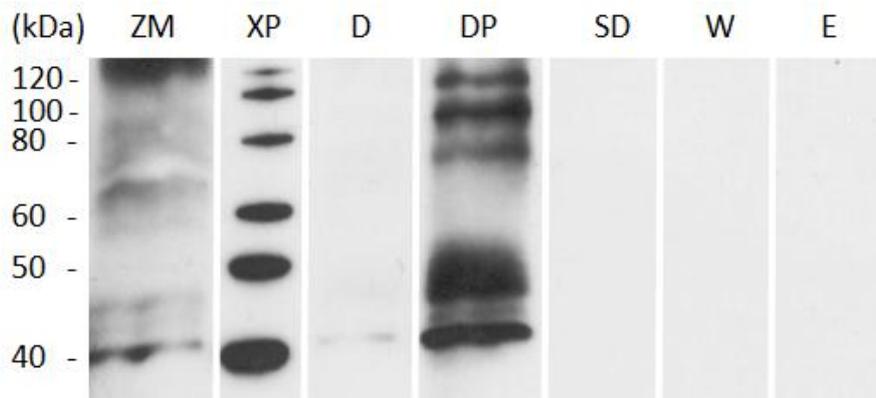


Abbildung 24: Western-Blot zur Überprüfung der Expression von Ovastacin-Strep in HighFive-Zellen.

Nach Auftrennen der Proteine in einer reduzierenden 12%igen SDS-PA-Gelelektrophorese wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem primären Ani-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000). ZM: Zellkulturmedium der *HighFive*-Zellen am Ende der Expression, XP: Magic Mark XP Protein Marker, D: Dialysat nach der Amoniumsulfatfällung, DP: Dialysepellet, SD Säulendurchlauf, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion.

ERGEBNISSE

Das Zellmedium zeigt nach der Expression von Ovastacin-Strep der *HighFive*-Zellen eine schwache Bande mit der erwarteten Größe von 40 kDa (Abbildung 24). Im Dialysat ist ebenfalls eine sehr schwache Bande auf dieser Höhe zu erkennen. Nach Fällung mit Ammoniumsulfat konnte das Pellet auch nach der Dialyse nicht mehr in Lösung gebracht werden. Somit war das Protein nicht mit der Strep-Tactin-Säule zu reinigen. Dieser Western-Blot wurde wie der folgende Western-Blot von Ovastacin-Kat-Strep von Konstantin Karmilin im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit durchgeführt (Karmilin 2012).

4.5 Expression und Reinigung von Ovastacin-Kat-Strep

Für die Expression von Ovastacin-Kat-Strep wurden *Sf9*-Zellen mit den Ovastacin-Bacmiden transfiziert. Die Transfektion wurde mittels Immundetektion mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum überprüft (Abbildung 25-2). Als Kontrolle dienten untransfizierte *Sf9*-Zellen (Abbildung 25-1). Das Ergebnis der Reinigung ist Abbildung 26 zu sehen.

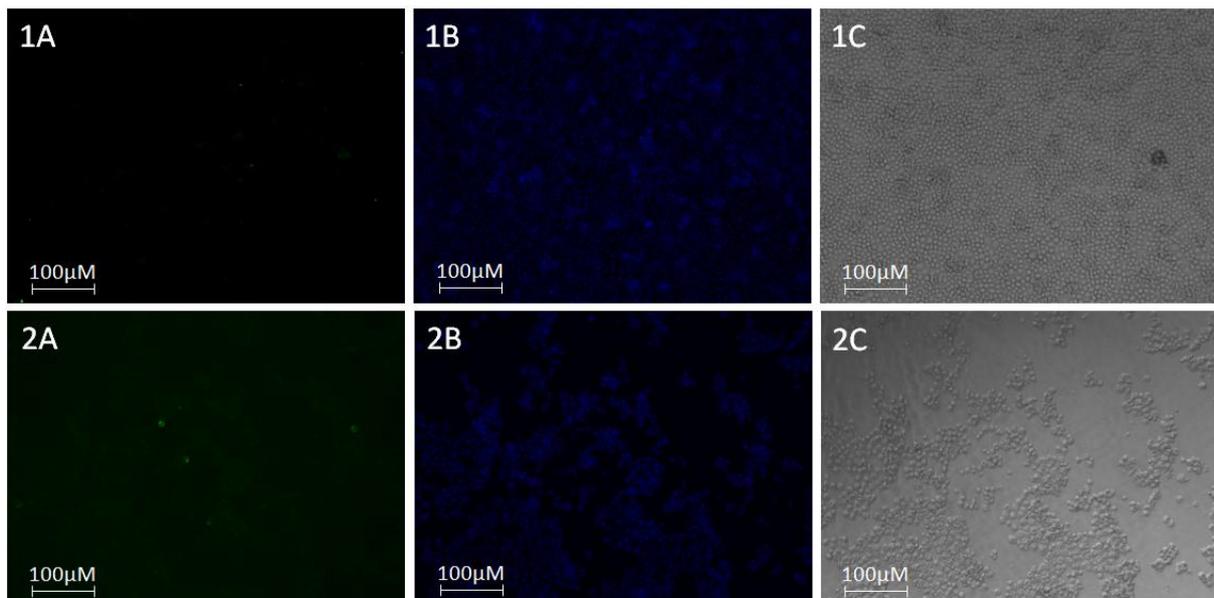


Abbildung 25: Immundetektion von Ovastacin-Kat-Strep in *Sf9*-Zellen.

Der Anti-Strep-*tag*-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Die Aufnahmen wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt. 1: Zellkontrolle, 2: mit Ovastacin-Kat-Strep transfizierte Zellen A: Alexa 488-Kanal, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht

In den mit Ovastacin-Kat-Strep Bacmiden transfizierten *Sf9*-Zellen (Abbildung 25-2A) ist mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum eine sehr schwache Fluoreszenz zu erkennen, die in den Kontrollzellen (Abbildung 25-1A) nicht zu erkennen ist. Die Zellzahl der beiden Ansätze war vor der Transfektion gleich (siehe Abbildung 25-1/2B/C). Nach der 72 Stunden Expression war die Zellzahl der mit den Ovastacin-Kat-Strep Bacmiden transfizierten Zellen deutlich

ERGEBNISSE

geringer. Bei der Transfektion von Pro-Ovastacin-Strep oder bei Ovastacin-Strep Bacmiden blieb die Zellzahl vergleichbar mit den Kontrollzellen.

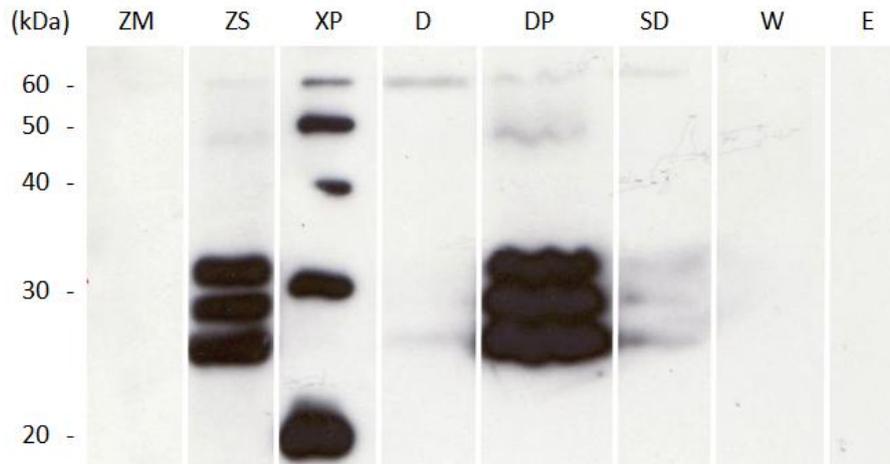


Abbildung 26: Western-Blot zur Überprüfung der Expression und Reinigung von Ovastacin-Kat-Strep in *HighFive*-Zellen.

Nach Trennung der Proteine durch reduzierende 12-igen SDS-PA-Gelelektrophorese wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem primären Ovastacin-Antikörper (1:10000). ZM: Zellkulturmedium der *HighFive*-Zellen am Ende der Expression, ZS: Zellsuspension, XP: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung, D: Dialysat am Ende nach der Ammoniumsulfatfällung, DP: Dialysepellet, SD Säulendurchlauf, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion.

Im Zellmedium ist keine Bande zu erkennen. Bei der Zellsuspension handelt es sich um den Inhalt der lysierten *HighFive*-Zellen. In diesen beiden Bahnen sind drei Banden von ungefähr 25, 28 und 32 kDa Größe zu erkennen. Das theoretische Molekulargewicht liegt bei 24124 Da. Somit entspricht die 25 kDa Bande der zu erwarteten Größe. Im Dialysat findet man noch eine schwache Bande in diesem Größenbereich. Der Großteil des Ovastacin-Kat-Strep war im Dialysepellet nach dem Zentrifugieren zu finden. Da im Dialysat schon fast kein Protein zu detektieren war, ist auch in der Wasch- und Elutionsfraktion kein Ovastacin-Kat-Strep zu detektieren. Somit konnte kein Ovastacin-Kat-Strep gereinigt werden.

4.6 Expression und Reinigung von Pro-Ovastacin-Strep

Für die Expression von Pro-Ovastacin-Strep wurden *Sf9*-Zellen mit den Ovastacin-Bacmiden transfiziert (Hildebrand 2008) und die Proteinexpression anschließend mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper überprüft (Abbildung 27-2). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte *Sf9*-Zellen (Abbildung 27-1).

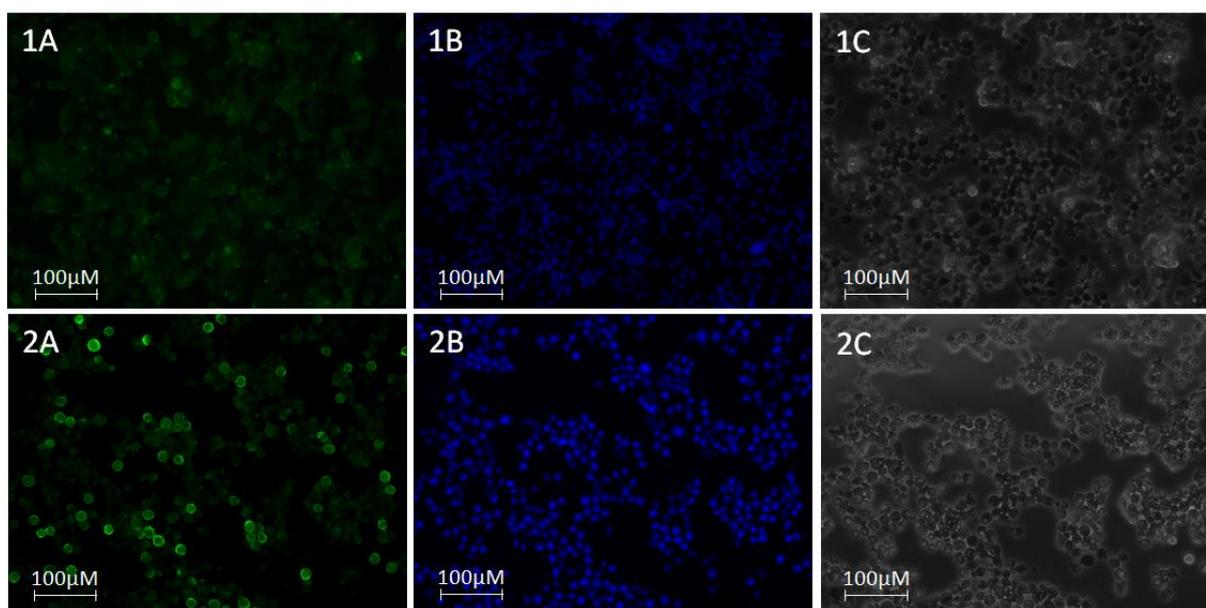


Abbildung 27: Immunofluoreszenzabbildung von Pro-Ovastacin in *Sf9*-Zellen.

Das Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Die Aufnahmen wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt 1: Zellkontrolle, 2 Pro-Ovastacin transfizierte Zellen, A: Alexa 488-Kanal, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

Deutlich ist in den mit Pro-Ovastacin transfizierten *Sf9*-Zellen (Abbildung 27-2A) mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum eine Fluoreszenz zu sehen, die in den nicht transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 27-1A) nicht zu erkennen war. Die Zellzahl der beiden Ansätze blieb relativ gleich (siehe Abbildung 27-1/2B/C). Nach der erfolgreichen Transfektion wurden die Viren zur Infektion von *HighFive*-Zellen zur Expression verwendet.

Das Elutionsprofil der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie bei pH 7,3 von einer Pro-Ovastacin-Strep-Reinigung ist in Abbildung 28A dargestellt. Die Ausbeute betrug 0,19 mg/ml in einer Elutionsfraktion. Die letzten beiden Waschfraktionen 11 und 12 sowie die ersten Elutionsfraktionen wurden mittels Western-Blot mit anschließender Immunodetektion analysiert. In den Waschfraktionen 11 und 12 der Abbildung 28B ist eine deutliche Bande bei 48 kDa und eine schwache Bande bei 58 kDa zu erkennen. Diese Banden sind auch in den Elutionsfraktionen 1 bis 4 zu sehen. Hier sind sie jedoch beide stärker und im selben Verhältnis zueinander vertreten.

ERGEBNISSE

Die Erhöhung des pHs von 7,3 auf 8,0 erbrachte eine deutliche Verbesserung der Proteinausbeute. Dies ist der optimale pH-Wert für die Strep-Tactin-Säule. (Abbildung 29). Bei den Fraktionen, die bei pH 8 eluiert wurden, war die 58 kDa Bande mit Anti-Pro-Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum im Vergleich mit dem Anti-Propeptid-Antikörper deutlich schwächer als die 48 kDa Bande. Bei den Elutionsfraktionen bei pH 8,0 waren mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum zudem Banden unterhalb der 40 kDa zu detektieren, die von dem Anti-Propeptid-Antikörper nicht erkannt wurden, was auf einen Verlust von Teilen des Propeptids hindeutete. Neben der Veränderung des pH-Werts wurde auch die Zugabe von Brij-35 (Polyalkylenglycolether) als Detergens zur Verbesserung der Ausbeute getestet. Es war jedoch keine Verbesserung durch die Zugabe von Brij-35 festzustellen.

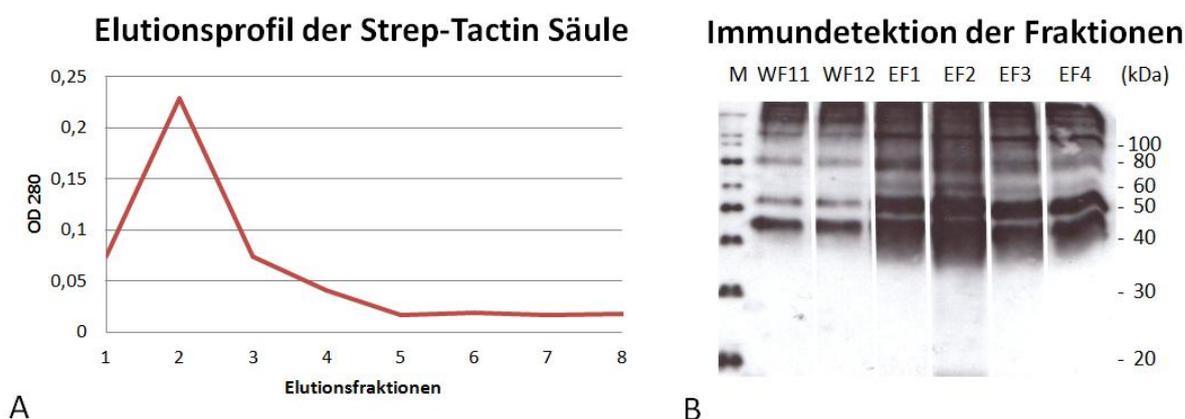


Abbildung 28: Elutionsprofil und Western-Blot zur Überprüfung der Expression von Pro-Ovastacin-Strep in *HighFive*-Zellen.

A: Elutionsprofil der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Die Waschfraktionen besaßen ein Volumen von 2 ml, die Elutionsfraktionen 1,5 ml. B: Es wurden 14µl der Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen auf ein 12%iges-SDS-PA-Gel aufgetragen. Nach Auftrennen der Proteine wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem primären Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000). WF: Waschfraktion, M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung, E: Elutionsfraktion.

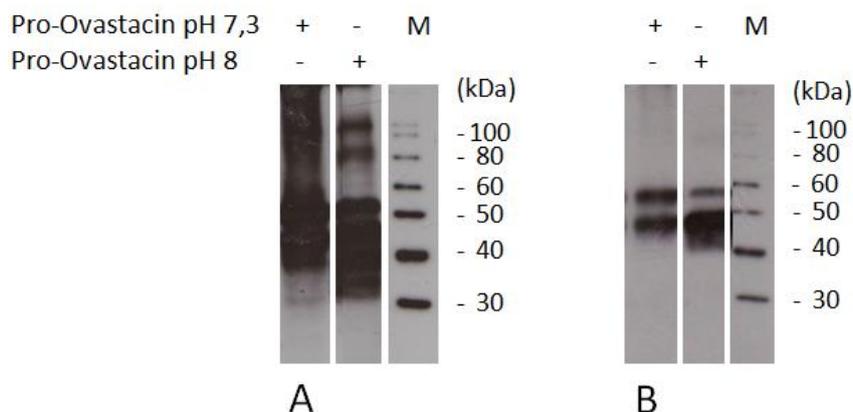


Abbildung 29: Western-Blot zur Überprüfung der Reinigung bei pH 8,0 im Vergleich zu pH 7,3.

Es wurden 1,9 µg (pH 7,3) und 3 µg (pH 8,0) der Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen auf ein 12%-iges-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte (A) mit dem primären Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000) und (B) mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (1:10000). M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

4.7 Massenspektrometrische Analyse und N-terminale Sequenzierung

Zur Identifizierung wurden die 58 kDa und die 48 kDa Bande von Pro-Ovastacin tryptisch gespalten und massenspektrometrisch analysiert (Tabelle 40).

Tabelle 40: Massenspektroskopie von Pro-Ovastacin-Strep.

Die unterstrichenen Abschnitte der Sequenz sind die identifizierten Peptide. Propeptid: rot, katalytische Domäne: grün, C-terminale Domäne: blau, Strep-tag: orange.

58 kDa-Bande des Pro-Ovastacin-Strep	48 kDa-Bande des Pro-Ovastacin-Strep
APSASRCSGVCSTSVPEGFTPEGSPVFQD	APSASRCSGVCSTSVPEGFTPEGSPVFQD
<u>KDIPAINQGLISEETPESSFLVEGDIIRPSPF</u>	<u>KDIPAINQGLISEETPESSFLVEGDIIRPSPF</u>
<u>RLLSVTNNKWPKGVGGFVEIPFLLSRKYD</u>	<u>RLLSVTNNKWPKGVGGFVEIPFLLSRKYD</u>
<u>ELSRRVIMDAFAEFERFTCIRFVAYHGQRD</u>	<u>ELSRRVIMDAFAEFERFTCIRFVAYHGQRD</u>
<u>FVSILPMAGCFSGVGRSGGMQVVSLAPTC</u>	<u>FVSILPMAGCFSGVGRSGGMQVVSLAPTC</u>
<u>LRKGRGIVLHELMHVLGFWHEHSRADDR</u>	<u>LRKGRGIVLHELMHVLGFWHEHSRADDR</u>
<u>RYIQVNWNEILPGFEINFIKSRSTNMLVPYD</u>	<u>RYIQVNWNEILPGFEINFIKSRSTNMLVPYD</u>
<u>YSSVMHYGRFAFSWRGQPTIPLWTSSVHI</u>	<u>YSSVMHYGRFAFSWRGQPTIPLWTSSVHI</u>
<u>GQRWNLSTSDITRVCRLYNCSRVPDSHG</u>	<u>GQRWNLSTSDITRVCRLYNCSRVPDSHG</u>
<u>RGFEAQSDGSSLTPASISRLQRLLEALSEE</u>	<u>RGFEAQSDGSSLTPASISRLQRLLEALSEE</u>
<u>SGSSAPSGSRTGGQSIAGLGNSQQGWEH</u>	<u>SGSSAPSGSRTGGQSIAGLGNSQQGWEH</u>
<u>PPQSTFSVGALARPPQMLADASKSGPGA</u>	<u>PPQSTFSVGALARPPQMLADASKSGPGA</u>
<u>GADSLSLEQFQLAQAPTVPALFPEARDK</u>	<u>GADSLSLEQFQLAQAPTVPALFPEARDK</u>
<u>PAPIQDAFERLAPLPGGCAPGSHIREVPRD</u>	<u>PAPIQDAFERLAPLPGGCAPGSHIREVPRD</u>
<u>RS WSHPQFEK</u>	<u>RS WSHPQFEK</u>

Die identifizierten Peptide deckten die Sequenz des Pro-Ovastacins im Fall der 58 kDa Bande zu 48,6% ab, im Fall der 48 kDa Bande zu 45,5% ab. Somit war die Identität der beiden Ovastacin Banden eindeutig belegt. Die bereits früher durchgeführte N-Terminale Sequenzierung der 58 kDa Bande (Mertens 2004) hatte die Sequenz Ala-Pro-Ser ergeben. Für die 48 kDa Bande konnte ich den N-Terminus nicht eindeutig ermitteln. Ein möglicher N-Terminus war Ala-Ser-Arg.

4.8 Untersuchung der Oligomerisierung von Pro-Ovastacin

Ovastacin besitzt zwei freie Cysteinreste, einen in der katalytischen Domäne und einen in der C-Terminalen Domäne. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wie sie außerhalb des Cytosols zu finden sind, wäre es daher möglich, dass diese freien Cysteine Disulfidbrücken ausbilden und so zur Oligomerisierung führen könnten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde gereinigtes Pro-Ovastacin-Strep unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen sowie unter nativen Bedingungen ohne SDS in einem abgewandelten Elektrophoresesystem nach (Laemmli 1970) untersucht (Abbildung 30).

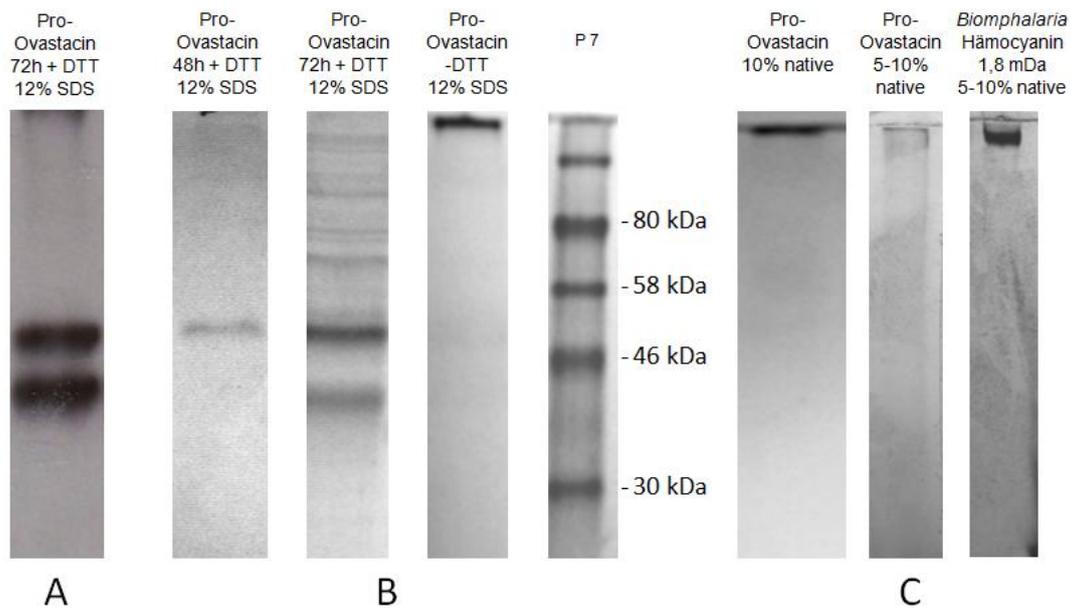


Abbildung 30: Acrylamidgele zur Analyse der Oligomerisierung von Ovastacin.

A: Western-Blot einer 12%-igen SDS-Acrylamidgelelektrophorese. B: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-Acrylamidgele unter reduzierten und nicht reduzierten Bedingungen. Als Marker wurde der *Prestained Protein Marker* verwendet. Expressionsdauer 48 h oder 72 h. C: Native Acrylamidgelelektrophorese mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen. Die Proteinkonzentration der verwendeten Pro-Ovastacin Proben betragen durchschnittlich 1,85 μM (1,24 μg). Zum Vergleich wurde *Biomphalaria* Hämocyanin aufgetragen.

Unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen waren die 58 kDa Bande und die 48 kDa Bande dominant. Unter nicht denaturierenden, nicht reduzierenden (nativen) Bedingungen (Abbildung 30C) war in der ersten Bahn eine deutliche Bande am oberen Rand des Trenngels zu erkennen, die im 5-10% Gradientengel etwas weiter in das Trenngel einwanderte. Der pI von Pro-Ovastacin-Strep liegt bei 7,3, der pH -Wert des Laufpuffers und des Probenpuffers lag bei pH 9,0. Somit sollte Pro-Ovastacin unter diesen Bedingungen negativ geladen vorliegen.

Der Befund deutete auf eine Oligomerisierung des Pro-Ovastacins hin. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchung der vermuteten Oligomere wurde eine Pro-Ovastacin-Probe mit 1%igem Uranylacetat negativ kontrastiert und im Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert. Die Kontrastierung und die Aufnahmen wurden von

ERGEBNISSE

Kristiane Rusitzka und Dr. Phillip Arnold (Molekulare Tierphysiologie, AG Prof. Markl) durchgeführt (Abbildung 31).

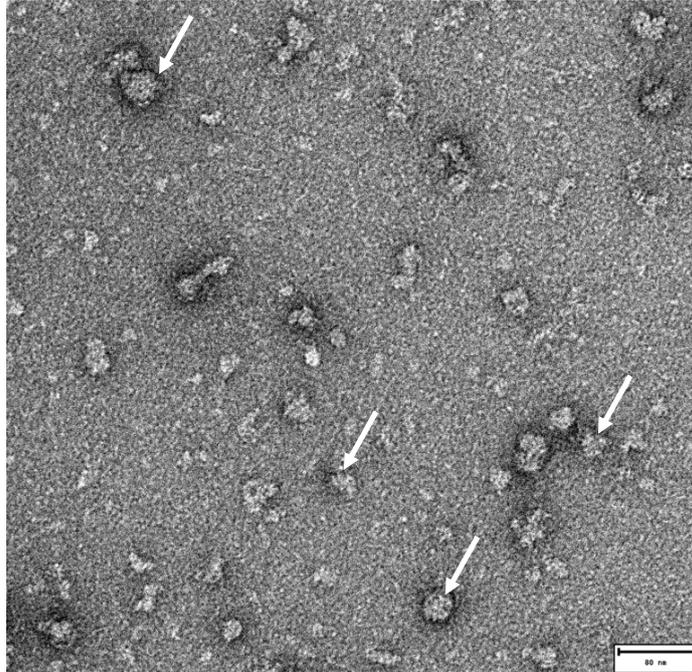


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von gereinigtem Pro-Ovastacin-Strep.

Das Protein wurde negativ kontrastiert mit 1%-igem Uranylacetat. Die Vergrößerung der Aufnahme betrug 49000-fach. Der Maßstabsbalken entspricht 80 nm. Die Pfeile markieren unterschiedliche Oligomere.

Auf den EM-Aufnahmen war eine Vielzahl von Proteinoligomeren unterschiedlicher Form und Größe zu erkennen, was auf eine Oligomerisierung des Pro-Ovastacins hindeutet. Allerdings war keine homogene Partikelverteilung zu erkennen. Dieses Phänomen ist Bestandteil der Diplomarbeit von Kristiane Rusitzka (Rusitzka 2012).

Einen weiteren Hinweis auf eine heterogene Oligomerisierung von Pro-Ovastacin-Strep lieferte die Gelfiltration zur Größenbestimmung (Abbildung 32). Die verwendete Gelfiltrationssäule Hema Bio 1000 trennt in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 20 kDa und 3000 kDa. Das Ausschlussvolumen liegt bei 10000 kDa. Somit liegt der erste Gipfel im Ausschlussvolumen. Es wurde eine gereinigte Pro-Ovastacin-Probe analysiert, die aus einer FCS-freien Expression stammte, um eine Kontamination von α_2 -Makroglobulin zu verhindern.

ERGEBNISSE

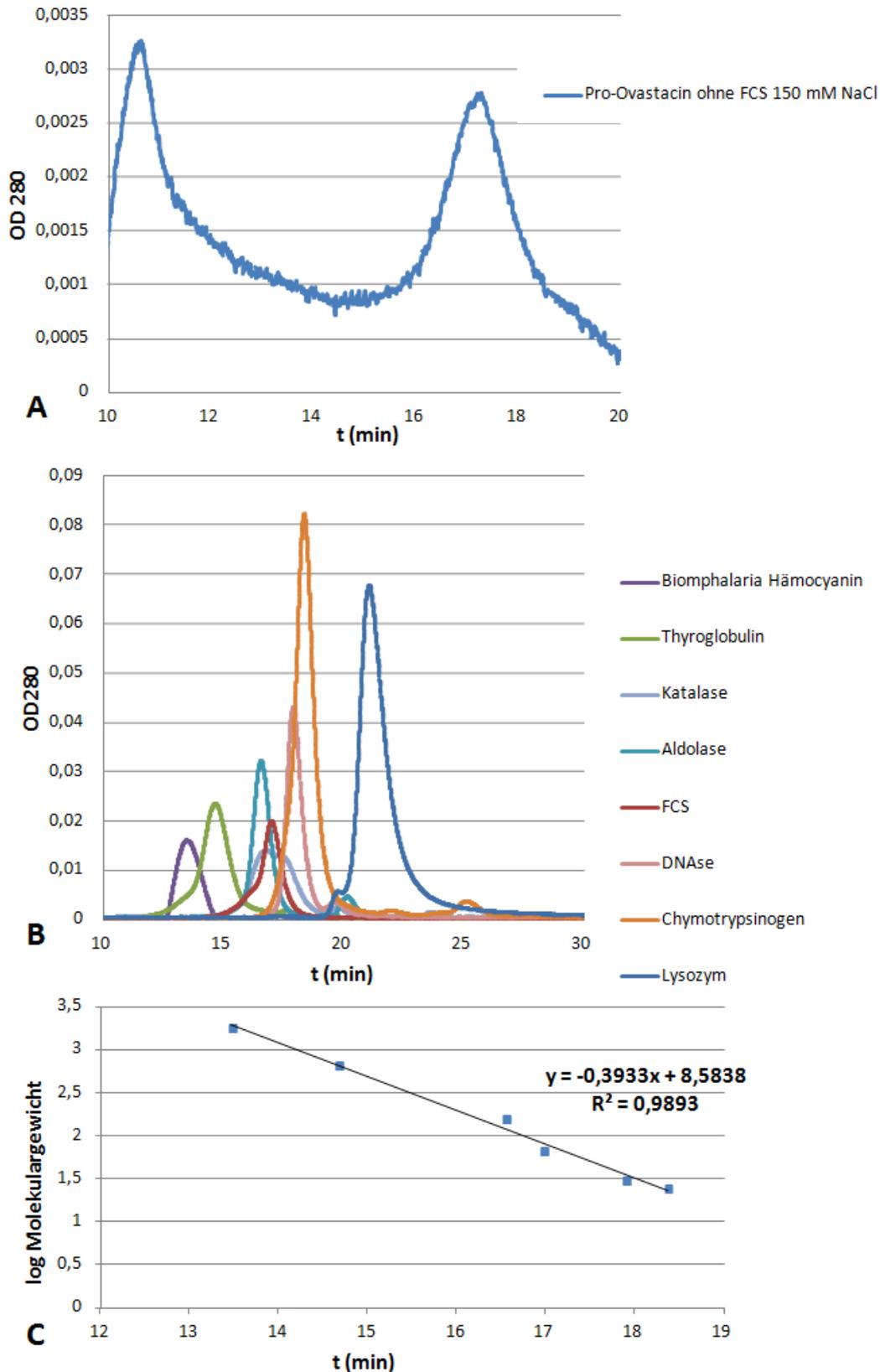


Abbildung 32: Gelfiltration von Pro-Ovastacin-Strep und Größenbestimmung.

A: Es wurde 53 µg gereinigtes Pro-Ovastacin-Strep ohne FCS in einem Volumen von 100 µl aufgetragen (HEMA Bio 1000). B: Eichlauf: Die verwendeten Eichproteine waren Hämocyanin der Schnecke *Biomphalaria glabrata* (1800 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Bovines Serumalbumin (67 kDa), DNase (31 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Lysozym (14,3 kDa). C: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min.

ERGEBNISSE

Das Ergebnis dieser Gelfiltration von Pro-Ovastacin sind zwei dominante Gipfel (Abbildung 32). Der erste Gipfel wurde zwischen 10 und 11 Minuten eluiert, der zweite Gipfel nach 17 Minuten. Diesem zweiten Gipfel (Abbildung 32A) konnte mit Hilfe der Eichgerade ein Molekulargewicht von 59,9 kDa zugeordnet werden. Dieses Gewicht entspricht einem Pro-Ovastacin-Monomer. Bei dem ersten Gipfel handelt es sich um Oligomere, die im Ausschlussvolumen eluiert wurden, so dass ihnen kein Molekulargewicht zugeordnet werden konnte.

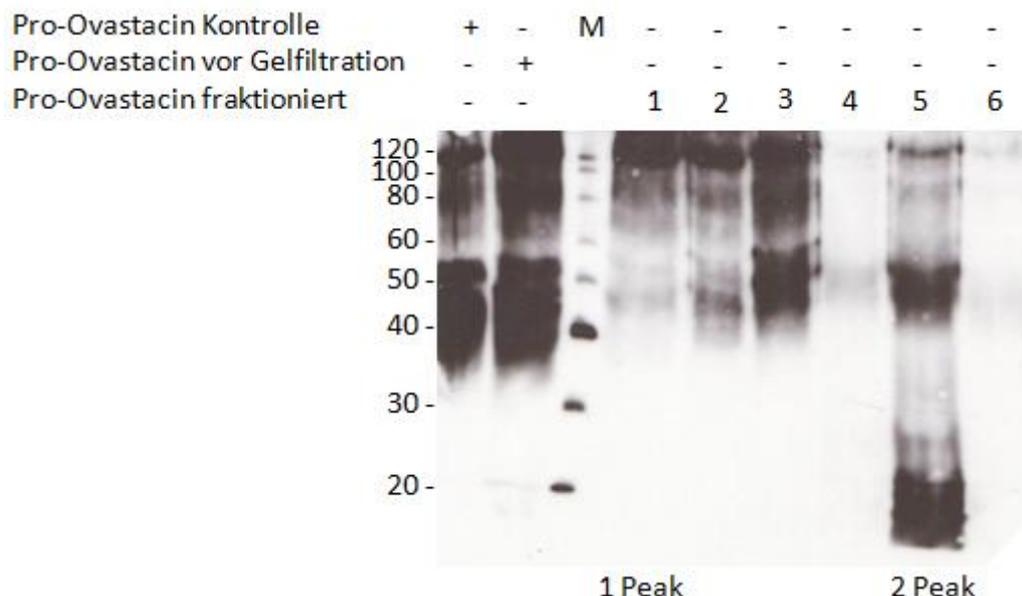


Abbildung 33: Western-Blot zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration.

Nach der Gelfiltration wurden je 500 µl der fraktionierten Proben mit TCA gefällt und die Niederschläge in einem Zehntel Volumen aufgenommen. Diese 10-fach konzentrierten Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen durch eine 12%ige Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem primären Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum (1:10000). M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

Die Immundetektion ergab, dass alle Elutionsfraktionen Ovastacin enthielten. Allerdings waren außer den typischen Banden bei 58 kDa und 48 kDa auch Banden mit höheren (Gipfel 1) und niedrigeren (Gipfel 2) Molekularmassen vertreten (Abbildung 33).

4.9 Stabilität des Pro-Ovastacins in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur

Zur Aufklärung des Ursprungs des 48 kDa Bande wurde untersucht, ob eine Kontamination der gereinigten Pro-Ovastacin Fraktionen mit anderen Proteasen vorlag. Dazu wurden verschiedene Protease-Inhibitoren einzeln und in Kombination mit Pro-Ovastacin (pH 7,3) für acht Tage bei 4°C inkubiert. Außerdem wurde überprüft, ob Pro-Ovastacin-Strep in der Lage ist, sich wie das Flusskrebs-Astacin autokatalytisch zu aktivieren [(Yiallourous et al. 2002) Abbildung 34].

ERGEBNISSE

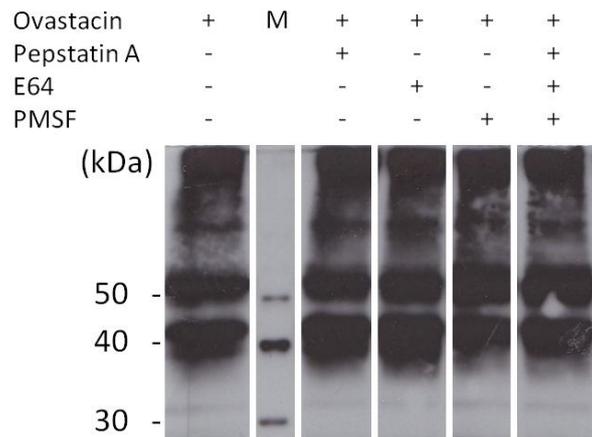


Abbildung 34: Western-Blot zur Überprüfung der Stabilität von Pro-Ovastacin.

Zum Auftrennen der Proteine (1,2 µg) wurde ein 12%-iges SDS-PA-Gel verwendet von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Als Marker wurde der Magic Mark XP (Invitrogen) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper 1:10000.

Als Kontrolle diente eine Pro-Ovastacin Probe ohne Inhibitoren (Abbildung 34). Es war keine Veränderung mit oder ohne Protease-Inhibitoren festzustellen. Somit ist davon auszugehen, dass die Präparation nicht mit einer Fremdprotease kontaminiert ist. Zudem konnte somit auch eine autokatalytische Aktivierung des Ovastacin unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden.

Da bei 4°C keine Veränderung des Pro-Ovastacin festzustellen war, wurde das Zymogen (pH 7,3) bei RT inkubiert und anschließend im Western-Blot analysiert (Abbildung 35).

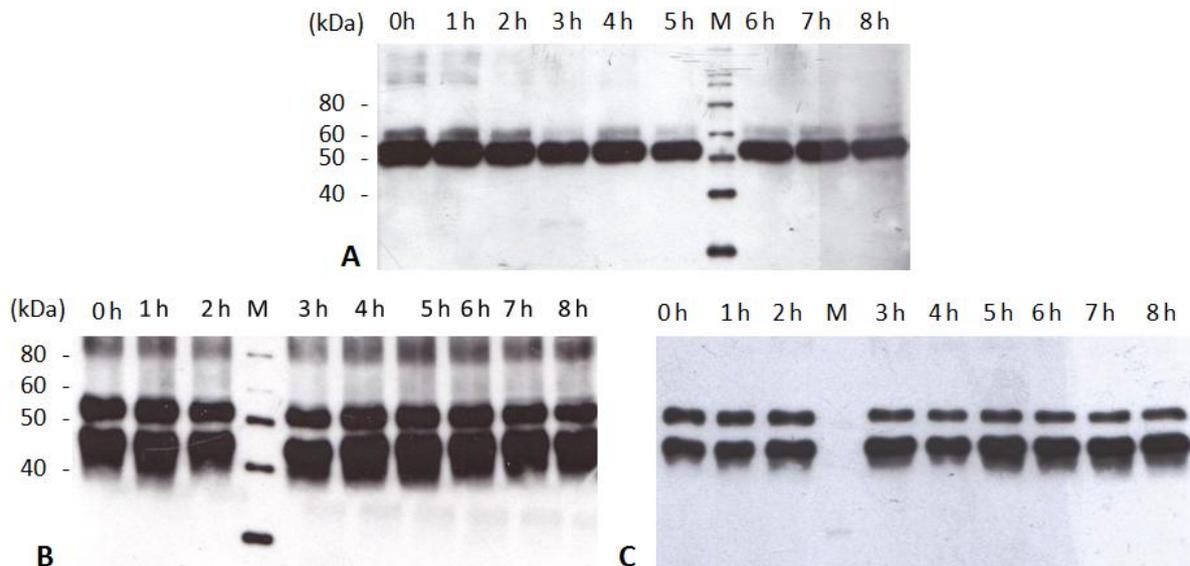


Abbildung 35: Western-Blots zur Überprüfung der Stabilität von Pro-Ovastacin-Strep.

Zum Auftrennen der Proteine wurde ein 12%-iges SDS-PA-Gel verwendet von dem die Proteine (1,1 µg) auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Als Marker wurde der Magic Mark XP (Invitrogen) verwendet. A: Die Detektion erfolgte mit dem Strep-tag Antikörper 1:10000. B: Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper 1:10000. C: Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Propeptid-Ovastacin-Antiserum 1:10000.

ERGEBNISSE

Für die Analyse der Zeitreihe zur Stabilität bei pH 7,3 von Pro-Ovastacin wurden drei verschiedene Antikörper benutzt. Der Strep-tag Antikörper (A), das Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum (B) und der Anti-Propeptid-Antikörper (C). Bei der Immundetektion mit dem Strep-tag Antikörper konnte nur die obere Ovastacin Bande nachgewiesen werden. Die Bande bleibt über den Zeitraum konstant und es ist keine Veränderung zu beobachten. Ein anderes Bild ergibt sich mit der Verwendung des Anti-Pro-Ovastacin-Antikörpers und des Anti-Propeptid-Antikörpers. Beide Antikörper detektieren jeweils die obere und die untere Ovastacin Bande. Jedoch ist auch hier im Verlauf der Zeitreihe keine Veränderung der Proben zu beobachten. Somit kann eine autokatalytische Aktivierung des Pro-Ovastacin unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden.

Das Pro-Ovastacin war bei der Reinigung pH-Werten von 7,3 bis 8,0 ausgesetzt. Um die pH-Abhängigkeit der Stabilität des Pro-Ovastacins zu untersuchen, wurde das Enzym in Davis-Puffer im Bereich von pH 4,0 bis pH 10,0 bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden Proben entnommen und mit 3x Probenpuffer gekocht.

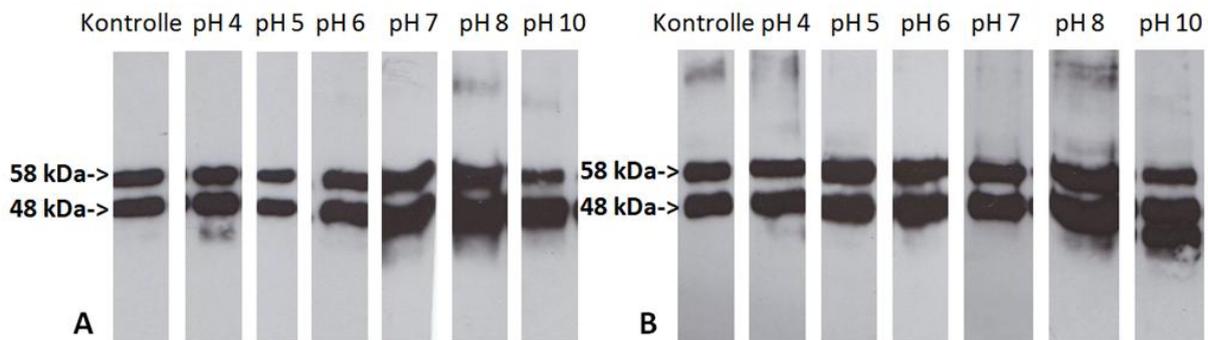


Abbildung 36: Western-Blot zur Überprüfung der pH-Stabilität von Ovastacin-Strep.

Nach Auftrennen der Proteine (1,8 µg je Probe) in einem 12%igen SDS-PA-Gel (+DTT) wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. In A erfolgte die Detektion mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (1:10000). Die Detektion (B) erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000). Kontrolle: pH 7,3, 30 Minuten, 37°C.

Mit dem Anti-Propeptid-Antiserum wurde in allen Proben das typische Doppelbandenmuster des Pro-Ovastacins detektiert (Abbildung 36A). Alle analysierten Proben stammen aus der gleichen Elutionsfraktion wie die Kontrolle. Es war lediglich eine leichte Abnahme der 58 kDa Bande bei pH 10,0 festzustellen. Mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (Abbildung 36B) konnte bei pH 10,0 darüber hinaus eine dritte Bande unterhalb der 48 kDa Bande detektiert werden, die mit dem Anti-Propeptid-Antikörper nicht nachweisbar war. Somit wurde das Pro-Ovastacin bei höherem pH fragmentiert.

Die Zeitabhängigkeit der Fragmentierung bei pH 10,0 zeigt die Abbildung 37. Erst bei über 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur war mit dem Anti-Propeptid-Antikörper eine Abnahme der 58 kDa Bande zu erkennen. Diese Abnahme setzte sich verstärkt im weiteren Zeitverlauf nach 60 und 110 min fort. Im Gegensatz dazu sieht man bei der Detektion mit

ERGEBNISSE

dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper bereits viel früher die trunkierte Form des Ovastacin unterhalb bei ca. 40 kDa (Abbildung 37B). Im weiteren Zeitverlauf kommen weitere Abbaubanden hinzu.

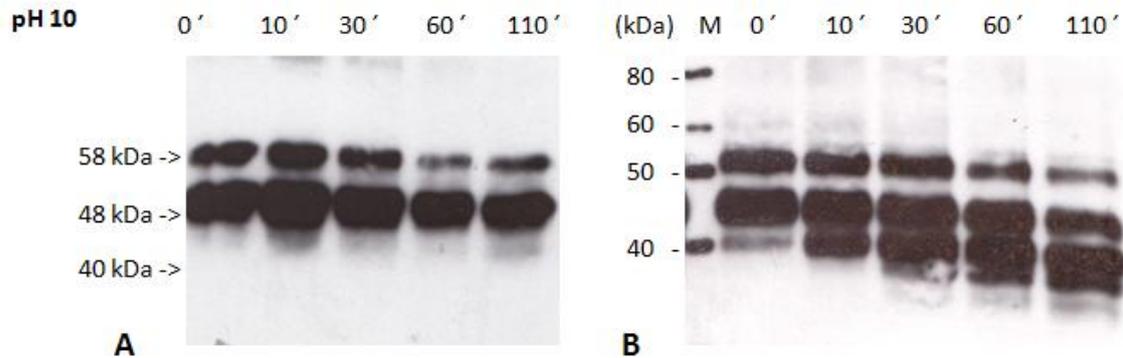


Abbildung 37: Western-Blot zur Überprüfung einer Zeitreihe der pH-Stabilität von Ovastacin-Strep bei 37°C.

Es wurde je 1,8µg Protein aufgetragen. Nach Auftrennen der Proteine in einem 12%igen SDS-PA-Gel wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte links (A) mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (1:10000) und rechts (B) mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem pH-abhängigen Abbau des Pro-Ovastacins um eine pH-bedingte Autoaktivierung handelte, wurde ein Aktivitätstest mit dem FRET-Substrat Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug 37°C. Die Messung der sauren pH-Werte wurde mittels eines 50 mM NaOAc-Puffers durchgeführt der auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurde. Dazu wurden die Puffer zuvor auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und die Pro-Ovastacin Probe 1:5 zugegeben.

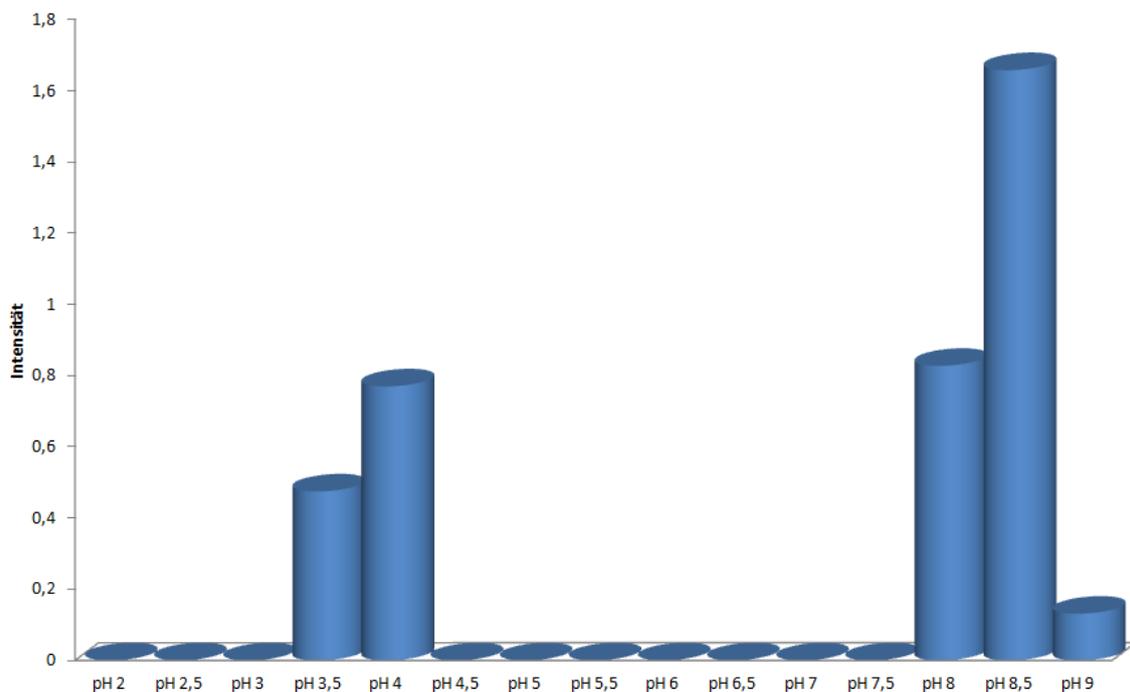


Abbildung 38: pH-Abhängige Aktivierung des Pro-Ovastacins.

Die Konzentration des Substrats Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ betrug 10 µM. Die Pro-Ovastacin-Konzentration betrug 2,2 µg im Ansatz. Die Versuchsdauer betrug 13 Minuten bei einer Temperatur von 37°C.

Die pH-Reihe zeigt ein auffälliges zweigipfeliges Aktivitätsprofil mit Peaks bei pH 3,5 – 4,0 sowie bei pH 8,0 - 8,5 (Abbildung 38). Bei niedrigen pH-Werten liegt Ovastacin noch als ungespaltenes Proenzym vor. Hier könnte die Aktivität daher rühren, dass die Interaktion des Propeptids mit dem Zink im aktiven Zentrum durch Protonierung des Aspartatschalters aufgehoben wird. Im alkalischen Bereich wird offenbar das Propeptid proteolytisch abgetrennt (Abbildung 36). Im Neutralbereich war keine Aktivität festzustellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Abhängigkeit zur Temperatur keine Autoaktivierung zu beobachten war. Dagegen konnte eine pH-Abhängige Autoaktivierung im alkalischen Milieu festgestellt werden. Der Aktivierungsmechanismus des Pro-Ovastacins wird im Folgenden näher analysiert.

4.10 Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep

Astacine werden als Zymogene synthetisiert. Diese Zymogene sind in der Regel unter physiologischen Bedingungen inaktiv. Zur Aktivierung muss ein aminoterminales Propeptid von der Vorstufe proteolytisch entfernt werden. Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Stabilität war deutlich geworden, dass unter bestimmten pH-Bedingungen, das Pro-Ovastacin analog zum Flusskrebsastacin zur Autoaktivierung neigt (Yiallourous et al. 2002). Allerdings bei unphysiologischen pH-Werten. Um den physiologischen Aktivierungsmechanismus aufzuklären wurde zunächst nach potenziellen Aktivierungsschnittstellen in der Aminosäuresequenz des Pro-Astacins gesucht. Zu diesem Zweck wurden Sequenzalignments mit den anderen Mitgliedern der Astacin-Familie erstellt und eine computerunterstützte 3D-Homologiemodellierung des Pro-Ovastacins durchgeführt.

4.10.1 Sequenzalignment und Homologiemodellierung zur Identifizierung der potenziellen Aktivierungsschnittstelle des Pro-Ovastacins

Als Matrize dazu diente die Sequenz des Pro-Astacins, dessen Aktivierungsschnittstelle und 3D-Struktur bekannt sind. Pro-Astacin (*Astacus astacus*) wird von Trypsin an der Aminosäuresequenz AR*VGAAIL geschnitten. Anschließend trimmt Astacin seinen N-Terminus autoproteolytisch, so dass die reife Astacinsequenz mit AAIL beginnt. Basierend auf diesen Daten ergab sich durch das Alignment auch beim Pro-Ovastacin eine tryptische Aktivierungsschnittstelle. Diese Aminosäuresequenz lautet FR*LLSV (Abbildung 39).

ERGEBNISSE

```
Sequenzbasiertes Alignment Ovastacin : -----LISEETPESSFLVEGDIIIRP---SPFRL---LSVTNNKW
Strukturbasiertes Alignment Ovastacin: -----LISEETPESSFLVEGDIIIR----PSPFRLLSVTNN-KWPK
Strukturbasiertes Alignment Astacin  : SPIIPEAARALYNDGMFEGDIKLRAGRQPARVGAAILGDEYLWS-
                                     ****                               *
Strukturbasiertes Alignment Ovastacin: GVGGFVEIPFLLSRKYDELSRRVIMDAFAEFERFTCIRFVAYHGQR
Strukturbasiertes Alignment Astacin:  ----GGVIPYTFAG-VSGADQSAILSGMQELEKTCIRFVPRPTES
                                     **                               * * *****
Strukturbasiertes Alignment Ovastacin: DFVSIILP-MAGCFSGVGRSGGMQVVS LA-PTCLRKGRGIVLHELMH
Strukturbasiertes Alignment Astacin:  DYVEIFTSGSGCWSYVGRISGAQQVSLQANGCVYH-GTILHALMHA
                                     * * *   * * * * * * * * * * * * *
```

Abbildung 39: Alignment der Aminosäuresequenzen von Pro-Ovastacin (*Mus musculus*) mit Pro-Astacin (*Astacus astacus*).

Das Alignment umfasst das Propeptid und die katalytische Domäne von Pro-Ovastacin (Q6HA09) sowie das Pro-Astacin (P07584) und wurde mit Clustal X durchgeführt. Bei dem Pro-Astacin handelte es sich um die E/A-Mutante (Yiallouros et al. 2000). Die potentielle Aktivierungsschnittstelle P1/P1' beim Ovastacin bzw. die verifizierte tryptische Aktivierungsschnittstelle beim Astacin sind rot markiert. Identische Aminosäuren sind mit einem * markiert.

Das Alignment der Aminosäuresequenzen ohne Einbeziehung der bekannten Kristallstrukturdaten des Pro-Astacins (Abbildung 39) zeigt eine gute Übereinstimmung der bei Pro-Astacin gefundenen Aktivierungsschnittstelle mit einer entsprechenden Spaltstelle im Pro-Ovastacin (sequenzbasiertes Alignment in Abbildung 39). Eine Modellierung der 3D-Struktur des Pro-Ovastacins basierend auf diesem Alignment und der Röntgenkristallstruktur des Pro-Astacins (Guevara et al. 2010) war allerdings nicht möglich. Grund war eine nicht schließbare Lücke im Bereich des Überganges zwischen Propeptid und katalytischer Domäne. Die Sequenzidentität der katalytischen Domänen liegt bei 32%. Das Aspartat (lila), welches das Propeptid im katalytischen Spalt stabilisiert, liegt an derselben Position. Das gleiche gilt für das konservierte Tryptophan (orange). Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Verschiebung im Bereich des Propeptids zwischen dem Aspartat und dem Tryptophan der katalytischen Domäne. Das strukturbasierte Alignment (Zeile 2 in Abbildung 39) und das daraus resultierende Homologiemodell der 3D-Struktur des Pro-Ovastacins (Abbildung 40) tragen diesem Umstand Rechnung.

Dieses Strukturmodell wurde herangezogen, um eine Vorstellung über die potentielle Aktivierungsschnittstelle im Pro-Ovastacin zu erhalten und Rückschlüsse auf physiologisch relevante aktivierende Proteasen ziehen zu können. Die Abbildung 40 zeigt Modelle des Pro-Astacins und des daran modellierten Pro-Ovastacins in der Standardansicht (Guevara et al. 2010; Gomis-Rüth et al. 2012).

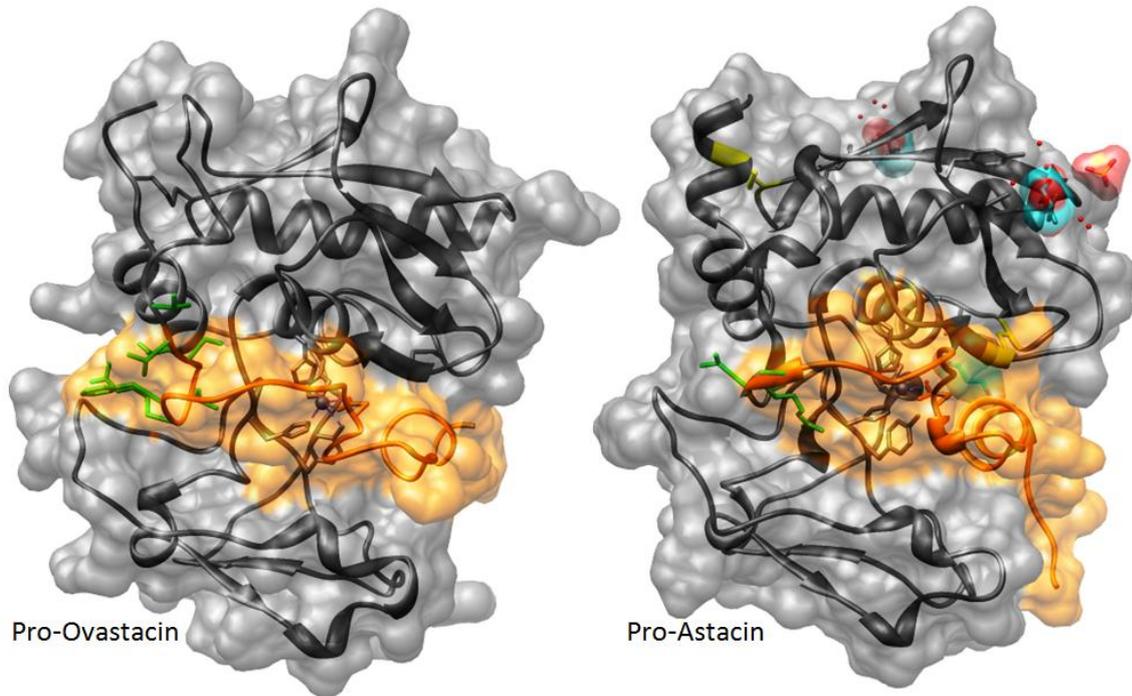


Abbildung 40: Modell der katalytischen Domäne und der Prodomäne des Ovastacins im Vergleich zur Kristallstruktur des Pro-Astacins.

Links: Pro-Ovastacins (grau) mit Übergang zum Propeptid (orange). Rechts: Pro-Astacin [pdb code 3LQ0; (Guevara et al. 2010)] welches als Vorlage für das Pro-Ovastacin-Modell diente. Pro-Peptid (orange), katalytische Domäne (grau). Die Seitenketten die für die Aktivierung von Interesse sind, sind grün markiert. Das Zink ist grau dargestellt.

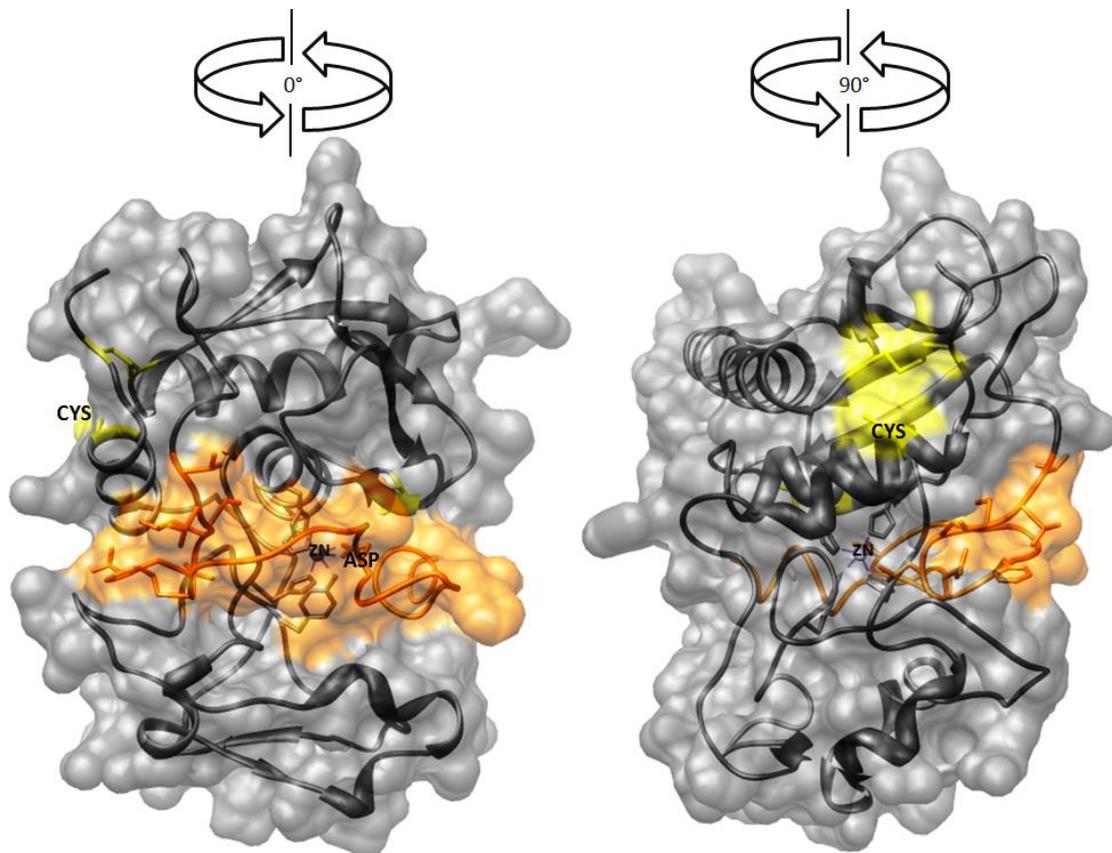


Abbildung 41: Homologie-Modell der katalytischen Domäne und der Prodomäne des Pro-Ovastacins.

Links: Standardansicht (Gomis-Rüth et al. 2012) rechts: um 90° rotiert. Katalytische Domäne (grau); Pro-Peptid (orange). Das Zink-Ion sowie das zinkbindende Aspartat des Propeptids sind markiert ebenso die vier disulfidverbrückten Cystenreste und der freie Cysteinrest (gelb).

ERGEBNISSE

Beim Pro-Ovastacin fehlen die C-terminale Domäne sowie die ersten 23 Aminosäuren des Propeptids. Der Grund hierfür liegt in der fehlenden Strukturinformation aufgrund der Tatsache, dass diese Abschnitte im Pro-Astacin nicht vorhanden sind. Das Propeptid (transparent orange), füllt in beiden Strukturen den katalytischen Spalt völlig aus und verdeckt das katalytisch essenzielle Zink-Ion (Abbildung 40). Auch die für die Aktivierung erforderlichen Aminosäurereste (grün) befinden sich in einer äquivalenten Position. Dies wird in der um 90° rotierten Ansicht noch deutlicher (Abbildung 41).

In Abbildung 41 sind der Aspartat-Switch (Guevara et al. 2010) sowie das freie Cys215 ebenfalls markiert. Dieses freie Cystein befindet sich direkt an der Oberfläche und könnte die Bildung von kovalenten Pro-Ovastacin-Dimeren ermöglichen.

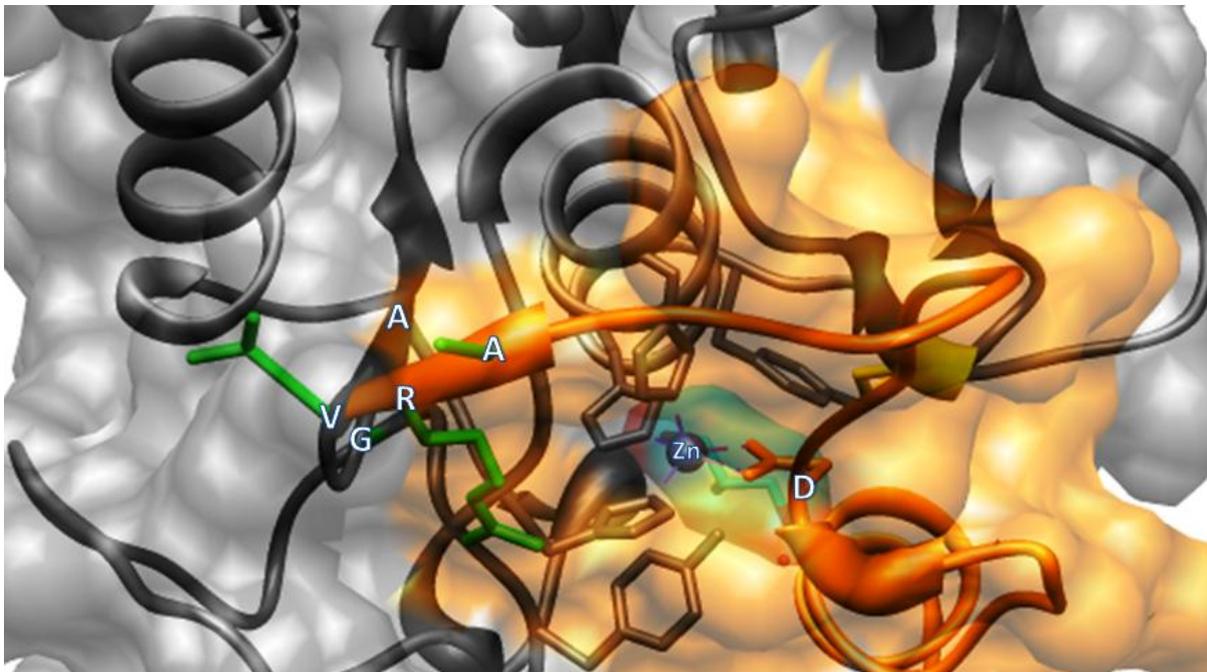


Abbildung 42: Modell der Kristallstruktur des Pro-Astacins mit der Aktivierungsschnittstelle (AR/VGA). (Standardansicht) Die Seitenketten der Schnittstelle sind grün markiert. Die katalytische Domäne ist grau, das Propetid orange markiert. In der Mitte liegt das Zink-Ion mit seinen fünf zinkbindenden Liganden. Rechts vom Zink sitzt das Zink-bindende Asp21, welches das Propeptid im katalytischen Spalt fixiert.

Die Aktivierungsstelle des Pro-Astacins sitzt an der Moleküloberfläche (Abbildung 42). Die für Trypsin so wichtige Seitenkette des Arginins in der P1-Position (Schechter und Berger 1967) liegt an der Oberfläche und ist gut erreichbar. Der reife N-Terminus von Astacin beginnt jedoch zwei Aminosäuren später und lautet AAIL (Yiallourous et al. 2002; Guevara et al. 2010).

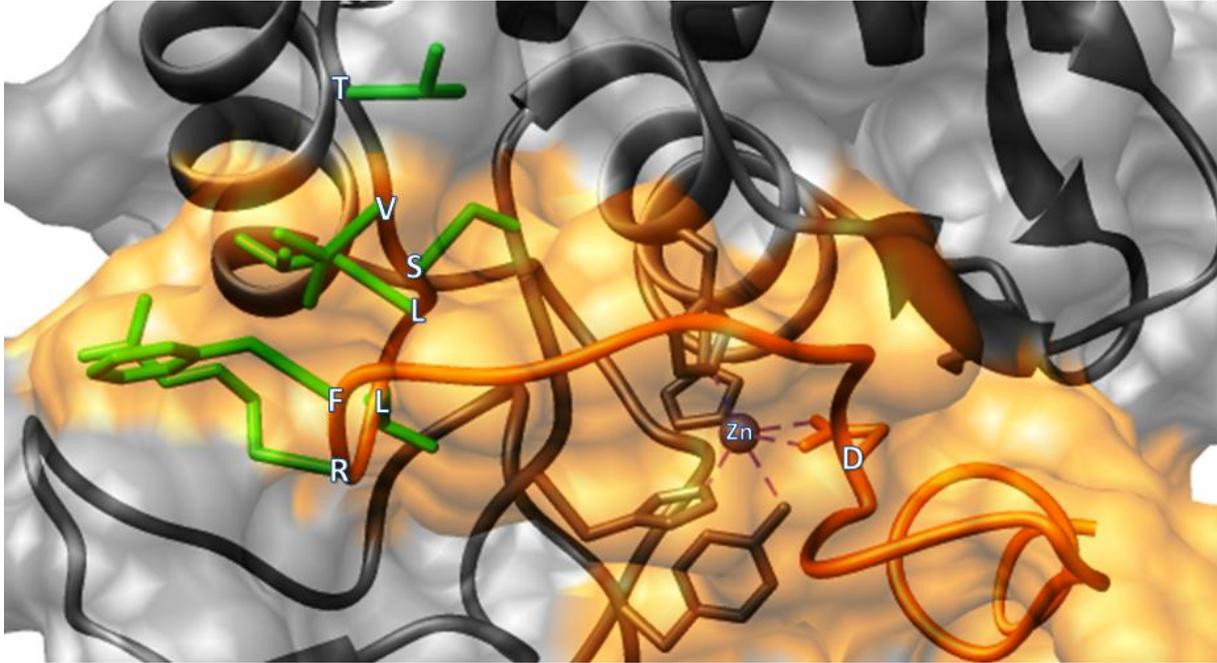


Abbildung 43: Modell der Aktivierungsschnittstelle (FR/LLSVT) des Pro-Ovastacins.

Die Seitenketten der Schnittstelle sind grün markiert. Die katalytische Domäne ist grau, das Propeptid orange markiert. In der Mitte ist das Zink-Ion mit seinen fünf Zinkbindenden-Liganden zu sehen. Auch hier ist rechts vom Zink das Aspartat 54 zu erkennen welches das Propeptid fixiert. Die für die Aktivierung relevanten Seitenketten, sind grün markiert.

Die analoge Darstellung der modellierten dreidimensionalen Struktur des Pro-Ovastacins zeigt, dass die potenzielle tryptische Schnittstelle, Arg62 durch Phe61 verdeckt ist. (Abbildung 43). Die Suche nach potenziellen Aktivatoren der Sequenzregion RLLSVTNN in der Proteasedatenbank MERPOPS ergab, dass außer Trypsin (R/L) eventuell die neutrophile Elastase (V/T) oder die Matrix-Metalloproteinase-2 (V/T) in dieser Region schneiden können.

4.10.2 Aktivierung von Pro-Ovastacin mit MMP-2

Ein weiterer potentieller Kandidat für die Aktivierung von Pro-Ovastacin, der durch die Datenbankrecherche identifiziert wurde, war die Matrix-Metalloprotease-2. Als physiologisch bedeutsam ist die Tatsache, dass MMP-2 in dem Akrosom von Spermien nachgewiesen werden konnte (Ferrer et al. 2012).

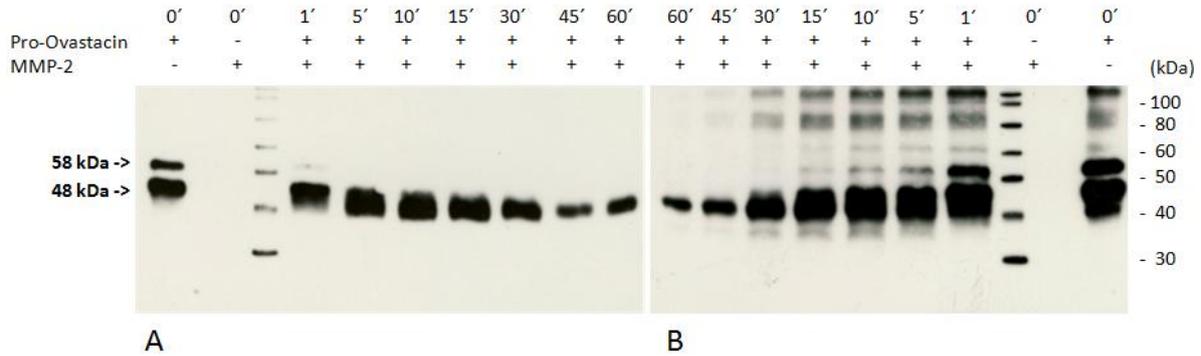


Abbildung 44: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch humanes MMP-2. Zum Auftrennen der Proteine wurde ein 12%iges SDS-PA-Gel verwendet, von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Als Marker wurde der Magic Mark XP (Invitrogen) verwendet. Die Detektion erfolgte A mit dem Anti-Propeptid-Antikörper 1:10000 und B mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper. M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung. Zur Aktivierung wurde 3,4 μ M Pro-Ovastacin-Strep mit 0,28 μ M aktiviertem MMP-2 bei 37°C inkubiert. Dies entspricht einem Verhältnis von 12:1.

Im Zeitverlauf der Inkubation ergab sich mit den beiden Antikörpern ein ähnliches Bild (Abbildung 44). Die beiden typischen Ovastacin Banden bei 48 und 58 kDa verschwinden und es gab nach einer ca. 10 minütigen Inkubation eine 40 kDa Bande die mit beiden Antikörpern detektiert werden konnte. Das Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum erkennt zudem eine sehr schwache Bande unterhalb der 40 kDa, die nicht mit dem Anti-Propeptid-Antikörper zu detektieren ist

Aufgrund der Tatsache, dass keiner der verwendeten Antikörper in der Lage ist MMP-2 zu detektieren wurde eine Polyacrylamid-Elektrophorese durchgeführt. Durch diesen Nachweises sollte das Bild des Aktivierungsverlaufs komplettiert werden. Diesmal wurde jedoch ein engeres Zeitfenster analysiert.

ERGEBNISSE

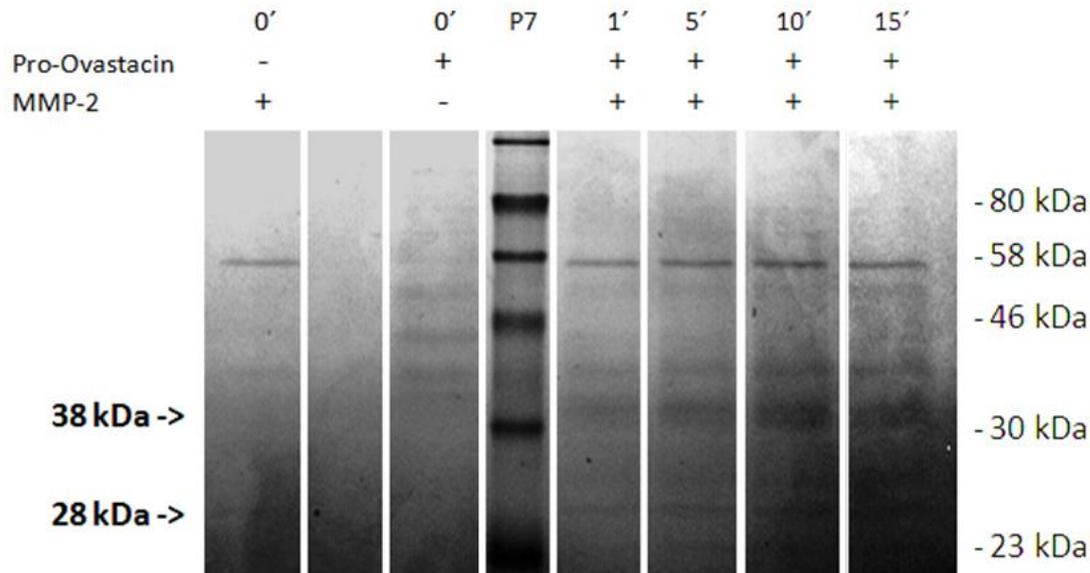


Abbildung 45: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch humanes MMP-2.

Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen in einer 12%-SDS-PA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Aktivierung wurden 3,4 μM Pro-Ovastacin-Strep mit 0,28 μM aktiviertem MMP-2 bei 37°C inkubiert. Zum Markieren der Proteine wurde eine hintergrundfreie Coomassie-Färbung nach Kang durchgeführt. Als Marker wurde der Prestained Protein Marker verwendet.

Durch die Zugabe von MMP-2 verschwinden die typischen Pro-Ovastacin-Strep Banden bereits nach 1 Minute (Abbildung 44). Durch die Proteolyse von Pro-Ovastacin mit MMP-2 sind oberhalb der 30 kDa und der 23 kDa Markerbande neue Banden zu erkennen. Bei den anschließenden Aktivitätsmessungen konnte keine Aktivierung von Ovastacin festgestellt werden. Durch den Abbau von Ovastacin ist aber klar festzustellen, dass MMP-2 erfolgreich aktiviert wurde.

4.10.3 Aktivierung von Pro-Ovastacin-Strep mit Trypsin

Bei der zeitabhängigen Inkubation des Pro-Ovastacins mit Trypsin (molares Verhältnis 8:1) tauchte im Western-Blot mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper nach ca. 1 Minute eine neue Bande bei 40 kDa auf. Im weiteren Verlauf verschwanden die Banden bei 58 kDa und 48 kDa Bande. Ein entsprechendes Bild ergibt sich bei der Detektion mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (Abbildung 46A, B).

ERGEBNISSE

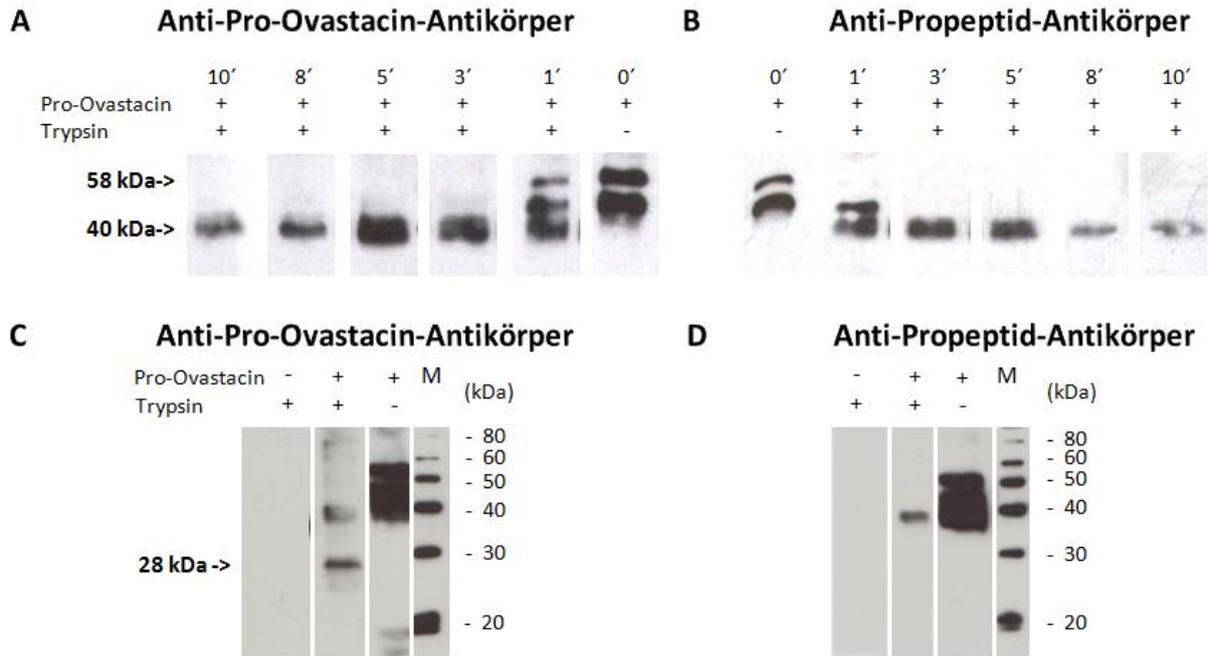


Abbildung 46: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch Trypsin.

Die Trypsin-Konzentration betrug in A+B 0,33 μM , in C+D 0,06 μM im Aktivierungsansatz, die Pro-Ovastacin-Konzentration betrug in A+B 2,7 μM , in C+D 3,6 μM im Ansatz. Zum Auftrennen der Proteine (+DTT) wurde ein 12% SDS-PA-Gel verwendet von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Die Detektion erfolgte A+C: mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000) und B+D: mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (1:10000). M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

Die Veränderung des Pro-Ovastacin zu Trypsin Verhältnisses auf 60:1 brachte eine neue Bande mit 28 kDa zutage (Abbildung 46C), die mit dem Anti-Propeptid-Antikörper nicht detektierbar war (Abbildung 46D). Dies spricht für eine mögliche Aktivierung von Pro-Ovastacin durch Abtrennung des Propeptids.

Ein Aktivitätstest mit dem FRET-Substrat (Ac-RE(EDANS)-Asp-Arg-Asn-Leu-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys-(DABCYL)-NH₂) zeigte, dass die Trypsin-Behandlung des Pro-Ovastacins zur Aktivierung des Enzyms geführt hatte. Das Trypsin war nach der Inkubation mit dem irreversiblen Serinprotease-Hemmstoff Pefabloc inhibiert worden (Abbildung 47).

ERGEBNISSE

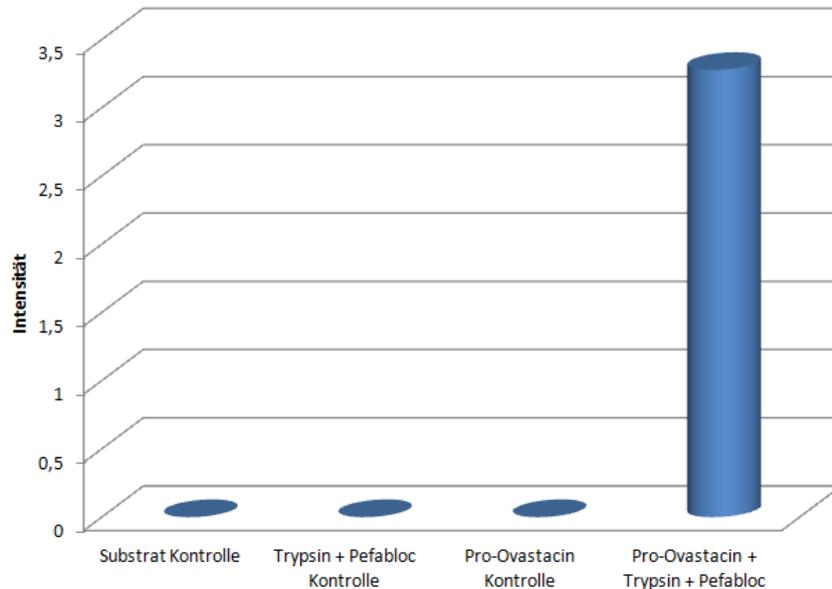


Abbildung 47: Aktivitätstest von Pro-Ovastacin-Strep nach Inkubation mit bovinem Trypsin.

Substratkonzentration (Ac-RE(EDANS)-Asp-Arg-Asn-Leu-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys-(DABCYL)-NH₂) 10 μ M; Verhältnis Pro-Ovastacin/Trypsin 60: 1; Aktivierungsdauer: 10 Minuten, Pefabloc Inkubation: 10 Minuten, Messzeit: 10 Minuten, Temperatur: 37°C.

4.10.4 Aktivierung von Pro-Ovastacin mit neutrophiler Elastase

Im Gegensatz zur Verdauungsprotease Trypsin erschien die neutrophile Elastase als potenziell physiologisch relevanter Aktivator des Pro-Ovastacins, da beide Enzyme im Blutserum nachgewiesen werden konnten. Bei der zeitabhängigen Inkubation des Pro-Ovastacins mit neutrophiler Elastase (molares Verhältnis 3:1) erschienen im Western-Blot mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper nach ca. einer Minuten zwei neue Banden bei 40 kDa bzw. 38 kDa auf. Im weiteren Verlauf verschwanden die Banden bei 58 kDa und 48 kDa. Nach 10 Minuten verschwand auch die Bande bei 40 kDa. Die 38 kDa Bande war auch nach 15 Minuten noch deutlich zu sehen. Des Weiteren entstand nach fünf Minuten eine neue Bande unterhalb bei ca. 28 kDa. Das Molekulargewicht der Bande entspricht der Bande die bei der Aktivierung von Ovastacin mit Trypsin detektiert werden konnte. Der Anti-Propeptid-Antikörper konnte die 40 kDa Bande nach einer Minute und fünf Minuten detektieren, bevor sie im weiteren Verlauf verschwand. Vermutlich handelte es sich bei der 38 kDa Bande und der 28 kDa Bande um aktiviertes Ovastacin. Die Analyse im Commassie Brillant Blue gefärbten Gel (Abbildung 49) bestätigte das Ergebnis des Western-Blots.

ERGEBNISSE

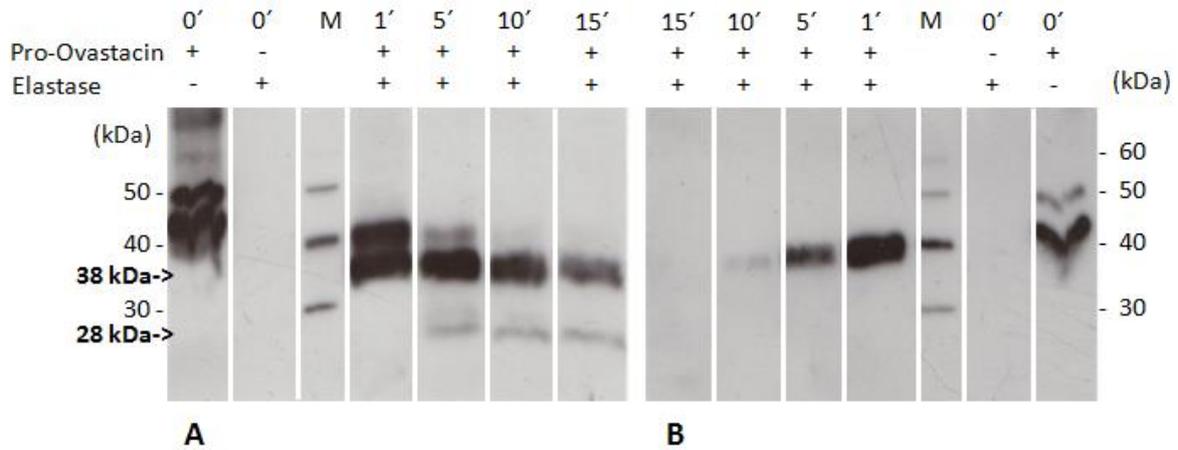


Abbildung 48: Western-Blot zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch neutrophile Elastase.

Zum Auftrennen der Proteine (+DTT) wurde ein 12%iges SDS-PA-Gel verwendet, von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Die Pro-Ovastacin-Konzentration betrug 3,36 μ M, die Elastase-Konzentration 1 μ g im Ansatz. Die Detektion erfolgte A: mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper (1:10000) und B: mit dem Anti-Propeptid-Antikörper (1:10000). M: Magic Mark XP Protein (Invitrogen) Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

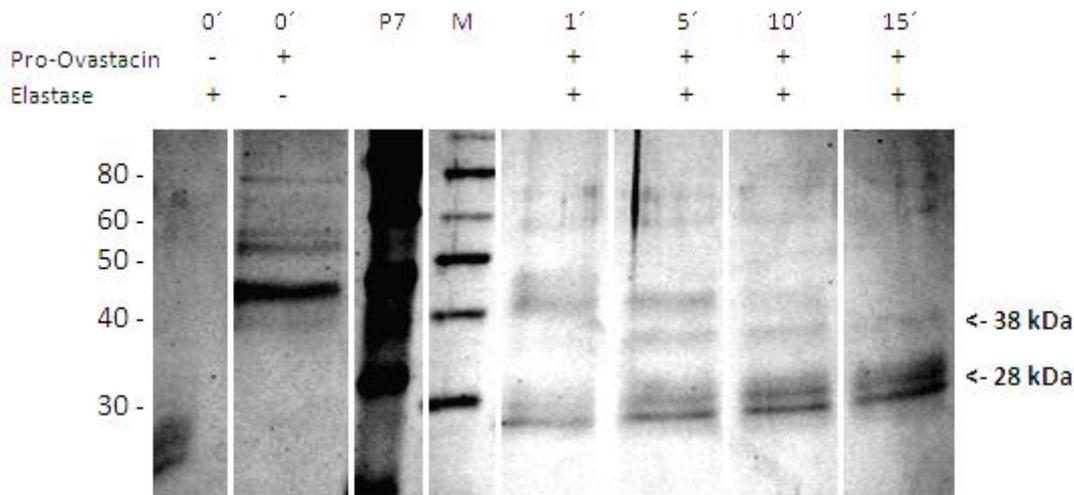


Abbildung 49: Coomassie-Gel zur Überprüfung der Aktivierung von Pro-Ovastacin durch neutrophile Elastase.

Zum Auftrennen der Proteine (+DTT) wurde ein 12%iges SDS-PA-Gel verwendet. Das Pro-Ovastacin wurde mit Elastase im Verhältnis 3:1 aktiviert. Die Ovastacin-Konzentration betrug 3,6 μ M, die Elastase-Konzentration lag bei 1 μ M. Als Marker wurden der Magic Mark XP (Invitrogen) und der *Prestained* Protein Marker (NEB) verwendet.

Um die Struktur von mit Elastase aktiviertem Ovastacin zu analysieren, wurden die Proben unter reduzierten und nicht reduzierten Bedingungen elektrophoretisch untersucht. Bei der Aktivierung lag ein Ovastacin-Elastase Verhältnis von 7,5:1 vor (Abbildung 50).

ERGEBNISSE

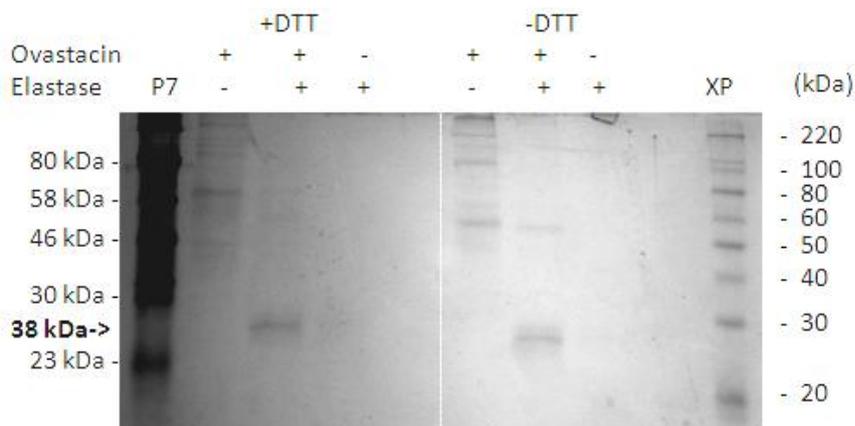


Abbildung 50: Vergleich zwischen reduzierten und nicht reduzierten Ovastacin Proben.

Zum Auftrennen der Proteine wurde ein 12% SDS-PA-Gel verwendet. Links sind die Proben unter reduzierenden Bedingungen (0,04 M DTT) zu sehen, rechts die Proben unter nicht reduzierenden Bedingungen. Das Pro-Ovastacin (3 μ M) wurde mit Elastase (0,4 μ M) im Verhältnis 7,5:1 aktiviert. Zum Markieren der Proteine wurde eine hintergrundfreie Coomassie-Färbung nach Kang durchgeführt. Als Marker wurden der Magic Mark XP (Invitrogen) und der Prestained Protein Marker (NEB) verwendet.

In der Pro-Ovastacin Kontrolle mit DTT war eine Bande bei 58 kDa zu sehen. Die 48 kDa Bande war nicht zu erkennen. Denkbar wäre eine zu geringe Konzentration (vgl. Abbildung 30B). Die 58 kDa Bande war auch unter nicht reduzierten Bedingungen vorhanden. Allerdings kommen auch noch Banden mit einem deutlich höheren Molekulargewicht hinzu (vgl. Abbildung 30). Vermutlich handelt es sich hierbei um Oligomere. Die durch Elastase-Behandlung erzeugte Bande bei 28 kDa Bande, bei der es sich vermutlich um das aktive Ovastacin handelt, bleibt im nicht reduzierten Gel erhalten. Dies deutet darauf hin, dass das aktivierte Ovastacin keine disulfidverbrückten Oligomere bildet.

Die Aktivität des mit Elastase behandelten Ovastacins wurde mit dem Proteinsubstrat Casein und mit einem FRET-Peptidsubstrat analysiert. Um eine Trennung der Elastase und des aktivierten Ovastacins zu ermöglichen, wurden der pH-Wert des Gelpuffer sowie des Laufpuffers auf pH 10,0 eingestellt. Der pI von Elastase liegt bei pH 9,9. Der pI von aktiviertem Ovastacin liegt darunter (pH 8,8). Somit ist die Gesamtladung des Ovastacins negativ und Ovastacin kann in einem elektrischen Feld zur Anode wandern, wogegen Elastase bei pH 10,0 immobil ist und nicht ins Gel wandert.

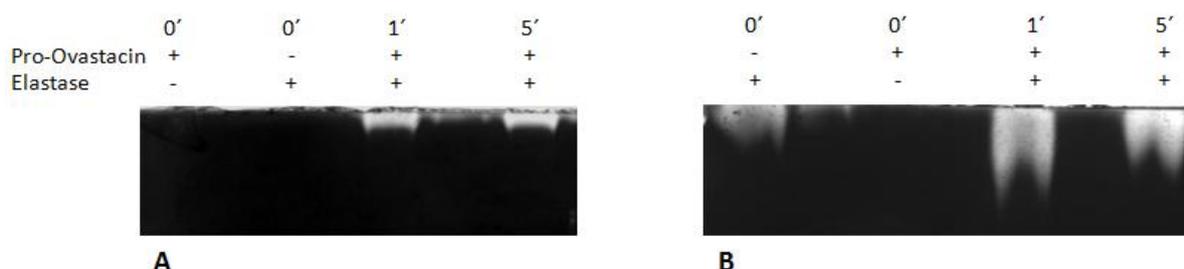


Abbildung 51: Native Casein Zymographie.

0,1% Casein als Substrat in einem 12% nativen-PA-Gel polymerisiert. Als Kontrollen wurden Elastase (1 μ M) und Pro-Ovastacin (3,6 μ M) verwendet. A: Dauer des Gellaufs 45 Minuten, B: Dauer des Gellaufs 75 Minuten. Zum Anfärben des Gels wurde eine Coomassie-Färbung nach Kang (Kang et al. 2002) durchgeführt.

ERGEBNISSE

In der Casein-Zymographie konnte eine proteolytische Aktivität des Elastase-behandelten Pro-Ovastacins eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 51A). Allerdings ist die Proteolyse auf den obersten Gelbereich beschränkt. Auch eine Verlängerung der Elektrophoresedauer (Abbildung 51B) erbrachte nur eine geringfügige Verlängerung der Laufstrecke.

Die Aktivität des Elastase-aktivierten Ovastacins konnte auch mit einer Serie fluoreszierender Substrate nachgewiesen werden (Abbildung 52).

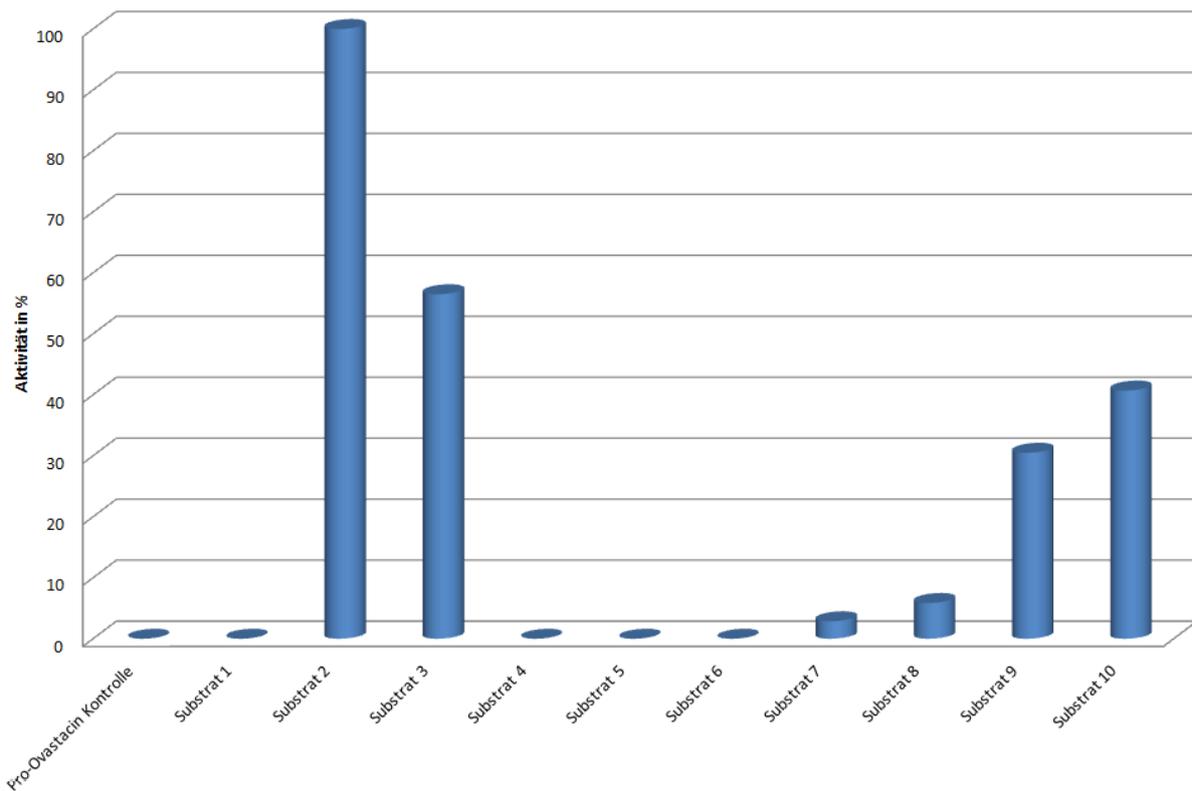


Abbildung 52: Substrattest von Pro-Ovastacin aktiviert mit Elastase.

Es wurden 10 verschiedene Substrate (Tabelle 41) mit aktiviertem Ovastacin inkubiert. Die Serinprotease Elastase wurde mittels Pefabloc (5 mM) inhibiert. Die Substratkonzentration betrug 10 μM . Es wurden 2 μM Pro-Ovastacin-Strep mit 1,95 μM Pro-Elastase bei 37°C aktiviert. Die Aktivierungsdauer betrug 10 Minuten, die Inhibitionsinkubation der Elastase betrug ebenfalls 10 Minuten. Die Messdauer betrug 13 Minuten. Als Maß für die Aktivität diente die Fluoreszenzemission bei 393 nm. Die höchste Fluoreszenzintensität (Substrat 2) wurde als 100% gesetzt.

ERGEBNISSE

Tabelle 41: Verwendete Substrate für den FRET-Assay

Nr.	Substrat	Konz.
1	Mca-Ala-Pro-Ala-Lys-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-NH ₂	1 mM
2	Mca-Arg-Pro-Lys -Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH ₂	1 mM
3	Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-NH ₂	1mM
4	Mca-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys(Dnp)-NH ₂	1 mM
5	Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH ₂	1 mM
6	Mca-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Arg-Arg- NH ₂	1 mM
7	Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH ₂	1 mM
8	Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH ₂	1 mM
9	Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Glu-Glu-Ala-Dap(Dnp)-NH ₂	1 mM
10	Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Ala-Lys(Dnp)-NH ₂	2 mM
11	Mca- Pro-Leu-Ala-Nva-(Dnp)-Ala-Arg-NH ₂	1 mM
12	Ac-RE(EDANS)-Asp-Arg-Asn-Leu-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys -(DABCYL)-NH ₂	1 mM

Mca: (7-Methyloxy coumarin-4-yl) acetyl; Dnp: N-2,4-Dinitrophenyl; Nva: Norvalin; EDANS: 5-((2-Aminoethyl)Amino)Naphthalen-1-Sulfonsäure; DABCYL= 4 - ((4 - (Dimethylamino)Phenyl)Azo)Benzoessäure

Eine deutliche Aktivität konnte mit den Substraten 2, 3, 9 und 10 gezeigt werden. Etwas schwächer ausgeprägt war die Aktivität bei dem Substrat 7 und 8. Somit konnten weitere Substrate für die Charakterisierung der Funktion von Ovastacin gefunden werden. Die Serinprotease Elastase ist in der Lage, die meisten dieser 10 Substrate zu schneiden. Substrat 8 bildet hier eine Ausnahme. Daher wurde bei allen Substraten mit Ausnahme von Substrat 8 nach der Aktivierung 50 mM des irreversiblen Serinproteasehemmstoffs Pefabloc zugegeben. Aufgrund der Tatsache, dass sich das Substrat 8 als stabil gegenüber der Elastase zeigte wurde es für einen Inhibitionstest gewählt bei dem verifiziert werden sollte

ERGEBNISSE

das die gemessene Aktivität von einer Metalloprotease herführt. Für die Inhibition wurde der Komplexbildner EDTA gewählt der positiv geladene Metallionen binden kann. Ohne das Zink-Ion im katalytischen Zentrum verlieren die Astatine ihre Aktivität.

4.10.5 Interaktion von Pro-Ovastacin mit Proteaseninhibitoren

Das Elastase-resistente Substrat 8 wurde in einem Inhibitionstest mit Ovastacin und dem Metallchelator EDTA eingesetzt, der viele Zinkproteasen reversibel hemmen kann (Abbildung 53).

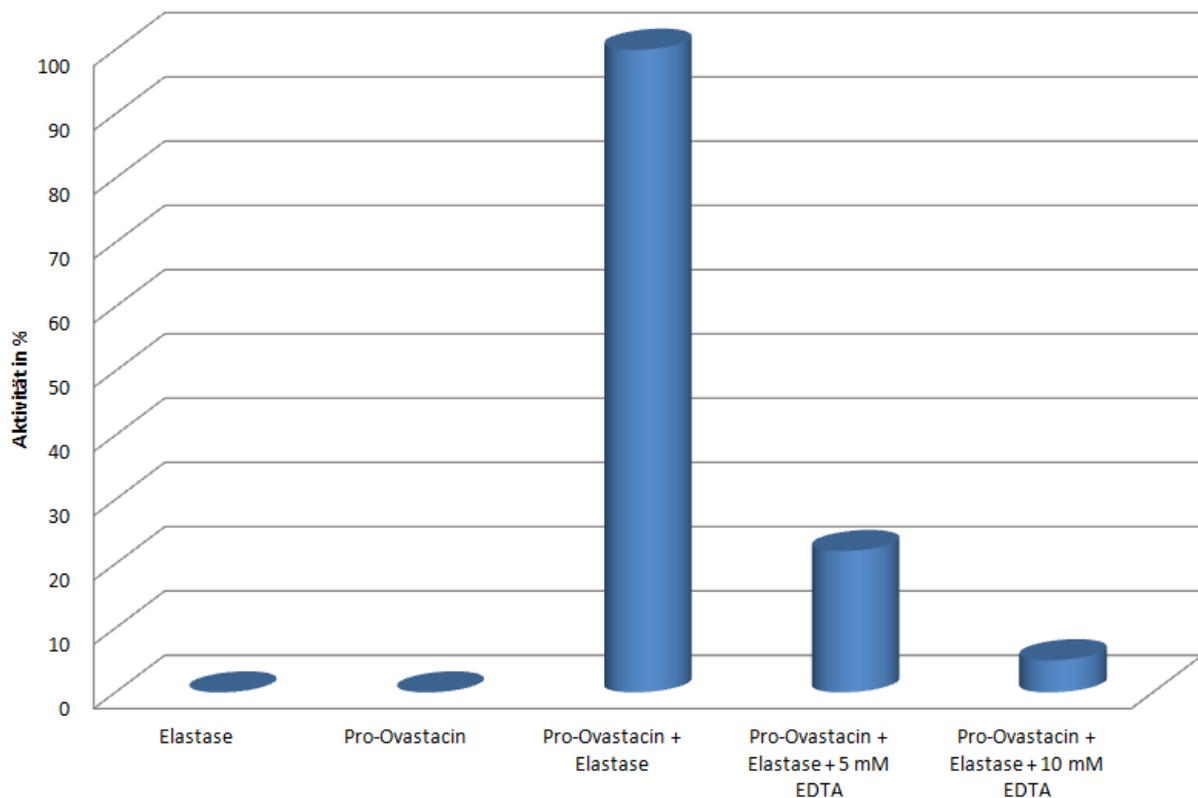


Abbildung 53: Inhibitionstest von Elastase-aktiviertem Ovastacin.

Die Elastase wurde in diesem Versuchsansatz nicht inhibiert weil sie das hier benutzte Substrat 8 nicht spaltet. Die Substratkonzentration betrug $10 \mu\text{M}$. Es wurden $2 \mu\text{M}$ Pro-Ovastacin-Strep mit $1,95 \mu\text{M}$ Pro-Elastase bei 37°C aktiviert. Die Aktivierungsdauer sowie die Inhibitionsinkubation der Elastase betrug 10 Minuten. Die Messdauer betrug 13 Minuten. Die höchste Fluoreszenzintensität (Pro-Ovastacin + Elastase) wurde als 100% gesetzt.

Der Metallchelator EDTA erwies sich als potenter Ovastacin-Hemmstoff. Damit war bewiesen, dass die gemessene Aktivität von einer Metalloprotease stammen muss.

Nach dieser ersten erfolgreichen Inhibition sollten spezifischere Inhibitoren getestet werden. Dabei fiel die Wahl auf das aus der Leber stammende Plasmaprotein Fetuin B, das auch in der Follikelflüssigkeit nachweisbar ist (Lee et al. 2009). Fetuine sind Proteine, die zur

ERGEBNISSE

Cystatin-3 Familie zählen. Für das homologe Fetuin A konnte bereits eine Inhibition von Astacin-Proteasen wie Meprin α gezeigt werden (Hedrich et al. 2010).

In den Ansätzen mit aktiviertem Ovastacin wurde Pefabloc zugegeben, um die Aktivität von Elastase zu inhibieren. Fetuin B zeigte sich als höchstpotenter Inhibitor des Ovastacins (Abbildung 54).

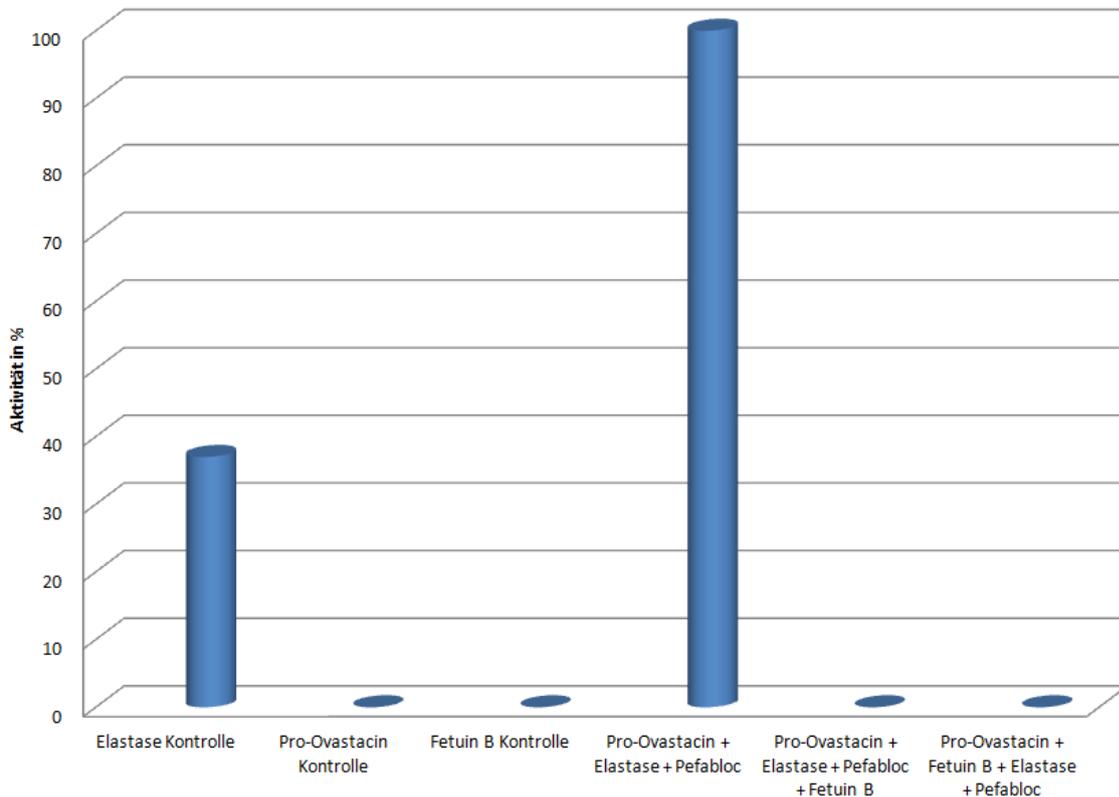


Abbildung 54: Inhibitionstest von aktiviertem Pro-Ovastacin-Strep.

Der Assay wurde in 150 mM NaCl, 50 mM Tris bei pH 7,3 durchgeführt. Es wurden 2,5 μ M Pro-Ovastacin-Strep mit 0,1 μ M Pro-Elastase bei 37°C aktiviert, 10 min aktiviert, mit 50 mM Pefabloc versetzt (10 Minuten), anschließend wurde 10 Minuten mit 6,43 μ M Fetuin-B vorinkubiert und die Reaktion mit 10 μ M Substrat 12 (Ac-RE(EDANS)-Asp-Arg-Asn-Leu-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys-(DABCYL)-NH₂) gestartet. Die Messdauer betrug 33 Minuten.

4.10.6 Massenspektrometrische Analyse und N-terminale Sequenzierung des aktivierten Ovastacins

Die N-terminalen Sequenzierung der 38 kDa Bande ergab die Sequenz FQDK, Dieser N-Terminus beginnt also an Position 27, in der Mitte des Propeptids. Damit ist ein Großteil des Propeptids noch vorhanden inklusive des Aspartat-Switchs. Der Aminoterminus der ebenfalls ansequenzierten 28 kDa Bande konnte nicht identifiziert werden.

Die massenspektrometrische Analyse der 38 kDa Bande wurde von Oliver Schilling (Universität Freiburg) durchgeführt (Tabelle 3). Dabei konnte Ovastacin inklusive des C-Terminus eindeutig identifiziert werden, allerdings kein Peptid aus dem Propeptidbereich.

ERGEBNISSE

Tabelle 42: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der 38 kDa Bande.

Die unterstrichenen Abschnitte der Sequenz sind diejenigen Peptide, die durch die Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Die verschiedenen Domänen sind folgendermaßen markiert: Propeptid: rot, katalytische Domäne: grün, C-terminale Domäne: blau, Strep-tag: orange.

38 kDa-Bande nach der Aktivierung mit Elastase
<p>APSASRC<u>SGVCSTSV</u>PEGFT<u>PEGSPVFQDKDIPAINQGLISEETPESSFLVEGDIIRPSPFRL</u> LSVTNNKWP<u>KGVGGFVEIPFLLSR</u>KYDELSR<u>RVIMDAFAEFER</u>FTCIRFVAYHGQR<u>DFVSIL</u> PMAGCFSGVGR<u>SGGMQVVSLAPTCLRK</u>GRGIVLHELMHVLGFWHEHSRADRDRYIQVN WNEILPGFEINFIKSR<u>STNMLVPYDYSSVMHYGR</u>FAFSWRGQPTIPLWTSSVHIGQR<u>WNLS</u> <u>TSDITRVCR</u>LYNCSR<u>SVPDSHGR</u><u>GFEAQSDGSSLTPASISR</u>LQRLLEALSEESGSSAPSGS RTGGQSIAGLGNSQQGWEHPPQSTFSVGALARPPQMLADASKSGPGAGADSLSEQFQ LAQAPT<u>VPLALFPEAR</u><u>DKPAPIQDAFERLAPLPGGCAPGSHIR</u>EVPRD RS WSHPQFEK</p>

4.11 Nachweis von Ovastacin in Geweben

Nachdem in der ersten Publikation über Ovastacin (Quesada et al. 2004) kein Nachweis zur Expression von Ovastacin außerhalb des Reproduktionstrakts identifiziert wurde gab es diesbezüglich in den folgenden Jahren neue Erkenntnisse basierend auf massenspektrometrischen Analysen (Tunica et al. 2009; Zgoda et al. 2009; Yin et al. 2010). Diese Ergebnisse sollten im Folgenden mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper überprüft werden.

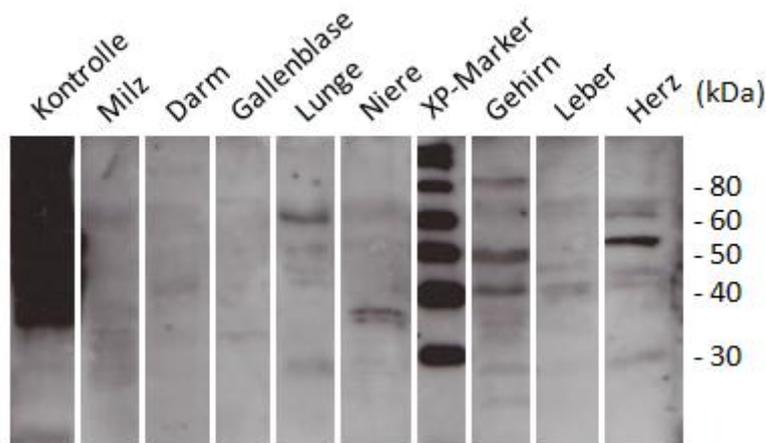


Abbildung 55: Western-Blot zur Immundetektion der Expression von Ovastacin in Gewebelysaten in FVB-Mäusen.

Zum Auftrennen der Proteine (+DTT) wurde ein 12%iges SDS-PA-Gel verwendet von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum 1:10000. M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

Es sind in den aufgetrennten Organlysaten von Milz, Darm, Gallenblase und Leber keine Banden zu erkennen (Abbildung 55). In den Nierenlysaten ist eine Bande unterhalb der 40 kDa Markerbande sichtbar. Mehrere Banden sind dagegen in den Gehirnllysaten erkennbar. Im Gegensatz dazu ist in der Probe mit den Herzlysaten eine sehr deutliche Bande oberhalb der 50 kDa Bande zu erkennen. Somit konnte Ovastacin in dem Herzlysaten

nachgewiesen und somit das Ergebnis der Massenspektrometrie für dieses Organ bestätigt werden. Allerdings ist die unterschiedliche Größe der detektierten Proteine noch ungeklärt.

4.12 Expression von Pro-Ovastacin in *Cho-K1*-Zellen

Um ein Expressionssystem zu testen, das dem physiologischen Expressionsgewebe ähnlich ist, wurde die Expression in *CHO*-Zellen getestet. Dabei ließ ich mich auch von der Hypothese leiten, dass das Enzym in diesem Zellsystem womöglich in aktiver Form produziert werden könnte. Adhärent wachsende *Cho-X1*-Zellen wurden mit dem Vektor Pro-Ovastacin-His pBk-cmv transfiziert (Mertens 2004) (Abbildung 56).

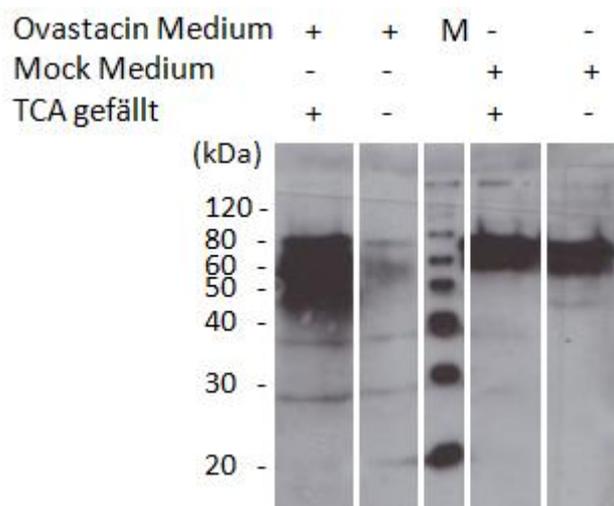


Abbildung 56: Western-Blot zur Immundetektion der Expression von Ovastacin im Zellmedium von *CHO-K1* Zellen.

Das Zellmedium wurde von *CHO-K1* Zellen abgenommen die zuvor mit Pro-Ovastacin-Strep pBK-cmv-Vektor transfiziert worden waren. Das Medium wurde 10x TCA gefällt oder 14 μ l ungefälltes Medium unter reduzierenden Bedingungen zum Auftrennen auf ein 12%iges SDS-PA-Gel geladen. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper 1:10000. M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

Es konnten Banden in den mit Pro-Ovastacin transfizierten Zellen auf Höhe der 60 kDa (Abbildung 56) mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper nachgewiesen werden, die nicht in der Mock-Kontrolle zu finden waren. Bei den Banden unterhalb der 60 kDa ist von einer trinkierten Form des Ovastacin auszugehen. Somit konnte gezeigt werden, dass die mit Pro-Ovastacin-Strep transfizierten *CHO*-Zellen Ovastacin exprimieren. Es konnte allerdings kein Anzeichen für eine Aktivierung festgestellt werden, da es sich in diesem Molekulargewichtsbereich um die Pro-Ovastacin Banden handelt.

4.13 Nachweis von Ovastacin in Embryonen

Die Expression des Ovastacins in Eizellen und befruchteten Eizellen wurde im Western-Blot und durch Immunfluoreszenz untersucht.

Um Ovastacin in befruchteten Eizellen nachweisen zu können wurden stagnierte oder defekte befruchtete Eizellen zu Anfang der *in vitro*-Kultivierung separiert oder während der Kultivierung aussortiert. Sie wurden anschließend in Probenpuffer gekocht und im Western-Blot analysiert.

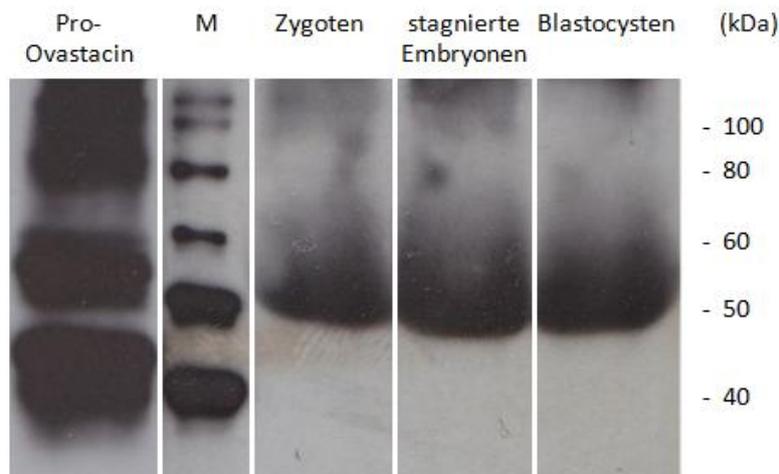


Abbildung 57: Western-Blot zur Detektion von Ovastacin in FVB-Embryonen.

Je 30 Embryonen wurden in 20 µl 3X Probenpuffer +DTT auf 100°C erhitzt. Zum Auftrennen der Proteine wurde ein 12%iges SDS-PA-Gel verwendet von dem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper 1:10000. M: Magic Mark XP Protein Marker zur Molekulargewichtsbestimmung.

In allen Bahnen in denen sich befruchtete Eizellen befanden war zwischen den 50 kDa und 60 kDa Markerbanden eine Bande zu detektieren, die vermutlich dem Ovastacin entspricht (Abbildung 57).

Für die immunhistologischen Analysen der Expression von Pro-Ovastacin in der Entwicklung von befruchteten Oocyten bis zum Blastocystenstadium war es notwendig die befruchteten Eizellen 12 h nach der Befruchtung zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren (Hildebrand 2008).

Bereits Carlos Lopez-Otin und Mitarbeiter hatten gezeigt, dass die Expression auf mRNA-Ebene bereits in Oocyten und in 2-Zell Embryonen erfolgt (Quesada et al. 2004). Auf Protein-Ebene konnte Ovastacin mit einem gegen die C-terminale Domäne gerichteten Antikörper ausschließlich in unbefruchteten Eizellen detektiert werden (Burkart et al. 2012). Da es dadurch nicht möglich ist, eine Differenzierung zwischen dem aktiven Ovastacin und der Pro-Form zu treffen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression von Ovastacin in Zygoten während ihrer Entwicklung zur Blastocyste mit dem Anti-Propeptid-Antiserum und dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum analysiert. Mithilfe dieser Analyse sollte die Expression von Ovastacin nachverfolgt werden und möglicherweise das Zeitfenster der

ERGEBNISSE

Aktivierung ermittelt werden. Hierzu wurden von jedem Zellstadium einige Embryonen *in vitro* kultiviert und nach dem Erreichen des erwünschten Zellstadiums für die histologische Immundetektion vorbereitet. In der Kontrolle konnte keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 58). Die Kontrollzellen wurde bis auf die Verwendung eines primären Antikörpers gleich behandelt.

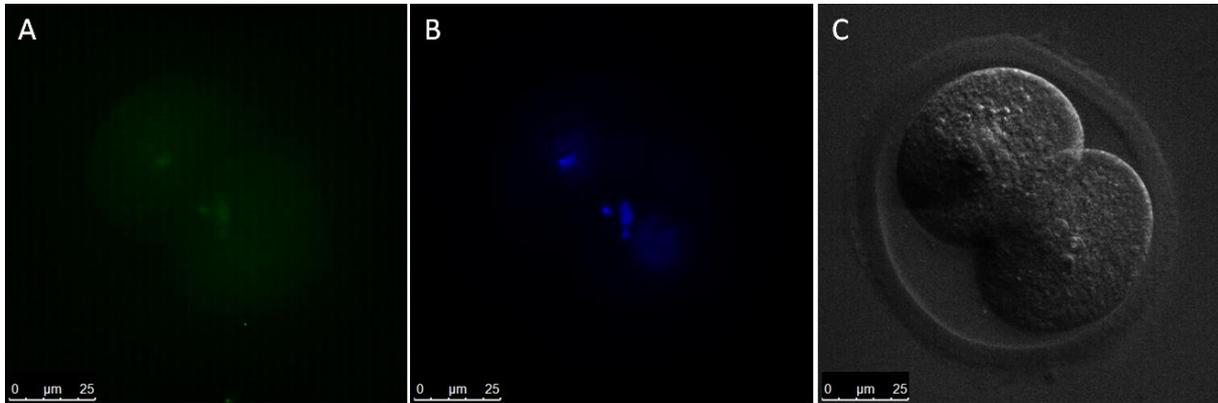


Abbildung 58: Immundetektion von Ovastacin in 2-Zell Mausembryonen.

Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. A: Alexa 488-Kana Antikörper, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

4.13.1 Immundetektion von Ovastacin in Embryonen mit dem Pro-Anti-Propeptid-Antiserum

Für die Immundetektion der Pro-Form des Ovastacins während der Entwicklung von der Zygote bis zum Blastocystenstadium wurde der Anti-Propeptid-Antikörper verwendet. Damit sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt die Aktivierung erfolgt.

In den befruchteten Eizellen konnten im Einzellstadium mit dem Anti-Propeptid-Antikörper deutliche Signale detektiert werden (Abbildung 59). Sie waren gleichmäßig verteilt in der Zygote. Während der Entwicklung war insgesamt eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz in den Embryonen festzustellen. Im Morula und Blastocysten-Zellstadium ist die Pro-Form des Ovastacin fast nicht mehr nachweisbar. Um eine Aussage über den möglichen Aktivierungszeitpunkt treffen zu können wurden Vergleichsuntersuchungen mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum durchgeführt

ERGEBNISSE

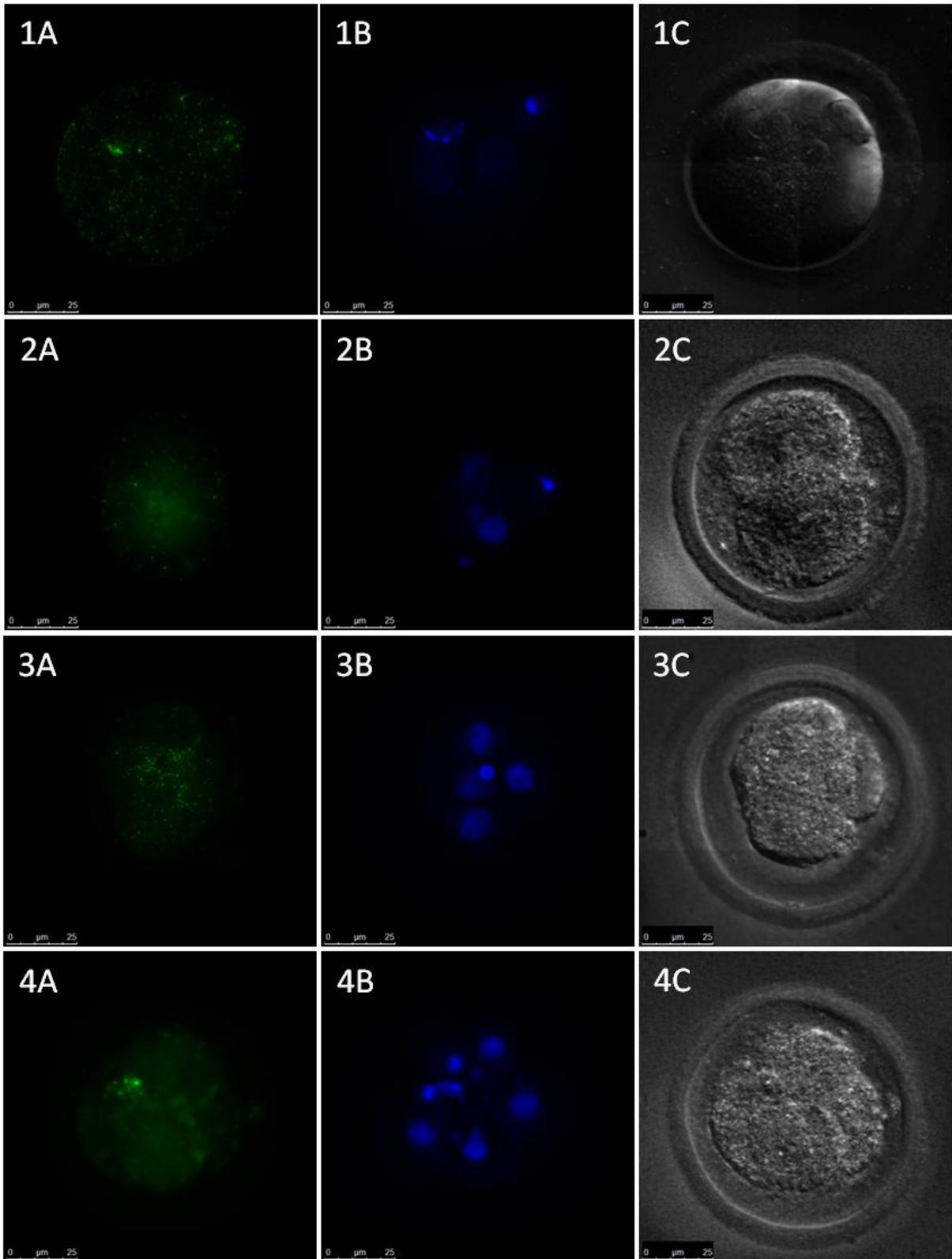


Abbildung 59: Immunedektion von Pro-Ovastacin in Mausembryonen.

Der Anti-Propeptid-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. 1: 1-Zellembryo; 2: 2-Zellembryo; 3: 4-Zellembryo; A: Alexa 488-Kanal Antikörper, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

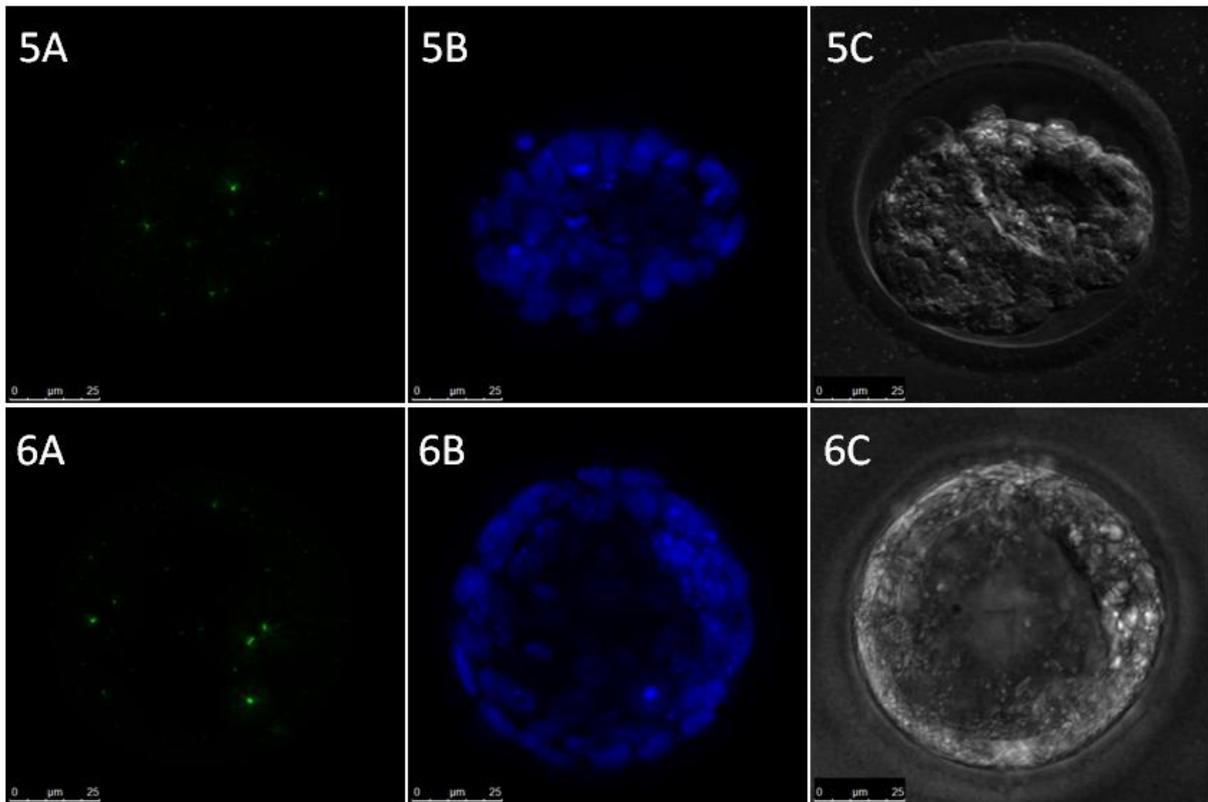


Abbildung 60: Immunedektion von Pro-Ovastacin in Mausembryonen.

Der Anti-Propeptid-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. 4: 8-Zellembryo; 5: Morula; 6: Blastocyste; A: Alexa 488-Kanal Antikörper, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

4.13.2 Immunedektion von Ovastacin in Embryonen mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper

Für die Immunedektion des Ovastacins während der Entwicklung von der Zygote bis zum Blastocystenstadium wurde der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper erkennt jede Domäne des Ovastacins.

ERGEBNISSE

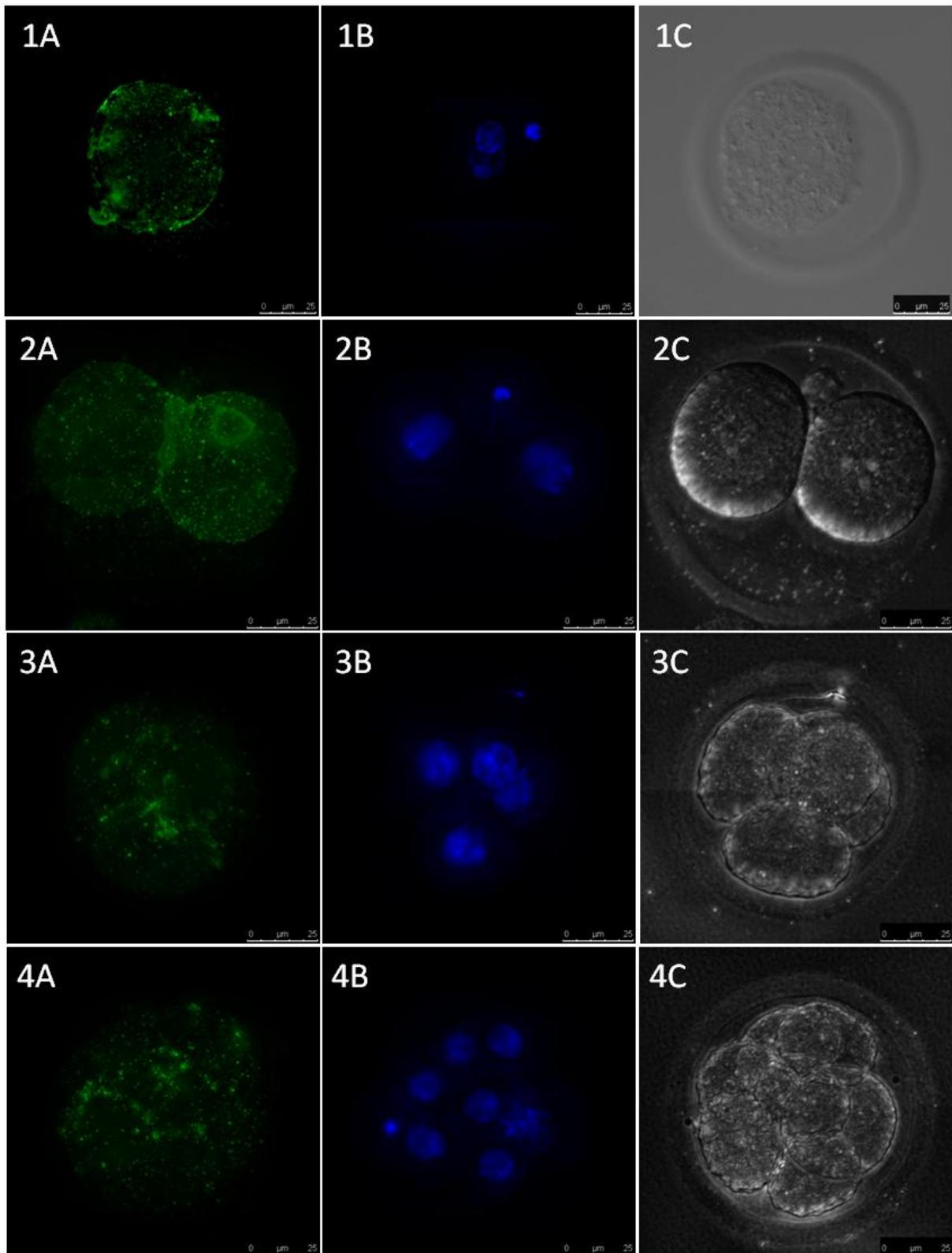


Abbildung 61: Immunfärbung von Ovastacin in Mausembryonen.

Der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. 1: 1-Zellembryo; 2: 2-Zellembryo; 3: 4-Zellembryo; 4: 8-Zellembryo; A: Alexa 488-Kanal Antikörper, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

ERGEBNISSE

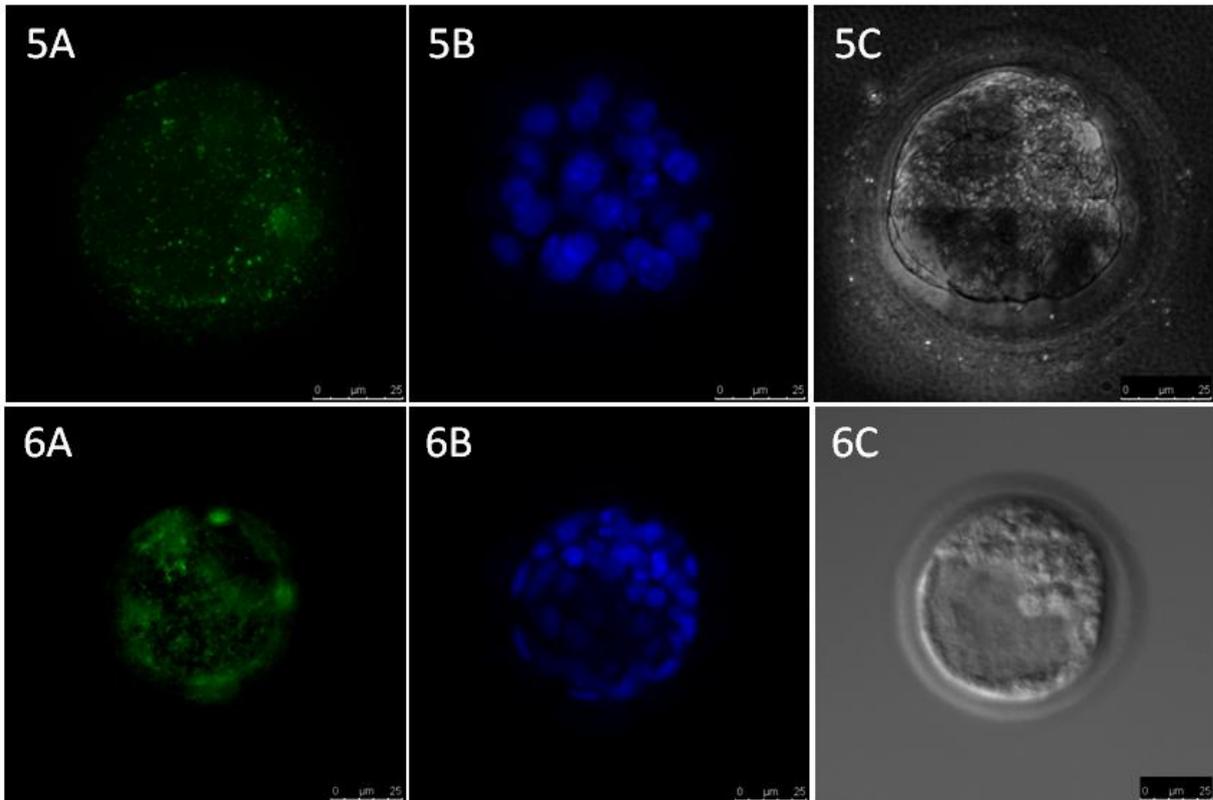


Abbildung 62: Immunfledektion von Ovastacin in einem Mausembryo.

Der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. 4: 8-Zellembryo; 5: Morula; 6: Blastocyste; A: Alexa 488-Kanal Antikörper, B: DAPI-Kanal, C: Durchlicht.

In den befruchteten Eizellen konnte im Einzellstadium mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum ein deutliches Signal detektiert werden (Abbildung 61). Deutlicher zeichnet sich der Rand der Zygote ab. Die Fluoreszenz ist nach dem Zygoten-Zellstadium deutlich vereinzelt. Insgesamt ist jedoch die Fluoreszenz stärker als mit dem Anti-Propeptid-Antikörper. Dies war auch zu erwarten, da der Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper die Signale der Pro-Form sowie der aktiven Form vereint. Aus der Abnahme der Signale beider Antikörper im Verlauf der Entwicklung kann geschlossen werden, dass die physiologische Funktion des Ovastacins in der Frühphase der Embryogenese zu suchen ist. Tatsächlich ist die Fluoreszenz mit dem Anti-Pro-Ovastacin Antiserum kurz nach der Befruchtung besonders intensiv. Zum gleichen Zeitpunkt ist das Signal des Anti-Propeptid Antikörpers deutlich schwächer. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass es sich schon im Einzellstadium um aktives Ovastacin handeln könnte.

5. DISKUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Astacin-Metalloprotease Ovastacin bekannt, dass sie als Pro-Enzym (Zymogen) in der Säugereizelle exprimiert wird. Weder über die physiologische Funktion, noch über den Mechanismus der Aktivierung des inaktiven Pro-Enzyms lagen Informationen vor (Quesada et al., 2004). Um das Enzym biochemisch analysieren zu können, exprimierte ich verschiedene Varianten der Ovastacin-kodierenden cDNA heterolog in Insektenzellen. Zur Beantwortung der Frage nach den physiologischen Funktionen suchte ich in Geweben der Maus nach alternativen Expressionsorten. Zur Einordnung des Ovastacins in das proteolytische Netzwerk sowie der Aufklärung des Aktivierungsmechanismus führte ich Aktivierungsstudien durch.

Rekombinantes Ovastacin

Bei den exprimierten Ovastacin-Varianten handelte es sich um das inaktive Zymogen Pro-Ovastacin-Strep, das sich aus dem Propeptid, der Proteasedomäne und der C-terminalen Domäne zusammensetzte, sowie um die aktive Variante Ovastacin-Strep, der das Propeptid fehlte, und Ovastacin-Kat-Strep, das nur aus der katalytischen Proteasedomäne bestand. Das komplette Pro-Enzym Pro-Ovastacin-Strep wurde exprimiert, um den unbekanntem Aktivierungsmechanismus des Ovastacins zu entschlüsseln. Die aktiven Ovastacin-Varianten sollten zur Aufklärung der unbekanntem Funktion der C-terminalen Domäne beitragen sowie zur Aufklärung der noch weitgehend unbekanntem Substratspezifität und der Spaltspezifität des Ovastacins dienen.

Die Expression der aktiven Ovastacin-Varianten war zwar erfolgreich, allerdings ergaben sich bei der Reinigung Probleme aufgrund der geringen Löslichkeit. Ovastacin-Strep wurde von den *HighFive*-Zellen sezerniert, war jedoch unlöslich. Im Vergleich dazu wurde das Ovastacin-Kat-Strep gar nicht von den *HighFive*-Zellen sezerniert. Erst nach der Lyse der Zellen konnte es als unlösliches Protein nachgewiesen werden. Das experimentell ermittelte Molekulargewicht (40 kDa) von Ovastacin-Strep entsprach dem theoretischen Wert von 39728 Da. Somit schien das Protein unglykosyliert zu sein. Da die Löslichkeit von Proteinen vom Puffersystem und dessen pH-Wert abhängt, wurde von Konstantin Karmilin in seiner Diplomarbeit (Karmilin 2012) versucht, ein optimiertes Reinigungsprotokoll zu ermitteln. Trotz intensiver Variation der Reinigungsbedingungen blieben sowohl Ovastacin-Strep wie auch Ovastacin-Kat-Strep unlöslich. Dabei war die Sequenz des Signalpeptids bei allen drei exprimierten Ovastacin-Varianten identisch. Pro-Ovastacin-Strep sowie das Ovastacin-Strep wurden in das Zellmedium sezerniert. Auch der Übergang zwischen Signalpeptid und der katalytischen Domäne war bei beiden aktiven Varianten gleich, sodass eine defekte Schnittstelle für die Signalpeptidase auszuschließen war. Eine mögliche Ursache für die

ausgebliebene Sekretion könnten im Fall des Ovastacin-Kat-Strep Mängel bei der Faltung in Frage kommen, bedingt durch die fehlende C-Terminale Domäne. Da aber beide aktiven Ovastacin-Varianten unabhängig von der C-Terminale Domäne unlöslich waren, liegt jedoch der Schluss nahe, dass das Propeptid für die Löslichkeit und die korrekte Sekretion von Bedeutung ist. Die Reinigung des exprimierten kompletten Pro-Ovastacin-Strep gelang sowohl aus Insektenzellen als auch aus Säugerzellen.

Für den Nachweis der exprimierten Ovastacin-Varianten war die Herstellung gegen das Gesamtprotein und gegen das Propeptid gerichteter spezifischer Antiseren eine Grundvoraussetzung. Dadurch ist es auch möglich natives Ovastacin in Geweben nachzuweisen. Als besonders wertvolles Werkzeug erwies sich der Anti-Propeptid-Antikörper mit dem es möglich war, selektiv die inaktive Zymogenform zu detektieren. Er kreuzreagierte nicht mit den Proformen anderer Astacine und konnte daher besonders effektiv in der immunhistochemischen Analyse eingesetzt werden. Dagegen erkannte das Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum nicht nur Ovastacin sondern auch Meprin α , obwohl die Sequenzidentität der katalytischen Domänen von Meprin α und Ovastacin nur 32% beträgt. Damit liegt sie in einem ähnlichen Bereich wie bei anderen Vertretern der Astacin-Familie (z.B. BMP-1), die alle nicht mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper detektierbar waren. Somit liegt der Schluss nahe, dass Meprin α und Ovastacin ein gemeinsames Epitop besitzen, das anderen Astacinen fehlt.

***In vitro-* und *in vivo*-Expression des Ovastacins**

Da Ovastacin ursprünglich in Oozyten und befruchteten Eizellen bis zum 2-Zellstadium auf mRNA-Ebene nachgewiesen worden war (Quesada et al. 2004), versuchte ich, das Enzym in befruchteten Eizellen auf Proteinebene mit Hilfe der beiden Antiseren im Zeitfenster von der Befruchtung bis zur Blastocyste nachzuweisen. Die Verwendung eines Antiserums, das gegen die C-terminale Domäne gerichtet war erschien weniger geeignet, da bisher nichts über seine Funktion und den Verbleib dieser Domäne bekannt ist. Andere Autoren beobachteten tatsächlich Unterschiede bei der Detektion mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antiserum (Burkart et al. 2012) verglichen mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antikörper und dem Anti-Propeptid-Antikörper (Sachdev et al. 2012). So konnte die C-terminale Domäne nur bis ins 2-Zellstadium nachgewiesen werden, während dies mit dem Anti-Pro-Ovastacin-Antiserum bis ins Blastocystenstadium gelang. Sachdev *et al.* konnten dies bis zum Morulastadium bestätigen (Sachdev et al. 2012). Insgesamt lässt sich feststellen, dass das Fluoreszenzsignal im Zeitverlauf der Embryonalentwicklung schwächer wurde. Dagegen konnte die Expression des Ovastacins mit den neuen Antiseren im Entwicklungsverlauf des Embryos exakter dokumentiert werden, da der C-terminus nach den neuesten Erkenntnissen dieser Arbeit nach der Aktivierung nicht mehr am aktivierten Ovastacin verbleibt. Bestätigen

konnte ich diese Ergebnisse durch den Nachweis von Ovastacin in isolierten befruchteten Eizellen im 1-Zellstadium sowie im Blastocysten-Stadium mittels Western-Blot-Analyse. Sogar in Embryonen, die in ihrer Entwicklung stagnierten konnte es nachgewiesen werden. Das im Western-Blot gefundene Molekulargewicht entspricht den von Burkart et al. veröffentlichten Ergebnissen (Burkart et al. 2012).

Auch in Bezug auf die Expression von Ovastacin in anderen Geweben der Maus konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Erkenntnisse gesammelt werden. Ich konnte in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene die Expression von Ovastacin in humanen *Huvec*-Zellen, d.h. in Endothelzellen der Nabelschnur nachweisen. Die bisher bekannten weiteren Fundorte von Ovastacin außerhalb des Reproduktionstraktes basierten auf massenspektrometrischen Analysen der Leber (Zgoda et al. 2009), des Herzens (Yin et al. 2010), der Nabelschnur (Tunica et al. 2009) und des Blutplasmas (Liu et al. 2005). Ein Nachweis mit spezifischen Antikörpern war bislang nicht publiziert worden. Hagen Westphal, ein Diplomand in unserer Arbeitsgruppe, den ich in der Frühphase seiner Arbeit mitbetreute, führte die immunhistologischen Analysen im Verlauf einer Diplomarbeit fort und konnte unter anderem deutliche Immunfluoreszenzsignale in Kryoschnitten des Herzens nachweisen. Somit kann angenommen werden, dass Ovastacin neben seiner Funktion im weiblichen Reproduktionstrakt noch eine weitere physiologische Funktion in anderen Geweben hat.

Mit den Antikörpern Anti-Propeptid und Anti-Pro-Ovastacin war es möglich den Expressionsverlauf von Ovastacin bei der Expression von Pro-Ovastacin in den *HighFive*-Zellen zu dokumentieren. Stets beobachtete ich neben der 58 kDa-Bande, eine Bande bei 48 kDa. Diese Doppelbande des Ovastacins wurde auch von anderen Autoren gefunden (Burkart et al. 2012). Bei der massenspektrometrischen Analyse der 48 kDa Bande wurde diese eindeutig als Ovastacin identifiziert. Allerdings wurde kein Fragment des C-terminalen Strep-tags detektiert. Von der C-terminalen Domäne fehlten jedoch lediglich die letzten fünf Aminosäurereste. Als mögliche Ursache käme die Fragmentierung des Proteins durch Trypsin in Frage, dass bei der MALDI-TOF Analyse verwendet worden war. Dabei entstehen aus dem C-terminalen Abschnitt relativ kleine Bruchstücke die nur vier (EVPR) und zwei Aminosäurereste (DR) umfassen. Peptide dieser Größe sind durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie generell schwer nachzuweisen. Dies würde auch erklären, dass sie auch bei der Analyse der 58 kDa Bande nicht gefunden werden, obwohl hier nachweislich (belegt durch Anti-Strep-tag-Antikörper) der Strep-tag vorhanden war. Die 48 kDa Bande entsteht sehr wahrscheinlich bereits während der Expression in den Insektenzellen und nicht im Rahmen der nachfolgenden Reinigung. Zwischen dem Pro-Ovastacin und dem Strep-tag gibt es eine aus zwei Aminosäuren (*Bgl II* Schnittstelle) bestehende *linker* Region (RS). Das hier enthaltene Arginin stellt eine typische tryptische Schnittstelle dar. Da im Zellmedium

neben einer Vielzahl anderer Proteasen auch tryptische Enzyme vorkommen kann es an dieser Stelle zu einer limitierten Proteolyse kommen. Der Größenunterschied zwischen der 58 kDa Bande und der 48 kDa Bande war aber so groß, dass er nicht nur durch den Verlust weniger Aminosäurereste am C-Terminus erklären werden konnte. Offenbar hatte auch eine aminoterminal Verkürzung stattgefunden. Allerdings konnte ich mit dem Anti-Propeptid-Antikörper die 48 kDa Bande nachweisen. Das Propeptidfragment, gegen das der Antikörper generiert worden war, beginnt 10 Aminosäuren nach dem N-Terminus des Pro-Ovastacins und umfasst 20 Aminosäuren. Damit liegt es noch vor dem Aspartat-*switch* und endet 32 Aminosäurereste vor dem vermuteten N-Terminus des reifen, aktiven Pro-Astacins. Um eine Detektion mit dem Anti-Propeptid-Antiserum zu ermöglichen dürfte das Pro-Ovastacin daher N-terminal um maximal 25-30 Aminosäuren verkürzt sein. Eine weitere Erklärung für den Größenunterschied wären posttranslationale Modifikationen. Die Glykosylierung des Pro-Ovastacins war bereits von Melanie Mertens im Rahmen ihrer Diplomarbeit untersucht worden (Mertens 2004). Mit dem zuckerspaltenden Enzym PNGase F konnte sie eine Abnahme des Molekulargewichts um 6 kDa nachweisen. Dieser Größenverlust zusammen mit dem Verlust des Strep-*tags* (mind. 1 kDa) könnte für die beobachtete Massendifferenz der Doppelbande verantwortlich sein. Allerdings wäre dann schwer zu erklären, warum die 48 kDa Bande durch affinitätschromatographische Reinigung an einer Streptactinsäule isoliert werden konnte. Dies wäre zum Beispiel dann vorstellbar, wenn man eine Oligomerisierung des Proteins durch Disulfidbrücken oder nichtkovalente Interaktionen in Erwägung zieht. Als Indiz für Oligomerisierung kann die 120 kDa Bande, und weitere Banden höherer Masse gewertet werden, die unter nicht reduzierenden Bedingungen beobachtet werden konnten.

Unter nicht reduzierenden und nicht denaturierenden („nativen“) Bedingungen zeigt das Pro-Ovastacin nur sehr geringe elektrophoretische Mobilität. Allerdings wird unter diesen Bedingungen die Mobilität nicht nur von der Masse, sondern auch durch die Eigenladung bestimmt, sodass dieses Verhalten kein zweifelsfreies Indiz für Oligomerisierung darstellt. Eine eingehendere Analyse der Oligomerisierung des Pro-Ovastacin führte Frau Kristiane Rusitzka (Abt. Molekulare Tierphysiologie, AG Markl) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durch. Dabei wurde deutlich, dass die Oligomerisierung des Proteins stark vom Salzgehalt der Probe abhing, und bei steigender Salzkonzentration zunahm (Rusitzka 2012). Bei 50 mM NaCl waren im Transmissionselektronenmikroskop nur wenige Oligomere zu erkennen. Dagegen stieg bei 150 mM NaCl die Anzahl der Oligomere signifikant und bei 300 mM kam es zur Bildung sehr großer Oligomere.

Bei der Größenbestimmung dieser Oligomere durch Gelfiltration von Pro-Ovastacin-Strep wurde bei physiologischer Kochsalzkonzentration (150 mM NaCl) eine Gelfiltration über eine

Säule vom Typ Hema Bio 1000 durchgeführt, die in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 20 kDa und 3000 kDa trennen kann und ein Ausschlussvolumen von ca. 10000 kDa besitzt. Die beobachteten Oligomere wurden von dieser Säule im Ausschlussvolumen eluiert, sodass keine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt werden konnte. Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie. Der zweite Gipfel entsprach dem monomeren Pro-Ovastacin mit ca. 60 kDa.

Der Anteil der 48 kDa Bande wird durch einen pH-Wert im alkalischen Bereich erhöht. Eine Möglichkeit für diesen Molekulargewichtsverlust der 58 kDa Bande wäre eine beginnende Deglykosylierung. Dies wäre allerdings erst bei stark alkalischem pH-Wert zu erwarten (Rademaker et al. 1998). Wahrscheinlicher ist die autoproteolytische Abspaltung von Teilen des Propeptids. Diese Hydrolyse des Propeptids bei pH 10 dürfte jedoch keine physiologische Relevanz besitzen. Aussagen über den Verbleib des gesamten Propeptids sind allerdings nicht möglich, da der Antikörper nur einen Teil des Propeptids erkennt. Den Verbleib des Propeptids zu klären wäre mittels einer N-terminalen Sequenzierung möglich.

Im sauren pH-Bereich war keine Veränderung des Molekulargewichts des Pro-Ovastacins zu beobachten. Aber auch hier war eine proteolytische Aktivität nachweisbar. Hier liegt es nahe, dass es zu einer Lösung der Ionenbindung zwischen dem Zink und dem Aspartat 54 (Aspartat-*switch*) des Propeptids gekommen sein muss. Die Carboxylgruppe in der Seitenkette des Aspartat weist einen pKs-Wert von 3,90 auf. Daher ist sie im Neutralbereich unprotoniert und kann am Zink binden. Im Sauren wird sie protoniert, wodurch die Bindung zum Zink-Ion verloren geht. Das Propeptid ist dann nicht mehr im katalytischen Spalt fixiert, der dadurch für Substrate zugänglich wird. Fraglich ist allerdings die Fixierung des Zink-Ions unter diesen Bedingungen, da der pKs-Wert des Histidins bei pH 6 liegt und somit im Sauren auch der Verlust des katalytisch essenziellen Metalls droht. Diese Frage gilt es durch Analyse der Metallbindungseigenschaften des Astacins zu klären. Dafür wurden mit der vorliegenden Arbeit die Voraussetzungen geschaffen. Es konnte bereits für ein weiteres Mitglied der Astacin-Familie, dem Meprin β diese pH-abhängige Aktivität gezeigt werden (Geyer 2010).

Aktivierung des Pro-Ovastacins

Damit stellt sich die Frage, ob diese pH-abhängige Aktivität des Ovastacins eine physiologische Bedeutung hat, zumal der Aktivierungsmechanismus des Pro-Ovastacins *in vivo* noch unbekannt ist. Bei der Ovulation gelangen die Oocyten in den Eileiter, in dem ein pH-Wert von 3,6 bis 4,5 vorliegt (Boskey et al. 1999). Dieser wird von Milchsäurebakterien (*Lactobacillus lactis*) erzeugt, die bei der Vergärung von Laktose entstehendes Laktat bedingt. Der saure pH-Wert schützt die Schleimhaut vor Infektionen durch weitere Bakterien. Dieses Milieu könnte die Aktivierung des Ovastacins fördern.

Diskussion

Hauptsächlich dürfte Ovastacin durch eine limitierte Proteolyse aktiviert werden, die zu einer Abtrennung des Propeptids führt. Unter neutralen Bedingungen liegt das Propeptid vor dem katalytischen Zentrum und verhindert so die proteolytische Aktivität. Durch die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der prototypischen Zinkprotease Astacin (Yiallourous et al. 2002) und die Aufklärung der Kristallstruktur des Pro-Astacins (Guevara et al. 2010) standen Erkenntnisse zur Verfügung, die ich zum Verständnis der Situation beim Pro-Ovastacin nutzen konnte. Die tryptische Aktivierungsschnittstelle beim Pro-Astacin lautet AR*VGAIL. Nach diesem Schnitt ist das katalytische Zentrum des Astacin nicht mehr blockiert und der endgültige Aminoterminus kann autoproteolytisch in die reife Form AAIL getrimmt werden. Die potentielle Aktivierungsschnittstelle FRLLSVT des Pro-Ovastacin enthält ein Arginin das entscheidend für eine Aktivierung durch Trypsin sein dürfte. Bei einer genaueren Betrachtung der dreidimensionalen Anordnung der Seitenketten in einem Homologiemodell fiel allerdings auf, dass das Arginin von einem Phenylalanin verdeckt wird. Dies könnte eine Aktivierung durch Trypsin erschweren. Besser erreichbar erschienen in diesem Modell die Seitenketten eines benachbarten Valins. Damit ergaben sich außer trypsinähnlichen Proteasen auch andere potentielle Aktivatoren für Pro-Ovastacin, zum Beispiel die neutrophile Elastase und die Matrix-Metalloprotease 2.

Erste Aktivierungsversuche des Pro-Ovastacin wurden mit Trypsin als Aktivator durchgeführt. Während bei den ersten erfolglosen Aktivierungsversuchen das Ovastacin/Trypsin Verhältnis bei 8:1 lag, gelang schließlich die Aktivierung bei einem Ovastacin/Trypsin Verhältnis von 60:1 oder weniger. Die Verdauungsprotease Trypsin ist wahrscheinlich nicht der physiologische Aktivator des Pro-Ovastacins. Allerdings könnten paraloge, trypsinähnliche Enzyme wie Plasmin als relevante *in vivo*-Aktivatoren fungieren (Zhang et al. 2002). Plasmin wurde bereits in der Vergangenheit erfolglos als Aktivator getestet (Hildebrand 2008). Wie allerdings die Ergebnisse mit Trypsin zeigen, so könnte auch hier das Substrat/Enzym-Verhältnis eine wichtige Rolle für die Aktivierung spielen.

Ein weiterer vielversprechender Kandidat als physiologisch relevanter Aktivator von Pro-Ovastacin war die Gelatinase A (Matrix-Metalloprotease 2, MMP2). Allerdings konnte ich durch Behandlung des Pro-Ovastacins mit MMP2 kein aktives Ovastacin erzeugen, obwohl das Pro-Ovastacin durch MMP2 prozessiert wurde.

Die ebenso als potentieller Aktivator identifizierte neutrophile Elastase wird von neutrophilen Granulocyten im Knochenmark exprimiert und gelangt über das Blutgefäßsystem in die verschiedenen Organe des Körpers. So findet sie sich beispielsweise auch im Auswurf der Lunge. Über den Auswurf gesammelte und gereinigte Elastase wurde für die Aktivierungsversuche verwendet. Die Aktivierungsversuche verliefen erfolgreich und es konnten zwei neue Ovastacin-Varianten mit Massen von 38 kDa, bzw. 28 kDa detektiert

werden, die durch die Wirkung der Elastase entstanden. Beide Banden waren aktiv und konnten nicht mit dem Anti-Propeptid Antikörper detektiert werden. Der N-terminus der 38 kDa Bande wurde als FQDK identifiziert, was bedeutet, dass noch ein beträchtlicher Teil des Propeptids vorhanden sein müsste, da dieser N-terminus an Position 27 noch vor dem Aspartat-*switch* (Asp54) liegt. Eigentlich wäre daher bei dieser Variante keine Aktivität zu erwarten. Mittels Massenspektrometrie konnte kein Fragment des Propeptids detektiert werden, sondern lediglich Fragmente aus dem C-terminalen Ende. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei der 38 kDa Bande um eine Mischform aus aminoterminal oder carboxyterminal verkürzten Pro-Ovastacin-Varianten handelt. Somit handelt es sich vermutlich um ein Zwischenprodukt im Rahmen der Pro-Ovastacin-Aktivierung. Die 28 kDa Bande zu isolieren gestaltete sich deutlich schwieriger, da sie ihre Masse ungefähr so groß ist wie die der Elastase. Es gelang schließlich bei einem Ovastacin/Elastase Verhältnis von 8:1 die 28 kDa Bande nachzuweisen und zu isolieren. Versuche diese Bande N-terminal zu sequenzieren waren bisher ohne Erfolg. Die 28 kDa Bande ist etwas größer als die katalytische Domäne (22 kDa) und könnte die endgültig aktivierte, reife Form des Ovastacins darstellen. Sie ist im SDS-Gel mit und ohne DTT vorhanden, was dafür spricht, dass das aktive Ovastacin keine disulfid-verbrückten Dimere bildet. Bei der einzige Bande, die ich unter reduzierenden Bedingungen zusätzlich finden konnte, handelte es sich um noch unprozessiertes 58 kDa Pro-Ovastacin.

Die erfolgreiche Aktivierung konnte ich durch verschiedene Aktivitätstests nachweisen. Dazu zählten die nativen Zymographie, sowie ein fluoreszenzbasierter Assay mit FRET-Substraten, die bereits mit anderen Astacinen getestet worden waren (Becker-Pauly et al. 2011). Dadurch war es möglich, auch Auskunft über die Spaltungsspezifität des Ovastacins zu erhalten. Die überwiegende Mehrzahl der Astacine präferiert saure Aminosäurereste (Asp oder Glu) in der P1'-Position (Becker-Pauly et al. 2011). Dieses Ergebnis konnte ich für Ovastacin bestätigen.

Physiologische Rolle des Ovastacins

Die physiologische Funktion des Ovastacin konnte lange Zeit nicht geklärt werden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und aufgrund des Expressionsortes wurde Ovastacin in die Astacinunterfamilie der *hatching* Enzyme eingeordnet. Hier wären die *hatching* Enzyme von Fischen, Amphibien und vieler wirbelloser Tiere zu nennen, z.B. HCE und LCE aus dem Medaka oder EHE aus dem Aal (Kawaguchi et al. 2007). Die Aufgabe der *hatching* Enzyme ist es, das Schlüpfen aus der embryonalen Eihülle erleichtern. Dies geschieht bei Fischen nach dem Abschluss der Embryonalentwicklung. Bei Säugetieren war die Funktion eines *hatching* Enzyms vollkommen unklar. Erwogen wurde eine Rolle bei der Implantation in den Uterus, wozu als Voraussetzung die *Zona pellucida* aufgebrochen werden muss um die

Diskussion

Weiterentwicklung des Embryos zu ermöglichen, da er auf die Nährstoffversorgung durch die Mutter angewiesen ist. Die *Zona pellucida* schützt als derbe extrazelluläre Matrix den Embryo in der Blastocyste. Sie umschließt die Eizelle von Anfang an und führt zu einer geordneten Befruchtung der Eizelle. Dieser Mechanismus wird durch das Andocken eines Spermiums an das *Zona pellucida* Protein 3 (ZP3) und die damit einhergehende Akrosomreaktion ausgelöst. Während das Spermium die *Zona pellucida* durchquert, wird von der Eizelle der Inhalt der Cortikalgranula ausgeschüttet. Dabei handelt es sich um Proteine, die essentiell für die Befruchtung sind. Darunter ist eine hochspezifische Protease, die einen definierten Schnitt innerhalb des ZP2 an der Position $^{167}\text{LA/DE}^{170}$ katalysiert (Gahlay et al. 2010). Bei dieser Protease handelt es sich um Ovastacin (Burkart et al. 2012). Diese Spezifität passt perfekt in das Spezifitätsmuster der Astacine (Becker-Pauly et al. 2011). Wird das ZP2 geschnitten kommt es zu einer Verdichtung und Aushärtung der Zona, sodass keine weiteren Spermien eindringen können (Bleil et al. 1981). Diese Funktion wird auch als Polyspermieblock bezeichnet. Polyspermie führt bei vielen Säugetieren zu einem erhöhten Risiko für einen Schwangerschaftsabbruch. Tatsächlich haben Ovastacin *knock-out* Mäuse eine 34% geringere Reproduktionsrate als der Wildtyp (Sachdev et al. 2012).

Ein anderer sensationeller Befund der Arbeitsgruppe von Wilhelm Jahnen-Dechent (RWTH-Aachen) zeigte, dass Fetuin B defiziente Mäuse infertil sind. Da es sich bei Fetuin B um ein Protein aus der Cystatin 3 Familie handelt, stellte sich die Frage, ob es in diesem Zusammenhang als Cystatin-ähnlicher Proteaseinhibitor funktioniert. In der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der AG Jahnen-Dechent bereits zeigen, dass Fetuin Astacinproteasen wie Mepripin hemmen können (Hedrich et al. 2010). In Hinblick auf die neuesten Erkenntnisse das Ovastacin innerhalb der Cortikalgranula lokalisiert ist (Burkart et al. 2012) wurde das Fetuin B daher auf seine inhibitorische Wirkung auf Ovastacin hin überprüft. Tatsächlich erwies sich Fetuin B als potenter Hemmstoff gegen Ovastacin. Die daraus entwickelte Hypothese geht davon aus, dass auch im unbefruchteten Ei eine geringe Menge aktives Ovastacin sezerniert wird, die ausreicht um die *Zona pellucida* zu verhärten (*Zona pellucida hardening*). Dies ist die Situation in der Fetuin B *knock out* Maus, die deshalb unfruchtbar ist. In Wildtyp-Weibchen ist allerdings Fetuin B vorhanden, das diese relativ kleine Menge Ovastacin inaktivieren kann. Kommt es nun allerdings zu einer Befruchtung, wird durch die Ausschüttung der Cortikalgranula deutlich mehr aktives Ovastacin freigesetzt und kann von Fetuin B nicht mehr vollständig inhibiert werden. Somit kann Ovastacin an der definierten Stelle ZP2 prozessieren und somit den Polyspermieblock, bedingt durch die Verhärtung und Verdichtung der *Zona Pellucida* (*Zona Pellucida Hardening*) auslösen. Eine Befruchtung ist somit nicht mehr möglich. Fetuin ist in der Vergangenheit bereits als Interaktionspartner im Zusammenhang mit dem Schutz vor Polyspermie identifiziert worden (Schröder et al. 1990; Kalab et al. 1991; George und

Diskussion

Johnson 1993; Kalab et al. 1993; Xu et al. 2011). Abschließend lässt sich sagen, dass mit der Aktivierung von Ovastacin und der Identifizierung des endogenen Inhibitors Fetuin B ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Funktion von Ovastacin geleistet worden ist.

6. AUSBLICK

Die Erkenntnis, dass Ovastacin eine für die Befruchtung der Eizelle essenzielle Protease ist, die durch den Inhibitor Fetuin B kontrolliert wird, hat ein neues Forschungsgebiet eröffnet. Ziel ist es nun, das proteolytische Netzwerk bei der Befruchtung des Säugereis aufzuklären. Dazu wäre es sehr vorteilhaft, wenn die dreidimensionale Struktur des Ovastacin/Fetuin B-Komplexes aufgeklärt werden könnte. Erste Indizien zeigen, dass Ovastacin nicht nur in Oocyten, sondern auch in anderen Geweben exprimiert wird. Die spezifischen proteolytischen Netzwerke, vor allem aber die Funktionen des Ovastacins und des Antagonisten Fetuin B in diesen Geweben sind noch unbekannt. Das Auffinden von physiologisch relevanten Substraten des Ovastacins in diesen Geweben wäre ein vorrangiger erster Schritt um weitere Erkenntnisse über eine mögliche Funktion zu erlangen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, K., K. Yamamoto and H. Sinohara (1989). "Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and alpha-macroglobulin." J Biochem **106**(4): 564-568.
- Adkins, S. and M. Burmeister (1996). "Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations." Anal Biochem **240**(1): 17-23.
- Ashida, H., K. Yamamoto and H. Kumagai (2000). "Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase." Biosci Biotechnol Biochem **64**(10): 2266-2268.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F., Ed. (2001). Handbook of proteolytic enzymes. London, Academic Press.
- Becker-Pauly, C., O. Barre, O. Schilling, U. Auf dem Keller, A. Ohler, C. Broder, A. Schutte, R. Kappelhoff, W. Stöcker and C. M. Overall (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, C., M. N. Kruse, K. A. Slotty, D. Kohler, J. R. Harris, S. Rosmann, E. E. Sterchi and W. Stöcker (2003). "Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin." Biol Chem **384**(5): 825-831.
- Berg, J. M., Tymoczko, J.L. and Streyer, L. (2005). Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Bleil, J. D., C. F. Beall and P. M. Wassarman (1981). "Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2." Dev Biol **86**(1): 189-197.
- Bode, W., F. X. Gomis-Rüth, R. Huber, R. Zwillig and W. Stöcker (1992). "Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases." Nature **358**(6382): 164-167.
- Bode, W. and R. Huber (2000). "Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 241-252.

- Boskey, E. R., K. M. Telsch, K. J. Whaley, T. R. Moench and R. A. Cone (1999). "Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification." Infect Immun **67**(10): 5170-5175.
- Brown, W. M. and K. M. Dziegielewska (1997). "Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution." Protein Sci **6**(1): 5-12.
- Burkart, A. D., B. Xiong, B. Baibakov, M. Jimenez-Movilla and J. Dean (2012). "Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy." J Cell Biol **197**(1): 37-44.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel, Eds. (1980). Biophysical chemistry part II: Techniques for the study of biological structure and function., W. H. Freeman & Co.
- Duhig, C. (2006). Untersuchungen zur Expression, Stabilität und Funktion des Ovastacins. Institut für Zoophysiologie. Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Dumermuth, E., E. E. Sterchi, W. P. Jiang, R. L. Wolz, J. S. Bond, A. V. Flannery and R. J. Beynon (1991). "The astacin family of metalloendopeptidases." J Biol Chem **266**(32): 21381-21385.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
- Eggers, C. T., I. A. Murray, V. A. Delmar, A. G. Day and C. S. Craik (2004). "The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase." Biochem J **379**(Pt 1): 107-118.
- Enewold, L., L. E. Mechanic, E. D. Bowman, E. A. Platz and A. J. Alberg (2012). "SERPINA1 and ELA2 polymorphisms are not associated with COPD or lung cancer." Anticancer Res **32**(9): 3923-3928.
- Ferrer, M., H. Rodriguez, L. Zara, Y. Yu, W. Xu and R. Oko (2012). "MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization." Cell Tissue Res **349**(3): 881-895.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Ann. Phys. **437**: 55-75.

- Gahlay, G., L. Gauthier, B. Baibakov, O. Epifano and J. Dean (2010). "Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein." Science **329**(5988): 216-219.
- George, M. A. and M. H. Johnson (1993). "Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition." Hum Reprod **8**(11): 1898-1900.
- Geyer, R. (2010). Molekulare Interaktion der humanen Metalloprotease Meprin β bei der Alzheimer Erkrankung. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Gold, A. M. and D. Fahrney (1964). "Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin." Biochemistry **3**: 783-791.
- Gomis-Rüth, F. X. (2003). "Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases." Mol Biotechnol **24**(2): 157-202.
- Gomis-Rüth, F. X., T. O. Botelho and W. Bode (2012). "A standard orientation for metallopeptidases." Biochim Biophys Acta **1824**(1): 157-163.
- Gornik, S. (2004). Charakterisierung einer neuen Astacin homologen Metalloprotease der Maus. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Goujon, M., H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern and R. Lopez (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W695-699.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.
- Grams, F., V. Dive, A. Yiotakis, I. Yiallourous, S. Vassiliou, R. Zwilling, W. Bode and W. Stöcker (1996). "Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor." Nat Struct Biol **3**(8): 671-675.
- Guevara, T., I. Yiallourous, R. Kappelhoff, S. Bissdorf, W. Stöcker and F. X. Gomis-Rüth (2010). "Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase." J Biol Chem **285**(18): 13958-13965.

- Harris, J. L., B. J. Backes, F. Leonetti, S. Mahrus, J. A. Ellman and C. S. Craik (2000). "Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7754-7759.
- Harris, J. R. (2007). "Negative staining of thinly spread biological samples." Methods Mol Biol **369**: 107-142.
- Hedrich, J. (2011). Funktionelle Analyse der Meprin Metalloproteasen α und β hinsichtlich ihrer physiologischen Regulation und biologischen Bedeutung. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hedrich, J., D. Lottaz, K. Meyer, I. Yiallourous, W. Jahnen-Dechent, W. Stöcker and C. Becker-Pauly (2010). "Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases." Biochemistry **49**(39): 8599-8607.
- Hildebrand (2008). Expression und funktionelle Analyse von Ovastacin. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hooper, N. M. (1994). "Families of zinc metalloproteases." FEBS Lett **354**(1): 1-6.
- Huang, W., Y. Yamamoto, Y. Li, D. Dou, K. R. Alliston, R. P. Hanzlik, T. D. Williams and W. C. Groutas (2008). "X-ray snapshot of the mechanism of inactivation of human neutrophil elastase by 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1-dioxide derivatives." J Med Chem **51**(7): 2003-2008.
- Jahnen-Dechent, W., A. Heiss, C. Schäfer and M. Ketteler (2011). "Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism." Circ Res **108**(12): 1494-1509.
- Kalab, P., G. S. Kopf and R. M. Schultz (1991). "Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation and egg activation: effects of newborn calf serum and fetuin." Biol Reprod **45**(5): 783-787.
- Kalab, P., R. M. Schultz and G. S. Kopf (1993). "Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation: inhibitory effects of follicular fluid, fetuin, and alpha 2HS-glycoprotein." Biol Reprod **49**(3): 561-567.
- Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh and C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. ." Bull. Korean Chem. Soc. **Vol. 23, No. 11.**

- Karmilin, K. (2012). Konsequenzen der Multidomänenstruktur des Ovastacins für seine Funktion und Expression. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Kato, I., J. Schrode, W. J. Kohr and M. Laskowski, Jr. (1987). "Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains." Biochemistry **26**(1): 193-201.
- Kawaguchi, M., S. Yasumasu, J. Hiroi, K. Naruse, T. Suzuki and I. Iuchi (2007). "Analysis of the exon-intron structures of fish, amphibian, bird and mammalian hatching enzyme genes, with special reference to the intron loss evolution of hatching enzyme genes in Teleostei." Gene **392**(1-2): 77-88.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lee, C., E. Bongcam-Rudloff, C. Sollner, W. Jahnen-Dechent and L. Claesson-Welsh (2009). "Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein." Front Biosci **14**: 2911-2922.
- Liu, M. (2011). "The biology and dynamics of mammalian cortical granules." Reprod Biol Endocrinol **9**: 149.
- Liu, T., W. J. Qian, M. A. Gritsenko, D. G. Camp, 2nd, M. E. Monroe, R. J. Moore and R. D. Smith (2005). "Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry." J Proteome Res **4**(6): 2070-2080.
- Löffler, G., Ed. (2008). Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo and A. Sali (2000). "Comparative protein structure modeling of genes and genomes." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 291-325.
- McKerrow, J. H. (1987). "Human fibroblast collagenase contains an amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of Serratia protease." J Biol Chem **262**(13): 5943.

- Mertens, M. (2004). Heterologe Expression von Mm2-Astacin. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Möhrlen, F. (2002). Analyse der Struktur, Funktion und Evolution der Astacin-Protein-Familie. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Morgunova, E., A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider and K. Tryggvason (1999). "Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed." Science **284**(5420): 1667-1670.
- Muir, A. and D. S. Greenspan (2011). "Metalloproteinases in Drosophila to humans that are central players in developmental processes." J Biol Chem **286**(49): 41905-41911.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Munk, K., Ed. (2011). Zoologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-573.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Neuhoff, V., R. Stamm, I. Pardowitz, N. Arold, W. Ehrhardt and D. Taube (1990). "Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution." Electrophoresis **11**(2): 101-117.
- Neurath, H. and G. H. Dixon (1957). "Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen." Fed Proc **16**(3): 791-801.
- Ohler, A., M. Debela, S. Wagner, V. Magdolen and C. Becker-Pauly (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.
- Ordonez, G. R., X. S. Puente, V. Quesada and C. Lopez-Otin (2009). "Proteolytic systems: constructing degradomes." Methods Mol Biol **539**: 33-47.

- Overall, C. M. (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites." Mol Biotechnol **22**(1): 51-86.
- Overall, C. M. and C. P. Blobel (2007). "In search of partners: linking extracellular proteases to substrates." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 245-257.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.
- Pfleiderer, G., R. Zwillig and H. H. Sonneborn (1967). "On the evolution of endopeptidases, 3. A protease of molecular weight 11,000 and a trypsin-like fraction from *Astacus fluviatilis* Fabr." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **348**(10): 1319-1331.
- Quesada, V., L. M. Sanchez, J. Alvarez and C. Lopez-Otin (2004). "Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish." J Biol Chem **279**(25): 26627-26634.
- Rademaker, G. J., S. A. Pergantis, L. Blok-Tip, J. I. Langridge, A. Kleen and J. E. Thomas-Oates (1998). "Mass spectrometric determination of the sites of O-glycan attachment with low picomolar sensitivity." Anal Biochem **257**(2): 149-160.
- Rattmann, I. (2002). Untersuchungen zur Expression und Funktion des Hs2-Genproduktes, einer neuen Astacin-Zinkpeptidase der Säuger. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong and A. J. Barrett (2008). "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D320-325.
- Rawlings, N. D. and G. Salvesen, Eds. (2012). Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London - Waltham.
- Rawlings, N. D., D. P. Tolle and A. J. Barrett (2004). "Evolutionary families of peptidase inhibitors." Biochem J **378**(Pt 3): 705-716.
- Rusitzka, K. A. K. (2012). 3D-Rekonstruktion von α 2-Macroglobulin im Komplex mit Ovastacin. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- Saarinen, M. A., K. A. Troutner, S. G. Gladden, C. M. Mitchell-Logean and D. W. Murhammer (1999). "Recombinant protein synthesis in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 insect cell aggregates." *Biotechnol Bioeng* **63**(5): 612-617.
- Sachdev, M., A. Mandal, S. Mulders, L. C. Digilio, S. Panneerdoss, V. Suryavathi, E. Pires, K. L. Klotz, L. Hermens, M. B. Herrero, C. J. Flickinger, M. van Duin and J. C. Herr (2012). "Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization." *Dev Biol* **363**(1): 40-51.
- Schäfer, C., A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Muller-Esterl, T. Schinke and W. Jahnen-Dechent (2003). "The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification." *J Clin Invest* **112**(3): 357-366.
- Schechter, I. and A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun* **27**(2): 157-162.
- Schenkel, J., Ed. (1995). *Transgene Tiere*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schmidt, T. G. and A. Skerra (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." *Nat Protoc* **2**(6): 1528-1535.
- Schröder, A. C., R. M. Schultz, G. S. Kopf, F. R. Taylor, R. B. Becker and J. J. Eppig (1990). "Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum." *Biol Reprod* **43**(5): 891-897.
- Schütte, A., J. Hedrich, W. Stöcker and C. Becker-Pauly (2010). "Let it flow: Morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin alpha2." *PLoS One* **5**(1): e8835.
- Semenova, S. A., G. N. Rudenskaya, L. V. Lyutova and O. A. Nikitina (2008). "Isolation and properties of collagenolytic serine proteinase isoenzyme from King Crab *Paralithodes camtschatica*." *Biochemistry (Mosc)* **73**(10): 1125-1133.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." *Mol Syst Biol* **7**: 539.

- Smith, H. O. and D. Nathans (1973). "Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes." J Mol Biol **81**(3): 419-423.
- Sottrup-Jensen, L. (1989). "Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation." J Biol Chem **264**(20): 11539-11542.
- Sterchi, E. E., H. Y. Naim and M. J. Lentze (1988). "Biosynthesis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase: disulfide-linked dimers are formed at the site of synthesis in the rough endoplasmic reticulum." Arch Biochem Biophys **265**(1): 119-127.
- Sterchi, E. E., H. Y. Naim, M. J. Lentze, H. P. Hauri and J. A. Fransen (1988). "N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase: a metalloendopeptidase of the human intestinal microvillus membrane which degrades biologically active peptides." Arch Biochem Biophys **265**(1): 105-118.
- Sterchi, E. E., W. Stöcker and J. S. Bond (2008). "Mepriins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 309-328.
- Sun, H., R. C. Panicker and S. Q. Yao (2007). "Activity based fingerprinting of proteases using FRET peptides." Biopolymers **88**(2): 141-149.
- Tarentino, A. L., G. Quinones, B. G. Grimwood, C. R. Hauer and T. H. Plummer, Jr. (1995). "Molecular cloning and sequence analysis of flavastacin: an O-glycosylated prokaryotic zinc metalloendopeptidase." Arch Biochem Biophys **319**(1): 281-285.
- Tunica, D. G., X. Yin, A. Sidibe, C. Stegemann, M. Nissum, L. Zeng, M. Brunet and M. Mayr (2009). "Proteomic analysis of the secretome of human umbilical vein endothelial cells using a combination of free-flow electrophoresis and nanoflow LC-MS/MS." Proteomics **9**(21): 4991-4996.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-5582.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins and P. McCawley (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)." In Vitro **13**(4): 213-217.
- Vihinen, P. and V. M. Kahari (2002). "Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets." Int J Cancer **99**(2): 157-166.

- Viscarello, B. R., R. L. Stein, E. J. Kusner, D. Holsclaw and R. D. Krell (1983). "Purification of human leukocyte elastase and cathepsin G by chromatography on immobilized elastin." Prep Biochem **13**(1): 57-67.
- Vogt, G., W. Stöcker, V. Storch and R. Zwillig (1989). "Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish." Histochemistry **91**(5): 373-381.
- Voss, S. and A. Skerra (1997). "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification." Protein Eng **10**(8): 975-982.
- Weikert, C., N. Stefan, M. B. Schulze, T. Pischon, K. Berger, H. G. Joost, H. U. Haring, H. Boeing and A. Fritsche (2008). "Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke." Circulation **118**(24): 2555-2562.
- Wolpert, L., Ed. (1999). Entwicklungsbiologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Xu, J., M. S. Lawson, R. R. Yeoman, K. Y. Pau, S. L. Barrett, M. B. Zelinski and R. L. Stouffer (2011). "Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin." Hum Reprod **26**(5): 1061-1072.
- Yasumasu, S., I. Iuchi and K. Yamagami (1989). "Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*." J Biochem **105**(2): 212-218.
- Yiallourou, I., E. Grosse Berkhoff and W. Stöcker (2000). "The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases." FEBS Lett **484**(3): 224-228.
- Yiallourou, I., R. Kappelhoff, O. Schilling, F. Wegmann, M. W. Helms, A. Auge, G. Brachtendorf, E. G. Berkhoff, B. Beermann, H. J. Hinz, S. König, J. Peter-Katalinic and W. Stöcker (2002). "Activation mechanism of pro-astacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing." J Mol Biol **324**(2): 237-246.
- Yin, X., F. Cuello, U. Mayr, Z. Hao, M. Hornshaw, E. Ehler, M. Avkiran and M. Mayr (2010). "Proteomics analysis of the cardiac myofilament subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution." Mol Cell Proteomics **9**(3): 497-509.
- Zgoda, V. G., S. A. Moshkovskii, E. A. Ponomarenko, T. V. Andrewski, A. T. Kopylov, O. V. Tikhonova, S. A. Melnik, A. V. Lisitsa and A. I. Archakov (2009). "Proteomics of

LITERATURVERZEICHNIS

mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS." Proteomics **9**(16): 4102-4105.

Zhang, L., D. Seiffert, B. J. Fowler, G. R. Jenkins, T. C. Thinner, D. J. Loskutoff, R. J. Parmer and L. A. Miles (2002). "Plasminogen has a broad extrahepatic distribution." Thromb Haemost **87**(3): 493-501.

8. ANHANG:

8.1 Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AcNPV	<i>Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AEA	<i>Astacus embryonic astacin</i>
AK	Antikörper
AP	Anodenpuffer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APMA	Amino-Phenyl-Mercuric-Acetate
AS	Aminosäure
ASTL	<i>Astacin-like metallo-proteases</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bacmid	<i>Baculo shuttle vector</i>
BMP-1	<i>bone-morphogenetic protein 1</i>
BMP 1 Substrat	3183-V Substrat von Pepta Nova GmbH
Brij-35	Polyalkylenglycolether
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DAPCO	1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2) octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
Dnp	N-2,4-dinitrophenyl
Dpc	<i>Days post coitum</i>
DTT	Dithiothreitol
E _{280 nm}	Extinktion bei 280 nm
EF	Elutionsfraktion
EHE-7	<i>eel hatching enzyme-7</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum

ANHANG

FL	<i>Full length</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
HABA	<i>hydroxy-azophenyl-benzoic acid</i>
hCG	<i>human chorionic Gonadotropin</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ISP	Implantations Serinprotease
KAT	katalytische Domäne
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
KP	Kathodenpuffer
Mca	7-methoxycoumarin-4-yl-acetyl
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMP	Magermilchpulver
MMP 2 Substrat	M-2520 Substrat von Bachem AG
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
PA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pl	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSG	<i>Pregnant Mare´s Serum Gonadotropin</i>
PV	Primärviren
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RT	Raumtemperatur
SAS1B	<i>Sperm Acrosomal SLLP1 Binding</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodocylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SLLP1	<i>Sperm lysozyme-like protein</i>
StV	Stammviren
SV	Sekundärviren
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline + Triton X-100 & Tween-20</i>
TCA	Trichloressigsäure

ANHANG

TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
TV	Tertiärviren
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor-A</i>
WF	Waschfraktion
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZR	Zellreste
ZP	<i>Zona pellucida</i>
ZS	Zellsuspension
ZVTE	Zentrale Versuchtiereinrichtung

8.2 Vektorkarten

Vektorkarte pGEM-T

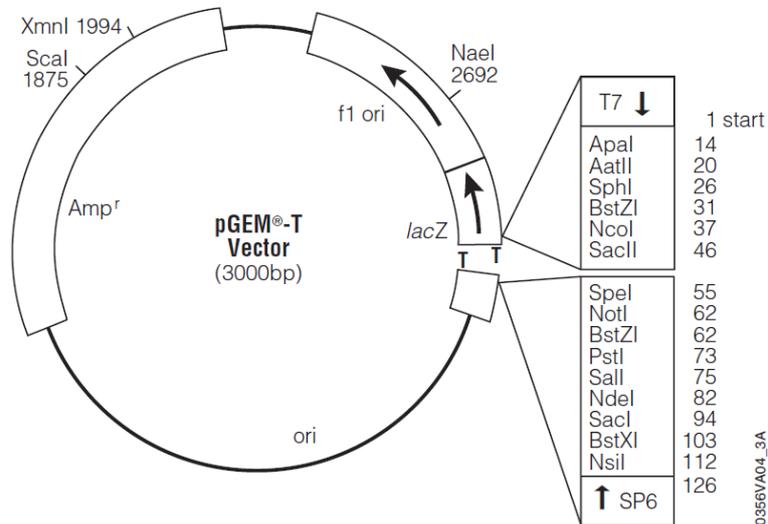


Abbildung 63: Vektorkarte des pGEM®-T-Vektors.

T7/SP6: Transkriptions-Initialisierungsregion und Promoter; MCS: *multiple cloning site*; Ori: Replikationsstartpunkt; Amp^r: Ampicillin-Resistenz.

Vektorkarte pFASTBac1

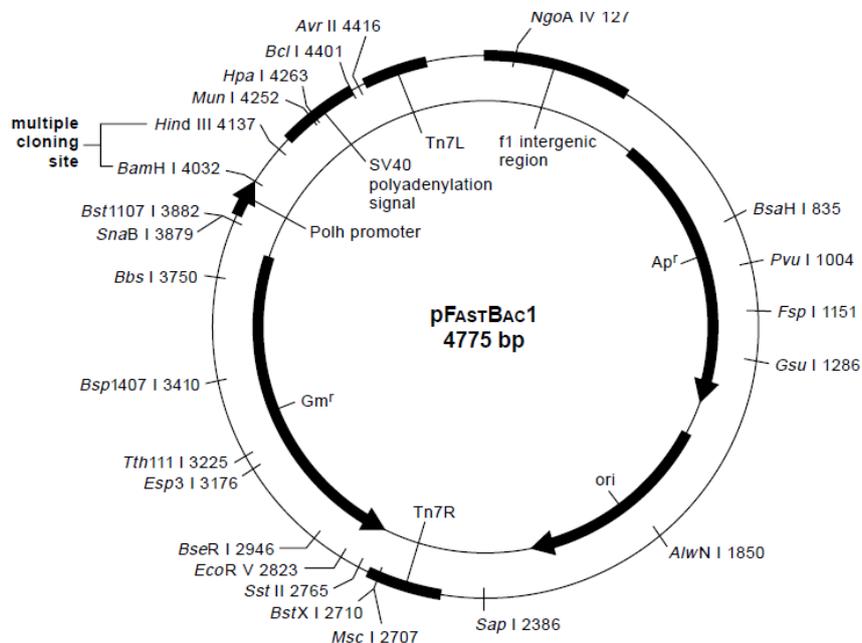


Abbildung 64: Vektorkarte des pFASTBac1.

Gm: Gentamycinresistenz; Ap: Ampicillin-Resistenz; pPolh: pPolyhedrin-Promotor; MCS: *multiple cloning site* ; Tn7L/Tn7R: Transposon-Erkennungsregion; Ori: Replikationsstartpunkt.

8.3 Verwendete Marker

DNA-Marker

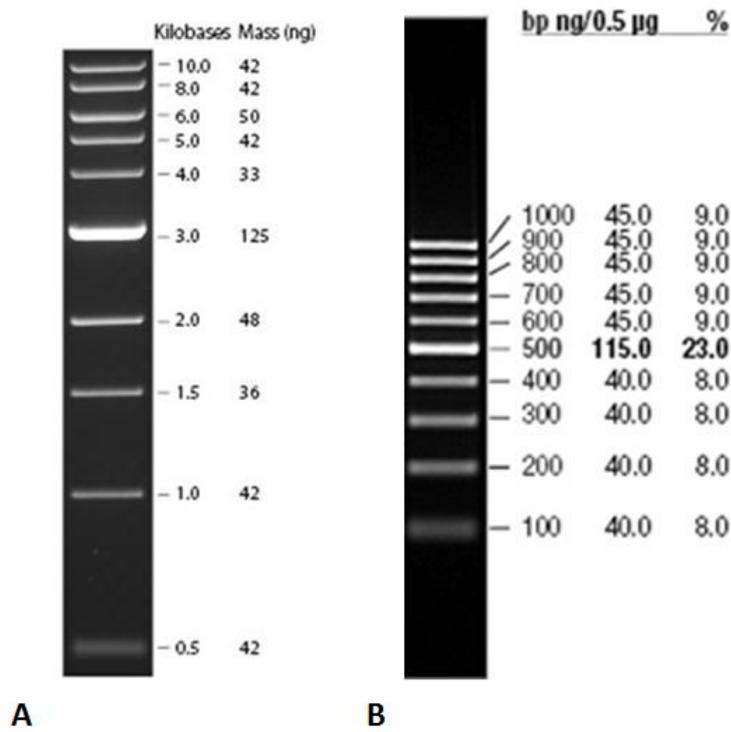


Abbildung 65: Verwendete DNA-Marker.

A: 1kb NEB-ladder (NEB, Frankfurt a. M.); B: 100bp-ladder Fermentas

Protein-Marker

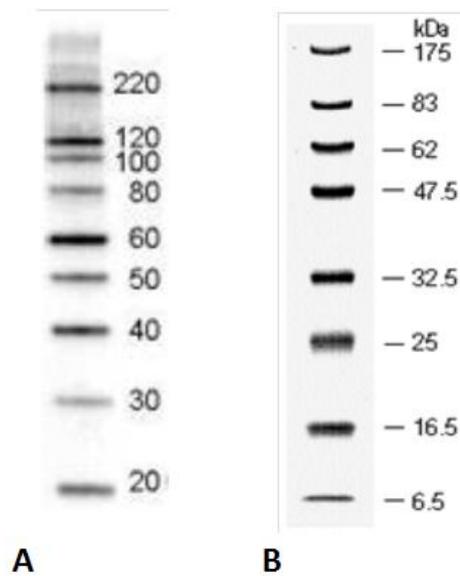


Abbildung 66: Verwendete Protein-Marker.

A: Magic Mark XP (Invitrogen, Karlsruhe); B: Prestained Protein Marker (NEB, Frankfurt a. M.)

8.5 Ergebnisse der Sequenzierung

Ovastacin-Strep

Sequenz: ATACTGGAATTCATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGGATATTAACATGCTCTCC 60
 Ergebnis: ATTCATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGGATATTAACATGCTCTCC 52

Sequenz: TTGCTAGGTTTGGAGCATGGGATTGTTGTCAGTGACCAATAATAAATGGCCCAAGGGCGTT 120
 Ergebnis: TTGCTAGGTTTGGAGCATGGGACTGTTGTCAGTGACCAATAATAAATGGCCCAAGGGCGTT 112

Sequenz: GGTGGCTTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGAAAGTATGATGAACTCAGCCGCCGG 180
 Ergebnis: GGTGGCTTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGAAAGTATGATGAACTCAGCCGCCGG 172

Sequenz: GTCATTATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTCACATGCATCCGGTTTGTTCCTAC 240
 Ergebnis: GTCATTATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTCACATGCATCCGGTTTGTTCCTAC 232

Sequenz: CATGGTCAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCCTATGGCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGA 300
 Ergebnis: CATGGTCAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCCTATGGCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGA 292

Sequenz: CGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTGTCCCTTGGCACCCACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGC 360
 Ergebnis: CGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTGTCCCTTGGCACCCACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGC 352

Sequenz: ATTGTCCTACATGAGCTCATGCACGTAATTGGCTTCTGGCATGAGCATTCACGGGCAGAT 420
 Ergebnis: ATTGTCCTACATGAGCTCATGCACGTAATTGGCTTCTGGCATGAGCATTCACGGGCAGAT 412

Sequenz: CGGGACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATCCTCCC GGCTTTGAAATCAACTTC 480
 Ergebnis: CGGGACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATCCTCCC GGCTTTGAAATCAACTTC 472

Sequenz: ATCAAGTCACGGAGTACCAATATGTTAGTTCCCTATGACTACTCATCTGTGATGCATTAT 540
 Ergebnis: ATCAAGTCACGGAGTACCAATATGTTAGTTCCCTATGACTACTCATCTGTGATGCATTAT 532

Sequenz: GGGAGATTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCACCATCATAACCACTCTGGACCTCCAGT 600
 Ergebnis: GGGAGATTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCACCATCATAACCACTCTGGACCTCCAGT 592

Sequenz: GTTCACATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCAGATATCACCCGGGTCTGCAGGCTG 660
 Ergebnis: GTTCACATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCAGATATCACCCGGGTCTGCAGGCTG 652

Sequenz: TATAACTGCAGCCGGAGTGTCCCTGACTCCCACGGGAGAGGGTTTGAGGCCAGAGTGAT 720
 Ergebnis: TATAACTGCAGCCGGAGTGTCCCTGACTCCCACGGGAGAGGGTTTGAGGCCAGAGTGAT 712

Sequenz: GGAAGCAGCCTCACCCCTGCCTCTATATCACGTCTACAAAGACTTCTCGAGGCACTGTCA 780
 Ergebnis: GGAAGCAGCCTCACCCCTGCCTCTATATCACGTCTACAAAGACTTCTCGAGGCACTGTCA 772

Sequenz: GAGGAATCTGGAAGCTCTGCCCTAGTGGCTCCAGGACTGGAGGCCAGAGTATTGCCGGG 840
 Ergebnis: GAGGAATCTGGAAGCTCTGCCCTAGTGGCTCCAGGACTGGAGGCCAGAGTATTGCCGGG 832

ANHANG

Sequenz: CTTGGTAACAGCCAGCAAGGATGGGAGCATCCTCCTCAGAGCACATTCAGTGTGGGAGCC 900
Ergebnis: CTTGGTAACAGCCAGCAAGGATGGGAGCATCCTCCTCAGAGCACATTCAGTGTGGGAGCC 523

Sequenz: TTGGCAAGACCACCTCAGATGCTAGCCGATGCTTCAAAATCGGGGCCTGGAGCAGGTGCA 960
Ergebnis: TTGGCAAGACCACCTCAGATGCTAGCCGATGCTTCAAAATCGGGGCCTGGAGCAGGTGCA 583

Sequenz: GACAGCTTGCTCTAGAGCAGTTCCAGCTAGCCAGGCCCCACTGTACCTCTTGCTCTA 1020
Ergebnis: GACAGCTTGCTCTAGAGCAGTTCCAGCTAGCCAGGCCCCACTGTACCTCTTGCTCTA 643

Sequenz: TTTCCAGAAGCCAGAGACAAGCCAGCACCTATCCAAGATGCCTTTGAGAGGCTAGCTCCA 1080
Ergebnis: TTTCCAGAAGCCAGAGACAAGCCAGCACCTATCCAAGATGCCTTTGAGAGGCTAGCTCCA 703

Sequenz: CTTCCAGGAGGCTGTGCACCTGGAAGTCACATTAGAGAGGTGCCCAGAGACAGATCTTGG 1140
Ergebnis: CTTCCAGGAGGCTGTGCACCTGGAAGTCACATTAGAGAGGTGCCCAGAGACAGATCTTGG 763

Sequenz: AGCCACCCGAGTTTCGAAAAATAATAAGCTTGGATCCAACATA 1183
Ergebnis: AGCCACCCGAGTTTCGAAAAATAATAAGCTTG----- 795

Abbildung 67: Ergebnis der Sequenzierung des verwendeten Ovastacin-Strep pFastBac.

Ovastacin-Kat-Strep

Sequenz: ATACTGGAATTCATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGGATATTA ACTATGCTCTCC 60
Ergebnis: ATACTGGAATTCATGGGTATCATGGGAAGCCTGTGGCCTTGGATATTA ACTATGCTCTCC 60

Sequenz: TTGCTAGGTTTGTAGCATGGGATTGTTGTCAGTGACCAATAATAAATGGCCCAAGGGCGTT 120
Ergebnis: TTGCTAGGTTTGTAGCATGGGATTGTTGTCAGTGACCAATAATAAATGGCCCAAGGGCGTT 120

Sequenz: GGTGGCTTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGAAAGTATGATGAACTCAGCCGCCGG 180
Ergebnis: GGTGGCTTTGTGGAGATCCCCTTCTGCTTTCCAGAAAGTATGATGAACTCAGCCGCCGG 180

Sequenz: GTCATTATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTCACATGCATCCGGTTTGTTCCTAC 240
Ergebnis: GTCATTATGGATGCCTTTGCTGAGTTTGAACGTTTCACATGCATCCGGTTTGTTCCTAC 240

Sequenz: CATGGTCAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCTATGGCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGA 300
Ergebnis: CATGGTCAGAGAGACTTTGTTTCCATTCTTCCTATGGCGGGGTGTTTCTCTGGTGTGGGA 300

Sequenz: CGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTGTCCCTTGGCACCCACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGC 360
Ergebnis: CGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTGTCCCTTGGCACCCACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGC 360

Sequenz: ATTGTCCTACATGAGCTCATGCACGTA CTGGCTTCTGGCATGAGCATTCACGGGCAGAT 420
Ergebnis: ATTGTCCTACATGAGCTCATGCACGTA CTGGCTTCTGGCATGAGCATTCACGGGCAGAT 420

Sequenz: CGGGACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATCCTCCCGGGCTTTGAAATCAACTTC 480
Ergebnis: CGGGACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGAGATCCTCCCGGGCTTTGAAATCAACTTC 480

ANHANG

```

Sequenz: ATCAAGTCACGGAGTACCAATATGTTAGTTCCCTATGACTACTCATCTGTGATGCATTAT 540
Ergebnis: ATCAAGTCACGGAGTACCAATATGTTAGTTCCCTATGACTACTCATCTGTGATGCATTAT 540
*****

Sequenz: GGGAGATTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCACCATCATAACCACTCTGGACCTCCAGT 600
Ergebnis: GGGAGATTTGCCTTCAGCTGGCGTGGGCAGCCCACCATCATAACCACTCTGGACCTCCAGT 600
*****

Sequenz: GTTCACATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCAGATATCACCCGGGTCTGCAGGCTG 660
Ergebnis: GTTCACATTGGCCAGCGATGGAACCTGAGTACCTCAGATATCACCCGGGTCTGCAGGCTG 660
*****

Sequenz: TATAACTGCAGCCGGAGTGTGAGATCTATAGGAGCATGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA 720
Ergebnis: TATAACTGCAGCCGGAGTGTGAGATCTATAGGAGCATGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA 720
*****

Sequenz: TAATAAGCTTAA 732
Ergebnis: TAATAAGCTT-- 730
*****

```

Abbildung 68: Ergebnis der Sequenzierung des verwendeten Ovastacin-Kat-Strep pFastBac.

8.5 Alignment *Humanes* und *Murides* Ovastacin

1	APSASRCSGVCSTSVPEGFTPEGSPVFQDKDIPAINQGLISEETPESSFLVEGDIIRPSP	60	Q6HA09	ASTL_MOUSE
1	APLASSCAGACGTSFPDGLTPEGTQASGDKDIPAINQGLILEETPESSFLIEGDIIRPSP	60	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	** ** *:*.**.*:****: . ***** *****:*****			
61	FRLLSVTNNKWPKGVGGFVEIPFLLSRKYDELSRRVIMDAFAEFERFTCIRFVAYHGQRD	120	Q6HA09	ASTL_MOUSE
61	FRLLSATSNKWPMMGGSGVVEVPFLSSKYDEPSRQVILEALAEFERSTCIRFVYQDQRD	120	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	****_*.**** * _*.:**** ***** **:*:*:*:**** *****:*. **			
121	FVSILPMAGCFSGVGRSGGMQVVS LAPTCLRKGRGIVLHELMHVLGFWHEHSRADRDYI	180	Q6HA09	ASTL_MOUSE
121	FISIIIPMYGCFSSVGRSGGMQVVS LAPTCLQKGRGIVLHELMHVLGFWHEHTRADRDYI	180	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	*.:**:* ****_*****:*****:*****:*****			
181	QVNWNEILPGFEINFIKSRSTNMLVPYDYSVMHYGRFAFSWRGQPTIIPLWISSVHIGQ	240	Q6HA09	ASTL_MOUSE
181	RVNWNEILPGFEINFIKSQSSNMLTPYDYSVMHYGRFAFSRRGLPTIIPLWAPSVHIGQ	240	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	:*****:*****:*.***_*****:**** ** ** *:****			
241	RWNLSSTDIRVCRLYNCSRSVPDSHGRGFQAQSDGSSLT PASISRLQRLLLEALSEESGS	300	Q6HA09	ASTL_MOUSE
241	RWNLSASDITRVKLYGCSFSGPRPRGRGSHAHSTGRSPAPASL-SLQRLLLEALS AESRS	299	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	*****:***** :** ** * * :***_*. * * _****: ***** ** *			
301	SAPSGSRTGGQSI-AGLGN SQQGWEPHPQSTF SVGALARPPQMLADASKSGPGAGADSL	359	Q6HA09	ASTL_MOUSE
300	PDPSGSSAGGQVPVAGPGESPHGWESPALKKLSAEASARQPQT LASSPRSRPGAGAPGVA	359	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	****_*** : ** ** * :*** * _.:* * ** ** *: :* ***** _.:			
360	LEQFQLAQAPTIVPLALFPEARDKPAIQDAFERLAPLPGGCAPGSHIREVPRD	412	Q6HA09	ASTL_MOUSE
360	QEQSWLAGVSTKPTVPSSEAGIQPVFVQ----GSPALPGGCVPRNHFKGMSED	408	Q6HA08	ASTL_HUMAN
	** ** _* * . ** *:*.** *****_*. *.: : *			

Abbildung 69: Alignment von *Muriden* Pro-Ovastacin und *Humanem* Pro-Ovastacin

8.6 Sequenzen der Ovastacin-Varianten

8.6.1 Die Sequenz von Pro-Ovastacin-Strep

```

1   atactgcatgctcgacactagtcaccatgggtatcatgggaagcctgtggccttgata
    T G M R R H - S T M G I M G S L W P W I
63   ttaactatgctctccttgctaggtttgagcatgggagcaccctcagcatccagatgttct
    L T M L S L L G L S M G A P S A S R C S
123  ggagtctgcagtaccagtgttccagaaggcttcaactcctgaggggaagcccggatattcag
    G V C S T S V P E G F T P E G S P V F Q
183  gacaaggacatccccgcaattaaccaagggtcattctcagaggagaccccagaaagcagc
    D K D I P A I N Q G L I S E E T P E S S
243  ttctgtgtagaaggggacattatccggccaagcccttccgattgttgctcagtgaccaat
    F L V E G D I I R P S P F R L L S V T N
303  aataaatggcccaagggcggttggtggccttgtggagatccccttccctgctttccagaaag
    N K W P K G V G G F V E I P F L L S R K
363  tatgatgaactcagccgcccgggtcattatggatgcctttgctgagtttgaacgtttcaca
    Y D E L S R R V I M D A F A E F E R F T
423  tgcattccggtttgttgctaccatgggtcagagagactttgtttccattcttccctatggcg
    C I R F V A Y H G Q R D F V S I L P M A
483  ggggtgtttctctggtgtgggacgcagtgagggatgcaggtggtgctccttggcaccact
    G C F S G V G R S G G M Q V V S L A P T
543  tgtctccggaagggccgaggcattgtcctacatgagctcatgcacgtacttggcttctgg
    C L R K G R G I V L H E L M H V L G F W
603  catgagcattcacgggcagatcgggaccgctacatccaagtcaactggaacgagatcctc
    H E H S R A D R D R Y I Q V N W N E I L
663  ccgggctttgaaatcaacttcatcaagtcacggagtaccaatatgttagttccctatgac
    P G F E I N F I K S R S T N M L V P Y D
723  tactcatctgtgatgcattatgggagatttgccttcagctggcgtgggcagcccaccatc
    Y S S V M H Y G R F A F S W R G Q P T I
783  ataccactctggacctccagtggtcacattggccagcgatggaacctgagtacctcagat
    I P L W T S S V H I G Q R W N L S T S D
843  atccccgggtctgcagcgtgtataactgcagccggagtgtccctgactcccacgggaga
    I T R V C R L Y N C S R S V P D S H G R
903  gggtttgaggcccagagtgatggaagcagcctcaccctgcctctatatcaogtctacaa
    G F E A Q S D G S S L T P A S I S R L Q
963  agacttctcgaggcactgtcagaggaatctggaagctctgcccctagtgggtccaggact
    R L L E A L S E E S G S S A P S G S R T
1023 ggaggccagagtattgccgggcttggtaacagccagcaaggatgggagcatcctcctcag
    G G Q S I A G L G N S Q Q G W E H P P Q
1083 agcacattcagtggtgggagccttggcaagaccacctcagatgctagccgatgcttcaaaa
    S T F S V G A L A R P P Q M L A D A S K
1143 tcggggcctggagcaggtgcagacagcttgtctctagagcagttccagctagcccaggcc
    S G P G A G A D S L S L E Q F Q L A Q A
1203 cccactgtacctcttctctatttccagaagccagagacaagccagcacctatccaagat
    P T V P L A L F P E A R D K P A P I Q D
1263 gcctttgagaggctagctccacttccaggaggctgtgcacctggaagtcacattagagag
    A F E R L A P L P G G C A P G S H I R E
1323 gtgccagagacagatctggagccaccgcagttcgaaaataataagcttaacata
    V P R D R S W S H P Q F E K - - A - H

```

Abbildung 70: Sequenz von Pro-Ovastacin-Strep.

Integrierte Restriktionsenzyme: *Sph* I, *Sal* I, *Spe* I, *Bgl* II und *Hind* III. Die cDNA wurde über *Sph* I und *Hind* III in den Vektor pFASTBAC eingefügt. Die Aminosäuresequenz von Pro-Ovastacin-Strep mit den einzelnen Domänen ist farblich markiert. **Signalpeptid**, **Propeptid**, **katalytische Domäne**, **C-terminale Domäne** und **Strep-tag**.

8.6.2 Die Sequenz von Ovastacin-Strep (1183 bp)

```

1   atactggaattcatgggtatcatgggaagcctgtggccttgatattaactatgctctcc
    I L E F M G I M G S L W P W I L T M L S
61  ttgctagggttgagcatgggattgttgctcagtgaccaataataaatggcccaagggcggt
    L L G L S M G L L S V T N N K W P K G V
121 ggtggctttgtggagatccccttcctgctttccagaaagtatgatgaactcagccgcccgg
    G G F V E I P F L L S R K Y D E L S R R
181 gtcattatggatgcctttgctgagtttgaacgtttcacatgcatccggtttgttgcttac
    V I M D A F A E F E R F T C I R F V A Y
241 catggtcagagagactttgtttccattcttctctatggcgggggtgtttctctggtgtggga
    H G Q R D F V S I L P M A G C F S G V G
301 cgcagtgagggatgaggtgggtgtccttggcaccacttgtctccggaagggccgagggc
    R S G G M Q V V S L A P T C L R K G R G
361 attgtcctacatgagctcatgcacgtacttggcttctggcatgagcattcacgggcagat
    I V L H E L M H V L G F W H E H S R A D
421 cgggaccgctacatccaagtcaactggaacgagatcctcccgggctttgaaatcaacttc
    R D R Y I Q V N W N E I L P G F E I N F
481 atcaagtcacgggagtaccaatatgttagttccctatgactactcatctgtgatgcattat
    I K S R S T N M L V P Y D Y S S V M H Y
541 gggagatttgccttcagctggcgtgggcagcccaccatcataccactctggacctccagt
    G R F A F S W R G Q P T I I P L W T S S
601 gttcacattggccagcgatggaacctgagtagctcagatatacccccgggtctgcaggctg
    V H I G Q R W N L S T S D I T R V C R L
661 tataactgcagccggagtgtccctgactcccacgggagaggggtttgaggcccagagtgat
    Y N C S R S V P D S H G R G F E A Q S D
721 ggaagcagcctcaccocctgcctctatatcacgtctacaaagacttctcgaggcactgtca
    G S S L T P A S I S R L Q R L L E A L S
781 gaggaatctggaagctctgcccctagtggtccaggactggaggccagagtattgccggg
    E E S G S S A P S G S R T G G Q S I A G
841 cttggtaacagccagcaaggatgggagcactcctcctcagagcacattcagtggtgggagcc
    L G N S Q Q G W E H P P Q S T F S V G A
901 ttggcaagaccacctcagatgcttagccgatgcttcaaaatcggggcctgggagcaggtgca
    L A R P P Q M L A D A S K S G P G A G A
961 gacagcttgtctctagagcagttccagctagcccaggccccactgtacctcttctgctcta
    D S L S L E Q F Q L A Q A P T V P L A L
1021 tttccagaagccagagacaagccagcacctatccaagatgcctttgagaggctagctcca
    F P E A R D K P A P I Q D A F E R L A P
1081 cttccaggaggctgtgcacctggaagtcacattagagaggtgccagagacagatcttgg
    L P G G C A P G S H I R E V P R D R S W
1141 agccaccgcagttcgaaaaataataagcttggatccaacata
    S H P Q F E K - - A W I Q H

```

Abbildung 71: Sequenz von Ovastacin-Strep.

Integrierte Restriktionsenzyme: *Eco* RI, *Bgl* II, *Bam* HI und *Hind* III. Die cDNA wurde über *Eco* RI und *Hind* III in den Vektor pFASTBAC eingefügt. Die Aminosäuresequenz von Ovastacin-Strep mit den einzelnen Domänen ist farblich markiert. **Signalpeptid**, **katalytische Domäne**, **C-terminale Domäne** und **Strep-tag**

8.6.3 Die Sequenz von Ovastacin-Kat-Strep (732 bp)

```

1   atactggaattcatgggtatcatgggaagcctgtggccttgatattaactatgctctcc
    I L E F M G I M G S L W P W I L T M L S
61  ttgctagggttgagcatgggattgttgctcagtgaccaataataaatggccaagggcggt
    L L G L S M G L L S V T N N K W P K G V
121 ggtggctttgtggagatccccttcctgctttccagaaagtatgatgaactcagccgccgg
    G G F V E I P F L L S R K Y D E L S R R
181 gtcattatggatgcctttgctgagtttgaacgtttcacatgcatccggtttgttgcttac
    V I M D A F A E F E R F T C I R F V A Y
241 catggtcagagagactttgtttccattcttccctatggcgggggtgtttctctggtgtggga
    H G Q R D F V S I L P M A G C F S G V G
301 cgcagtgagggatgcaggtgggtgtccttggcaccacttgtctccggaagggccgagggc
    R S G G M Q V V S L A P T C L R K G R G
361 attgtcctacatgagctcatgcacgtacttggcttctggcatgagcattcacgggcagat
    I V L H E L M H V L G F W H E H S R A D
421 cgggaccgctacatccaagtcaactggaacgagatcctcccgggctttgaaatcaacttc
    R D R Y I Q V N W N E I L P G F E I N F
481 atcaagtcacgggagtaccaatatgttagttccctatgactactcatctgtgatgcattat
    I K S R S T N M L V P Y D Y S S V M H Y
541 gggagatttgccttcagctggcgtgggcagcccaccatcataccactctggacctcaggt
    G R F A F S W R G Q P T I I P L W T S S
601 gttcacattggccagcgatggaacctgagtacctcagatatacccccgggtctgcaggctg
    V H I G Q R W N L S T S D I T R V C R L
661 tataactgcagccggagtgtcagatctataggagcatggagccaccgcagttcgaaaaa
    Y N C S R S V R S I G A W S H P Q F E K
721 taataagcttaa
  
```

Abbildung 72: Sequenz von Ovastacin-Kat-Strep.

Integrierte Restriktionsenzyme: *Eco*RI, *Bgl*II und *Hind*III. Die cDNA wurde über *Eco*RI und *Hind*III in den Vektor pFASTBAC eingefügt. Die Aminosäuresequenz von Ovastacin-Kat-Strep mit den einzelnen Domänen ist farblich markiert. **Signalpeptid**, **katalytische Domäne** und **Strep-tag**

8.7 Symbole für Aminosäuren

Tabelle 43: Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9. CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

10. DANKSAGUNG

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

München, März 2013

.....

(André Hildebrand)