

**Funktionelle Charakterisierung der
Metalloendopeptidasen Meprin α und
Meprin β unter besonderer Berücksichtigung
pathologischer Umstände in der
menschlichen Dermis**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

AM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

BERND BRUNS
GEB. AM 01.04.1975 IN MÜNSTER
MAINZ, 2011



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden in zwei Veröffentlichungen detailliert beschrieben. Im Folgenden werden diese und weiterführende Arbeiten erläutert und zusammengefasst.

Mainz, März 2011

Inhalt

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Zusammenfassung | 1 |
| 2. | Einleitung..... | 2 |
| 2.1 | Metzinkine..... | 2 |
| 2.1.1 | Astacine | 3 |
| 2.1.2 | Adamalysine | 14 |
| 2.1.3 | Matrix-Metalloproteasen..... | 15 |
| 2.2 | Kollagene und Kollagenassemblierung..... | 16 |
| 2.2.1 | Biosynthese und posttranslationale Modifikation fibrillärer Kollagene | 16 |
| 2.3 | Stratifin..... | 17 |
| 2.4 | IGFBP3 | 18 |
| 2.5 | FGF19..... | 19 |
| 3. | Material und Methoden | 20 |
| 3.1 | RNA Isolation und RT-PCR | 20 |
| 3.2 | Agarose Gelelektrophorese..... | 21 |
| 3.3 | Proteinexpression und Insektenzellkultur | 22 |
| 3.3.1 | Baculovirus-Expressionssystem | 22 |
| 3.3.2 | Hitzeschocktransformation und Transposition | 23 |
| 3.3.3 | Bakterienkultivierung | 24 |
| 3.3.4 | Plasmidisolierung | 25 |
| 3.3.5 | Bacmidisolierung und –überprüfung | 25 |
| 3.3.6 | Insektenzellkultur | 26 |
| 3.3.7 | Transfektion mit rekombinanten Bacmiden und Virenampifikation | 26 |
| 3.3.8 | Proteinreinigung und Aktivierung von Meprin α und β | 27 |
| 3.4 | Zellkultur humaner Zelllinien..... | 30 |
| 3.4.1 | Aufzucht der verwendeten Zelllinien | 30 |
| 3.4.2 | Passage der HDFa-und HaCats | 31 |
| 3.4.3 | HaCat/HDFa Kokultur..... | 31 |
| 3.5 | MMP1-Aktivitätsassays | 32 |
| 3.6 | Substratassays..... | 33 |
| 3.7 | Zymographie | 33 |
| 4. | Ergebnisse | 34 |
| 4.1 | Spaltung von MMP1 und Stratifin durch Meprine..... | 34 |
| 4.2 | Vergleich der Spaltung von pro-MMP1 und aktiviertem MMP1 durch Meprine | 35 |
| 4.3 | Einfluss der Substrate auf die MMP1-Expression in dermalen Fibroblasten | 36 |
| 4.4 | Detektion MMP1- und MMP9-Aktivität im Zellkulturüberstand | 39 |

Verzeichnisse

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.4.1 | Einfluss der Substrate..... | 39 |
| 4.4.2 | Einfluss der Meprine..... | 41 |
| 5. | Diskussion..... | 43 |
| 5.1 | MMP1-Spaltung durch Meprin führt zu dessen Funktionsverlust:..... | 43 |
| 5.2 | Stratifin..... | 44 |
| 5.3 | IGFBP3..... | 45 |
| 5.4 | FGF19..... | 46 |
| 5.5 | Meprin..... | 46 |
| 6. | Literaturliste..... | 50 |
| 7. | Anhang..... | 59 |
| 7.1 | Veröffentlichung 1..... | i |
| 7.2 | Veröffentlichung 2..... | ii |
| 8. | Eidesstattliche Erklärung..... | iii |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Einteilung der Metalloproteasen (nach GOMIS-RÜTH, 2003) | 2 |
| Abbildung 2: Katalysemechanismus von Astacin (nach Grams et al.,1996):..... | 3 |
| Abbildung 3: Domänenstruktur der Meprine: | 4 |
| Abbildung 4: Spaltspezifitäten für Meprin α und Meprin β | 7 |
| Abbildung 5: Detektion von Meprin α und Meprin β in der menschlichen Haut..... | 9 |
| Abbildung 6: Dorsale und ventrale Sicht eines <i>Limulus polyphemus</i> (www.infovisual.info).. | 10 |
| Abbildung 7: Domänenstruktur der humanen Tolloide | 12 |
| Abbildung 8: BMP1 Spaltspezifität..... | 13 |
| Abbildung 9: Domänenstruktur der Adamalysine | 15 |
| Abbildung 10: Überblick Baculovirus-Expressionssystem..... | 23 |
| Abbildung 11: Prinzip der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie | 29 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung des HaCat/HDFa Kokultur-Systems..... | 32 |
| Abbildung 13: In vitro Spaltung von Stratifin und pro-MMP1 durch Meprine. | 34 |
| Abbildung 14: MMP1-Aktivität in Abhängigkeit von der Abfolge der Aktivierung und Spaltung durch Meprin α und β | 36 |
| Abbildung 15: RT-PCR mit MMP1,- Meprin β und GAPDH-Primern | 37 |
| Abbildung 16: Western Blot: MMP1-Expression im Zellkulturüberstand- und Zelllysate von HDFa-Zellen..... | 38 |
| Abbildung 17: Relative Kollagenase-Aktivität und MMP9-Aktivität im Zellkulturüberstand von Fibroblasten. | 40 |
| Abbildung 18: Relative Kollagenase-Aktivität im Zellkulturüberstand von Fibroblasten nach Inkubation mit Meprin α und Meprin β | 41 |
| Abbildung 19: Übersicht über den Einfluss von Stratifin und epidermalen Faktoren auf die Aktivität von Plasmin, MMP1, MMP3 und MMP9. | |
| Abbildung 20: Überblick zur hypothetischen Meprin-vermittelten MMP1- und MMP9-Expression durch Interleukin 1β und Interleukin 18 induzierte MAPK-Signaltransduktionskaskaden:..... | 48 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: PCR-Protokoll | 20 |
| Tabelle 2: Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese..... | 21 |
| Tabelle 3: Materialien für die Bakterienkultivierung..... | 24 |
| Tabelle 4: Bacmid-PCR-Ansatz (25 µl) | 25 |
| Tabelle 5: PCR-Protokoll zur Überprüfung der Bacmide..... | 26 |
| Tabelle 6: Medien und Zusätze in der Insektenzellkultur | 27 |
| Tabelle 7: Puffer für die Meprin α -Reinigung | 28 |
| Tabelle 8: Puffer für die Meprin β -Reinigung | 29 |
| Tabelle 9: Reagenzien für die Zymographie | 33 |

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neuentdeckte Astacin-ähnliche-Proteasen LAST und LAST_MAM aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* funktionell charakterisiert. Insbesondere LAST_MAM, eignet sich zur phylogenetischen Untersuchung, hinsichtlich der Evolution von Astacin-ähnlichen-Proteasen mit MAM-Domäne, zu denen auch die Meprine zählen. Es wurde deutlich, dass LAST_MAM nicht unmittelbar mit anderen Astacinen, die über eine MAM-Domäne verfügen, verwandt ist, und dass von einer divergenten Entwicklung dieser Proteasen und der MAM-Domäne selbst ausgegangen werden muss.

Meprin Metalloendopeptidasen werden in membrangebundener und sezernierter Form, vorwiegend in Epithelien aber auch in intestinalen Leukozyten und bestimmten Krebszellen exprimiert. Meprin α und Meprin β , zwei homologe Varianten der Protease, kommen in der menschlichen Epidermis in unterschiedlichen Zellschichten vor. Beide Proteasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität, wobei Zytokine, Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix, insbesondere der Basallamina wie Kollagen IV, Laminin und Nidogen, zu den Substraten zählen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die N- und C-terminale Prozessierung von Prokollagen III durch Meprine gezeigt werden. Die Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide ist ein essentieller Schritt bei der Kollagenassemblierung und wurde bisher ausschließlich Vertretern der Adamalysine und Tolloide, insbesondere BMP1, zugeschrieben. In ihrer Aktivität als Prokollagen III C-Proteinasen spalteten Meprine das Propeptid an der identischen Sequenz, wie BMP1. Hierbei zeigten Meprine eine wesentlich höhere katalytische Aktivität als BMP1 und wurden überraschenderweise in Anwesenheit des endogenen BMP1-Aktivators PCPE (Prokollagen C-Proteinase *enhancer*) gehemmt. Eine erstmals demonstrierte erhöhte Meprin α -Expressionsrate, sowie die Detektion einer Meprin β -Expression in der Dermis unter fibrotischen Bedingungen, legen zusammen mit der Entdeckung von Prokollagen III, als Substrat eine gewichtige Rolle für Meprine bei der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix nahe. Desweiteren wurden das regulatorische Protein Stratifin und die Metalloprotease MMP1 als Meprin-Substrate *in vitro* verifiziert. Die Spaltung von Stratifin, IGFBP3 und FGF19 durch Meprine wurde in Bezug auf die MMP1-Expression und –Aktivität sowie die MMP9-Aktivität, als wichtiger kataboler Faktor in dermalen Fibroblasten untersucht. Hervorzuheben ist, dass eine Prozessierung von IGFBP3 durch Meprin α Spaltfragmente generiert, die nach Applikation auf Fibroblasten eine signifiante Steigerung der MMP1-Expression zur Folge hatte. Zu dem konnte eine signifikante, von den getesteten Substraten unabhängige Meprin-vermittelte Steigerung der MMP1- und MMP9-Aktivitätsrate detektiert werden.

2. Einleitung

2.1 Metzinkine

Metzinkine gehören zu den Metalloendopeptidasen, einer Gruppe von Enzymen, die Peptidbindungen innerhalb einer Aminosäuresequenz hydrolysieren, d.h. durch Addition von Wasser eine kovalente Bindung spalten.

Während der übergeordnete Klan der Zinkine im katalytischen Zentrum über das hoch konservierte Zink-Bindemotiv **HEXXH** verfügt, findet man bei den Metzinkinen das erweiterte Motiv **HEXXHXXGXXH/D** (Bode, Gomis-Ruth et al. 1993; Stocker, Grams et al. 1995). Alle drei Histidine sind hierbei an der Koordination des Zinkions beteiligt. Dieses stabilisiert ein Wassermolekül, das, durch das ebenfalls konservierte Glutamat polarisiert, die Peptidbindung angreifen kann. Dadurch wird das Zinkion für die Katalyse unverzichtbar, so dass man Metzinkine mit Zinkchelatoren wie 1,10 ortho-Phenanthrolin oder EDTA inhibieren kann. Weiterhin charakteristisch ist der namensgebende Methionin-*turn*, der vermutlich zur strukturellen Integrität des Enzyms beiträgt (Tallant, Garcia-Castellanos et al.). Zu den Metzinkinen zählen die Proteasefamilien Serralysine, Leishmanolysine, Snapalysine, Astacine, Matrix-Metalloproteasen (MMPs), sowie die Adamalysine (Abb.1).

Im Folgenden soll auf die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Adamalysine und Astacine näher eingegangen werden.

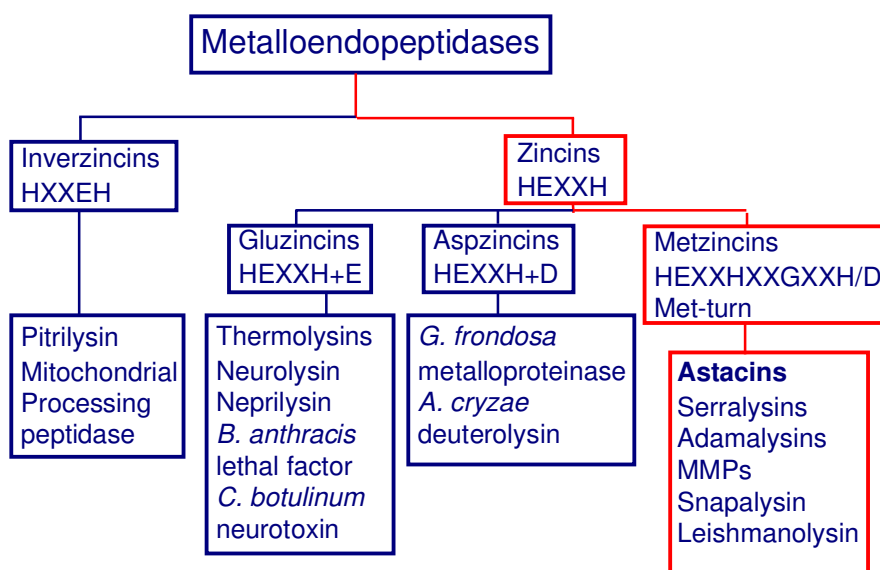


Abbildung 1: Einteilung der Metalloproteasen (nach GOMIS-RÜTH, 2003)

2.1.1 Astacine

Astacin, ein Verdauungsenzym aus dem Kaumagen des Edelflusskrebse *Astacus astacus* und der Namensgebers der Familie, wurde erstmals 1967 von Pfeleiderer et al. beschrieben (Pfeleiderer, Zwilling et al. 1967). Meprin β , auf das später genauer eingegangen wird, ist die einzige bekannte Protease dieser Familie, die membrangebunden vorliegt, während alle weiteren Vertreter von den Zellen sezerniert werden. Wie bei den meisten Metalloproteasen bedarf es zur Aktivierung dieser Enzyme einer proteolytischen Prozessierung (Bond and Beynon 1995). Die enzymatischen Eigenschaften (Stocker and Zwilling 1995) und die Proteinstruktur (Guevara, Yiallourous et al.; Titani, Torff et al. 1987; Gomis-Ruth, Stocker et al. 1993; Gomis-Ruth 2008) des Astacins sind zwar weitgehend bekannt, bei den über 800 weiteren Vertretern dieser Familie ist die physiologische Funktion meist jedoch noch unklar. Allen Astacinen gemein ist die erweiterte Konsensussequenz HExxHxxGFxHExxDR (Stocker, Gomis-Ruth et al. 1993) und der Met-turn mit der Sequenz SxMHY, die um einen Tyrosinrest (Tyr 149 bei Astacin) erweitert ist, der den fünften Zinkliganden darstellt. Bei der Hydrolyse stabilisiert dieser Rest die Carboxylgruppe, der zu spaltenden Peptidbindung (Stocker, Gomis-Ruth et al. 1993; Grams, Dive et al. 1996; Yiallourous, Grosse Berkhoff et al. 2000). Ein weiteres Charakteristikum der Astacine ist ein konservierter Glutamatrest, der auf den dritten Histidinrest in der Konsensussequenz folgt. Dieser Glutamatrest (Glu 102 bei Astacin) bildet eine Salzbrücke zum N-Terminus des Enzyms, welche einen stabilisierenden Effekt auf das Enzym hat und vermutlich auch bei der Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist (Gomis-Ruth, Kress et al. 1993). Im Menschen wurden bisher 7 Astacine auf Proteinebene identifiziert. Diese umfassen Ovastacin, 4 Isoformen von Tolloiden und 2 Meprine. Auf BMP1, einem Vertreter der Tolloide, Meprin α und eprin β , sowie auf LAST und LAST_MAM, zwei Astacin-ähnlichen Proteasen soll hierbei näher eingegangen werden.

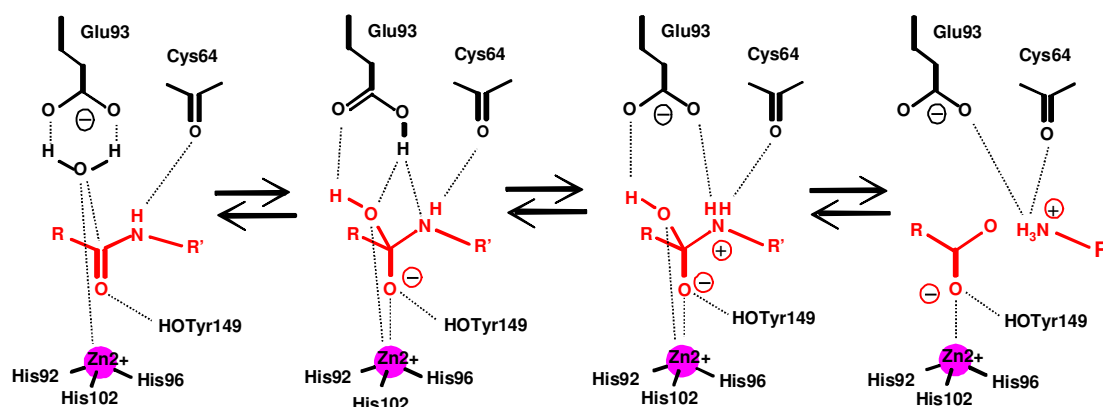


Abbildung 2: Katalysemechanismus von Astacin (nach Grams et al., 1996). Der Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung (rot) wird durch ein polarisiertes Wassermolekül nukleophil angegriffen. Der Glutamatrest fungiert dabei als Base und wird protoniert. Der Spaltung der Peptidbindung geht eine Protonierung der Amidgruppe voraus.

2.1.1.1 Meprine

Meprin α und Meprin β wurden erstmals in den 80 er Jahren des letzten Jahrhunderts in Nieren von Mäusen und Ratten entdeckt (Beynon, Shannon et al. 1981; Barnes, Ingram et al. 1989). Im Menschen wurde Meprin als ein im Darm aktives Enzym identifiziert, welches in der Lage war das Chymotrypsinsubstrat N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoessäure (PABA-Peptid) zu spalten (Sterchi, Green et al. 1983). Anhand von Homologien zur katalytischen Domäne von BMP1 wurden die Meprine als zur Astacinfamilie gehörig definiert (Dumermuth, Eldering et al. 1993; Bond and Beynon 1995). Meprin bildet immer Dimere die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Diese Dimere können α/α und β/β Homodimere sein (Bond and Beynon 1995). Meprin α Homodimere können die größten bekannten extrazellulären Proteasekomplexe mit Massen von mehreren Mio. Dalton bilden, wobei sich die Dimere über nichtkovalente Interaktionen zu größeren Komplexen zusammenlagern (Becker, Kruse et al. 2003; Bertenshaw, Norcum et al. 2003). Meprin β bildet hingegen nur Dimere. Wenn aber Meprin α und β koexprimiert werden, können sich α/β Heterodimere bilden, was sich aber bislang nur bei den Enzymen der Rodentia nachweisen lies (Marchand, Tang et al. 1994; Bertenshaw, Norcum et al. 2003).

2.1.1.1.1 Domänenstruktur

Die Domänenstruktur von Meprin α als auch β besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, der Astacin-ähnlichen Proteasedomäne, der MAM-Domäne (*meprin*, *A5 protein*, *receptor protein tyrosine phosphatase μ*), einer TRAF-Domäne (*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor*) einer EGF (*epidermal growth factor*)-Domäne, gefolgt von einer Transmembran-Domäne und einer zytosolischen Domäne.

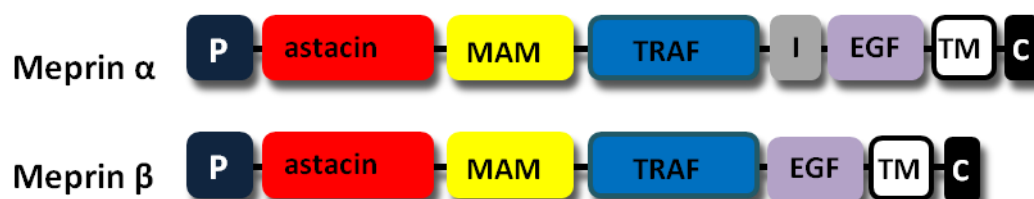


Abbildung 3: Domänenstruktur der Meprine: Pro: Propeptid, Protease: Proteasedomäne, MAM: Meprin, A5 protein tyrosin phosphatase μ domäne, TRAF: Tumor necrosis factor receptor associated factor-Domäne, I: Inserierte Domäne, EGF: Epidermal growth factor Domäne, TM: Transmembrandomäne, C: Cytosolische Domäne

Die MAM-Domäne findet sich in Proteinen mit diversen Funktionen, wie z.B. Neuropilin (Nakamura and Goshima 2002), Zonadhesin (Herlyn and Zischler 2005) aber auch anderen Astacin-ähnlichen Proteasen, wie HMP2 (*hydra metalloprotease 2*) aus *Hydra* (Yan, Fei et al. 2000), sowie LAST_MAM aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (Becker-Pauly, Bruns et al. 2009). In Neuropilin ermöglicht die MAM-Domäne eine Oligomerisierung (Chen, He et al. 1998). Auch bei Meprin werden Disulfidbrücken bei der Oligomerisierung, zwischen den MAM-Domänen der einzelnen Untereinheiten geknüpft. Untersuchungen mit Meprin Mutanten, bei denen die MAM-Domäne deletiert worden ist, zeigten, dass diese vom Proteasom degradiert wurden (Tsukuba, Kadowaki et al. 2002).

Eine weitere Besonderheit stellt die TRAF-Domäne dar. Normalerweise besitzen nur intrazelluläre Proteine diese Domäne. Ihr werden Funktionen bei der Signaltransduktion und der Proteinassoziation zugeschrieben (Cheng, Cleary et al. 1995). Meprin ist somit das einzige bisher bekannte Membranprotein, dessen TRAF-Domäne extrazellulär lokalisiert ist, wo es vermutlich durch Bildung von Disulfidbrücken, zusammen mit der MAM-Domäne an der Dimerisierung beteiligt ist (Zapata, Martinez-Garcia et al. 2007). Mutanten, denen die TRAF-Domäne fehlte, konnten nach der Expression nicht aktiviert werden (Tsukuba and Bond 1998). Demnach sind die MAM und die TRAF-Domänen neben den erwähnten Funktionen von höchster Wichtigkeit für die strukturelle Integrität dieser Protease.

Meprin α und Meprin β unterscheiden sich in ihrer Domänenstruktur durch das Vorhandensein einer Inserted (I)-Domäne bei Meprin α . Die I-Domäne befindet sich unmittelbar N-terminal der EGF-Domäne. Meprin α wird posttranslational innerhalb dieser Domäne von furinartigen Propeptidkonvertasen im Golgi gespalten und verliert dadurch seine EGF, TM- und die zytosolische Domäne, wodurch eine freie Sezernierung in den extrazellulären Raum möglich wird (Hahn, Lottaz et al. 1997) (Tsukuba and Bond 1998). Fehlt die I-Domäne, verbleibt Meprin α im endoplasmatischen Retikulum und wird hier vermutlich degradiert (Hengst and Bond 2004).

Meprin α und Meprin β unterscheiden sich auch in der Beschaffenheit ihrer zytosolischen Domänen. Diese umfasst bei Meprin β 28 Aminosäuren (bei Meprin α nur 6) und beinhaltet eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Serin 687) innerhalb einer Konsensussequenz für PKC (Proteinkinase C). Hierdurch wäre eine Verbindung zu intrazellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion denkbar (Leuenberger, Hahn et al. 2003).

2.1.1.1.2 Aktivierung von proMeprin

Wie zuvor erwähnt werden Meprin α und Meprin β als inaktive Zymogene exprimiert. Katalytisch aktiv werden diese Proteasen erst nach Abspaltung des Propeptids. Im Gegensatz zu den MMPs und den ADAMs sind Meprine nicht zu Autoaktivierung befähigt.

Vielmehr werden Meprine durch trypsinähnliche Serinproteasen aktiviert. ProMeprin α aber nicht proMeprin β , konnte *in vitro* von Plasmin aktiviert werden (Becker, Kruse et al. 2003). Eine differentielle Aktivierung von Meprin α und Meprin β wird *in vivo* vermutlich von verschiedenen Kallikreinen durchgeführt. Unlängst konnten die humanen Kallikreine (KLKs) 4, 5 und 8 als Meprinaktivatoren beschrieben werden (Becker-Pauly, Howel et al. 2007; Ohler, Debela et al. 2010). Während KLK 5 beide Meprine aktivierte, wurde festgestellt, dass KLK 4 und KLK 8 nur Meprin β zu aktivieren vermochten.

2.1.1.1.3 Meprinsubstrate- und Inhibitoren

Meprine sind der Lage eine Vielzahl an biologisch aktiven Substraten zu spalten. Hierzu gehören Proteine des Verdauungssystems, wie z.B. Gastrin und Cholecystokinin, aber auch Komponenten des Immunsystems wie Zytokine (Villa, Bertenshaw et al. 2003; Bylander, Bertenshaw et al. 2007). Während einige dieser Zytokine schlicht degradiert werden, unterliegt der Vorläufer Interleukin 1 β der limitierten Proteolyse, wodurch es aktiviert wird (Herzog, Haun et al. 2009). Von besonderem Interesse ist die Fähigkeit von Meprin Komponenten der extrazellulären Matrix zu prozessieren. Hierzu gehören Bestandteile der Basallamina wie z.B. Kollagen IV, Laminin-1, Nidogen und Fibronectin (Kohler, Kruse et al. 2000; Kruse, Becker et al. 2004). Aber auch das Adhäsionsprotein E-Cadherin, das Zell-Zell Interaktionen ermöglicht, gehört ebenfalls zu den bekannten Meprin-substraten (Huguenin, Muller et al. 2008). Des Weiteren ist die Lysyl-Oxidase, ein essentielles Enzym bei der Assemblierung von Kollagenfibrillen (siehe Abschnitt (Kollagene) und als Substrat für BMP1 bekannt, ein Meprin-substrat (Ambort, Stalder et al. 2008). Im Gegensatz zu BMP1 scheint die Lysyl-Oxidase von Meprin nicht aktiviert zu werden. Aufgrund der ähnlichen Spaltspezifität zwischen BMP1 und Meprin, ist davon auszugehen, dass einige BMP1-Substrate potentiell auch Substrate für Meprin, insbesondere aber für Meprin β darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies auch für proKollagen III bestätigt. Wie auch BMP1 bevorzugt Meprin β an der P1'-Position saure Aminosäuren, wie Aspartat und Glutamat. Meprin α zeigt zudem eine Bevorzugung von kleinen aliphatischen Resten, sowie Prolin in der P2'-Position (Villa, Bertenshaw et al. 2003; Kruse, Becker et al. 2004).

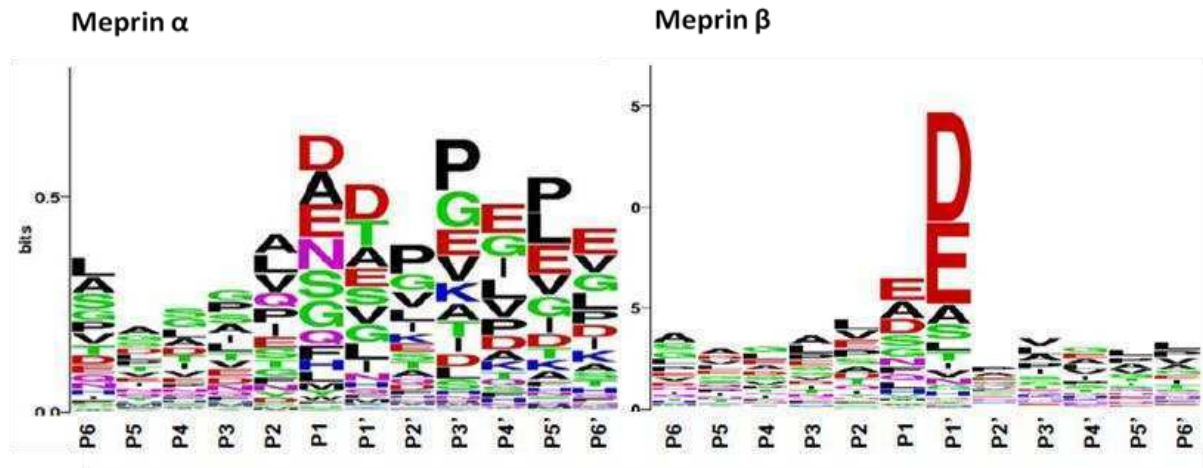


Abbildung 4: Spaltspezifitäten für Meprin α und Meprin β (Becker-Pauly et al., unveröffentlicht). P6-P1 (Non-prime) indizieren die Positionen der Aminosäuren N-terminal der Schnittstelle, P1'-P6' (prime) entsprechend die Positionen C-terminal der Schnittstelle. Bei der Proteolyse wird die Peptidbindung zwischen P1 und P1' hydrolysiert. Die Größe der Buchstaben ist hierbei ein Maß für die Aminosäurepräferenz in der jeweiligen Position. Meprin β beispielsweise bevorzugt die sauren Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) direkt C-terminal der Schnittstelle in der P1'-Position.

Der zurzeit effektivste bekannte Meprin-Inhibitor ist das aus *Streptomyces* stammende Hydroxamat Actinonin. Meprin α wird hierbei schon mit einem K_i -Wert von 20 nM, und Meprin β mit einem etwa 100fach höheren K_i -Wert von 1,7 μM gehemmt (Kruse, Becker et al., 2004). Desweiteren inhibieren Hydroxamatderivate, die als Peptidanaloga ursprünglich für Vertreter der MMPs und ADAMs generiert wurden, Meprin α und Meprin β in unterschiedlichem Maße. Meprin α und Meprin β werden nicht von typischen endogenen Inhibitoren der extrazellulären Matrix wie den TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) und α₂-Macroglobulin, einem unspezifischen Proteaseinhibitor, gehemmt (Kruse, Becker et al. 2004). Gegenwärtig sind nur drei endogene Meprin-inhibitoren bekannt: Zum einen *Mannan-binding Protein* (MBP), ein Lektin, das vermutlich mit den N-verknüpften Glykanen von Meprin interagiert und damit die Aktivität hemmt (Hirano, Ma et al. 2005). Allerdings konnte eine Inhibition durch MBP bei humanem Meprin nicht verifiziert werden (Lottaz et al., unveröffentlicht). Unlängst konnten 2 miteinander verwandte endogene Inhibitoren, Fetuin-A und Cystatin C aus humanem Blutserum identifiziert werden (Hedrich, Lottaz et al.). Fetuin-A inhibierte Meprin α mit einer Inhibitionskonstante von $K_i=42$ μM und Meprin β mit einer Inhibitionskonstante von $K_i=1,1$ μM. Eine Inhibition von Meprin β durch Cystatin C konnte nicht festgestellt werden. Meprin α dagegen wurde von Cystatin C mit einer Konstante von $K_i=8,5$ μM inhibiert.

2.1.1.1.4 Expression von Meprin

Im adulten menschlichen Organismus werden Meprine vorwiegend in Epithelien exprimiert. In der Niere konnte Meprin in epithelialen Zellen des proximalen Tubulus, sowie in den Podozyten der Glomeruli detektiert werden (Oneda, Lods et al. 2008). Man nimmt an, dass Meprin im Bereich des proximalen Tubulus an der Degradierung von Proteinen im Filtrat beteiligt ist, bevor diese resorbiert werden (Barnes, Ingram et al. 1989).

Im Dünndarm des Menschen findet man Meprin hauptsächlich im apikalen Bereich der epithelialen Bürstensaumzellen. Hier beschränkt sich die Expression auf die epithelialen Zellen der Villi, die zu den Krypten hin abnimmt (Lottaz, Hahn et al. 1999). Im Dickdarm wird dagegen nur Meprin α exprimiert, wie anhand von *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden konnte (Sterchi, Stocker et al. 2008). Desweiteren wird Meprin im Darm in den Leukozyten der *Lamina propria* exprimiert, wobei die Expression bei Entzündungen tendenziell zunimmt. Bei der Gluten-induzierten Zölliakie, einer Darmkrankheit, die sich durch die Zerstörung der Darmepithelzellen auszeichnet, ist in den Epithelzellen ein Rückgang der Meprinexpression zu beobachten, während in den Leukozyten der *Lamina propria* die Expression von Meprin α und β zeitgleich hochreguliert wird (Lottaz, Buri et al. 2007).

In der menschlichen Haut werden Meprin α und Meprin β vornehmlich in der Epidermis exprimiert (Becker-Pauly et al., 2007; Kronenberg et al., 2010). Immunohistochemische Untersuchungen ergaben, dass Meprin α im *Stratum basale* und Meprin β im *Stratum granulosum* exprimiert werden (Abb.5). Beim *Stratum basale* handelt es sich um die jüngste, direkt apikal der Basallamina angeordnete Epidermisschicht. Keratinozyten, die etwa 90% der Zellmasse in der Epidermis ausmachen, sind hier noch nicht ausdifferenziert und proliferieren. Es wird daher vermutet, dass Meprin α eine Funktion bei der Proliferation in dieser Zellschicht innehat. Meprin β im *Stratum granulosum* spielt dagegen möglicherweise bei der terminalen Differenzierung der Keratinozyten eine tragende Rolle. *In vitro* Versuche mit Keratinozyten in Kultur zeigten, dass exogen appliziertes Meprin β in der Tat konzentrationsabhängig Apoptose induzierte, während selbst höhere Konzentrationen von Meprin α sich nicht toxisch auf die Zellen auswirkten (Becker-Pauly, Howel et al. 2007). Eine mögliche Rolle für Meprin α bei der Proliferation steht im Einklang mit folgender Beobachtung: Bei *Psoriasis* (Schuppenflechte), einer nicht ansteckenden, entzündlichen Dermatose, die sich durch eine hyperproliferative Dermis auszeichnet (Kurilic, Prpic-Massari et al.), konnte eine ektopische Expression von Meprin α im *Stratum granulosum* und Meprin β im *Stratum corneum* detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Dermis auf Proteinebene lediglich Meprin α aber nicht Meprin β detektiert werden konnte (Kronenberg, Bruns et al.). RT-PCR Analysen, sowie

Immunohistochemische Untersuchungen mit Hautpräparaten ergaben, dass in der hyperproliferativen und fibrotischen Keloiddermis, Meprin α stärker und Meprin β ektopisch exprimiert werden. Die hier erstmals gezeigte Fähigkeit von Meprin ProKollagen III C-terminal zu prozessieren, steht dabei im Einklang mit einer potentiell mit Fibrose assoziierten Funktion vom Meprin.

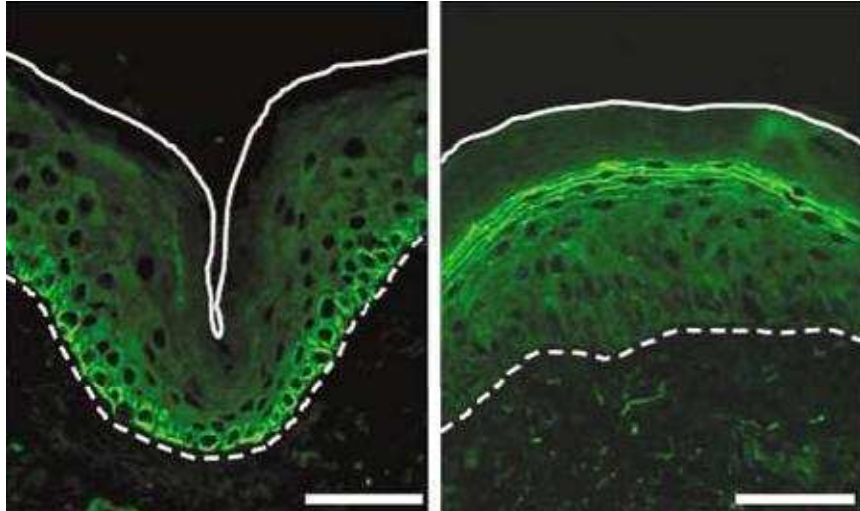


Abbildung 5: Detektion von Meprin α und Meprin β in der menschlichen Haut (Becker-Pauly et al., 2007). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Basallamina, die durchgehende Linie die apikale Grenze der Epidermis. Die grüne Fluoreszenz zeigt das Vorkommen der Meprine, detektiert durch spezifische Antikörper. (A) Meprin α wird in der basalen, epidermalen Schicht, der *Stratum basale* exprimiert. (B) Die Expression von Meprin β beschränkt sich vorwiegend auf das *Stratum granulosum*. Balken entspricht 50 μm .

2.1.1.2 Astacin-ähnliche Metalloproteasen aus *Limulus polyphemus*

Zum tieferen Verständnis der Familie der Astacin-Metalloproteasen, insbesondere der Funktionen im Menschen, ist es unerlässlich sich mit der Evolution dieser entwicklungsgeschichtlich sehr alten Enzyme, zu beschäftigen. Gegenstand der Untersuchungen waren hierbei zwei neue Metalloproteasen LAST (**L**imulus **A**stacin) und LAST_MAM (**L**imulus **A**stacin with **MAM** domain) aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*. Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (Aus dem lateinischen: „Der kleine schielende Cyclop“) ist eine der vier rezenten Arten in der Familie der Limulidae, die auf verschiedene Meeresbereiche verteilt leben

Während die Gattungen *Tachypleus* und *Carcinoscorpius* in südostasiatischen Küstengebieten beheimatet sind, bewohnt der amerikanische *Limulus polyphemus* (engl. *horseshoe crab*) die amerikanische Ostküste von Maine bis Yucatan (Mexico).

Obwohl der englische Name suggeriert, dass es sich bei *Limulus polyphemus* um einen Krebs handelt, zeigt die phylogenetische Klassifizierung, dass das Tier den Spinnentieren zuzuordnen ist (Kükenthal Zoologisches Praktikum).

Stamm: Arthropoda (Gliederfüßer)
 Unterstamm: Chelicerata (Spinnentiere)
 Klasse: Merostomata (Hüftmünder)
 Ordnung: Xiphosura (Schwertschwänze)
 Familie: Limulidae
 Gattung: *Limulus*
 Art: *Limulus polyphemus*

Die sehr charakteristische Morphologie der Tiere hat sich seit ihrem ersten Erscheinen in der Paläozoischen Ära (540-248 Mio. Jahre) nicht mehr wesentlich verändert, was ihnen die häufig verwendete Bezeichnung „Lebende Fossilien“ einbrachte.

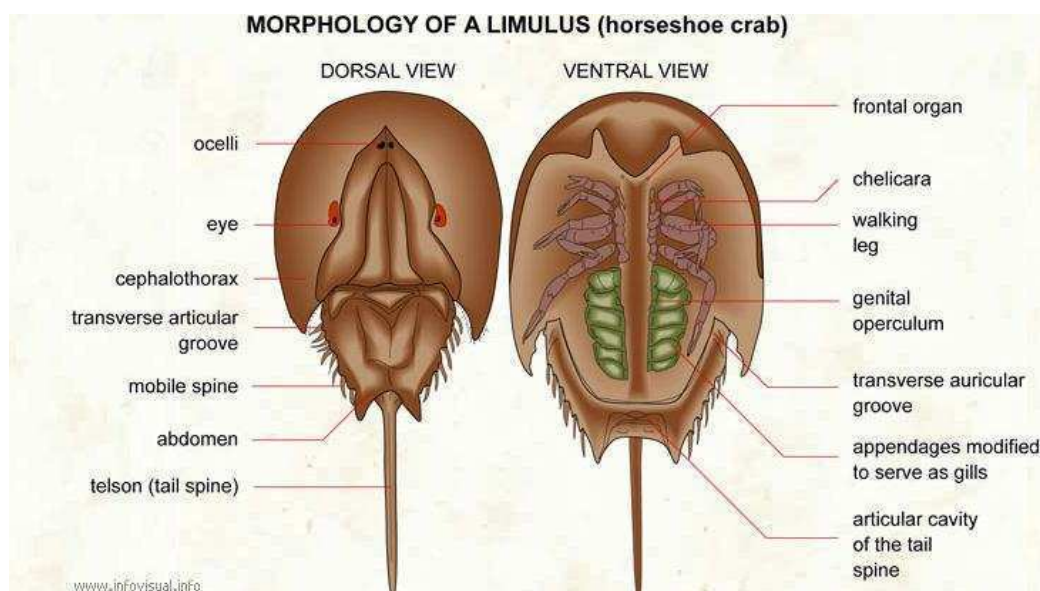


Abbildung 6: Dorsale und ventrale Sicht eines *Limulus polyphemus* (www.infovisual.info).

Eine besondere Bedeutung hat *Limulus polyphemus* für die medizinische Diagnostik. In den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde entdeckt, dass Blut aus *Limulus polyphemus* in Anwesenheit von Endotoxinen aus Gram-negativen Bakterien augenblicklich gerinnt (BANG, 1953). Diese Reaktion macht man sich beim sogenannten LAL-Test (*Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test) zunutze, um eventuelle Kontaminationen beispielsweise in intravenösen Lösungen nachzuweisen.

Da sich *Limulus polyphemus* seit mehreren hundert Mio. Jahren kaum verändert hat, stellen LAST und LAST_MAM geeignete Untersuchungsobjekte dar, die Evolution von Astacin-ähnlichen-Proteasen mit MAM-Domäne zu analysieren. Aufgrund struktureller Homologien

die Metalloproteasen LAST und LAST_MAM der Astacin-Familie zuzuordnen. Während LAST wie Astacin über eine einfache Domänenstruktur bestehend aus Signal- und Propeptid, sowie eine Proteasedomäne verfügt, zeichnet sich LAST_MAM durch eine zusätzliche MAM-Domäne aus. Trotz der Kenntnis, dass die MAM-Domäne bei der Oligomerisierung der Meprine essentiell ist, ist ihre Funktion in LAST_MAM noch unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit ist es anhand phylogenetischer Untersuchungen gelungen nachzuweisen, dass LAST_MAM mit anderen Astacinen mit MAM-Domäne nicht unmittelbar verwandt ist. Diese divergente Entwicklung wurde nicht nur in Bezug auf die Protease, sondern auch für die MAM-Domäne selbst, bestätigt. Während LAST über den bei Proteasen weit verbreiteten Mechanismus der limitierten Proteolyse aktiviert wird, zeichnet sich LAST_MAM hier durch eine besondere Eigenschaft aus. Zwar besitzt LAST_MAM auch ein Propeptid, allerdings ist diese Protease bereits als Zymogen katalytisch aktiv. Diese Eigenschaft ist bei Astacinen bisher einzigartig. Eine Inkubation mit Trypsin hatte die Abspaltung der MAM-Domäne und des Propeptids zur Folge, wobei die katalytische Aktivität hiervon unbeeinflusst blieb. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass LAST_MAM ubiquitär im Pfeilschwanzkrebs vorkommt, wobei die Expressionsrate abhängig vom Gewebe ist. Da beide Proteasen Komponenten der extrazellulären Matrix spalten können, liegt eine Beteiligung an der Gewebsdifferenzierung nahe. LAST wurde am stärksten im Auge exprimiert, schwächer auch im Gehirn und Proventrikulus. Dies deutet auf eine neuronale Funktion hin.

2.1.1.3 Tolloide und BMP1

Derzeit sind auf Proteinebene 4 humane Tolloide bekannt: *Bone morphogenetic protein1* (BMP1), *mammalian tolloid* (mTLD) sowie *mammalian tolloid like-1* und *mammalian tolloid like -2* (mTLL-1,-2). Bei BMP1 und mTLD, auch bekannt als *procollagen C-proteinases* (pCP)-1 und -2 handelt es sich um von einem Gen transkribierte Splicevarianten (Takahara, Kessler et al. 1994). Im Gegensatz dazu sind mTLL-1 und mTLL-2 Produkte verschiedener Gene. Tolloide werden als inaktive Zymogene exprimiert, wobei das Propeptid bereits im Golgi-Apparat von Furin-ähnlichen Proteasen abgespalten wird, was die Sezernierung aktiver Proteasen aus der Zelle zur Folge hat (Leighton and Kadler 2003).

Bei BMP1 folgt dem N-terminalen Propeptid die Astacin-ähnliche Proteasedomäne, die anders als Astacin 6 statt 4 Cysteine enthält, und dessen konservierter Tyrosinrest aus dem Methionin-*turn*, im Gegensatz zu Astacin, vermutlich nicht an der Zinkbindung beteiligt ist, da die Röntgenstrukturanalyse einen zu großen Abstand zwischen den beiden Bindungspartnern offenbart (Mac Sweeney, Gil-Parrado et al. 2008). Es folgen 2 CUB (*domain found in proteins of the complement system, sea urchin EGF and BMP1* (Bork and Beckmann 1993))-Domänen, eine EGF (*epidermal growth factor*), eine weitere CUB-Domäne

und zuletzt der C-Terminus. Hiermit unterscheidet sich BMP1 von den übrigen humanen Tolloiden, die am C-Terminus über eine weitere EGF-, sowie 2 CUB-Domänen verfügen. Diese Domänen sind bei der Substraterkennung von großer Bedeutung. Experimente mit trunkierten BMP1-Mutanten ergaben, dass insbesondere das Vorhandensein der CUB2-Domäne für die Prokollagen C-Protease-Aktivität essentiell ist (Hartigan, Garrigue-Antar et al. 2003; Hintze, Howel et al. 2006).



Abbildung 7: Domänenstruktur der humanen Tolloide: P: Propeptid; astacin: astacin-ähnliche-Potease-Domäne, CUB: domain found in proteins of the complement system, sea urchin EGF and BMP1-Domäne, EGF: Epidermal-growth-factor-like-Domäne, C.Cytosolische Domäne.

2.1.1.3.1 Substrate von BMP1

Im Menschen werden Tolloide in diversen Organen exprimiert. Hierzu gehören u.a. Leber, Niere, Skelettmuskulatur, Lungen und das Herz. Die Spleißvarianten mTLL-1,-2 und mTL konnten darüber hinaus im Gehirn nachgewiesen werden (Takahara, Lyons et al. 1994). Desweiteren kommt BMP1 in Geweben vor, die die fibrillären Kollagene I und II exprimieren. Osteoblasten, Chondrozyten und auch Fibroblasten sezernieren BMP1 und Kollagene in die ECM, wo das Enzym durch Abspaltung des Prokollagen C-Propeptids an der Reifung der fibrillären Kollagene entscheidend mitwirkt (Kessler and Adar 1989). Die Lysyl-Oxidase, die die Fibrillenassemblierung von Kollagenenfibrillen katalysiert, wird ebenfalls von BMP1 aktiviert (Cronshaw, Fothergill-Gilmore et al. 1995). BMP1-Substrate beschränken sich allerdings keineswegs ausschließlich Bestandteile der ECM. Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren, wie TGF β (Miyazono 1997; Massague 1998), oder auch das Myostatin, ein weiterer Vertreter aus der TGF β –Familie, von BMP1 durch limitierte Proteolyse aktiviert wird (Wolfman, McPherron et al. 2003).

Die große Anzahl der bisher identifizierten BMP1-Substrate und die Analyse entsprechender Schnittstellen ermöglichte es, eine Spaltspezifität für BMP1 zu definieren (Abb.8) In der P1-Position d.h. als erste Aminosäure N-Terminal der Schnittstelle werden vermutlich aus sterischen Gründen kleine Aminosäuren bevorzugt. Hierzu gehören Glycin, Alanin und Serin. Dies konnte auch mit durch die Röntgenkristallstrukturanalyse belegt werden (Mac Sweeney, Gil-Parrado et al. 2008). C-Terminal der Schnittstelle also in der P1'-Position ist eine deutliche Präferenz für die Aminosäure Aspartat vorhanden.

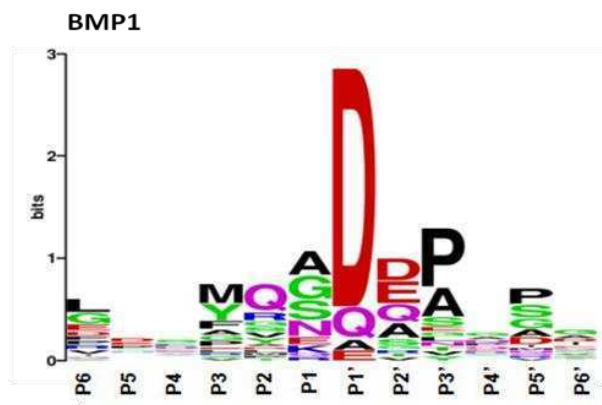


Abbildung 8: BMP1 Spaltspezifität (<http://merops.sanger.ac.uk/>). P6-P1 (Non-prime) indizieren die Positionen der Aminosäuren N-terminal der Schnittstelle, P1'-P6' (prime) entsprechend die Positionen C-terminal der Schnittstelle. Bei der Proteolyse wird die Peptidbindung zwischen P1 und P1' hydrolysiert. Die Größe der Buchstaben ist hierbei ein Maß für die Aminosäurepräferenz in der jeweiligen Position. BMP-1 hat eine besondere Präferenz für Aspartat (D) in der P1'-Position.

2.1.1.3.2 Regulation der Prokollagen C-Proteinase-Aktivität

In seiner Funktion als Prokollagen C-Proteinase wird die BMP1-Aktivität streng reguliert. In Bezug auf die Substrate Kollagen I-III zeigt BMP1 für sich allein eine geringe basale Aktivität. Dies mag der Grund sein warum mit Ausnahme von α_2 -Macroglobulin, einem Proteaseinhibitor aus dem Blutplasma, das neben einer Vielzahl an Metalloproteasen auch Cystein-, Aspartat-, und Serinproteasen unspezifisch hemmt, bis dato noch kein spezifischer endogener Inhibitor für diese Reaktion gefunden worden ist (Zhang, Ge et al. 2006). In Anwesenheit des Prokollagen C-Proteinase enhancers (PCPE) 1 und 2 erreicht BMP1 eine katalytische Geschwindigkeit, welche die basale Umsatzrate, bis um das 20-fache steigert (Kessler and Adar 1989; Steiglitz, Keene et al. 2002). Interessanterweise vermag PCPE, das an sich keine katalytische Aktivität besitzt, die BMP1 Aktivität nur zu steigern, wenn es sich beim Substrat um die Prokollagene I-III handelt. Der Umsatz anderer Substrate wird von PCPE nicht beeinflusst. Dies gilt auch für die N-terminale Prozessierung von Prokollagen V, sowie die C-terminale Prozessierung von Prokollagen VII (Moali, Font et al. 2005). Zu erklären ist diese Beobachtung damit, dass die verstärkte BMP1-Aktivität von einer PCPE/Substrat- Interaktion abhängig ist (Bernocco, Steiglitz et al. 2003). Die PCPE/Substrat-Interaktion bewirkt dabei eine Konformationsänderung des Substrats, d.h. des fibrillären Kollagens, was den Zugang zur Schnittstelle erleichtert (Ricard-Blum, Bernocco et al. 2002). Im Einklang hiermit steht, dass Meprin in seiner Funktion als Prokollagen C-Protease von PCPE im Gegensatz zu BMP1 konzentrationsabhängig inhibiert wurde. Die Inhibition nahm dabei bis zu einem Substrat/PCPE-Verhältnis von 1:1 zu

(Kronenberg, Bruns et al.). Dies deutet auf eine Behinderung zur Schnittstelle durch die Substrat/PCPE Interaktion hin.

2.1.2 Adamalysine

Adamalysine, auch Reprolysin, in Säugetieren ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) genannt, zeichnen sich, wie der Name schon sagt durch ihre Disintegrin-ähnliche Domäne aus (Jia, Shimokawa et al. 1996). In Schlangengiften vorkommende Proteasen (*snake-venom metalloproteinases*: SVMs) gehören häufig dieser Proteasefamilie an und sind u.a. charakterisiert durch ihre Fähigkeit Bestandteile der extrazellulären Matrix, insbesondere im Umfeld von Kapillaren zu degradieren, was zur großflächigen Gewebenekrose führt. Zusätzlich hat die Disintegrin-Domäne hämorrhagische Eigenschaften, was darin resultiert, dass das Beutetier innerhalb kürzester Zeit verblutet (Bjarnason and Fox 1994). In Säugetieren unterscheidet man zwei Familien; die membrangebundenen ADAMs und die ADAMTS, die C-terminal über repetitive Thrombospondin 1 ähnliche Domänen anstelle der Transmembranregion verfügen und deshalb in die extrazelluläre Matrix sekretiert werden. Zu den bekanntesten und am besten erforschten physiologischen Funktionen der ADAMs zählen die Prozessierung des *amyloid precursor proteins* (APP), sowie des Transmembran-Rezeptorproteins Notch, was durch ADAM-17, auch TACE (*Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme*) genannt, und ADAM-10 bewerkstelligt wird. Die Prozessierung von Notch nach der Bindung seines Liganden steht am Anfang einer konservierten Signaltransduktionskaskade, die bei allen Vertretern der Metazoa, bei wichtigen physiologischen Ereignissen, wie z.B. der neuronalen Entwicklung eine tragende Rolle spielt (Muraguchi, Takegami et al. 2007). Interessanterweise sind einige Mitglieder der ADAMs proteolytisch inaktiv. Diese Vertreter haben dennoch wichtige Funktionen bei der Zelladhäsion, was durch ihre Disintegrin-Domäne vermittelt wird (Blobel and White 1992; Edwards, Handsley et al. 2008).

Proteasen aus der ADAMTS-Unterfamilie verfügen über keine Transmembran-Domäne und liegen daher frei löslich oder mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix assoziiert vor. Sie werden als inaktive Zymogene sezerniert und bis auf ADAMTS-4 von Furin-ähnlichen Proprotein-Konvertasen aktiviert. Zu ihren Substraten zählen diverse Strukturproteine der extrazellulären Matrix. ADAMTS 2, 3 und 14 sind an der N-terminalen Prozessierung fibrillärer Kollagene I-III beteiligt.

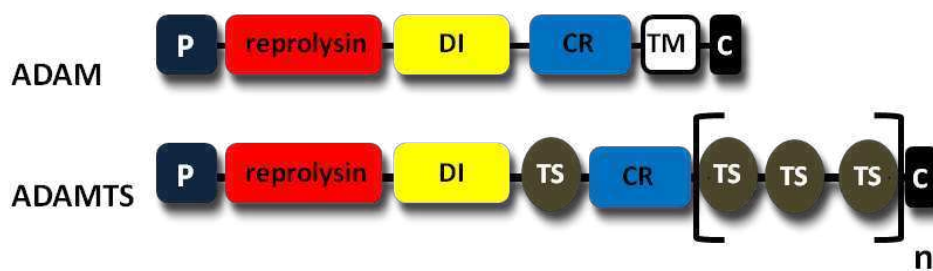


Abbildung 9: Domänenstruktur der Adamalysine: P:Propeptid; reprolysin: katalytische Domäne; DI: Disintegrin-Domäne; CR: Cystein reiche Domäne; TM: Transmembrandomäne, TS: Thrombospondin-1-like repeats-Domäne; C: C-terminale-Domäne.

2.1.3 Matrix-Metalloproteasen

Matrix-Metalloproteasen (MMPs), auch bekannt als Matrixine sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Hierzu gehören u.a. der Abbau der extrazellulären Matrix, die Wundheilung und die Aktivierung von Wachstumsfaktoren (Nagase, Visse et al. 2006). Erst durch MMP-vermittelten Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, erlangen Immunzellen, Stammzellen und Fibroblasten, während physiologischer Prozesse wie Wundheilung und Gewebsumstrukturierung ihre Migrationsfähigkeit. Durch diese Eigenschaft werden Matrix-Metalloproteasen auch mit pathologischen Zuständen, wie etwa bei der Tumorentstehung sowie der Metastasierung in Verbindung gebracht (Nagase and Woessner 1999). Wie viele andere Proteasen, werden auch MMPs als inaktive Zymogene exprimiert. Die N-terminale Pro-Domäne verhindert hierbei sterisch den Zugang zum katalytischen Zentrum. Unter den 28 humanen MMPs finden sich die einzigen im humanen Proteom bekannten Metalloproteasen, MMP1, MMP8 und MMP13, die in der Lage sind natives fibrilläres Kollagen zu schneiden. Der Hemopexin-Domäne, die sich bei nahezu allen MMPs findet, außer MMP7 und MMP26, wird eine tragende Rolle beim Entwinden der tripelhelikalen Struktur von Kollagenen zugeschrieben (Nagase, Visse et al. 2006).

2.1.3.1 Matrix-Metalloproteasen in der Haut

In Bezug auf die Homöostase in gesunder Haut erfüllen MMPs wichtige Funktionen. Insbesondere MMP1 ist in seiner Funktion als Kollagenase einer der wichtigsten katabol wirkenden Faktoren zu werten. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen anabolen Prozessen wie der Proliferation und der Bildung extrazellulärer Matrix und katabolen Prozessen wie dessen Abbau und Apoptose führt unweigerlich zu pathologischen Zuständen. Folglich ist die Kontrolle von MMP1-Aktivität auf Expressionsebene aber auch posttranslational von immenser Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Integrität der extrazellulären Matrix. Eine übermäßige Anhäufung extrazellulärer Matrix in keloidaler Dermis scheint u.a. abhängig von

MMP1-Aktivität zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate von MMP1 und MMP3 in Dermis keloidaler Herkunft stark vermindert war (Smith, Boone et al. 2008). Das fragile Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Ereignissen in der Dermis ist hierbei in besonderem Maße abhängig von epidermal sezernierten Faktoren, wie z.B. TGF β 1. In diesem Zusammenhang erhöhte eine verzögerte Reepithelisation im Verlauf einer Wundheilungskaskade in humaner Haut die Wahrscheinlichkeit der Bildung einer hypertrophen Narbe signifikant (Machesney, Tidman et al. 1998).

Im Folgenden wird zunächst Kollagen, als quantitativ bedeutendste Komponente der ECM sowie als Substrat für MMPs, BMP1 sowie Meprin beschrieben. Desweiteren wird auf Stratifin, IGFBP3 und FGF19 eingegangen. Als Substrate von Meprin in humaner Haut haben diese potentiell regulativen Einfluss auf die Expression und Aktivität von MMP1 in der Dermis.

2.2 Kollagene und Kollagenassemblierung

Kollagene machen als Strukturproteine 25-35 % aller Proteine im menschlichen Körper aus. Ihre, wenn auch nicht alleinige Aufgabe, besteht darin Geweben Zugfestigkeit zu verleihen. Per Definition gehören Proteine zu den Kollagenen, wenn sie mindestens eine tripel-helikale Region aufweisen. Bisher wurden 28 humane Kollagene identifiziert (Kadler, Baldock et al. 2007). Kollagene sind homo- oder heterotrimere Proteine, die aus Untereinheiten, den sogenannten α -Ketten bestehen. Jede α - Untereinheit bildet für sich eine linksgängige Helix. Die drei α -Ketten winden sich umeinander zu der charakteristischen rechtsgängigen Tripel-Helix. Ermöglicht wird diese einzigartige raumsparende Anordnung durch eine besondere Primärstruktur. Häufig ist hierbei das konservierte repetitive Motif: Gly-Xaa-Yaa, wobei Xaa häufig ein Prolin und Yaa ein Hydroxyprolin ist. Die quantitativ wichtigsten fibrillären Kollagene sind hierbei Kollagene des Typ I (Vorkommen in praktisch allen Bindegeweben außer Knorpel), II (Knorpel und Glaskörper des Auges) und III (embryonale Haut, Lunge, Narben, dehnbares Bindegewebe und Gefäße) (Hulmes 2008).

2.2.1 Biosynthese und posttranslationale Modifikation fibrillärer Kollagene

Schon während der Translation werden Kollagenvorläuferketten ins raue endoplasmatische Retikulum (RER) geschleust. Zu den wichtigsten Modifikationen, denen sie im ER unterworfen werden, gehören die Hydroxylierung der Prolin-, aber auch einiger Lysinreste. Das Hydroxyprolin trägt durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie die charakteristische unflexible, sperrige Konformation zur Stabilität der Tripelhelix bei. Hydroxylysine sind Ziele für O-Glykosylierung. Weitere Modifikationen im ER umfassen die Trimerisierung, Knüpfung von Disulphidbrücken und Proteinfaltung. Die im rauhen ER begonnene N-Glykosylierung wird anschließend im Golgi-Apparat vollendet.

Fibrilläre Kollagene werden in Form von löslichem Prokollagen synthetisiert. N- und C-terminale Propeptide vermitteln u.a. die Löslichkeit und werden zur weiteren Reifung proteolytisch entfernt. Bei den Kollagenen des Typs I-III wird die N-terminale Abspaltung des Propeptids von Vertretern der ADAMTS Familie (ADAMTS 2, 3 und 14) durchgeführt. Die C-terminale Prozessierung wird hierbei durch tolloid-Proteasen bewerkstelligt, zu denen auch BMP1 (*Bone morphogenetic protein1*) zählt (Canty and Kadler 2005). Die proteolytische Entfernung des C-terminalen und des N-terminalen Propeptids ermöglicht eine spontane Assemblierung des sogenannten Tropokollagens zu Fibrillen. Durch die charakteristische Versetzung der Monomere zueinander, entsteht das mikroskopische Erscheinungsbild von Bändern in den Polymeren. Für die Assemblierung reicht schon die Abspaltung des größeren C-terminalen Propeptids. Der kleinere N-Terminus beeinflusst die Form und Funktionalität der Fibrillen (Chapman 1989; Hulmes, Kadler et al. 1989; Linsenmayer, Gibney et al. 1993; Birk 2001; Hulmes 2002). Das Ausbleiben der N-terminalen Prozessierung geht einher mit der Entwicklung eines pathologischen Zustands, genannt Ehlers Danlos Syndrom Typ 7 (Smith, Wertelecki et al. 1992).

Nach erfolgter Aggregation, findet zur Erlangung zusätzlicher Festigkeit die Quervernetzung der Kollagenfibrillen statt. Hierbei werden die Endregionen zweier Tropokollagene miteinander verknüpft. Das Enzym Lysyl-Oxidase desaminiert hierbei Lysylseitenketten. Das verbleibende reaktive Aldehyd Allysin kann jetzt zusammen mit einem Histidinrest und einem Hydroxylysin kovalent verbunden werden.

2.3 Stratifin

Stratifin auch bekannt als 14-3-3 σ Protein, ist ein ubiquitär exprimiertes und als Dimer regulatorisch aktives Protein. Es gehört zu der Familie der 14-3-3 Proteine, zu deren Liganden diverse Kinasen, Phosphatasen und Transmembranrezeptoren zählen. Durch diese Interaktionen spielen 14-3-3 Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose aber beeinflussen auch die mitogen-induzierte Signaltransduktion (Fu, Subramanian et al. 2000). 14-3-3 Proteine binden ihre Liganden mit Hilfe der konservierten Erkennungssequenz **RSxpSxP**. Die Aminosäure Serin liegt hierbei vorwiegend phosphoryliert vor (Muslin, Tanner et al. 1996). Obwohl inzwischen über 100 intrazelluläre Liganden beschrieben worden sind, ist über potentielle Aufgaben außerhalb der Zelle immer noch wenig bekannt (Pozuelo Rubio, Geraghty et al. 2004). 14-3-3 ϵ und 14-3-3 σ wurden bereits 1999 im Überstand von in Kultur gehaltenen Keratinozyten entdeckt wurde, allerdings konnte extrazellulärem Stratifin erst 2004 eine wichtige Eigenschaft zugeordnet werden (Ghahary, Karimi-Busheri et al. 2004; Ghaffari, Kilani et al. 2009). Hierbei wurde von Keratinozyten sezerniertes Stratifin, als ein wesentlicher Faktor beschrieben, der in dermalen

Fibroblasten signifikant die Expression von MMP1 erhöht. Insofern scheint Stratifin als antifibrotischer Faktor eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in der menschlichen Haut zu erfüllen.

2.4 IGFBP3

Insulin-like-growth-factor-binding-protein 3 (IGFBP3) ist ein Mitglied einer Familie, die 7 IGFBPs umfasst, die IGF (*Insulin-like-growth-factor*) mit großer Affinität binden können (Firth and Baxter 2002). Die Aktivität des Wachstumsfaktors IGF wird weniger über die Menge an IGF, sondern größtenteils durch die Interaktion mit verschiedenen IGFBP-Proteinen gewährleistet. Die Bindung von IGFBPs an IGF verlängert zum einen die Halbwertszeit von IGF und beeinflusst dadurch auch die Affinität an den IGF-Rezeptor IGFR1 (Butt, Firth et al. 2000). IGFBP3 ist das am häufigsten vorkommende Bindeprotein der IGFBP-Familie. 75-80% des im Serum vorhandenen IGF-I und IGF-II liegt zusammen mit IGFBP3 und dem Glykoprotein ALS gebunden als Heterotrimer vor (Baxter, Martin et al. 1989). Da viele verschiedene IGFBP-Proteine simultan in verschiedenen Geweben exprimiert werden, ist ihre Kontrolle in Anbetracht IGF aktivierter Signalwege von höchster Bedeutung. Während die Expression einiger IGFBPs direkt von ihrem Liganden IGF-1 kontrolliert wird, wird ihre Aktivität auch durch postrtranslationale Modifikationen moduliert. Hierzu zählen die Phosphorylierung durch Kinasen und limitierte Proteolyse (Camacho-Hubner, Busby et al. 1992). Proteasen können IGFBPs prozessieren und die Freisetzung von IGF begünstigen. Es wurde allerdings auch beobachtet, dass IGFBP Spaltprodukte mit verringerter bzw. aufgehobener Affinität zu IGF, IGF vermittelte Proliferation zum Erliegen brachten (Lalou, Lassarre et al. 1996; Firth and Baxter 2002). Zu den bekannten Proteasen, die im Stande sind IGFBP3 zu spalten, gehören u.a. die Metalloproteasen MMP1, MMP2, MMP3 und die Serinprotease Plasmin (Firth and Baxter 2002). Bei pathologisch, fibrotischen Zuständen, die durch übermäßige Proliferation und extensiver Produktion und Sezernierung von Kollagenen gekennzeichnet sind, weichen Expressionsraten verschiedener IGFBPs deutlich von der Norm ab. Fibroblasten aus Keloiddermis beispielweise exprimieren vermehrt IGFBP 2, 5 und 7, während die Expression von IGFBP3 signifikant reduziert war (Smith, Boone et al. 2008). Eine vergleichbare Reduzierung konnten Phan et al. in Fibroblasten aus Keloiddermis beobachten, sofern diese mit Keratinozyten kokultiviert wurden, die auch aus Keloiden stammten (Phan, Lim et al. 2003).

2.5 FGF19

Humanes FGF19 (*Fibroblast-growth-Factor19*) ist eines der 22 im Menschen identifizierten FGFs. Diverse Funktionen bei Zellmigration, -Proliferation und -Differenzierung in verschiedenen Zelltypen konnten dieser Familie von Wachstumsfaktoren zugeordnet werden (Ornitz and Itoh 2001). Darüber hinaus konnte in humanen Hepatozyten und in der Mäuseleber FGF19 eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der Gallensäuresynthese zugeschrieben werden (Holt, Luo et al. 2003). Die Aktivierung des FXR (farnesoid X receptor)-Rezeptors durch Gallensäure reduziert die Expression des Enzyms cholesterin 7 α -hydroxylase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Umsetzung von Cholesterin zu Gallensäuren, wodurch die Synthese von Gallensäuren im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Die Aktivierung von FXR steigerte auch die Expression von FGF19, das wiederum JNK (c-Jun N-terminal Kinases) und MAPK (mitogen activated protein kinases) vermittelt die Expression des FXR- Rezeptors herunterreguliert. FGF19 ist somit als Bestandteil eines autonomen Rückkopplungsmechanismus an der Homöostase in der Leber beteiligt. Experimente mit konstitutiv FGF19 überexprimierenden Mäusen, zeigten einen erhöhten Metabolismus, sowie einen verringerten Anteil von adipösem Gewebe (Tomlinson, Fu et al. 2002). Normalerweise wirken FGFs parakrin an epithelial/mesenchymalen Grenzen. FGF19, -21, und -23 besitzen als einzige der Familie keine Bindedomäne für die Glycosaminoglykane Heparin und Heparansulfat. Hierdurch sind diese FGFs befähigt ihre Wirkung auch über größere Distanzen endokrin zu entfalten, und werden nicht nahe der Zelloberfläche von Heparin oder Heparansulfat gebunden. Dies geschieht durch die Bindung an eines der 4 bekannten FGF-Rezeptoren FGFR1-4 (Jones 2008). Hierbei handelt es sich um membrangebundene Rezeptortyrosinkinasen. FGF19 bindet vorwiegend an FGFR4 wodurch eine mitogene Signalkaskade ausgelöst wird (Jones 2008).

3. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (D-Taufkirchen), Roth (D-Karlsruhe), Applichem (D-Darmstadt) und wurden in den höchstmöglichen Reinheitsgraden erworben. Das für die Arbeiten erforderliche Wasser (ddH₂O) wurde mit der MilliQ RD-Anlage von Millipore (D-Eschborn) gewonnen und für die Arbeiten mit DNA und RNA wurde Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser (Fa. Roth, D-Erlangen) verwendet.

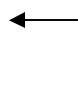
3.1 RNA Isolation und RT-PCR

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus primären HDFa (*human derived fibroblasts adult*) Zellen (Invitrogen) wurde „E.Z.N.A. Total RNA Isolierungskit“ (Fa. Peqlab, D-Erlangen) verwendet und alle Arbeitsschritte entsprechend der Arbeitsanweisung des Herstellers durchgeführt. Es wurden ausschließlich RNase freie Reaktionsgefäße (Fa. Sarstedt, D-Nümbrecht) sowie RNase-freie Pipettenspitzen (Fa. Peqlab, D-Erlangen) verwendet. Sämtliche Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O) (Fa. Roth, D-Karlsruhe) angesetzt. Diethylpyrocarbonat wirkt als Ribonuklease-Inhibitor. Äquivalente Mengen an RNA wurden in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden für ein Reaktionsvolumen von 25 µl zunächst bis zu 13 µl RNA-Lösung und unspezifische 1 µl oligo d(T)primer (10 mM; Roth) zusammenpipettiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 65°C. Nach der folgenden Applikation von RNase inhibitor (30 u/µl), dNTPs (200 µM), MMLV-Reverse Transcriptase (200 U/µl) (New England Biolabs) wurde die Lösung in einem Thermocycler 1h bei 40°C gefolgt von 5 min bei 95°C inkubiert.

Bei der folgenden PCR wurden mit 1 µl der neu synthetisierten cDNA mit 2.5 u *Taq* Polymerase (New England Biolabs), 200 µM dNTP-Mix, 0.2 pM je Primer (Biomers) in einem Thermocycler nach folgendem PCR-Protokoll verfahren:

Tabelle 1: PCR-Protokoll

| | | | |
|----|------------------------|--------------|--------|
| 1. | Initiale Denaturierung | 94 °C | 5 min |
| 2. | Denaturierung | 94 °C | 1 min |
| 3. | Annealing | 50- 55 °C | 45 sec |
| 4. | Elongation | 72 °C | 60 sec |
| 5. | Terminale Elongation | 72 °C | 5 min |



Dabei fanden folgende Primerpaare Verwendung:

Hs_MMP-1: sense 5'-AGAAAGCCTTCCAACCTGG-3'
 antisense 5'-TTTCCTGCATTGAACCAGC-3'
 hs_merin α : sense 5'-AAGTCGCACACATCTCCAGC-3'
 antisense 5'-GATCACCATGCCAGGACAC-3'
 hs_merin β : sense 5'-CACTGGGAGCTGGCAACTTT-3'
 antisense 5'-GTTCCATAGCCCCACCTCT-3'

3.2 Agarose Gelelektrophorese

PCR-Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein 1 %iges Agarosegel angefertigt. 0,6 g Agarose (Agarose MP, Fa Applichem, D-Darmstadt) wurden in 60 ml 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) in einem Mikrowellenherd erhitzt, bis sich die Agarose vollständig auflöste. Vor dem Erkalten des Gels wurden 2 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Proben mit 3 μ l Auftragspuffer (10x) versetzt und 22 μ l des Ansatzes auf das Gel aufgetragen. Beim Laufpuffer handelte es sich ebenfalls um 1x TAE.

Tabelle 2: Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

| Reagenzien | Zusammensetzung |
|--|--|
| 1 x TAE-Puffer | 0,04 M Tris 0,001 M EDTA pH 8,0 mit Eisessig einstellen |
| 10 x DNA-Probenpuffer | 1 % (w/v) SDS 50 % (w/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau |
| Ethidiumbromidlösung Endkonzentration: 0,5 μ g/ml | 1,5 μ l 1 % (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung in 60 ml Gellösung |

3.3 Proteinexpression und Insektenzellkultur

3.3.1 Baculovirus-Expressionssystem

Bei der Expression von Meprin α und der Meprin β *tail-switch* Mutante fand das Baculovirus-Expressionssystem Verwendung (Invitrogen, D-Karlsruhe). Baculoviren sind doppelsträngige DNA-Viren, welche ausschließlich Arthropoden befallen und somit für Menschen als ungefährlich einzustufen sind. Genetisch veränderte Baculoviren, wie das hier verwendete *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis virus* (AcNPV) sind in der Lage, eine in die Viren-DNA integrierte Meprin cDNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Trotz der im Vergleich mit bakteriellen Expressionssystemen niedrigen Ausbeute an rekombinantem Protein, wurde diesem heterologen Expressionssystem, aufgrund herausragender Vorteile der Vorzug gegeben. Da es sich bei der Wirtszelle um eine eukaryotische Zelle handelt, ist diese zu postranslationellen Modifizierungen, wie der Ausbildung von Disulfidbrücken und Glykosylierungen, sowie einer gezielten Sezernierung des Proteins in den extrazellulären Raum befähigt.

Meprin α -und Meprin β cDNA lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits im Expressionsvektor pFastBac1 vor. Vor dem Inserierungslokus besitzt dieser Vektor einen starken baculoviruspezifischen Polyhedrin-Promotor, wodurch eine effektive Transkription der Meprin α –bzw. Meprin β cDNA ermöglicht wird. Mit Hilfe einer Hitzeschocktransformation wurden die Plasmide in DH10Bac *E.Coli* Zellen eingebracht. Diese Zellen verfügen neben ihrem bakteriellen Genom über die virale DNA, das Bacmid, (bMON14272), sowie das Helferplasmid (pMON7124), das für eine Transposase und ein Tetrazyklin-Resistenzgen codiert. Die Transposase bewirkt die Transposition des DNA-Fragments, inklusive des Meprin-Gens zwischen den Transpositionserkennungssequenzen Tn7R und Tn7L aus dem Vektor in das Bacmid. Hierbei unterbricht das Fragment, das zusätzlich ein Gentamycin-Resistenzgen enthält, ein LacZ Gen am Inserierungslokus des Bacmids, wodurch eine Blau-Weiß-Selektionierung zur Identifizierung rekombinanter DH10Bac-Zellen möglich wird. Ein Kanamycin-Resistenzgen, welches vom Bacmid codiert wird, verleiht den rekombinanten DH10Bac-Zellen eine Dreifachresistenz gegenüber den Antibiotika Tetrazyklin, Gentamycin und Kanamycin.

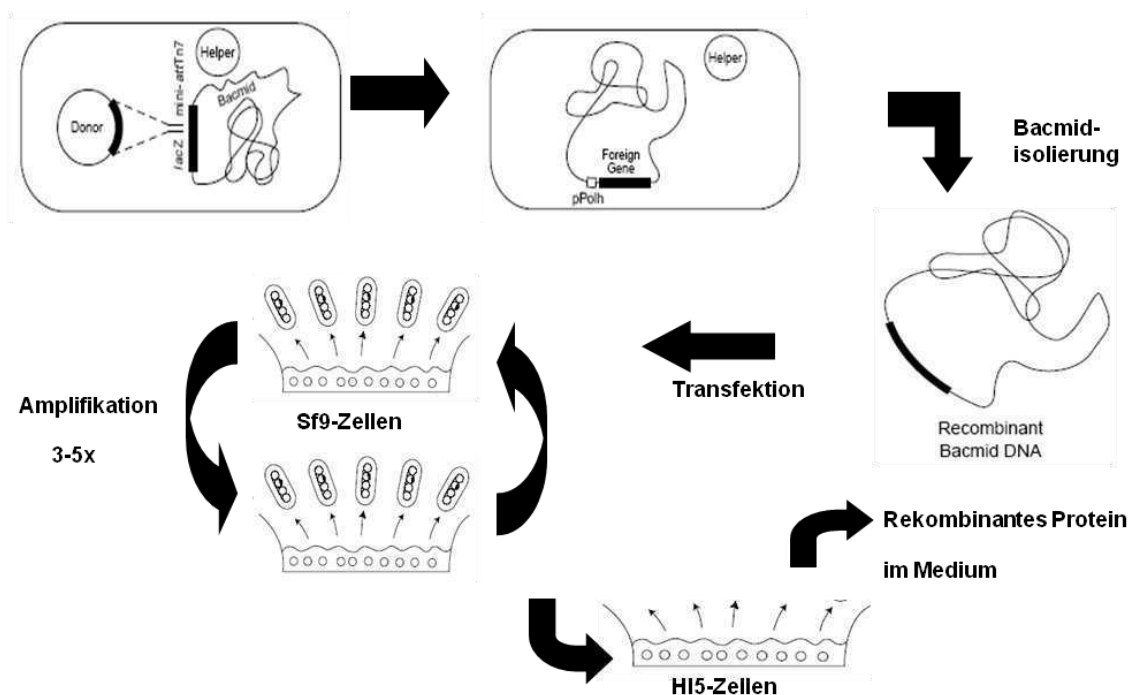


Abbildung 10: Überblick Baculovirus-Expressionssystem (Bac-To-Bac-Handbuch, Invitrogen, D-Karlsruhe)

3.3.2 Hitzeschocktransformation und Transposition

Zur Vervielfältigung des Plasmids pFastBac1 mit einkloniertem Mepri-Gen wurde eine Hitzeschocktransformation von JM109 *E.Coli* Zellen mit anschließender Kultivierung über Nacht durchgeführt. 100 µl kompetente *E.coli* JM 109 Zellen (JM109 *High Efficiency Competent Cells*; Promega, Mannheim) wurden auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng DNA sorgfältig gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch in einem Wasserbad für 45 s auf 42°C erwärmt und sofort auf Eis abgekühlt. Der induzierte Hitzeschock bewirkt ein aktives Aufnehmen von Nukleinsäuren in die Zellen. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 3 h auf einem Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden danach 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. 900 µl des Mediums wurden abgenommen und die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurde auf eine ampicillinhaltige (100 µg/ml Endkonzentration) LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert.

Zur Erzeugung rekombinanter Bacmide wurde eine Transposition durchgeführt. 100 µl DH10bac-Zellen (Invitrogen, D-Karlsruhe) wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 ng des rekombinanten, aufgereinigten Plasmids vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 s auf 42 °C erwärmt und sofort auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde daraufhin mit 900 µl SOC-Medium versehen und 5 h auf einem Schüttler bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit fand die eigentliche Transposition statt.

Daraufhin wurde der Ansatz für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. 900 µl des Mediums wurden abgenommen und verworfen. Das Bakterienpellet wurde resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, die die Antibiotika Tetrazyclin, Kanamycin und Gentamicin sowie die Zusätze IPTG und X-Gal enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die folgende Kultivierung wurden weiße Kolonien verwendet. Nur bei nicht rekombinanten Bacmiden wurde dabei das farblose X-Gal durch das Enzym β -Galaktosidase zu Indoxyl umgesetzt, das wiederum zum blauen 5,5-dibrom-4,4-dichlorindigo oxidiert.

Antibiotika sowie Reagenzien für die Blau-Weiß-Selektionierung und effektive Konzentrationen in den Medien:

| | |
|-------------------|----------|
| Ampicillin (Amp) | 50 µg/ml |
| Kanamycin (Kan) | 10 µg/ml |
| Tetrazyclin (Tet) | 50 µg/ml |
| Gentamycin (Gen) | 7 µg/ml |
| X-Gal | 50 µg/ml |
| IPTG | 40 µg/ml |

3.3.3 Bakterienkultivierung

Zum Ansetzen der Übernachtskultur wurden je 5 ml LB-Medium mit Hilfe eines Zahnstochers mit Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Durch die Vermehrung der Bakterien wurden hierbei auch die durch die Transformation aufgenommenen Plasmide bzw. die neu generierten rekombinanten Bacmide vervielfältigt.

Tabelle 3: Materialien für die Bakterienkultivierung

| Medien | Zusammensetzung |
|---------------------------|--|
| LB-Agar | 1 % Agar (AppliChem, Darmstadt) ad 1 l LB Medium |
| LB (Luria-Bertani)-Medium | 0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton (AppliChem, Darmstadt) 1 % NaCl ad 1 l H ₂ O, autoklaviert |
| SOB Medium | 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl ad 980 ml H ₂ O, autoklaviert |
| SOC Medium | Zugabe von 1 ml 2 M Glucoselösung und 1 ml 1 M MgCl ₂ , sterilfiltriert (Filtermembran mit 0,22 µm Porendurchmesser, Sarstedt, D-Nümbrecht) ad 100 ml SOB-Medium |

3.3.4 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmide wurde das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB, Erlangen) gemäß des darin enthaltenen Protokolls verwendet. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde mit 50 µl DEPC H₂O eluiert. Nach der folgenden DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Plasmidlösung, bis zu ihrer Verwendung bei der Transposition bei -20 °C eingefroren.

3.3.5 Bacmidisolierung und –überprüfung

Zur Isolierung von Bacmiden wurde, wie auch bei der Plasmidisolierung, das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB, Erlangen) gemäß des darin enthaltenen Protokolls verwendet. Auch hier wurde mit 50 µl DEPC-H₂O eluiert.

Daraufhin wurde überprüft, ob die rekombinanten Bacmide, das Plasmidfragment, samt Meprin-DNA, die sogenannte Expressionskassette inseriert hatten. Der Inserierungsloкус des Bacmids wird flankiert von Bindestellen für die bacmidpezifischen Primer pUC/M13 *forward* und pUC/M13 *reverse*. Bei einer PCR wurde dieser Bereich amplifiziert. Amplifikate der Größe 300 bp indizierten dabei ein Bacmid ohne inserierte Expressionskassette, wobei Fragmente mit einer Größe von ca. 5Kb auf eine erfolgreiche Transposition hindeuteten.

Bei der Bacmidüberprüfung wurden folgende Primer verwendet:

pUC/M13 forward: 5´ - CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG – 3´

pUC/M13 reverse: 5´ - AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG - 3´

Tabelle 4: Bacmid-PCR-Ansatz (25 µl)

| Reagenzien | Volumen (µl) |
|-------------------------------|--------------|
| Template DNA | 1 |
| Taq Polymerase (NEB) | 0,5 |
| dNTP´s (10 mM) | 1 |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 1 |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 1 |
| 10 x Polymerase Buffer | 2,5 |
| dH ₂ O | 18 |

Tabelle 5: PCR-Protokoll zur Überprüfung der Bacmide

| Temperatur [°C] | Zeit | Anzahl der Zyklen |
|--------------------|--------|-------------------------|
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 45 s | 30 |
| 55 | 30 s | |
| 72 | 5 min | |
| 72 | 10 min | 1 |

3.3.6 Insektenzellkultur

Für die Proteinexpression kamen *Sf9*-Zellen aus dem Schmetterling *Spodoptera frugiperda*, sowie HighFive[®]-Zellen aus *Trichoplusia ni* (Invitrogen/ Gibco, D-Karlsruhe) zum Einsatz. Die *Sf9*-Zellen wuchsen adhärent in Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm²) bei 27 °C, bis sie eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Danach wurden sie mit einer 1:10 Verdünnung in Zellkulturflaschen mit frischem Vollmedium überführt. Für die Proteinexpression in den HighFive[®]-Zellen wurden eine Suspensionskultur mit ca. 450 ml Expressionsmedium in Fernbachkolben bei 27 °C auf einem Schüttler inkubiert, bis eine Zelldichte von 1,2 x10⁶ pro ml erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie mit 25 ml Quartärviren beimpft

3.3.7 Transfektion mit rekombinanten Bacmiden und Virenamplifikation

Für die Transfektion von *Sf9*-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen, wurde das Transfektionskit Nanofectin (PAA Laboratories GmbH; A-Pasching) nach Herstellerangaben verwendet. Nach 72 Stunden Inkubation bei 27 °C wurden die Stammviren abgenommen.

Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration bei der Expression zu gewährleisten, wurden die Primärviren amplifiziert. Hierfür wurden *Sf9*-Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgespült und danach 3 min bei 4000 x g zentrifugiert. 3-5 ml des Überstandes, die Virenstammlösung, wurden zu frischen *Sf9*-Zellen gegeben, sobald diese zu 80 % konfluent waren. Der Rest der Virenstammlösung wurde bei -20 °C gelagert. Nach einer 72-96 stündigen Inkubation im Brutschrank bei 27 °C wurde die Prozedur wiederholt, wobei der Überstand die Sekundärviren enthielt. Nach jeder Amplifikationsrunde war der Virentiter im Medium höher. Abschließend wurden 10 ml Quartärviren zum Beimpfen der HighFive[®]-Zellen verwendet.

Tabelle 6: Medien und Zusätze in der Insektenzellkultur

| Medien | Zusätze |
|---|--|
| Vollmedium: Graces Insect Medium (Invitrogen/ Gibco, D-Karlsruhe) sublementiert | 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10% FCS (Fötale Kälberserum) |
| Expressionsmedium: ExpressFive® SFM Serumfrei | 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 4 mM Glutamin |
| Transfektionsmedium: Grace's Insektenmedium | 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10% FCS (Fötale Kälberserum) |

3.3.8 Proteinreinigung und Aktivierung von Meprin α und β

3.3.8.1 Ammoniumsulfatfällung

Nach der Expression in HighFive® wurde die Zellsuspension für 20 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 g/l Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt, was einer Sättigung von 60% entsprach. Die Lösung wurde bei 8°C über Nacht gerührt. Abschließend wurde die Suspension 2 h bei 9000 g zentrifugiert, um das gefällte Protein zu pelettieren.

3.3.8.2 Dialyse

Nach einer Resuspension in 100 ml Waschpuffer, wurden die gefällten Proteine in einen Dialyseschlauch (Visking® MVCO 12000-16000 Serva Electrophoresis GmbH D-Heidelberg) überführt und mehrere Stunden bei 4°C gegen den Waschpuffer dialysiert. Hierdurch wurden niedermolekulare Bestandteile, insbesondere Ammoniumsulfat aus der Lösung entfernt. Danach wurde die Suspension 15 min bei 9000 U/min zentrifugiert, um Reste von ausgefallenem Protein zu entfernen.

3.3.8.3 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Pro-Meprin α wurde mit Hilfe der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Voss and Skerra 1997) gereinigt. Die Proteine wiesen eine als *Strep-tag* bezeichnete Aminosäuresequenz auf, die N-terminal der Propeptidsequenz integriert war. Die *Strep-tag* Sequenz besteht aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK) und bindet mit großer Affinität an das Säulenmaterial Strep-Tactin® Sepharose® (IBA, D-Göttingen). Während nicht erwünschte Proteine mit Hilfe des

Waschpuffers entfernt wurden, war Pro-Meprin α zu diesem Zeitpunkt fest an das Säulenmaterial gebunden. Der Waschvorgang wurde so lange durchgeführt, bis in den Waschfraktionen kein Protein mehr detektiert werden konnte. Zum Eluieren von Meprin α wurde das Säulenmaterial mit Elutionspuffer gewaschen. Das im Elutionspuffer gelöste Desthiobiotin, das eine noch größere Affinität zum Säulenmaterial besitzt, als der Strep-tag, verdrängte das Protein. Das Eluat mit dem Protein in Lösung wurde bei -80°C gelagert.

Tabelle 7: Puffer für die Meprin α -Reinigung

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------|--------------------------------------|
| Dialysepuffer | 100 mM Tris, pH 8,0 50 mM NaCl |
| Waschpuffer | 100 mM Tris, pH 8,0 50 mM NaCl |
| Elutionspuffer | 0,5 mg Desthiobiotin /ml Waschpuffer |

3.3.8.4 Nickel-NTA Affinitätschromatographie

Bei der Nickel-NTA (Nitrilotriacetat)-Affinitätschromatographie macht man sich die Wechselwirkung zwischen dem Histidin-tag, einer Abfolge von mehreren Histidinresten, die in das zu reinigende Protein eingefügt wurden und Nickel-NTA, welches gebunden an die Säulenmatrix vorliegt, zunutze. Im unbeladenen Zustand der Säule wird ein Ni^{2+} -Ion von den Acetatresten und dem dreifach gebundenen Stickstoff des Nitrilotriacetats, sowie zwei Wassermolekülen komplexiert. Bei Beladung der Säule, werden diese Wassermoleküle, durch zwei aufeinanderfolgende

Histidinreste des His-Tags, aufgrund ihrer höheren Affinität zum Ni^{2+} -Ion verdrängt.

Nach der Beladung der Säule über Nacht, wurde diese mit dem Waschpuffer so lange gewaschen, bis in den Waschfraktionen kein Protein mehr detektierbar war. Der Waschpuffer enthält Imidazol welches als Histidinanalog unspezifische Bindungen von der Säule verdrängt. Bei der Elution wird die Imidazolkonzentration soweit erhöht, dass das über den His-tag gebundene Protein von der Matrix getrennt wird. Meprin β wurde zuletzt umgepuffert (50 mM HEPES, pH 7,5) und bei -80°C weggefroren.

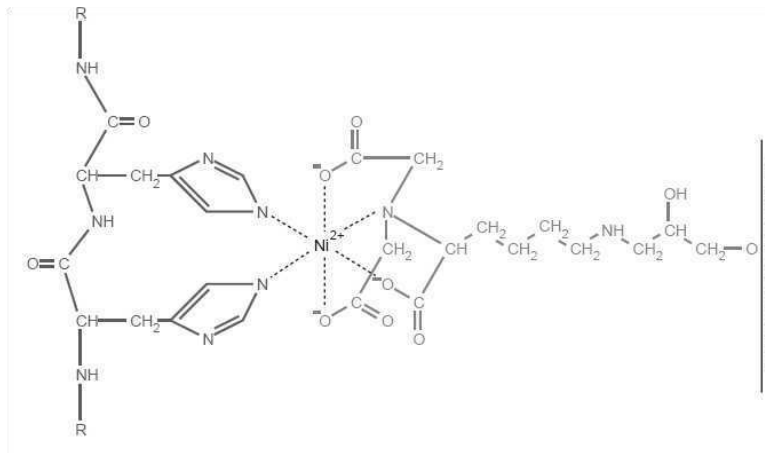


Abbildung 11: Prinzip der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie: Histidinreste des His-Tags komplexieren zusammen mit den Acetatresten und dem Stickstoff des Nitrilotriacetats ein Ni^{2+} -Ion (Quiagen Experimentator).

Tabelle 8: Puffer für die Meprin β -Reinigung

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------|---|
| Dialysepuffer | 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol |
| Waschpuffer | 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 300 mM NaCl 30 mM Imidazol |
| Elutionspuffer | 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 300 mM NaCl 60 mM Imidazol |

3.3.8.5 Konzentrationsbestimmung

Ausgehend von dem photometrisch ermittelten OD_{280} -Wert ist es möglich, die Konzentration eines Proteins in Lösung zu bestimmen. Hierfür wurde das Lambert-Beer-Gesetz verwendet:

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$

E = Extinktion

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($(\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c = Proteinkonzentration (mol /l)

d = Schichtdicke (cm)

Der Extinktionskoeffizient ϵ ist dabei abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins. Je höher der Anteil der absorbierenden Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein, desto höher ist auch der molare Extinktionskoeffizient.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

$$\epsilon = \sum \text{Try} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cys} \cdot 125$$

Ausgehend von der berechneten Konzentration wurde die Masse ermittelt.

Massenbestimmung aus gegebener Konzentration

$$c = \frac{m}{M \cdot V} \Rightarrow m = c \cdot M \cdot V$$

c = Proteinkonzentration (mol /l)

m =Masse (g)

M =Molmasse (g/mol)

V =Volumen (mol/l)

3.3.8.6 Aktivierung von Meprin α und $-\beta$

Zur Erlangung katalytischer Aktivität, musste bei beiden Proteinen das Propeptid abgetrennt werden. Dies geschah durch die Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin (Sigma Aldrich) für 30 min bei 37°C. Um Trypsin aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde eine Ovomucoïd-Affinitätschromatographie durchgeführt. Ovomucoïd, ein natürlicher Trypsininhibitor aus dem Hühnerei lag hierbei kovalent gebunden an CNBr-Sepharose vor und konnte das Trypsin aus der Proteinlösung binden.

3.4 Zellkultur humaner Zelllinien

3.4.1 Aufzucht der verwendeten Zelllinien

In dieser Arbeit fanden die humanen Zelllinien HaCat (*Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes*) sowie primäre HDFa (*Human adult dermal fibroblasts*) (Invitrogen, D-Karlsruhe) Verwendung. HaCat-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Dirk Breitkreutz vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) zur Verfügung gestellt. HaCat-Zellen wurden in 75 cm^2 Zellkulturflaschen in GIBCO® DMEM High Glucose (Invitrogen, D-Karlsruhe) Zellkulturmedium, dem 2-5% FCS und 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 100 U/ml) zugesetzt waren. Der Mediumwechsel fand alle 72 h statt, bis die Keratinozyten eine Konfluenz von 100% aufwiesen d.h. einen geschlossenen Monolayer

bildeten. HDFa-Zellen wurden bis auf das verwendete Zellkulturmedium identisch behandelt. Hier kam das für die Zucht der Fibroblasten optimierte M106-Medium (Invitrogen, D-Karlsruhe) zum Einsatz. Das Medium wurde vor der Verwendung mit dem LSGS-Kit (*Low Serum Growth Supplement Kit*) nach Angaben des Herstellers vervollständigt (Invitrogen, D-Karlsruhe). Die Konfluenz der Zellen wurde täglich überprüft. Nach 5-10 Tagen konnten die Zellen passagiert werden.

3.4.2 Passage der HDFa-und HaCats

Zum enzymatischen Ablösen der HaCat und HDFa-Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und dreimal mit FCS-freiem DMEM-Medium gespült. Die Zellen wurden danach mit 5 ml einer zuvor auf 37°C erwärmten 0,05%igen Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Adhäsionszustand der Zellen wurde in dieser Zeit mehrmals mikroskopisch kontrolliert. Kurz vor dem Ablösen wurden HaCats in DMEM-und HDFas je nach weiterer Verwendung in DMEM oder M106 Medium resuspendiert.

3.4.3 HaCat/HDFa Kokultur

Im Folgenden soll auf das in dieser Arbeit verwendete Kokultursystem eingegangen werden. Hierbei werden HaCat und HDFa im gleichen Medium aber zwei getrennten Kompartimenten gehalten, wobei sie durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. HDFa-Zellen befanden sich in 6-well Zellkulturschalen bis zum Erreichen der benötigten Konfluenz. HaCat-Zellen wuchsen zunächst getrennt von den HDFa Zellen in 0,4 µm-ThinCert™ Zellkultureinsätzen auf einer semipermeablen Membran mit einer Ausschlussgröße von 0,4 µm (Greiner Bio-One). Mit Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit DMEM-Medium gespült. Die HaCat-Zellen in den *Inlays* wurden in die 6-Well-Zellkulturschalen, in denen sich bereits HDFa Zellen befanden gesteckt. Die zwei Zelltypen wurden in DMEM-Medium mit 2% FCS für weitere 72 h zusammen kultiviert, bis sie bereit für die Applikation exogener Substrate waren. Mit Hilfe der Kokultur ist es möglich *in vivo* stattfindende parakrine epidermal/dermale Interaktionen im Rahmen der Zellkultur einzubeziehen. Wie auch in lebender Haut befinden sich epidermale und dermale Zellen hierbei in enger Nachbarschaft, wobei die Trennung durch die semipermeable Membran einen Austausch von bestimmten biologisch aktiven Komponenten, zulässt aber auch den Kontakt von Keratinozyten mit Fibroblasten oder Kollagenen, die von den HDFas sezerniert werden, verhindert. In der Tat zeigen kokultivierte Zellen ein *in vivo*-ähnliches beschleunigtes Proliferations- und inhibiertes Apoptoseverhalten (Funayama, Chodon et al. 2003).

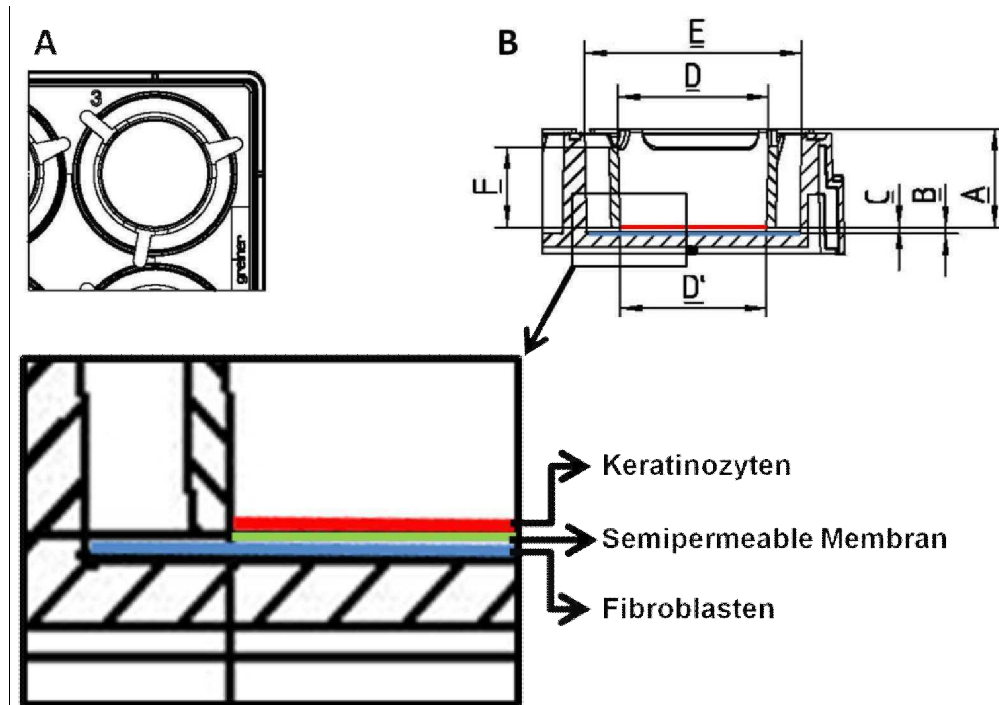


Abbildung 12 Schematische Darstellung des HaCat/HDFa Kokultur-Systems: **A** Vertikale Sichtweise eines Inlays in einer 6-Well-Zellkulturschale. **B:** Horizontale Sichtweise: Keratinozyten (rot) im Inlay sind durch die semipermeable Membran (grün) des Inlays von den Fibroblasten (blau) in der Zellkulturschale räumlich getrennt.

3.5 MMP1-Aktivitätsassays

Rekombinantes pro-MMP1 wurde freundlicherweise von Dr. Christopher Overall von der University of British Columbia zur Verfügung gestellt. Zur Aktivierung wurde rekombinantes pro-MMP1 mit 1 mM APMA (4-Aminophenyl Quecksilberazetat) 2 h bei 37°C in HEPES-Puffer inkubiert (50 mM HEPES, pH 7,5). Dies geschah vor bzw. nach der Prozessierung durch Meprin. Beim Nachweis der Aktivität von rekombinanten MMP1 bzw. der Kollagenase-Aktivität im Zellkulturüberstand, fand das fluorogene Peptidsubstrat MOCAC-Pro-Leu-Gly-Leu-A₂(Dnp)—Ala-Arg-NH₂ (R&D Systems) Verwendung, das inert gegenüber einer Prozessierung durch Meprine war, was im Vorfeld getestet wurde. Die enzymatische Aktivität wurde hierbei mit einem Varioskan Flash Fluorescence Spectrophotometer (Thermo Scientific) detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe von Skanlt Software 2.4 ausgewertet. Für MMP1-Prozessierungsassays wurden Pro-MMP1 bzw. aktiviertes MMP1 (beide 150 nM in 50 mM HEPES, pH 7,5) mit Meprin α und Meprin β (45 nM in 50 mM HEPES, pH 7,5) 2 h bei 37°C inkubiert, bevor das fluorogene Substrat (finale Konzentration 10 μM in 50 mM HEPES, pH 7,5) appliziert wurde. Die finale Konzentration der Proteasen MMP1 und Meprin α bzw. Meprin β betrug hierbei 15 nM (MMP1) bzw. 4,5 nM (Meprin α und Meprin β). Bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm wurde die fluorogene Emission bei 405 nm bis zu 120 min aufgezeichnet. Die relative proteolytische Aktivität wurde über die Steigung im anfänglich linearen Bereich ermittelt.

3.6 Substratassays

50 ng rekombinantes Stratifin und 400 ng rekombinantes pro-MMP1 wurden mit Meprin α und β (je 25 nM) 3h bzw. 2h bei 37°C inkubiert. Sämtliche Spaltversuche fanden in HEPES-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5) statt. Spaltfragmente wurden nach Laemmli (Laemmli 1970) in 10-12 % Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Hilfe des Western Blot Verfahrens auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels Verwendung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Zur Applikation in der Zellkultur wurden die Substrate Stratifin (2,5 μ g/ml Kulturmedium), IGFBP3 (1 μ g/ml Kulturmedium) und FGF19 (2 ng/ml Kulturmedium) unprozessiert als Kontrolle bzw. nach Spaltung durch Meprin (je 25 nM) nach einer Inkubationsdauer 3h bei 37°C konfluenten HDFa-Zellen in Mono- und HaCat/HDFa Kokultur appliziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden MMP1, Meprin α und Meprin β Expressionsraten mittels RT-PCR untersucht.

3.7 Zymographie

Mit der Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese war es möglich, Proteasen, die befähigt sind das Substrat Gelatine zu spalten, der Größe nach zu trennen und anschließend proteolytische Aktivität im Gel nachzuweisen. Die Gelatine war hierbei in das Polyacrylamid-Gel einpolymerisiert. Entscheidende Unterschiede zur regulären SDS-PAGE lagen darin, dass auf ein reduzierendes Milieu in Form von DTT und auf das Aufkochen der Probe vor dem Auftragen verzichtet wurde. Nach der Auftrennung wurde die Protease renaturiert und prozessierte lokal das einpolymerisierte Substrat. Nach der folgenden Coomassie-Färbung ist die lokale Substratspaltung, anhand der nicht oder weniger gefärbten Lysehöfe erkennbar. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3 x 20 Minuten mit Waschpuffer, dann 3 x 5 Minuten mit Wasser gewaschen, um SDS- Reste zu entfernen. Nach der abschließenden Über-Nacht Inkubation des Gels im Renaturierungspuffer bei 37°C wurde die Katalyse mit 12 %iger TCA gestoppt, das Gel fixiert und anschließend mit Coomassie gefärbt.

Tabelle 9: Reagenzien für die Zymographie

| Reagenzien | Zusammensetzung |
|----------------------|------------------------------------|
| Waschpuffer | 2,5 % Triton |
| Renaturierungspuffer | 50 mM Tris 50 mM NaCl pH 7,5 |

4. Ergebnisse

4.1 Spaltung von MMP1 und Stratifin durch Meprine

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass Meprin α und Meprin β rekombinantes pro-MMP1 *in vitro* prozessieren. Zusätzlich wurde die Spaltung des regulatorischen Proteins Stratifin, durch Meprin α und Meprin β verifiziert. IGFBP3 und FGF19 waren zu dieser Zeit bereits als *in vitro* Substrate von Meprin α und Meprin β validiert (Claudia Broder, Diplomarbeit 2010). Stratifin, IGFBP3 und FGF19 wurden in Bezug auf ihren Einfluss auf die MMP1 und MMP9 Expression in HDFa-Zellen hin untersucht. Obwohl FGF19 in der Fachliteratur nicht mit der Hautthomöostase in Verbindung gebracht wird, konnte eine deutliche Wirkung dieses Wachstumsfaktors auf dermale Zellen in Kultur nachgewiesen werden, die durch die Spaltung seitens Meprin β aufgehoben wurde.

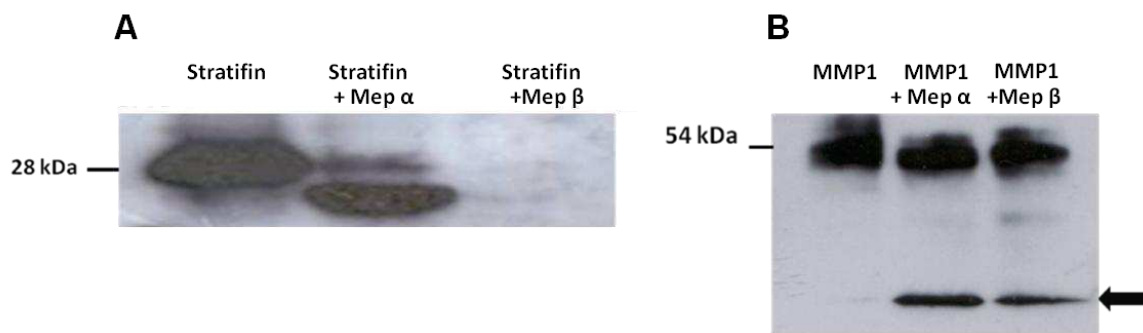


Abbildung 13: In vitro Spaltung von Stratifin und pro-MMP1 durch Meprine: Nach einer Inkubationsdauer von 3 h mit Meprin α bzw. Meprin β wurden die Ansätze per SDS-PAGE getrennt und im semi-dry Verfahren geblottet. Die Immunodetektion erfolgte mit spezifischen monoklonalen Stratifin-Antikörpern (1:1000 in 3 % BSA) und polyklonalen MMP1-Antikörpern (1:1000 in 5 % Magermilch).

Stratifin wurde von beiden Proteasen geschnitten (Abb.13 A), wobei die Inkubation mit Meprin α und β unterschiedliche Bandenmuster lieferte. Meprin α setzte hierbei einen Großteil des Substrats um, wobei ein Peptidfragment mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kDa nicht weiter prozessiert wurde. Im Gegensatz hierzu war nach einer Inkubationszeit von 3 h mit β nur noch ein sehr schwaches Signal zu detektieren. Das korrespondierende Peptidfragment weist, wie bei der Spaltung durch Meprin α ein Molekulargewicht von etwa 23 kDa. auf, welches von Meprin β weitgehend degradiert wird. Zur Validierung der Schnittstelle in Form einer N-terminalen Sequenzierung, wurde hierbei die Inkubationszeit auf 30 min verkürzt, um einer Degradierung der Fragmente vorzubeugen. Eine der Schnittstellen für Meprin β wurde durch N-terminale Sequenzierung validiert und befindet sich Cys-96 und Asp-97.

4.2 Vergleich der Spaltung von pro-MMP1 und aktiviertem MMP1 durch Meprine

Ersichtlich ist, dass beide Proteasen zur Spaltung von rekombinantem pro-MMP1 befähigt sind (Abb. 13 B). Meprin α und Meprin β erzeugen hierbei jeweils ein Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa. Ergebnisse aus massenspektrometrischen Untersuchungen (Becker-Pauly in Bearbeitung) ergaben für Meprin α und Meprin β eine Spaltstelle innerhalb der katalytischen Domäne von MMP1. Die Schnittstellen für Meprin α und Meprin β befanden sich zwischen Ala-184 und Phe-185 bzw. zwischen Gly-193 und Asp-194, was durch das *in vitro* generierte 22 kDa große Spaltfragment bekräftigt wurde. Folglich war von einem Verlust der katalytischen Aktivität in Folge von Prozessierung seitens Meprin auszugehen. Desweiteren war die Frage, in welchem Maße das MMP1-Propeptid, diese Spaltung innerhalb der katalytischen Domäne beeinflusst bzw. behindert, im Hinblick auf die *in vivo* Situation, von besonderem Interesse.

Um festzustellen, ob MMP1 als Zymogen oder in seiner aktivierten Form, als Substrat bevorzugt wird, wurde pro-MMP1 vor bzw. nach der Spaltung aktiviert und die verbleibende MMP1 Aktivität wurde aufgezeichnet. Die Aktivierung erfolgte durch die Inkubation mit APMA (4-Aminophenyl Quecksilberazetat), das durch die Interaktion mit Cys-92 in der Propeptid-Domäne, die Wechselwirkung dieser Aminosäure mit dem Zinkion im aktiven Zentrum verhindert. Hierdurch dissoziiert das Propeptid, das im inaktiven Zustand des Enzyms den Zugang eines Substrats zum aktiven Zentrum sterisch behindert, ab, wodurch das Enzym aktiviert wird.

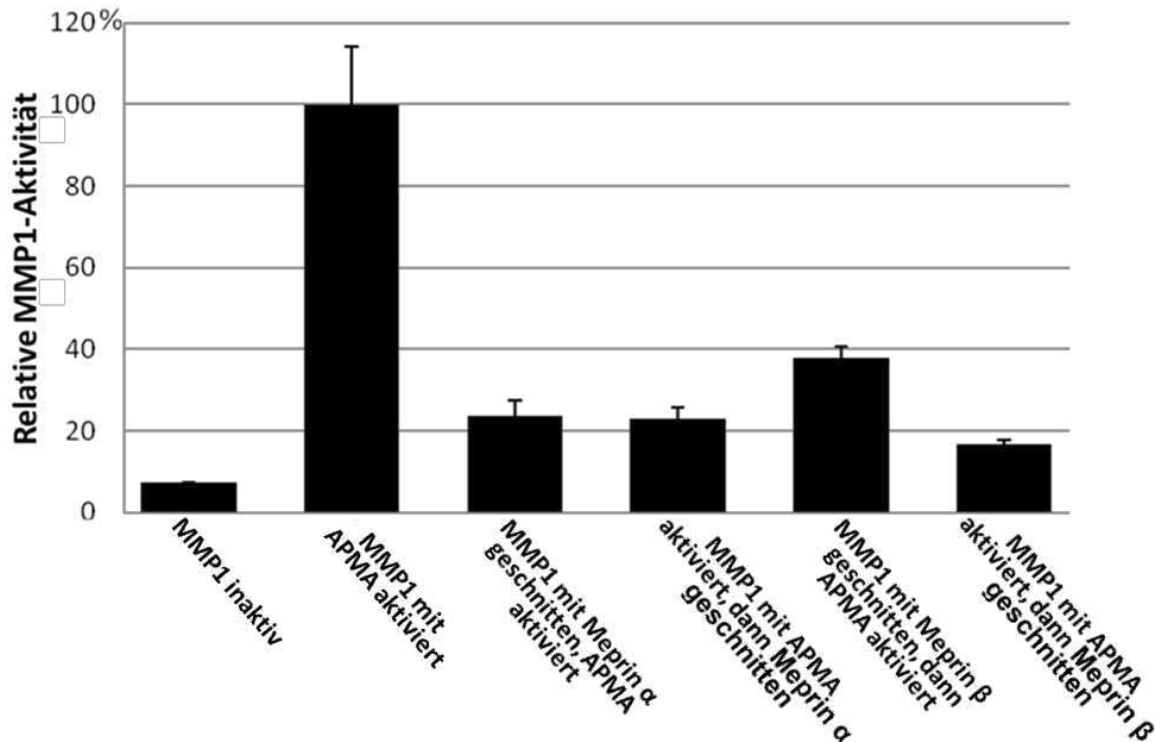


Abbildung 14: MMP1-Aktivität in Abhängigkeit von der Abfolge der Aktivierung und Spaltung durch Meprin α und β : Die Kollagenase-Aktivität in den Überständen wurde anhand der Umsatzgeschwindigkeit des fluorogenen MMP1-Peptidsubstrats photometrisch ermittelt und quantifiziert. Während die Spaltung von MMP1 durch Meprin α durch eine vorherige Aktivierung seitens APMA (4-Aminophenyl-Quecksilberazetat) nicht beeinflusst wurde, resultierte eine zuvor stattgefundenene Aktivierung, in einem besseren Spaltvermögen von Meprin β .

Wie man Abb.14 entnehmen kann, zeigt der Ansatz mit pro-MMP1 weniger als 10% der Aktivität, die mit APMA aktivierten Referenz aufweist (Abb. 14 Balken 1, 2). Eine vorherige Inkubation mit Meprin α hatte eine verbliebene Restaktivität von 20-25% zur Folge (Abb. 14 Balken 3). Hierbei war es nicht von Bedeutung, ob MMP1 vor oder nach der Spaltung aktiviert wurde (Abb. 14 Balken 4). Im Gegensatz dazu resultierte eine vorherige Aktivierung von MMP1 vor der Meprin β Prozessierung (38-40%), in einer signifikant geringeren Restaktivität von weniger als 20% (Abb. 14 Balken 6). Hieraus folgt, dass Meprin β APMA behandeltes MMP1 als Substrat bevorzugt.

4.3 Einfluss der Substrate auf die MMP1-Expression in dermalen Fibroblasten

Ausgehend von der Annahme, dass rekombinantes extrazelluläres Stratifin die MMP1-Expression in dermalen Fibroblasten signifikant erhöht (Ghahary, Karimi-Busheri et al. 2004) wurde untersucht, inwiefern die nachgewiesene Prozessierung seitens Meprin diesen Effekt beeinflusst. Hierfür wurde HDFa-Zellen in Monokultur und in HaCat/HDFa-Kokultur

unbehandeltes Stratifin als Positivkontrolle und prozessiertes Stratifin (2,5 µg/ml Kulturmedium) appliziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden MMP1, Meprin α und Meprin β Expressionsraten mittels RT-PCR untersucht.

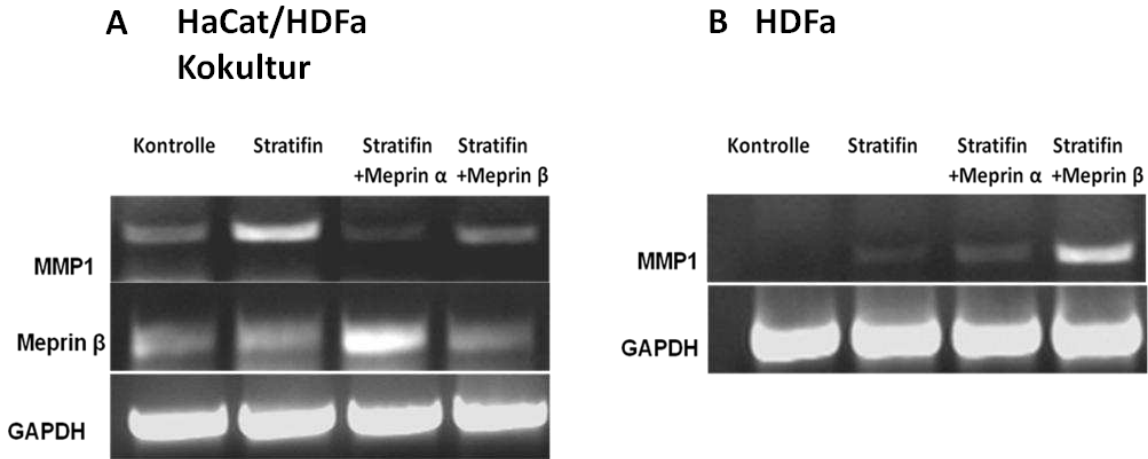


Abbildung 15: RT-PCR mit MMP1,- Meprin β und GAPDH-Primern: HDFa-Zellen wurden für 24 h mit intaktem und prozessiertem Stratifin behandelt. Danach wurde die Gesamt-RNA aus den HDFa-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Template für die folgende PCR mit spezifischen MMP1,- β und für den Kontrollansatz GAPDH-Primern.

Die erste Beobachtung war hierbei, dass Fibroblasten in Kokultur mit Keratinozyten eine deutlich höhere MMP1-Expressionsrate aufwiesen (Abb. 15 A, B). Während der stimulierende Einfluss von Stratifin auf die Fibroblasten bezüglich MMP1-Expression sichtbar war, konnte nur in Kokultur ein aufhebender Effekt durch die Prozessierung nachgewiesen werden (Abb.15 A, Spur 3, 4). Überraschenderweise schienen Fibroblasten in Monokultur, die MMP1-Expression deutlich zu verstärken, wenn sie vorher mit Meprin β prozessiertem Stratifin inkubiert wurden (Abb.15 B, Spur 4). Die Tatsache, dass unbehandeltes Stratifin die MMP1-Expression nicht in diesem Maße zu erhöhen vermochte, ließ auf einen vom Substrat unabhängigen Einfluss von Meprin β schließen. Die Expression von Meprin β schien von Stratifin nicht beeinflusst zu sein. Das starke Signal, das in Stratifin/Meprin α behandelten Fibroblasten in Kokultur detektiert wurde, konnte demnach als Meprin α vermittelt gewertet werden.

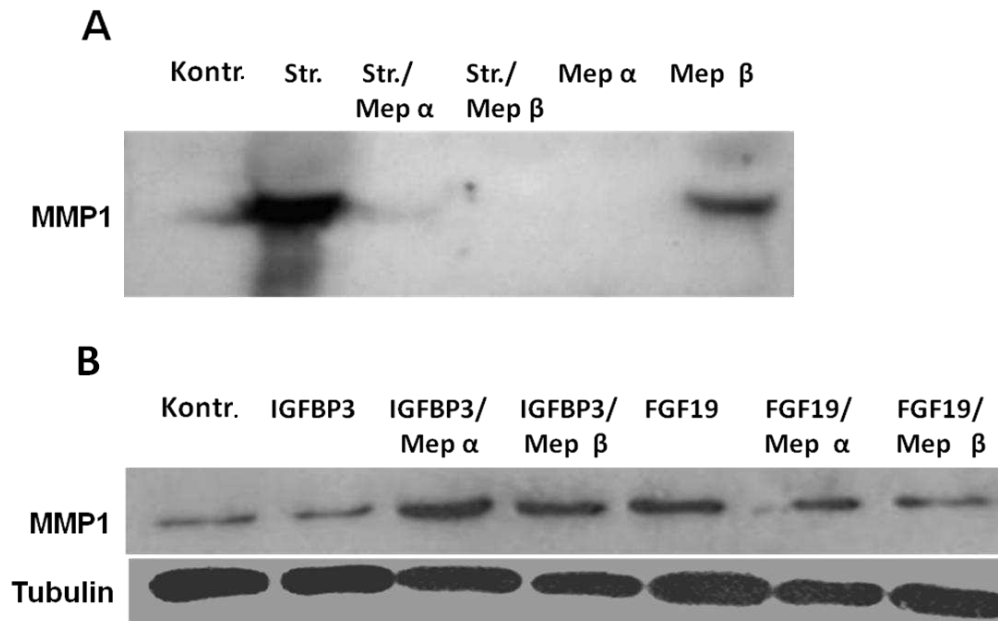


Abbildung 16: Western Blot: MMP1-Expression im Zellkulturüberstand- und Zelllysat von HDFa-Zellen: **A** HDFa-Zellen aus HaCat/HDFa Kokultur wurden mit intaktem und prozessiertem Stratifin für 48 h inkubiert. Je 20 μ l des Zellkulturüberstands wurden per SDS-Page aufgetrennt und geblottet. **B** HDFa-Zellen aus HaCat/HDFa Kokultur wurden mit intaktem und prozessiertem IGFBP3 und FGF19 für 48 h inkubiert. Zelllysate wurden angefertigt. Proteinmengen in den Lysaten wurden angeglichen; Lysate wurden per SDS-Page aufgetrennt und geblottet. Immunodetektion erfolgte mit spezifischen MMP1- und Tubulin-Antikörpern.

Um die Wirkung von nativem und prozessiertem Stratifin, IGFBP3 und FGF19 auf die MMP1-Expression in HDFa-Zellen auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Zellkulturüberstände 10x konzentriert, per SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit folgender Immunodetektion durchgeführt. Die Zellen in Kultur wurden mit intaktem und prozessiertem Stratifin, IGFBP3 und FGF19 behandelt, wie zuvor beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Inkubationszeit auf 48 h verlängert wurde. Hierdurch war es möglich sezerniertes MMP1 im Überstand zu akkumulieren. Um zwischen Substrat-, bzw. Meprin-vermittelten Effekten besser differenzieren zu können, wurden Zellen in zusätzlichen Ansätzen mit Meprin α und β , aber ohne Substrat behandelt. Da es nach der Inkubation mit nativem und prozessiertem IGFBP3 und FGF19 nicht gelungen ist, im Überstand Signale zu detektieren, die zweifellos MMP1 zugeordnet werden konnten, wurden in diesen Fällen Zelllysate hergestellt. Proteinkonzentrationen der Lysate wurden angeglichen, bevor ein Blot angefertigt wurde.

Wie Abb. 16 A zu entnehmen ist, führte die Inkubation mit intaktem Stratifin (Spur 2) und auch Meprin β (Spur 6) zu einer signifikanten Erhöhung der MMP1 Expression. Eine vorhergegangene Prozessierung durch Meprine schien Stratifin so weit zu inaktivieren, dass eine Stimulation der MMP1-Expression nicht mehr stattfand (Spur 3, 4). Die stimulierende

Wirkung von Meprin β auf die MMP1-Expression, wie sie hinsichtlich der RT-PCR Ergebnisse angedeutet wurde, konnte hierbei validiert werden.

IGFBP3 zeigte im Vergleich mit der Negativkontrolle keine veränderte Expressionsrate. Erst die Behandlung mit Meprin, besonders aber Meprin α resultierte in stärkeren Signalen (Abb. 16 B, Spuren 3 und 4). Auch FGF19 vermochte die Expressionsrate zu erhöhen, was durch die Spaltung seitens Meprin α und besonders Meprin β aufgehoben wurde.

Dennoch ließ sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausschließen, dass der Expressionsfördernde IGFBP3 Einfluss auf der substratunabhängigen Wirkung von Meprin beruhte.

4.4 Detektion MMP1- und MMP9-Aktivität im Zellkulturüberstand

4.4.1 Einfluss der Substrate.

Erst die Inkubation des fluorogenen MMP1 Peptidsubstrats mit den Zellüberständen ermöglichte es die tatsächliche Kollagenaseaktivität quantitativ zu vergleichen und zu bewerten (Abb.17 A). Hierdurch war es nicht nur möglich, die observierte Aktivität durch einen Abgleich mit den bisherigen Ergebnissen, MMP1 zuzuordnen, sondern auch eine Aussage darüber zu treffen, ob MMP1 aktiv oder inaktiv vorliegt.

Zudem wurde mit den Überständen eine Gelatinezymographie durchgeführt. Diese Methode gestattete es, die Aktivität von MMP9 und weiterer Vertreter der MMP-Familie, quantitativ darzustellen

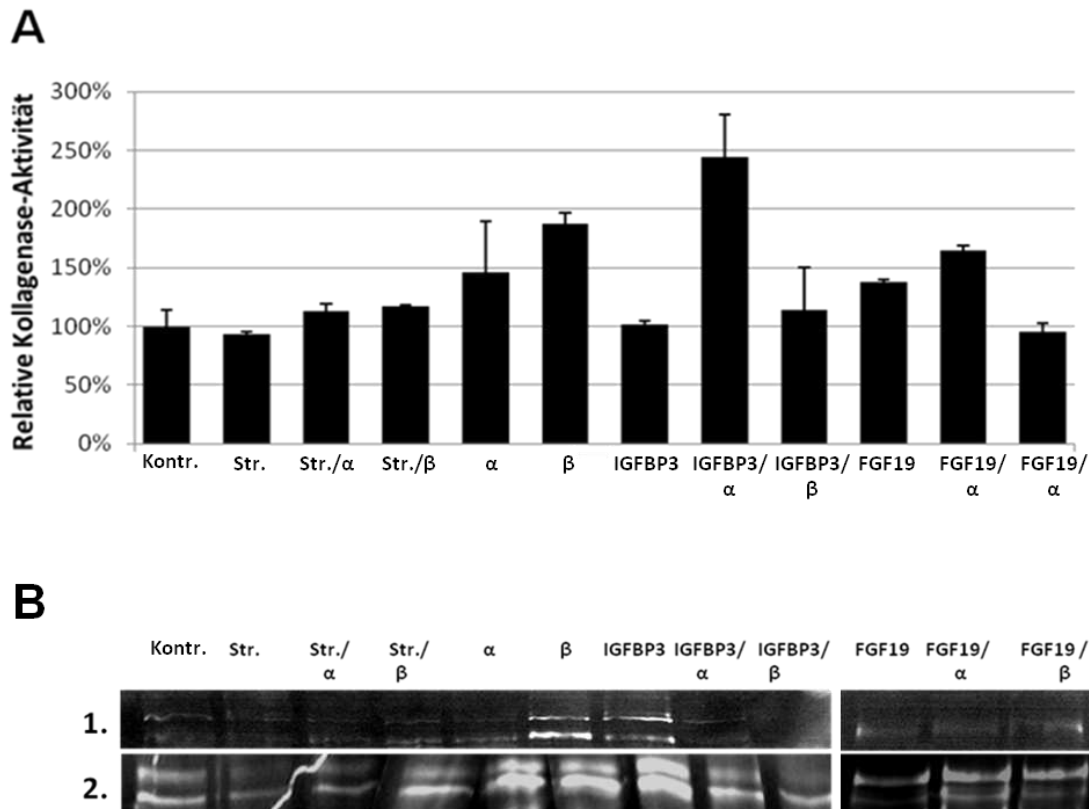


Abbildung 17: Relative Kollagenase-Aktivität und MMP9-Aktivität im Zellkulturüberstand von Fibroblasten. Nach einer Inkubation mit intaktem und prozessiertem Stratifin (Str., Str./ α , Str./ β), Meprin α (α), Meprin β (β), IGFBP3 (IGFBP3, IGFBP3/ α , IGFBP3/ β) und FGF19 (FGF19, FGF19/ α , FGF19/ β) wurden die Überstände nach 48 h abgenommen. **A** Die Kollagenase-Aktivität in den Überständen wurde anhand der Umsatzgeschwindigkeit des fluorogenen MMP1 Peptidsubstrats photometrisch ermittelt und quantifiziert. **B** Zur Überprüfung der MMP9 Aktivität wurden 2 Gelatinezymographieansätze mit 1 μ l (B 1.) bzw. 3 μ l (B2.) Zellkulturüberstand angefertigt.

Der Vergleich der Kollagenaseaktivität im Zellkulturüberstand mit den detektierten MMP1-Mengen weist eine Korrelation auf (Abb.16, 17 A). Unerwartet hingegen war der Befund, dass die Stratifin induzierte starke MMP1-Expression (Abb. 16 A, Spur 2) nicht einhergeht mit einer vergleichbaren Kollagenaseaktivität (Abb.17 A, Balken 2). Diese war sogar geringfügig schwächer, als die Aktivität im Kontrollansatz. Ansätze mit prozessiertem Stratifin zeigten eine leichte Aktivitätssteigerung von etwa 10 % (Abb.17 A, Balken 3, 4). Die Applikation von Meprin α und Meprin β hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung von ca. 70 bzw. 90 % (Abb.17 A, Balken 5, 6). Hervorstechend war zu dem, dass Meprin α gespaltenes IGFBP3 den Substratumsatz am deutlichsten anregte, während intaktes IGFBP3 keine Auswirkungen zeigte (Abb. 17 A, Balken 7, 8). Diese 2,5 fache Erhöhung stand auch tendenziell im Einklang mit detektierten Proteinmengen im Zelllysat (Abb. 16 B, Spur 3). Dieser Einfluss von Meprin α gespaltenem IGFBP3 kann in Anbetracht der Größenordnung dieser Aktivitätszunahme auch nicht einer Interferenz seitens Meprin α zugeordnet werden.

Natives rekombinantes FGF19 vermochte die Kollagenaseaktivität auch zu steigern, wobei die Prozessierung seitens Meprin β diesen Effekt aufhob. Eine vermeintliche Prozessierung seitens Meprin α schien den Substratumsatz signifikant zu beschleunigen (Abb. 17 A, Balken 11). In diesem Fall ist allerdings ein additiver Effekt FGF19-, und Meprin α -vermittelter Aktivität nicht auszuschließen.

In Bezug auf die MMP9-Aktivität schienen intaktes Stratifin und FGF19, diese zu vermindern (Abb. 17 B, Ansatz 2, Spur 10). Prozessierung durch Meprin konnte diesen wiederum unterbinden (Abb. 17 B, Ansatz 2, Spur 11,12). Im Gegensatz erhöhten IGFBP3 und Meprin β die MMP9 Aktivität deutlich (Abb. 17 B, Ansatz 1, Spur 6, 7).

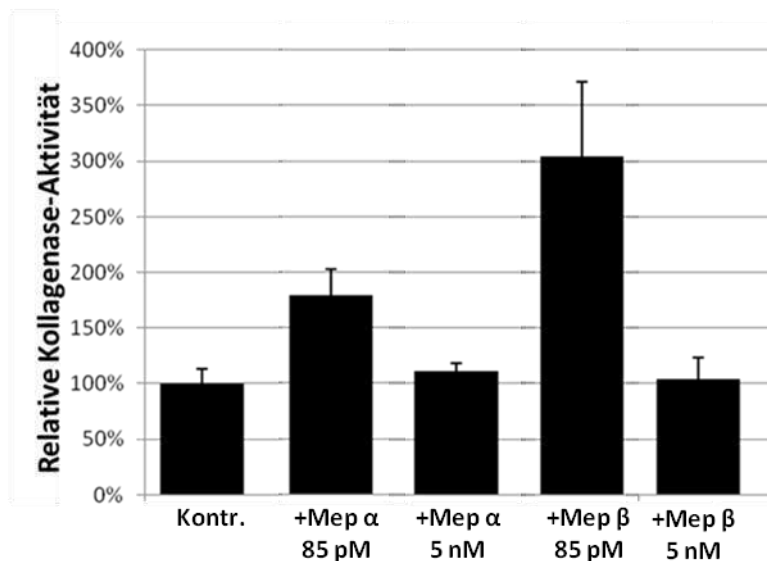


Abbildung 18: Relative Kollagenase-Aktivität im Zellkulturüberstand von Fibroblasten nach Inkubation mit Meprin α und Meprin β : HDFa Zellen in Monokultur wurden für 48 h mit 85 pM bzw. 5 nM Meprin α und Meprin β inkubiert.

4.4.2 Einfluss der Meprine

Substratunabhängiger Einfluss der Die Entdeckung, dass Meprin α und besonders Meprin β in der Lage sind die MMP1 und MMP9-Expression in dermalen Fibroblasten anzuregen, führte zu der Fragestellung, inwiefern dieser Befund konzentrationsabhängig ist. HDFa Zellen in Kokultur waren bei vorherigen Versuchen einer effektiven Meprin-Konzentration von 85 pM ausgesetzt, wodurch die MMP1 und MMP9 Aktivität im Kulturmediumüberstand signifikant zunahm. Bei einer Endkonzentration von 5 nM wurde rekombinantes MMP1 bereits effizient gespalten, ohne dass die Zellintegrität in Kultur beeinträchtigt wurde. HDFa Zellen wurden folglich mit 85 pM und 5 nM Meprin für 48 h inkubiert. Zellüberstände wurden daraufhin auf ihre Kollagenase-Aktivität untersucht (Abb.18). Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen, wurden HDFa-Zellen in Monokultur verwendet. Dadurch war gewährleistet, mögliche epidermale parakrine Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen könnten, auszuklammern. Die erwartete Zunahme an Aktivität trat nur bei 85 pM ein, wobei

diese durch Meprin β verdreifacht wurde (Abb. 18, Balken 5), während nach Einsatz von Meprin α eine immer noch sehr signifikante Steigerung von ca. 80% beobachtet wurde (Abb.18, Balken 3).

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen die potentielle Rolle der Meprine bei der Assemblierung fibrillärer Kollagene darzustellen. Meprin α und Meprin β waren nicht nur in der Lage N- und C-terminale Propeptide abzuspalten, sondern es konnte eine verstärkte Expression von Meprin α , sowie eine erstmalige Expression von Meprin β in der menschlichen Dermis unter fibrotischen Bedingungen detektiert werden. Diese Befunde legen eine wichtige Rolle der Meprine bei der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix *in vivo* nahe. Desweiteren ist es gelungen Stratifin und MMP1, die als essentiell für die Aufrechterhaltung der Hauthomöostase einzustufen sind, als *in vitro* Substrate für Meprin α und Meprin β zu validieren. Ferner wurde die Prozessierung von Stratifin, IGFBP3 und FGF19 im Hinblick auf den Einfluss auf die MMP-Expression in primären dermalen Fibroblasten untersucht. Im Zellkulturüberstand wurde neben der Kollagenaseaktivität, die MMP1 zugeordnet werden konnte, auch die MMP9-Gelatinase-Aktivität detektiert. In diesem Zusammenhang wurde erstmals entdeckt, dass Meprin α und Meprin β die MMP1-Expression in dermalen Fibroblasten anregen und konzentrationsabhängig die Kollagenase-Aktivität im Zellkulturüberstand zu beeinflussen.

5.1 MMP1-Spaltung durch Meprin führt zu dessen Funktionsverlust:

Pro-MMP1 Prozessierung durch Meprin α und Meprin β resultierte in einem Spaltfragment mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa (Abb 14.). Obwohl diese, aufgrund der zu geringen verfügbaren Menge nicht sequenziert wurde, deutet zum einen die Größe von 22 kDa, sowie die spaltungsbedingte nachlassende proteolytische Aktivität von MMP1, auf eine Spaltstelle innerhalb der Protease-Domäne. Diese Ergebnisse stehen im Einklang, mit massenspektrometrischen Daten, die eine Spaltstelle zwischen Alanin-184 und Phenylalanin-185 für Meprin α und Gly-193 und Asp-194 für Meprin β anzeigen (Becker-Pauly, in Bearbeitung).

Eine Aktivierung von MMP1 vor der Prozessierung durch Meprin β hatte eine relative verbliebene Aktivität von etwa 20% zur Folge. Wurde die Spaltung vor der Aktivierung durchgeführt, wurde eine signifikant höhere Restaktivität von mehr als 35% gemessen. Diese offensichtliche Präferenz für aktiv vorliegendes MMP1 kann so gedeutet werden, dass das MMP1-Propeptid den Zugang zur Spaltstelle geringfügig behindert aber nicht komplett unterbindet. Im Fall von Meprin α konnte kein Einfluss der Reihenfolge beobachtet werden. Folglich scheint Meprin α vom Propeptid nicht behindert zu werden.

5.2 Stratifin

Wie erwartet steigerte rekombinantes Stratifin die MMP1-Expression in dermalen Fibroblasten. Gezeigt wurden gesteigerte Expressionsraten auf mRNA Ebene, in HDFa/HaCat Kokulturen aber auch in HDFa-Monokulturen (Abb. 15). Zu dem konnte in Überständen von Stratifin behandelten Fibroblasten eine hohe Konzentration an sezerniertem MMP1 detektiert werden. Eine Inkubation mit Meprin α resultierte in einem Peptidfragment mit geringfügig verminderter Größe, was eine einzelne Schnittstelle in der Nähe des N-Terminus indiziert. Eine Behandlung mit Meprin β hingegen, resultierte dagegen in nahezu kompletter Degradation von Stratifin, was mit massenspektrometrisch ermittelten Daten, die 6 Schnittstellen für Meprin β identifizierten, tendenziell im Einklang steht. Normalerweise erkennen 14-3-3-Proteine ihre Liganden primär mittels ihres Phosphoserin-Erkennungsmotivs: RSxpSxP (Muslin, Tanner et al 1996). Bei Berücksichtigung der angenommenen Schnittstellen, müsste die Spaltung demnach mit einem Funktionsverlust einhergehen, der zwar im Zellkulturüberstand, nicht aber auf mRNA Ebene detektiert wurde (Abb.15). Im Gegenteil schien die MMP1-Expression nach der Inkubation sogar zuzunehmen. Wie sich später herausstellen sollte, handelte es sich bei dieser Beobachtung um eine Überlagerung mit einer Meprin-vermittelten Förderung der MMP1-Expression. Deutlich wird diese besonders nach einer Inkubation mit Meprin β alleine (Abb. 15, B Spur 4).

Die fehlende Korrelation zwischen starker Stratifin induzierter MMP1-Expression bzw. Sezernierung (Abb. 16 A, Spur 2;) und der niedrigen Kollagenase Aktivität im Zellkulturüberstand (Abb. 17 A Balken 2) ist überraschend und kann nur als ein Zustand fehlender MMP1-Aktivität interpretiert werden. Das detektierte MMP1 ist demnach nicht aktiviert worden, liegt also als pro-MMP1 vor oder wird in seiner Aktivität gehemmt. Ghaffari et al. zeigten, dass Stratifin nicht nur die Expression von MMP1, sondern auch MMP3 und PAI1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) steigert (Ghaffari, Li et al. 2006). *In vivo* wird MMP1 vornehmlich durch die Serinprotease Plasmin und MMP3 aktiviert, wobei MMP3 selbst auch von Plasmin aktiviert wird (Chakraborti, Mandal et al. 2003). Eine gesteigerte PAI1-Expression ginge, aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von aktivem Plasmin, einher mit einer verminderter Aktivierung von MMP1 und MMP3. Ferner wurde mit Hilfe von microarray assays gezeigt, dass Fibroblasten in Kokultur mit Keratinozyten PAI2 (*plasminogen activator inhibitor 2*) 12x stärker und den Metalloprotease-Inhibitor TIMP2 (*tissue inhibitor of metalloprotease*) doppelt so stark exprimieren, wie Fibroblasten in einer Monokultur. Es ist wahrscheinlich, dass die gesteigerte Koexpression dieser Faktoren zu der geringen Kollagenaseaktivität im Zellkulturüberstand beitrug. Bezüglich der MMP9-Aktivität im Zellkulturüberstand, zeigte Stratifin eine hemmende Wirkung.

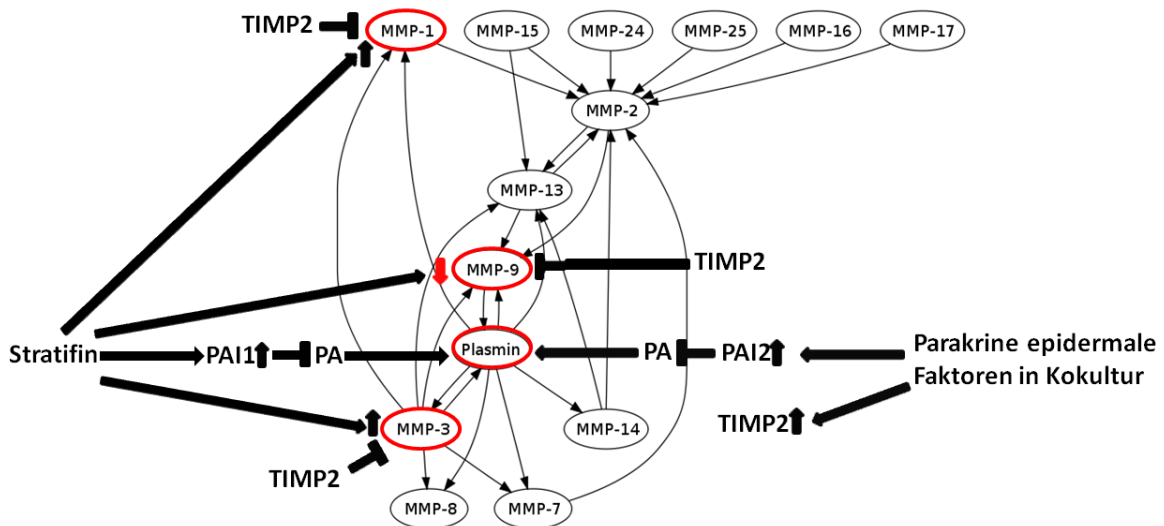


Abbildung 19: Übersicht über den Einfluss von Stratifin und epidermalen Faktoren auf die Aktivität von Plasmin, MMP1, MMP3 und MMP9. Verändert nach Chakraborti et al.: Regulation of matrix metalloproteinases: An overview; Mol Cell Biochem 253:269-85;2003

5.3 IGFBP3

Rekombinantes natives IGFBP3 hatte keinen signifikanten Einfluss auf MMP1-Expression und proteolytische Aktivität im Überstand. Deutlich wurde allerdings die Stimulation auf die MMP9-Aktivität (Abb. 17 B, Spur 7), was in Epithelien bereits beschrieben wurde (Granata, Trovato et al. 2007). Durch die Spaltung seitens Meprin wurde dieser Effekt aufgehoben (Abb. 17 B, Spur 8, 9). Eine signifikante Steigerung der MMP1-Expression auf Proteinebene in Zelllysaten, sowie eine korrelierende Zunahme der Kollagenaseaktivität im Überstand ist erkennbar, wenn IGFBP3 zuvor mit Meprin α inkubiert wurde (Abb. 16 B, Spur 3; Abb.17 A, Balken 7.). Eine Interferenz mit Meprin α vermittelten Effekten konnte ausgeschlossen werden, da Meprin α allein die Kollagenaseaktivität nicht annähernd in diesem Maße stimulierte (Abb.17 A, Balken 5). Wie bereits erwähnt, haben IGF1 und TGF β 1 induzierte Signalkaskaden einen störenden Einfluss auf p38 und MAPK-vermittelte Steigerung der MMP1-Expression (Lam, Kilani et al. 2005). IGFBPs sind in der Lage IGF1-vermittelte mitogene Signale zu regulieren. IGFBP3 kann hierbei durch direkte Interaktion mit IGF und IGFR1 förderlich wirken aber auch unabhängig von einer IGF und IGFR1 Interaktion eine gegensätzliche Wirkung entfalten. Besonders limitierte Proteolyse von IGFBP3 kann hierbei die Affinität zu IGF1 reduzieren oder gar aufheben (Firth et al., 2002). Lalou et. al entdeckten, dass bei der IGFBP3 Prozessierung seitens Plasmin zwei Peptidfragmente mit einer Größe von 22/25 und 16 kDa generiert wurden, wobei das 16 kDa Peptid IGF1 gegenüber keine Affinität mehr zeigte. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment bezüglich IGF1-vermitteltem Zellwachstum inhibierend wirkte (Lalou, Lassarre et al. 1996). Die Spaltung von IGFBP3 durch Meprin α und Meprin β hatte zwei Peptidfragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 25 und 15 kDa zur Folge, wobei das

von β generierte Fragment geringfügig größer ist (Claudia Broder, Diplomarbeit 2010). Das von Meprin α generierte 15-kDa Spaltprodukt könnte ähnlich wirken: Durch die Inhibition IGF vermittelter anaboler Signalwege könnte indirekt die MMP1-Expression gefördert werden.

5.4 FGF19

Natives rekombinantes FGF19 steigerte die MMP1-Expression und die Kollagenase-Aktivität im Zellkulturüberstand (Abb. 16 B, Spur 5; Abb.17 A, Balken 10). Letztere nahm zu, wenn FGF19 zuvor mit Meprin α inkubiert wurde und nahm nach einer Inkubation mit Meprin β deutlich ab (Abb.17 A, Balken 11, 12). Da FGF19 kein Substrat für Meprin α darstellt, ist bezogen auf die katalytische Aktivität im Überstand von einem additiven Effekt seitens FGF19 und Meprin α auszugehen. Die MMP9-Aktivität nahm unter dem Einfluss von FGF19 tendenziell ab, und stieg in Folge der Spaltung wieder auf Werte der unbehandelten Kontrolle an. In der Literatur wurde FGF2 bereits mehrfach als stimulierender Faktor der MMP1-Expression in Osteoblasten (Newberry, Willis et al. 1997) aber auch in Fibroblasten charakterisiert (Aho, Rouda et al. 1997). Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von FGF19 als eines, von Keratinozyten sezernierten, in dermalen Fibroblasten parakrin wirksamen Mitglieds der FGF-Familie beschrieben werden. Nicht auszuschließen ist, dass FGF19, welches in der Leber gebildet wurde, auf dermale Fibroblasten endokrin wirkt. Die Bedeutung der Prozessierung von FGF19 seitens Meprin α und Meprin β in Bezug auf anaboler und kataboler Ereignisse in der Dermis ist aufgrund interferierender Effekte seitens der Meprine vorerst nicht eindeutig.

5.5 Meprin

Im Verlauf der bisher beschriebenen Versuche gab es zahlreiche Anzeichen dafür, dass Meprin α und Meprin β die MMP1-Expression bzw. Aktivität in dermalen Fibroblasten steigerte. Diese Beobachtung war insofern überraschend, wenn bisherige Befunde über den Beitrag von Meprin zur Aufrechterhaltung der Hautintegrität mit berücksichtigt werden. Im Vergleich zu gesunder Haut, konnte in Hautproben, die aus Keloiden stammten, eine Überexpression von Meprin α bzw. eine ektopische Meprin β -Expression in der Dermis detektiert werden, ein Hinweis auf eine vermeintliche fibrotische Rolle in der Hautthomöostase. Untermuert wird diese Annahme durch die Erkenntnis, dass Meprine in der Lage sind Pro-Kollagen III zu aktivieren (Kronenberg, Bruns et al.). Die Verifizierung von MMP1 als *in vitro* Substrat für beide Meprine ist durchaus als weitere antikatabole bzw. profibrotische Eigenschaft zu werten. Aus diesem Grunde scheint eine durch Meprin

verursachte verstärkte MMP1-Expression bzw. Aktivität zunächst den bisherigen Befunden zu widersprechen.

Man kann Abb.18 entnehmen, wie die *in vivo* Situation in der Dermis aussehen könnte: Die Kollagenase-Aktivität wird hierbei, in inverser Korrelation mit der Meprin-Konzentration unterdrückt bzw. verstärkt. Die niedrige Meprin-Konzentration von 85 pM initiiert die MMP1-Expression, wobei für einen effizienten MMP1-Abbau die Konzentration zu gering ist, was sich in der hohen Kollagenase-Aktivität im Überstand widerspiegelt. Bei 5 nM Meprin allerdings würde zwischen MMP1-Spaltung und der Förderung der MMP1-Expression durch Meprin annähernd ein Gleichgewicht herrschen. Die Frage, die sich unweigerlich stellt, ist die nach dem Mechanismus der Meprin-vermittelten MMP1-Expression bzw. nach Faktoren, die als Substrate von Meprin einen Einfluss auf Signalwege haben, die mit einer MMP1- aber auch MMP9-Expression assoziiert werden. Die Möglichkeit, dass Meprin α ubiquitär vorkommendes IGFBP3 spaltet und so die MMP1-Expression steigert, ist unwahrscheinlich, da hierbei die Stimulation von MMP1 und MMP9 seitens Meprin β nur unzureichend begründet wird. Erfolgsversprechend ist die Annahme, dass bestimmte in fötalem Kälberserum vorkommende Zytokine, welche mit der Stimulation der Expression von MMPs in Verbindung gebracht werden, eine Rolle spielen. In der Tat können die proinflammatorische Zytokine Interleukin 1 β und Interleukin 18 von Meprin gespalten und aktiviert werden (Herzog, Haun et al. 2009), (Herzog, Kaushal et al. 2005) (Banerjee and Bond 2008). Während Interleukin 1 β von beiden Proteasen prozessiert werden kann, wird IL-18 nur von Meprin β aber nicht von Meprin α umgesetzt, wie anhand einer Studie mit Meprin^{-/-} Mäusen gezeigt werden konnte (Banerjee and Bond 2008). Dass IL-1 β die MMP1-Expression in verschiedenen Geweben, u.a. in dermalen Fibroblasten stimuliert, ist in der Fachliteratur mehrfach belegt worden (Mengshol, Vincenti et al. 2000; Dasu, Barrow et al. 2003). In Chondrozyten bewirkte eine Stimulation mit IL-1 β eine erhöhte Produktion von IL-18, das wiederum zu einer Überexpression von MMP1, MMP3 und MMP13 führte (Dai, Shan et al. 2005). Neueste Studien belegen in Cardiomyozyten einen Zusammenhang zwischen IL-18 und MMP9-Expression (Reddy, Prabhu et al.). In glatter Muskulatur konnte zudem eine direkt durch IL-1 β induzierte, p40/p42 MAPK vermittelte Stimulation der MMP9 Expression beobachtet werden (Liang, Lee et al. 2007). Vor diesem Hintergrund ist folgendes denkbar: Meprin β aktiviert IL-1 β sowie IL-18, was eine p38 MAPK abhängige Expression von MMP1, MMP9 und vermutlich IL18 zur Folge hatte. Zusätzliches IL-18, das von Meprin β aktiviert wurde, könnte eine weitere Zunahme der MMP1- und MMP9-Expression bewirken. Meprin α aktivierte IL-1 β aber nicht IL-18 und induzierte damit die MMP1-Expression signifikant, aber nicht im gleichen Maße wie Meprin β . Auch die in der Zymographie detektierte MMP9-Expression, ist aufgrund fehlender IL-18-Aktivierung seitens Meprin α nicht so signifikant. Die

Inkubation mit Meprin α bewirkt somit, in Bezug auf die MMP1-, und MMP9 –Expression ähnliche wenn auch nicht so deutliche Resultate (Abb. 20).

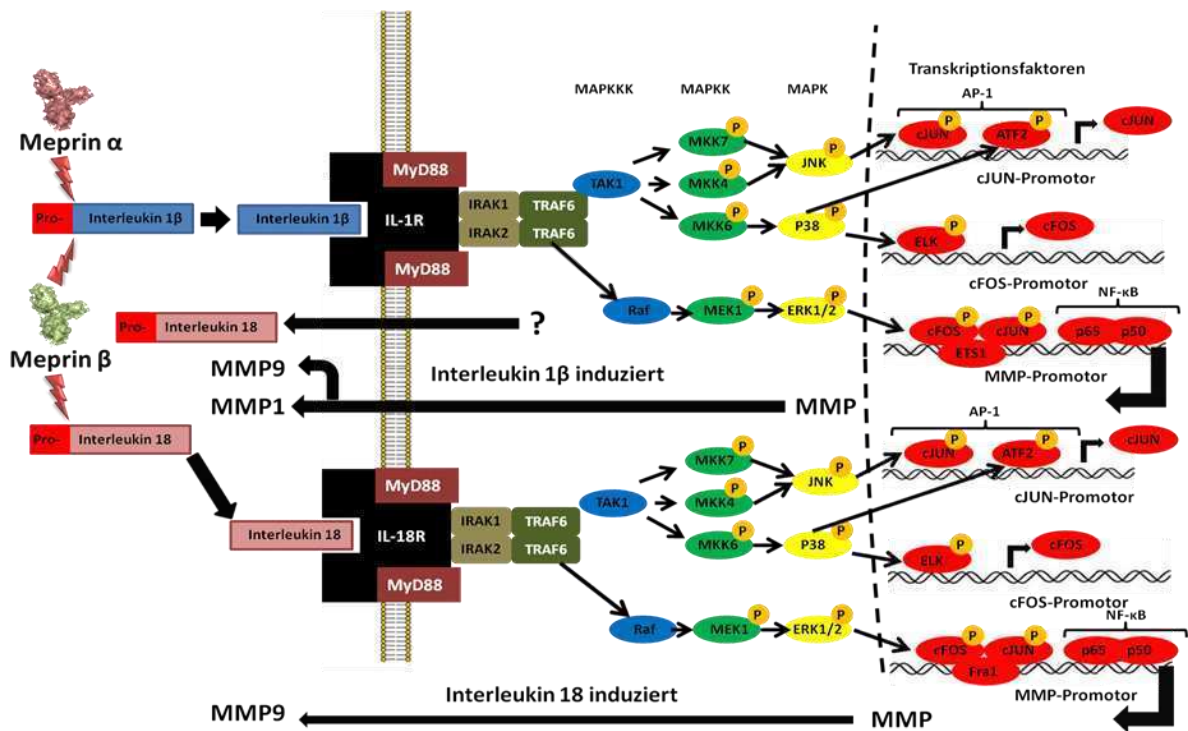


Abbildung 20: Überblick zur hypothetischen Meprin-vermittelten MMP1- und MMP9-Expression durch Interleukin 1 β und Interleukin 18 induzierte MAPK-Signaltransduktionskaskaden: Pro-Interleukin 1 β wird von Meprin α und Meprin β durch limitierte Proteolyse aktiviert, bindet an den membranständigen Rezeptor IL-1R (IL-1 receptor) und setzt. Vermittelt durch IRAK1,2 (IL-1 receptor activated kinase) und TRAF6 (TNF receptor-associated factor) werden die MAPK Kinase Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert (MAPKKKs; in blau) transforming-growth-factor- β -activated kinase-1 und Raf, welche ihrerseits MAPK Kinasen (MAPKK; in grün) MKK6, MKK4, MKK7, MEK aktivieren. Die MAPKK aktivieren die MAPKinasen (MAPK; in gelb) p38, JNK (c-Jun N-terminal kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase), welche in den Zellkern translozieren und aktivieren hier die Transkriptionsfaktoren (in rot) ATF2 (activating transcription factor 2), c-Jun, Elk-1 und ETS1 (erythroblastosis twenty-six), welche zusammen mit NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) die Transkription von MMP1 und MMP9 initiieren. Interleukin18, das infolge der IL-1 β -Stimulation hochreguliert wird, kann von Meprin β aktiviert werden und induziert über eine weitere MAPK- Signaltransduktionskaskade eine stärkere Expression von MMP9 (Vicenti and Brinckerhoff 2002; Burrage, Mix et al. 2006).

Ein weiterer, möglicher Mechanismus für den Meprin vermittelten Anstieg der MMP1 und MMP9-Expression wäre die Generierung von Fibronectin-Spaltfragmenten, die bei Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis den Krankheitsverlauf nachweislich ungünstig beeinflussen. Insbesondere das 29 kDa große N-Terminale Fragment aber auch ein 50 kDa großes Fragment, das Kollagen bindet, erhöhen in Chondrozyten die Expression u.a. von entzündungsfördernden Zytokinen IL-1 α und β , und auch MMP3 (Homandberg 2001). In einer anderen Studie zu biologisch aktiven Fibronectin-Fragmenten, konnte auch nach Applikation des Fibronectin C-Terminus ein MAPK-vermittelter Anstieg der MMP1, MMP3 und MMP13-Expression in Chondrozyten beobachtet werden (Yasuda, Shimizu et al. 2003;

Yasuda, Julovi et al. 2004; Yasuda 2006). Fibronectin wurde bereits als Substrat für Meprin α und β beschrieben (Kruse, Becker et al. 2004). Hierbei wurde rekombinantes Fibronectin mit Meprin prozessiert und die Spaltfragmente N-terminal sequenziert. Denkbar ist, dass exogenes Meprin α und β Fibronectin, das als Bestandteil der ECM auch von HDFa Zellen ins Kulturmedium sezerniert wird, prozessieren und somit die MMP1 und MMP9-Expression der Fibroblasten anregen.

6. Literaturliste

- Aho, S., S. Rouda, et al. (1997). "Regulation of human interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) promoter activity by fibroblast growth factor." Eur J Biochem **247**(2): 503-10.
- Ambort, D., D. Stalder, et al. (2008). "A novel 2D-based approach to the discovery of candidate substrates for the metalloendopeptidase meprin." Febs J **275**(18): 4490-509.
- Banerjee, S. and J. S. Bond (2008). "Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation." J Biol Chem **283**(46): 31371-7.
- Barnes, K., J. Ingram, et al. (1989). "Proteins of the kidney microvillar membrane. Structural and immunochemical properties of rat endopeptidase-2 and its immunohistochemical localization in tissues of rat and mouse." Biochem J **264**(2): 335-46.
- Baxter, R. C., J. L. Martin, et al. (1989). "High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum." J Biol Chem **264**(20): 11843-8.
- Becker-Pauly, C., B. C. Bruns, et al. (2009). "News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab." J Mol Biol **385**(1): 236-48.
- Becker-Pauly, C., M. Howel, et al. (2007). "The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation." J Invest Dermatol **127**(5): 1115-25.
- Becker, C., M. N. Kruse, et al. (2003). "Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin." Biol Chem **384**(5): 825-31.
- Bernocco, S., B. M. Steiglitz, et al. (2003). "Low resolution structure determination shows procollagen C-proteinase enhancer to be an elongated multidomain glycoprotein." J Biol Chem **278**(9): 7199-205.
- Bertenshaw, G. P., M. T. Norcum, et al. (2003). "Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers." J Biol Chem **278**(4): 2522-32.
- Beynon, R. J., J. D. Shannon, et al. (1981). "Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney." Biochem J **199**(3): 591-8.
- Birk, D. E. (2001). "Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly." Micron **32**(3): 223-37.
- Bjarnason, J. B. and J. W. Fox (1994). "Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms." Pharmacol Ther **62**(3): 325-72.
- Blobel, C. P. and J. M. White (1992). "Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain." Curr Opin Cell Biol **4**(5): 760-5.
- Bode, W., F. X. Gomis-Ruth, et al. (1993). "Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and

- Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'." FEBS Lett **331**(1-2): 134-40.
- Bond, J. S. and R. J. Beynon (1995). "The astacin family of metalloendopeptidases." Protein Sci **4**(7): 1247-61.
- Bork, P. and G. Beckmann (1993). "The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins." J Mol Biol **231**(2): 539-45.
- Burrage, P. S., K. S. Mix, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases: role in arthritis." Front Biosci **11**: 529-43.
- Butt, A. J., S. M. Firth, et al. (2000). "Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells." J Biol Chem **275**(50): 39174-81.
- Bylander, J. E., G. P. Bertenshaw, et al. (2007). "Human and mouse homo-oligomeric meprin A metalloendopeptidase: substrate and inhibitor specificities." Biol Chem **388**(11): 1163-72.
- Camacho-Hubner, C., W. H. Busby, Jr., et al. (1992). "Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion." J Biol Chem **267**(17): 11949-56.
- Canty, E. G. and K. E. Kadler (2005). "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." J Cell Sci **118**(Pt 7): 1341-53.
- Chakraborti, S., M. Mandal, et al. (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 269-85.
- Chapman, J. A. (1989). "The regulation of size and form in the assembly of collagen fibrils in vivo." Biopolymers **28**(8): 1367-82.
- Chen, H., Z. He, et al. (1998). "Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins." Neuron **21**(6): 1283-90.
- Cheng, G., A. M. Cleary, et al. (1995). "Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling." Science **267**(5203): 1494-8.
- Cronshaw, A. D., L. A. Fothergill-Gilmore, et al. (1995). "The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase." Biochem J **306** (Pt 1): 279-84.
- Dai, S. M., Z. Z. Shan, et al. (2005). "Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal." Ann Rheum Dis **64**(5): 735-42.
- Dasu, M. R., R. E. Barrow, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts." Burns **29**(6): 527-31.
- Dumermuth, E., J. A. Eldering, et al. (1993). "Cloning of the PABA peptide hydrolase alpha subunit (PPH alpha) from human small intestine and its expression in COS-1 cells." FEBS Lett **335**(3): 367-75.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley, et al. (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 258-89.

- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." Endocr Rev **23**(6): 824-54.
- Fu, H., R. R. Subramanian, et al. (2000). "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 617-47.
- Funayama, E., T. Chodon, et al. (2003). "Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid." J Invest Dermatol **121**(6): 1326-31.
- Ghaffari, A., R. T. Kilani, et al. (2009). "Keratinocyte-conditioned media regulate collagen expression in dermal fibroblasts." J Invest Dermatol **129**(2): 340-7.
- Ghaffari, A., Y. Li, et al. (2006). "Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin." J Cell Biochem **98**(2): 383-93.
- Ghahary, A., F. Karimi-Busheri, et al. (2004). "Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts." J Invest Dermatol **122**(5): 1188-97.
- Gomis-Ruth, F. X. (2008). "Structure and mechanism of metallocarboxypeptidases." Crit Rev Biochem Mol Biol **43**(5): 319-45.
- Gomis-Ruth, F. X., L. F. Kress, et al. (1993). "First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases." Embo J **12**(11): 4151-7.
- Gomis-Ruth, F. X., W. Stocker, et al. (1993). "Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin." J Mol Biol **229**(4): 945-68.
- Grams, F., V. Dive, et al. (1996). "Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor." Nat Struct Biol **3**(8): 671-5.
- Granata, R., L. Trovato, et al. (2007). "Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms." J Thromb Haemost **5**(4): 835-45.
- Guevara, T., I. Yiallouros, et al. "Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase." J Biol Chem **285**(18): 13958-65.
- Hahn, D., D. Lottaz, et al. (1997). "C-cytosolic and transmembrane domains of the N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase alpha subunit (human meprin alpha) are essential for its retention in the endoplasmic reticulum and C-terminal processing." Eur J Biochem **247**(3): 933-41.
- Hartigan, N., L. Garrigue-Antar, et al. (2003). "Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity." J Biol Chem **278**(20): 18045-9.
- Hedrich, J., D. Lottaz, et al. "Fetuin-A and Cystatin C Are Endogenous Inhibitors of Human Meprin Metalloproteases." Biochemistry.
- Hengst, J. A. and J. S. Bond (2004). "Transport of meprin subunits through the secretory pathway: role of the transmembrane and cytoplasmic domains and oligomerization." J Biol Chem **279**(33): 34856-64.

- Herlyn, H. and H. Zischler (2005). "Identification of a positively evolving putative binding region with increased variability in posttranslational motifs in zonadhesin MAM domain 2." Mol Phylogenet Evol **37**(1): 62-72.
- Herzog, C., R. S. Haun, et al. (2009). "Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 904-8.
- Herzog, C., G. P. Kaushal, et al. (2005). "Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B." Cytokine **31**(5): 394-403.
- Hintze, V., M. Howel, et al. (2006). "The interaction of recombinant subdomains of the procollagen C-proteinase with procollagen I provides a quantitative explanation for functional differences between the two splice variants, mammalian tolloid and bone morphogenetic protein 1." Biochemistry **45**(21): 6741-8.
- Hirano, M., B. Y. Ma, et al. (2005). "Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta." J Immunol **175**(5): 3177-85.
- Holt, J. A., G. Luo, et al. (2003). "Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis." Genes Dev **17**(13): 1581-91.
- Homandberg, G. A. (2001). "Cartilage damage by matrix degradation products: fibronectin fragments." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S100-7.
- Huguenin, M., E. J. Muller, et al. (2008). "The metalloprotease meprinbeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion." PLoS One **3**(5): e2153.
- Hulmes, D. J. (2002). "Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures." J Struct Biol **137**(1-2): 2-10.
- Hulmes, D. J. (2008). Collagen diversity, synthesis and assembly. Collagen: Structure and Mechanics. P. Franzl. New York, Springer Science+Business Media: 15-41.
- Hulmes, D. J., K. E. Kadler, et al. (1989). "Pleomorphism in type I collagen fibrils produced by persistence of the procollagen N-propeptide." J Mol Biol **210**(2): 337-45.
- Jia, L. G., K. Shimokawa, et al. (1996). "Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins." Toxicon **34**(11-12): 1269-76.
- Jones, S. (2008). "Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19." Mol Pharm **5**(1): 42-8.
- Kadler, K. E., C. Baldock, et al. (2007). "Collagens at a glance." J Cell Sci **120**(Pt 12): 1955-8.
- Kessler, E. and R. Adar (1989). "Type I procollagen C-proteinase from mouse fibroblasts. Purification and demonstration of a 55-kDa enhancer glycoprotein." Eur J Biochem **186**(1-2): 115-21.
- Kohler, D., M. Kruse, et al. (2000). "Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro." FEBS Lett **465**(1): 2-7.
- Kronenberg, D., B. C. Bruns, et al. "Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly?" J Invest Dermatol.

- Kruse, M. N., C. Becker, et al. (2004). "Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors." Biochem J **378**(Pt 2): 383-9.
- Kurilic, M., L. Prpic-Massari, et al. "[Systemic therapy in the treatment of psoriasis: drugs of prebiological era]." Lijec Vjesn **132**(7-8): 246-51.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lalou, C., C. Lassarre, et al. (1996). "Isolation and characterization of proteolytic fragments of insulin-like growth factor-binding protein-3." Horm Res **45**(3-5): 156-9.
- Lam, E., R. T. Kilani, et al. (2005). "Stratifin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation." J Invest Dermatol **125**(2): 230-8.
- Leighton, M. and K. E. Kadler (2003). "Paired basic/Furin-like proprotein convertase cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi network." J Biol Chem **278**(20): 18478-84.
- Leuenberger, B., D. Hahn, et al. (2003). "Human meprin beta: O-linked glycans in the intervening region of the type I membrane protein protect the C-terminal region from proteolytic cleavage and diminish its secretion." Biochem J **369**(Pt 3): 659-65.
- Liang, K. C., C. W. Lee, et al. (2007). "Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells." J Cell Physiol **211**(3): 759-70.
- Linsenmayer, T. F., E. Gibney, et al. (1993). "Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis." J Cell Biol **121**(5): 1181-9.
- Lottaz, D., C. Buri, et al. (2007). "Compartmentalised expression of meprin in small intestinal mucosa: enhanced expression in lamina propria in coeliac disease." Biol Chem **388**(3): 337-41.
- Lottaz, D., D. Hahn, et al. (1999). "Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the alpha and beta subunits." Eur J Biochem **259**(1-2): 496-504.
- Mac Sweeney, A., S. Gil-Parrado, et al. (2008). "Structural basis for the substrate specificity of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteases." J Mol Biol **384**(1): 228-39.
- Machesney, M., N. Tidman, et al. (1998). "Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars." Am J Pathol **152**(5): 1133-41.
- Marchand, P., J. Tang, et al. (1994). "Membrane association and oligomeric organization of the alpha and beta subunits of mouse meprin A." J Biol Chem **269**(21): 15388-93.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.
- Mengshol, J. A., M. P. Vincenti, et al. (2000). "Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3." Arthritis Rheum **43**(4): 801-11.

- Miyazono, K. (1997). "TGF-beta receptors and signal transduction." Int J Hematol **65**(2): 97-104.
- Moali, C., B. Font, et al. (2005). "Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1." J Biol Chem **280**(25): 24188-94.
- Muraguchi, T., Y. Takegami, et al. (2007). "RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity." Nat Neurosci **10**(7): 838-45.
- Muslin, A. J., J. W. Tanner, et al. (1996). "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine." Cell **84**(6): 889-97.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-4.
- Nakamura, F. and Y. Goshima (2002). "Structural and functional relation of neuropilins." Adv Exp Med Biol **515**: 55-69.
- Newberry, E. P., D. Willis, et al. (1997). "Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element." Mol Endocrinol **11**(8): 1129-44.
- Ohler, A., M. Debela, et al. (2010). "Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation." Biol Chem.
- Oneda, B., N. Lods, et al. (2008). "Metalloprotease meprin beta in rat kidney: glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis." PLoS One **3**(5): e2278.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Pfleiderer, G., R. Zwiing, et al. (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): 1319-31.
- Phan, T. T., I. J. Lim, et al. (2003). "Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro." Am J Physiol Cell Physiol **284**(4): C860-9.
- Pozuelo Rubio, M., K. M. Geraghty, et al. (2004). "14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking." Biochem J **379**(Pt 2): 395-408.
- Reddy, V. S., S. D. Prabhu, et al. "Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(4): H1242-54.
- Ricard-Blum, S., S. Bernocco, et al. (2002). "Interaction properties of the procollagen C-proteinase enhancer protein shed light on the mechanism of stimulation of BMP-1." J Biol Chem **277**(37): 33864-9.

- Smith, J. C., B. E. Boone, et al. (2008). "Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways." J Invest Dermatol **128**(5): 1298-310.
- Smith, L. T., W. Wertelecki, et al. (1992). "Human dermatosparaxis: a form of Ehlers-Danlos syndrome that results from failure to remove the amino-terminal propeptide of type I procollagen." Am J Hum Genet **51**(2): 235-44.
- Steiglitz, B. M., D. R. Keene, et al. (2002). "PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1." J Biol Chem **277**(51): 49820-30.
- Sterchi, E. E., J. R. Green, et al. (1983). "Nonpancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA peptide) in the rat small intestine." J Pediatr Gastroenterol Nutr **2**(3): 539-47.
- Sterchi, E. E., W. Stocker, et al. (2008). "Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 309-28.
- Stocker, W., F. X. Gomis-Ruth, et al. (1993). "Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases." Eur J Biochem **214**(1): 215-31.
- Stocker, W., F. Grams, et al. (1995). "The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases." Protein Sci **4**(5): 823-40.
- Stocker, W. and R. Zwilling (1995). "Astacin." Methods Enzymol **248**: 305-25.
- Takahara, K., E. Kessler, et al. (1994). "Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE)." J Biol Chem **269**(42): 26280-5.
- Takahara, K., G. E. Lyons, et al. (1994). "Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues." J Biol Chem **269**(51): 32572-8.
- Tallant, C., R. Garcia-Castellanos, et al. "On the relevance of the Met-turn methionine in metzincins." J Biol Chem **285**(18): 13951-7.
- Titani, K., H. J. Torff, et al. (1987). "Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*." Biochemistry **26**(1): 222-6.
- Tomlinson, E., L. Fu, et al. (2002). "Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity." Endocrinology **143**(5): 1741-7.
- Tsukuba, T. and J. S. Bond (1998). "Role of the COOH-terminal domains of meprin A in folding, secretion, and activity of the metalloendopeptidase." J Biol Chem **273**(52): 35260-7.
- Tsukuba, T., T. Kadowaki, et al. (2002). "Chaperone interactions of the metalloproteinase meprin A in the secretory or proteasomal-degradative pathway." Arch Biochem Biophys **397**(2): 191-8.

- Villa, J. P., G. P. Bertenshaw, et al. (2003). "Critical amino acids in the active site of meprin metalloproteinases for substrate and peptide bond specificity." J Biol Chem **278**(43): 42545-50.
- Villa, J. P., G. P. Bertenshaw, et al. (2003). "Meprin proteolytic complexes at the cell surface and in extracellular spaces." Biochem Soc Symp(70): 53-63.
- Vincenti, M. P. and C. E. Brinckerhoff (2002). "Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors." Arthritis Res **4**(3): 157-64.
- 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): 975-82.
- Wolfman, N. M., A. C. McPherron, et al. (2003). "Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15842-6.
- Yan, L., K. Fei, et al. (2000). "Identification and characterization of hydra metalloproteinase 2 (HMP2): a meprin-like astacin metalloproteinase that functions in foot morphogenesis." Development **127**(1): 129-41.
- Yasuda, T. (2006). "Cartilage destruction by matrix degradation products." Mod Rheumatol **16**(4): 197-205.
- Yasuda, T., S. M. Julovi, et al. (2004). "Requirement of mitogen-activated protein kinase for collagenase production by the fibronectin fragment in human articular chondrocytes in culture." Mod Rheumatol **14**(1): 54-60.
- Yasuda, T., M. Shimizu, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase production by COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment in rheumatoid synovial cells." Lab Invest **83**(2): 153-62.
- Yiallourous, I., E. Grosse Berkhoff, et al. (2000). "The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases." FEBS Lett **484**(3): 224-8.
- Zapata, J. M., V. Martinez-Garcia, et al. (2007). "Phylogeny of the TRAF/MATH domain." Adv Exp Med Biol **597**: 1-24.
- Zhang, Y., G. Ge, et al. (2006). "Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of alpha2-macroglobulin." J Biol Chem **281**(51): 39096-104.

Eidesstattliche Erklärung

8. Eidesstattliche Erklärung

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

Mainz, 27.02.2011 _____
Bernd Bruns