

Interaktion von Astacin-Metalloproteasen mit dem Plasmaprotein Fetuin-A aus *Cyprinus carpio*

Dissertation zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Vorgelegt von Katharina Maria Meyer

Geboren am 27.12.1979 in Berlin

Mainz, den 18. Juli 2016

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 3. November 2016

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	Inhaltsverzeichnis	i
II.	Abbildungsverzeichnis	iv
III.	Tabellenverzeichnis	vi
IV.	Abkürzungsverzeichnis	vii
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Allgemeines zu Peptidasen	2
2.2	Astacin Familie	5
2.2.1	Astacin	6
2.2.2	BMP1-Tolloid-Proteasen (BTPs)	8
2.2.3	Meprine	8
2.2.4	<i>Hatching</i> Enzyme	9
2.2.4.1	Nephrosin	10
2.3	Cystatin-Superfamilie	11
2.3.1	Typ I: Stefine	12
2.3.2	Typ II: Cystatine	13
2.3.3	Typ III: Kininogene, Histidin-reiche Glykoproteine und Fetuine	13
2.3.3.1	Kininogen	13
2.3.3.2	Histidin-reiches Glykoprotein	14
2.3.3.3	Fetuine	14
2.4	Ziel dieser Arbeit	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Verwendete Chemikalien	17
3.2	Molekularbiologie	17
3.2.1	Bakterienstämme	18
3.2.2	Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung	18
3.2.3	Hitzeschocktransformation und Bakterienkultivierung	20
3.2.4	Plasmidisolierung und Konzentrationsbestimmung	20
3.2.5	Restriktionsanalyse und Sequenzierung	20
3.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen	21
3.2.7	Primer	21
3.2.8	D ¹⁴⁴ A Mutagenese	21
3.3	Heterologe Expression des rekombinanten Fisch-Fetuins-A	22
3.4	Proteinbiochemie	23
3.4.1	Nachweismethoden	23
3.4.1.1	Konzentrationsbestimmung	23
3.4.1.2	TCA-Fällung	24
3.4.1.3	SDS PAGE	24
3.4.1.4	Coomassie-Färbeprotokoll	26
3.4.1.5	Western Blot	26
3.4.1.6	Immunodektion mittels Chemiluminiszenz	26
3.4.2	Reinigung des Fisch-Fetuins-A	29
3.4.2.1	Lyse der bakteriellen Zellen	29
3.4.2.2	Nickel-NTA Affinitätschromatographie	29
3.4.2.3	Proteinfaltung, Dialyse und Konzentration	30

3.4.2.4	Affi-Gel® Blau Affinitätsgelchromatographie	32
3.4.3	Native Elektrophorese	32
3.4.3.1	Zymographie nach Troeberg & Nagase (2003)	32
3.4.4	Spaltung des Fisch-Fetuin-A durch Proteasen	34
3.5	Hemmung der proteolytischen Aktivität verschiedener Proteasen durch Fisch-Fetuin-A	34
3.5.1	Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Proteasen und Fisch-Fetuin-A	34
3.5.1.1	Substrate	35
3.5.1.2	Geräte und Einstellungen/Programme für die Bestimmung proteolytischer Aktivitäten	39
3.5.1.3	Bestimmung kinetischer Parameter	40
3.5.2	Hemmung verschiedener Proteasen durch Fisch-Fetuin-A	43
3.6	Bioinformatik	45
3.6.1	Sequenzalignments	45
3.6.2	Strukturvorhersagen	45
3.6.3	Stammbaumanalyse der Cystatin-Superfamilie	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Die verwendete Inhibitorsequenz	47
4.2	Expression des Inhibitors Fetuin-A aus <i>Cyprinus Carpio</i>	47
4.3	Der Inhibitor nach der Reinigung	50
4.4	Kontrolle des gewonnenen Fisch-Fetuin-A	51
4.5	Affi-Gel® Blau Affinitätschromatographie	52
4.6	Untersuchung der Interaktion des Inhibitors mit der Astacin-Protease Nephrosin ..	53
4.6.1	Native Gelelektrophorese von Fisch-Fetuin-A und Nephrosin	53
4.6.2	Gelatine-Zymographie	54
4.7	Prozessierung des Fisch-Fetuin-A durch Proteasen	55
4.8	Hemmung der proteolytischen Aktivität verschiedener Proteasen durch Fisch-Fetuin-A	56
4.8.1	Vergleich von Fisch-Fetuin-A (wt) und der (D ¹⁴⁴ A) Mutante	56
4.8.2	Inhibition von Astacinproteasen durch Fisch-Fetuin-A	57
4.8.2.1	Nephrosin und Fisch-Fetuin-A	57
4.8.2.2	Astacin und Fisch-Fetuin-A	57
4.8.2.3	Mepri α und Fisch-Fetuin-A	58
4.8.2.4	Mepri β und Fisch-Fetuin-A	60
4.8.2.5	BMP1	61
4.8.3	Inhibition von Serinproteasen durch Fisch-Fetuin-A	61
4.8.4	Inhibition der Cysteinprotease Papain durch Fisch-Fetuin-A	62
4.9	Bioinformatische Untersuchungen	63
4.9.1	Astacine	63
4.9.1.1	Sequenzvergleich der Astacine	63
4.9.1.2	Strukturvergleiche der Astacine	66
4.9.2	Fetuine	68
4.9.2.1	Sequenzvergleiche verschiedener Fetuine	68
4.9.2.2	Homologiemodellierung der Cystatin-ähnlichen Domänen in Fetuinen	71
4.10	Phylogenetischer Stammbaum	79
5	Diskussion	82
5.1	Heterologe Expression von Fisch-Fetuin-A	82
5.2	Hemmung von Astacinproteasen durch Fisch-Fetuin-A	84
5.2.1	Inhibition von Proteinasen anderer mechanistischer Klassen	86
5.2.2	Vergleich von Fisch-Fetuin-A (wt) und der (D ₁₄₄ A) Mutante	86

5.3	Spaltung des Fisch-Fetuin-A durch Astacinproteasen	87
5.4	Alignments und Modelle	88
5.4.1	Nephrosin	88
5.4.2	Fisch-Fetuin	89
5.4.2.1	Disulfidbrücken in Fetuinen	90
5.4.2.2	Die dritte Domäne der Fetuine	91
5.4.2.3	Weitere Strukturmerkmale	91
5.4.2.4	Mögliche Anordnungen der Domänen zueinander	94
5.5	Stammbaumanalyse	95
5.6	Fazit	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Anhang.....	126
7.1	Fetuin-Sequenzalignment.....	126
7.2	Das verwendete Inhibitor Konstrukt im Vergleich zu <i>full length</i> Fetuin des Karpfens	132
7.2.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Fisch-Fetuin-A	133
7.2.2	pQE-TriSystem His- <i>Strep</i> 2 Vektorkarte.....	134
7.2.3	pREP4-Plasmid	136
7.3	Zugangsnummern der verwendeten Proteinsequenzen	136
7.4	Bindungsstellen für die Mutagenese-Primer	138
7.5	Extinktionskoeffizienten und Quellen für die verwendeten Substrate	139
7.6	Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren	139
7.7	Abkürzungen für Nukleotide	139
7.8	Veröffentlichung	140
8	Eidesstattliche Erklärung	141
9	Curriculum Vitae.....	142

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Einordnung von Proteasen der Astacinfamilie in die allgemeine Klassifikation von Proteasen.....	2
Abbildung 2:	Klassifikation der Adamalysine/Reprolysine.....	4
Abbildung 3:	Übersicht über die Gliederung der Matrix Metalloproteinasen und schematische Darstellung ihrer Domänenorganisationen.....	5
Abbildung 4:	Gliederung der Astacinfamilie und schematische Darstellung ihrer Domänenorganisation.....	6
Abbildung 5:	Struktur des Astacins und seines aktiven Zentrums.....	7
Abbildung 6:	Übersicht über die Domänen einiger Mitglieder der Cystatin-Superfamilie.....	11
Abbildung 7:	Darstellung von Cystatin aus dem Hühnereiklar und Stefin B mit Papain.....	12
Abbildung 8:	Hydrolyse des chromogenen para-Nitroanilid (pNA) Substrates.....	35
Abbildung 9:	Absorptionspektren von p-Nitroanilid und p-Nitroanilin.....	36
Abbildung 10:	Schema des Funktionsprinzips von FRET-Substraten am Beispiel Mca/Dnp.....	37
Abbildung 11:	Fluoreszenzspektren der fluorogenen Gruppe MCA und des AMCs nach proteolytischer Abspaltung von einer Peptidkette und Strukturformeln.....	39
Abbildung 12:	Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante K_M	41
Abbildung 13:	Darstellung einer Tripeptidkette mit seinen Peptidbindungen und Torsionswinkeln.....	45
Abbildung 14:	Ramachandran Diagramm für ZHE1 (3LQB.pdb).....	46
Abbildung 15:	Kontrolle der heterologen Expression des reifen Fisch-Fetuin-A in <i>E. coli</i> M15[pREP4].	48
Abbildung 16:	Ni-NTA Elutionsprofile der parallelen Reinigung von Fisch-Fetuin-A und der (D144A)-mutierten Variante.....	49
Abbildung 17:	Kontrolle des Reinigungserfolgs nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	49
Abbildung 18:	Kontrolle der Faltung des Fisch-Fetuin-A, sowie des D144A- Fisch-Fetuin-A.....	50
Abbildung 19:	Vergleich verschiedener Fisch-Fetuin-A Chargen per SDS PAGE.....	51
Abbildung 20:	Gegenüberstellung der Aktivität verschiedener Fisch-Fetuin-A Chargen per FRET assay.	51
Abbildung 21:	Elutionsprofil der Affi-Gel® Blau Affinitätschromatographie.....	52
Abbildung 22:	Kontrolle von Affi-Gel® Blau-Elutionsfraktionen durch SDS PAGE und Vergleich der inhibitorischen Aktivität des Fisch-Fetuin-A aus verschiedenen affinitätschromatographischen Reinigungen.....	53
Abbildung 23:	Native Gelelektrophorese von Fisch-Fetuin-A und autoaktiviertem Nephrosin.....	54
Abbildung 24:	Gelatine-Zymographie von Nephrosin und Fisch-Fetuin-A.....	54
Abbildung 25:	Fisch-Fetuin-A nach der Prozessierung durch Proteasen der Astacinfamilie.....	55
Abbildung 26:	Der Einfluß von Fisch-Fetuin-A auf die Nephrosin-Aktivität.....	57
Abbildung 27:	Enzymkinetik von Astacin mit Fisch-Fetuin-A.....	58
Abbildung 28:	Darstellung der Inhibitionskinetiken von Meprin α mit Fisch-Fetuin-A.....	59
Abbildung 29:	Doppelt-reziproke Auftragung aller Werte der Inhibition von Meprin α durch Fisch-Fetuin-A nach Lineweaver und Burk.....	59
Abbildung 30:	Darstellung der Inhibitionskinetiken von Meprin β mit Fisch-Fetuin-A.....	60
Abbildung 31:	Doppelt-reziproke Auftragung aller Werte der Inhibition von Meprin β durch Fisch-Fetuin-A.....	61
Abbildung 32:	Der Einfluß von Fisch-Fetuin-A auf die Trypsinaktivität nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten.....	62
Abbildung 33:	Der Einfluß von 500 nM Fisch-Fetuin-A auf die Aktivität von Serinproteasen.....	62
Abbildung 34:	Sequenzvergleich der Proteasedomänen verschiedener Astacine.....	65
Abbildung 35:	Basische Reste in hypothetischen Heparinbindungsstellen von Karpfen- und Zebrafisch-Nephrosin.....	65

Abbildung 36:	<i>Gegenüberstellung der S₁' Substratbindungstaschen der modellierten Nephrosinstrukturen.</i>	67
Abbildung 37:	<i>Ausschnitte aus Sequenzvergleichen verschiedener Cystatine.</i>	70
Abbildung 38:	<i>Gegenüberstellung der modellierten Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuinen.</i>	74
Abbildung 39:	<i>Seitenansicht der markierten Modelle aus der Abbildung 38.</i>	74
Abbildung 40:	<i>Sekundärstrukturen der modellierten Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine.</i>	76
Abbildung 41:	<i>Latexin-ähnliche Anordnung beider Cystatin-ähnlicher Domänen des Fisch-Fetuin-A.</i>	78
Abbildung 42:	<i>Latexin Strukturen (Bänderdarstellung).</i>	79
Abbildung 43:	<i>Phylogenetischer Stammbaum einzelner Cystatin-ähnlicher Domänen von Mitgliedern der Cystatin-Superfamilie.</i>	81
Abbildung 44:	<i>Schnittstellen der zweiten Fisch-Fetuin-A Domäne, die im Komplex mit Nephrosin nicht durch Trypsin hydrolysiert werden.</i>	93
Abbildung 45:	<i>Bänderdarstellung von dimerisiertem humanem Cystatin C.</i>	95
Abbildung 46:	<i>Vergleich vollständige Fetuin Sequenzen von Säugetieren, Schlangen, echten Knochenfischen und einem Knorpelfisch.</i>	131
Abbildung 47:	<i>Vergleich der Aminosäuresequenzen von Karpfen Fetuin-S und -L und dem reifen Fisch-Fetuin-A.</i>	132
Abbildung 48:	<i>Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Fisch-Fetuin-A.</i>	133
Abbildung 49:	<i>Vektorkarte mit Restriktionsschnittstellen des pQE-TriSystem His-Strep 2.</i>	134
Abbildung 50:	<i>Sequenzbereich der MCS des pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektors.</i>	135
Abbildung 51:	<i>Vektorkarte mit Restriktionsschnittstellen des pREP4 Plasmids.</i>	136
Abbildung 52:	<i>Positionen der Primerbindungsstellen für die Einfügung einer Punktmutation innerhalb der für Fisch-Fetuin-A kodierenden Sequenz.</i>	138

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	<i>Escherichia coli</i> Stämme, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.	18
Tabelle 2:	Lösungen für die Kultivierung der verschiedenen Bakterienstämme.....	19
Tabelle 3:	Verwendete Oligonukleotid-Primer.	21
Tabelle 4:	Puffer für die SDS Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli.	25
Tabelle 5:	Pipettierschema für die Gelherstellung für die SDS PAGE nach Laemmli.	25
Tabelle 6:	Materialien und Puffer für das semi dry Blotverfahren.	26
Tabelle 7:	Puffer für den immunologischen Nachweis von Strep-tag markierten Proteinen mittels Chemilumineszenz.	27
Tabelle 8:	Puffer für den immunologischen Nachweis von His-tag markierten Proteinen mittels Chemilumineszenz.	27
Tabelle 9:	Reagenzien für die Detektion von Strep-tag und His-tag markierten Proteinen.	27
Tabelle 10:	Behandlungsprotokoll der Membranen für die Immunodetektion des Strep-tags, bzw. His-tags.....	28
Tabelle 11:	Zusammensetzung des stripping Puffers.	28
Tabelle 12:	Lysepuffer für die Herstellung von Bakterienlysaten unter denaturierenden Bedingungen.	29
Tabelle 13:	Puffer für die Nickel-Chelat Affinitätschromatographie.	30
Tabelle 14:	Faltungspuffer für die Renaturierung der rekombinanten Proteine.....	31
Tabelle 15:	Endkonzentrationen im Faltungsansatz der rekombinanten Proteine.	31
Tabelle 16:	Puffer für die native Gelelektrophorese.	32
Tabelle 17:	Zusammensetzung eines Zymographiegels.	33
Tabelle 18:	Puffer für die Zymographie und die native Gelelektrophorese.	33
Tabelle 19:	Beispiele von FRET-Substraten, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	38
Tabelle 20:	Auflistung der getesteten Proteasen und der Bedingungen während des Aktivitätstests	44
Tabelle 21:	Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Astacin mit und ohne Fisch-Fetuin-A, durch den Umsatz des FRET Substrates Dns-PKRAPWV.	58
Tabelle 22:	Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Meprin α mit und ohne Fisch-Fetuin-A, durch den Umsatz des FRET Substrates MOCAc-YVADAPK(Dnp)NH ₂	60
Tabelle 23:	Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Meprin β mit und ohne Fisch-Fetuin-A.....	61
Tabelle 24:	Daten aus den Ramachandran Diagrammen für die Bewertung der modellierten Nephrosin-Strukturen.	66
Tabelle 25:	Bewertung der modellierten Strukturen der Cystatin-ähnlichen Domänen.....	77
Tabelle 26:	Legende der Fetuin-Sequenzen des folgenden Alignments.	126
Tabelle 27:	Sequenzen von Astacinmetalloproteinasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	136
Tabelle 28:	Fetuin-Sequenzen, die in dieser Arbeit für die Stammbaumanalyse und Sequenzvergleiche verwendet wurden.	137
Tabelle 29:	Extinktionskoeffizienten und die entsprechenden Quellen für die verwendeten Substrate. .	139

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[E]	Enzymkonzentration
[S]	Substratkonzentration
μ	Mikro
3x PP	3-fach Probenpuffer
Å	Ångström
Ac	Acetyl
ADAM	<i>a disintegrin and a metalloproteinases</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and a metalloproteinases with thrombospondin-motif</i>
AHSG	α ₂ -Heremans-Schmid-Glykoprotein
AK	Antikörper
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
Anz.	Anzahl
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure/n
BMP1	<i>bone morphogenetic protein 1</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>bone sialic acid-containing protein</i>
BTPs	BMP1-Tolloid-Proteasen
c	Stoffmengenkonzentration (mol/l)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Kalziumphosphat
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CiMP1	Cichlid Metalloproteinase 1
cMFS	<i>chinese mamushi serum factor</i>
C-Terminus	Carboxyl-Ende der Aminosäuresequenz
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CUB	<i>complement factors C1r & C1s</i> – UEGF – BMP1
D	Deutschland
d	Schichtdicke
D1-3	Bezeichnung der einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen (1 bis 3)
Da	Dalton
Dabcyl	4-(4-Dimethylaminophenylazo)-benzoyl
Dansyl	5-Dimethylamino-1-naphthalen-sulfonyl
DL	Durchlauf
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
Dns	Dansyl
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E64	trans-Epoxisuccinyl-L-Leucylamido-4-Guanidiniobutan)
Edans	5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalen-1-sulfonsäure

EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EF	Elutionsfraktion(en)
EHE	<i>eel hatching enzyme</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde/n
H ₂ O reinst	hochgereinigtes Wasser (<i>Aqua valde purificata</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCE	<i>high choriolytic enzyme</i>
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRG	Histidin-reiches Glykoprotein
HSF	Habu Serum Faktor
I	Intensität nach der Absorption ($W \cdot m^{-2}$)
I ₀	Intensität des einfallenden monochromatischen Lichts ($W \cdot m^{-2}$)
IgG	Immunglobulin Gamma
Int _{max}	maximale Intensität
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase
jMSF	<i>japanese mamushi serum factor</i>
k _{cat}	Wechselzahl
K _i	Inhibitionskonstante
K _M	Michaelis-Menten Konstante
Kng/KNG	Kininogen
Konz.	Konzentration
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCE	<i>low choriolytic enzyme</i>
M	mol/l
MAM	<i>meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ</i>
MCA	4-Methyl-Coumaryl-7-Amid
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute/n
mM	Millimolar
MM XP	<i>MagicMark™ XP</i> (Invitrogen, Karlsruhe, D)
MMP	Matrix Metalloproteinase(n)
MOCac	(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl
mTld	<i>mammalian tolloid</i>
MT-MMP	<i>membrane type MMP</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs (Frankfurt am Main, D))
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Qiagen, Hilden, D)
Nle	L-Norleucyl (L-2-Aminohexanoyl)

nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Ende der Aminosäuresequenz
Nva	L-Norvalyl (L-2-Aminoaleryl)
OD	optische Dichte
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
P7 Marker	Protein Marker, 7-175 kDa (NEB, Frankfurt am Main, D)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Prokollagen C Protease
PCPE	PCP <i>enhancer</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PM Marker	<i>broad range</i> Protein Marker, 2-212 kDa (NEB, Frankfurt am Main, D)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>para</i> -Nitroanilid
POX	Meerrettich-Peroxidase
PP63	<i>rat tyrosine kinase inhibitor</i> ; = Fetuin-A (AHSG)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QHE	<i>quail hatching enzyme</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Insektenzellen
sFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
Suc	Succinyl (3-Carboxy-propionyl)
SVMP	<i>snake venom metalloproteinase</i>
TACE	TNF- α <i>converting enzyme</i> (ADAM 17)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAILS	<i>terminal amine isotopic labeling of substrates</i>
TBS	Tris <i>buffered saline</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLL	<i>tolloid like</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TuHE	<i>turtle hatching enzyme</i>
V	Volt
v	Umsatzgeschwindigkeit
v ₀	Umsatzgeschwindigkeit bei Abwesenheit eines Inhibitors
v _i	Umsatzgeschwindigkeit bei Anwesenheit eines Inhibitors
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewichtsprozent)

v/v	<i>volume/volume</i> (Volumenprozent)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactosidase
XP	siehe <i>MagicMarkTM XP</i>
ZHE1	<i>zebrafish hatching enzyme 1</i>
ZK	Zellkultur
ZP	<i>zona pellucida</i> Glykoprotein
ϵ	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ($\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)
λ_{Em}	Wellenlänge, bei der die emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert wurde
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
$\Sigma \text{ Nt}$	Summe der Nukleotide

1 ZUSAMMENFASSUNG

Proteasen der Astacinfamilie wurden bisher in allen Großgruppen biologischer Organismen – außer den Pflanzen – gefunden. Der Mensch besitzt sechs Gene dieser Familie. Beispielsweise während der Befruchtung der Eizelle, der Entwicklung und der Kollagenassemblierung übernehmen diese Proteasen wichtige Funktionen. Ist die Expression oder die Aktivität dieser Proteasen nicht adequat reguliert, kann dies zu verschiedenen Krankheiten führen. Demzufolge ist die Kenntnis ihrer Regulation durch aktivierende Faktoren oder Inhibitoren notwendig. Diese Arbeit soll zur Aufklärung der Funktionsweise des endogenen Hemmstoffs Fetuin beitragen. Der Inhibitor Fisch-Fetuin-A wurde erstmals 2004 zusammen mit der Astacinprotease Nephrosin aus den hematopoietischen Geweben des Karpfens isoliert. Im Menschen wurden die Fetuine-A und -B identifiziert, welche unterschiedliche Funktionen im Organismus übernehmen.

Die aktive Form des verkürzten Fisch-Fetuin-A wurde mit Hilfe des pQE-TriSystem His-*Strep* Vektor 2 in *E. coli* M15[pREP4] exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch isoliert und in die native, funktionelle Konformation gefaltet. Durch den Expressionsvektor erhält das Fusionsprotein einen N-terminalen *Strep-tag* und einen C-terminalen *His-tag*, welche unter anderem für die Reinigung und die Identifizierung genutzt wurden. Die Metalloproteasen Meprin α und Meprin β schneiden den Inhibitor an definierten Positionen. Meprin α schneidet im N-terminalen und Meprin β im C-terminalen Bereich der Fisch-Fetuin-A Sequenz. Dabei ist die Spaltung durch Meprin β schneller. Für Astacin ist der Inhibitor kein Substrat. Kinetische Messungen mit Astacin lassen auch darauf schließen, dass Fisch-Fetuin-A diese Protease nicht hemmt. Meprine hingegen werden gehemmt. Die Inhibitionskonstante K_i für Fisch-Fetuin-A mit Meprin α beträgt 115 nM und mit Meprin β 556 nM und weist so Fisch-Fetuin-A als physiologisch relevanten Inhibitor dieser Astacinproteasen aus. Außerdem konnte die Hemmung der Astacinprotease Nephrosin aus *Danio rerio* (Zebrafisch) und Trypsin gezeigt werden. Weitere Serinproteasen und die Cysteinprotease Papain wurden nicht durch Fisch-Fetuin-A gehemmt.

Aufgrund der Substratpräferenz der Meprine wurde vermutet, dass bei der Inhibition der Astacinproteasen eine negativ geladene Aminosäure eine Rolle spielen könnte. Die D¹⁴⁴A-Fisch-Fetuin-A-Mutante zeigte jedoch kein verändertes Verhalten gegenüber Meprin α . In Sequenzvergleichen wurde besonderes Augenmerk auf saure Reste in der Aminosäuresequenz des Fisch-Fetuin-A gelegt. Außerdem wurden die Strukturen der beiden Cystatin-ähnlichen Domänen von Fisch-Fetuin-A, humanem Fetuin-A und humanem Fetuin-B berechnet. Auch diese Strukturen wurden auf exponierte, negativ geladene Reste untersucht, welche inhibitorische Funktionen übernehmen könnten. Diese Daten grenzen den inhibitorisch aktiven Bereich auf die α -Helix der zweiten Domäne oder den Bereich zwischen den β -Faltblattsträngen β_3 und β_4 ein und legen den Grundstein weiterer Analysen. Weitere Untersuchungen sollten sich daher einerseits auf die Reste Glu¹⁵⁸ bzw. Glu¹⁶⁹ von Fetuin-A bzw. B und andererseits auf den ungeordneten Bereich, welcher gegenüber der beiden *loops* L1 und L2 liegt, konzentrieren.

Bisher ist noch kein Mechanismus der Regulation von Astacinen durch endogene Inhibitoren aufgeklärt. Mit dieser Arbeit wird zum einen ein umfangreicheres Bild der Typ III Cystatine, insbesondere der Fetuine, präsentiert. Zum anderen werden potentielle inhibitorische Positionen der Fetuine auf ein überschaubares Maß reduziert. Nun gilt es, diese Thesen zu prüfen.

2 EINLEITUNG

2.1 ALLGEMEINES ZU PEPTIDASEN

Enzyme haben für das Leben eine wichtige Bedeutung, denn im Organismus sind Enzyme für den Stoffwechsel, aber auch für die Replikation und die Transkription der DNA essentiell. Als Katalysatoren beschleunigen sie chemische Reaktionen, indem sie den Übergangszustand stabilisieren und dadurch die Aktivierungsenergie herabsetzen, die bei vielen zwar exergonischen, aber dennoch nicht spontan ablaufenden, chemischen Reaktionen aufgebracht werden muss.

Proteasen oder Peptidasen sind Enzyme, die Peptidbindungen durch Hydrolyse spalten (Barrett & McDonald, 1986; Rawlings, 2013). Sie werden durch ihren Angriffsort am Substrat – an den Enden der Polypeptidkette oder innerhalb einer Peptidkette bzw. eines Proteins – in **Exopeptidasen** und **Endopeptidasen** unterschieden (Barrett *et al.*, 2004). Für letztere ist außerdem der Begriff „Proteinase“ gebräuchlich (Barrett & McDonald, 1986).

Peptidasen unterscheiden sich aber nicht nur durch ihren Wirkungsort, sondern auch durch den Mechanismus der katalytischen Spaltung, aufgrund dessen sie klassifiziert werden. Im Folgenden wird kurz auf Proteaseklassen eingegangen, die im Laufe der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Weitere Klassen sind der Abbildung 1 zu entnehmen.

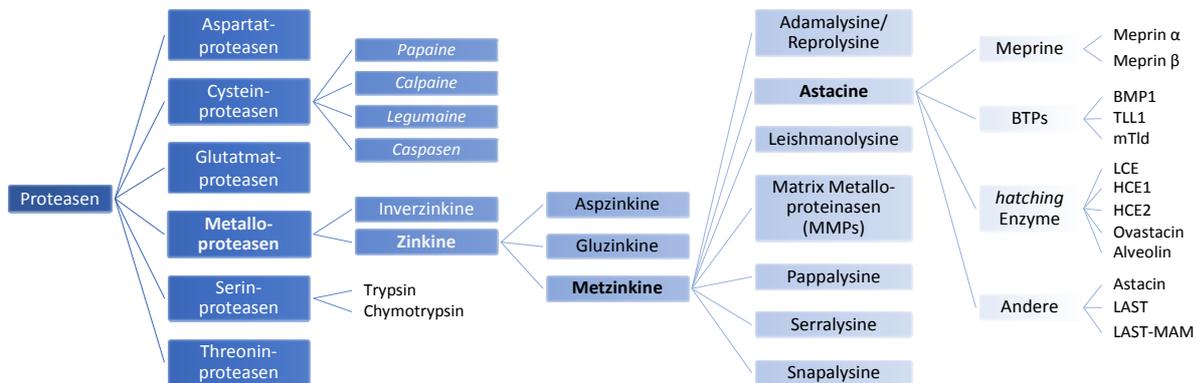


Abbildung 1: Einordnung von Proteasen der Astacinfamilie in die allgemeine Klassifikation von Proteasen.

Ausgewählte Vertreter sind ohne farbliche Unterlegung angegeben. Des Weiteren sind Familien von Cysteinproteinasen kursiv gedruckt. Diese Grafik basiert auf den im Text zitierten Veröffentlichungen, insbesondere auf Becker-Pauly *et al.*, 2009; Gomis-Rüth *et al.*, 2012a und Rawlings *et al.*, 2014.

BTPs = BMP1-Tolloid-Proteasen, BMP1 = bone morphogenetic protein 1, TLL1 = tolloid-like protein 1, mTld = mammalian tolloid, LCE = low choriolytic enzyme, HCE = high choriolytic enzyme, LAST = Limulus Astacin, LAST-MAM = Limulus Astacin mit einer MAM-Domäne, MAM = Meprin A5 Protein Tyrosin Phosphatase μ .

Serinproteasen wirken über eine sogenannte katalytische Triade, die durch die Aminosäurereste Histidin, Aspartat und Serin (His⁵⁷, Asp¹⁰² und Ser¹⁹⁵ im bovinen Trypsin; Walter *et al.*, 1982)¹ im aktiven Zentrum gebildet wird. Die Hydroxylgruppe in der Seitenkette des Serin wird durch die

¹ In dieser Arbeit wird der 1- und 3-Buchstabencode angewendet. Diese sind im Anhang (7.6) aufgeführt.

beiden anderen involvierten Aminosäuren polarisiert, wodurch der nucleophile Angriff der Peptidbindung durch den Sauerstoff der Serinseitenkette ermöglicht wird (Kasserra & Laidler, 1969; Huber & Bode, 1978). Prominente Vertreter der Serinpeptidasen sind Trypsin, Chymotrypsin und die Kallikreine.

Bei **Cysteinproteasen** wird die katalytische Einheit durch eine Diade aus Cystein und Histidin gebildet (Kasserra & Laidler, 1969). Hier übernimmt der Stickstoff des Imidazolrings des Histidins das Proton der Thiolgruppe des Cysteins. Das Thiolat kann nun die Peptidbindung angreifen. Die Klasse der Cysteinproteasen wird in neun *Clans* mit insgesamt *circa* 60 Familien untergliedert (Rawlings *et al.*, 2012). Zu nennen sind hier die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, mit dessen sehr gut untersuchtem Vertreter Papain aus der Papayafrucht (*Carica papaya*).

Metalloproteasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum in der Regel ein Zinkkation (Zn^{2+}), welches die Katalyse der Peptidbindungsspaltung durch die Aktivierung eines Wassermoleküls ermöglicht. Eine weitere Untergliederung erfolgt entsprechend der Ausrichtung eines Teils des Zink-bindenden Motivs: HEXXH¹ für Zinkine und HXXEH für Inverzinkine. In beiden Stämmen wird das Zinkion durch die Stickstoffatome der Histidine komplexiert. Zinkine werden weiter anhand des dritten Zinkion-bindenden Liganden (z. B. Apartat bei Aspzinkinen und Glutamat bei Gluzinkinen) unterschieden. Einen großen Anteil haben hier Proteinase, die aufgrund konservierter Sequenzmotive als **Metzinkine** zusammengefasst werden. Mit der Konsensussequenz HEXXHXXGXXH/D weisen alle Mitglieder der Metzinkin-Superfamilie eine Verlängerung des Zink-bindenden HEXXH-Motivs der Zinkine auf (Stöcker *et al.*, 1988; Bode *et al.*, 1993; Gomis-Rüth, 2003). Des Weiteren besitzen sie alle eine 1,4- β -Schleife (β -turn), die in allen Proteinasefamilien dieser Superfamilie unterhalb des aktiven Zentrums liegt und einen konservierten Methioninrest enthält, welcher dieser Schleife die Bezeichnung als *Met-turn* verschaffte (Bode *et al.*, 1993; Stöcker *et al.*, 1995). Wie aus der Abbildung 5D (Seite 7) ersichtlich ist, steht dieser hydrophobe Rest in keinem direkten Kontakt zum katalytisch wichtigen Zinkion. Die Frage, warum Methionin in dieser Position bevorzugt ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Gomis-Rüth, 2009).

Die Superfamilie der Metzinkine umfasst fünfzehn Proteasefamilien, von denen erst sieben Familien strukturell charakterisiert werden konnten (Gomis-Rüth, 2009). Zu ihnen gehören die **Adamalysine**, die auch als Reprolysine bezeichnet werden (Killar *et al.*, 1999). Diese Familie umfasst Metalloproteinasen aus dem Schlangengift (SVMPs, *snake venom metalloproteinases*) die Proteine der Basalmembran abbauen können, sowie die Gruppe der ADAMs (*a disintegrin and metallopeptidase*), die membrangebunden oder als ADAMTSs (*a disintegrin and metallopeptidase with thrombospondin motif*) sezerniert vorliegen (Stöcker & Bode, 1995; Klein & Bischoff, 2011; Takeda *et al.*, 2012). Bis auf einige, proteolytisch nicht aktive ADAMs besitzen sie alle in ihrer Metalloproteasedomäne das Zink-bindende HEXGHXXGXXHD Motiv (Black & White, 1998; Fahrenholz *et al.*, 2000). Adamalysine werden – wie auch alle anderen Metzinkine – als inaktive Vorstufen synthetisiert (Zymogen). Dabei bindet ein konservierter Cysteinrest des Propeptids direkt an das Zinkion des aktiven Zentrums. Die Aktivierung der Protasen erfolgt durch den „Cystein-switch“, bei dem der Cysteinrest von dieser Position proteolytisch oder auch auf andere Weise entfernt wird (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass das Propeptid nicht nur die Latenz der Protease sicherstellt, sondern auch - durch seine Funktion als Chaperon - für die Umfaltung der Primärstruktur zum aktiven Enzym notwendig ist (Fahrenholz *et al.*, 2000).

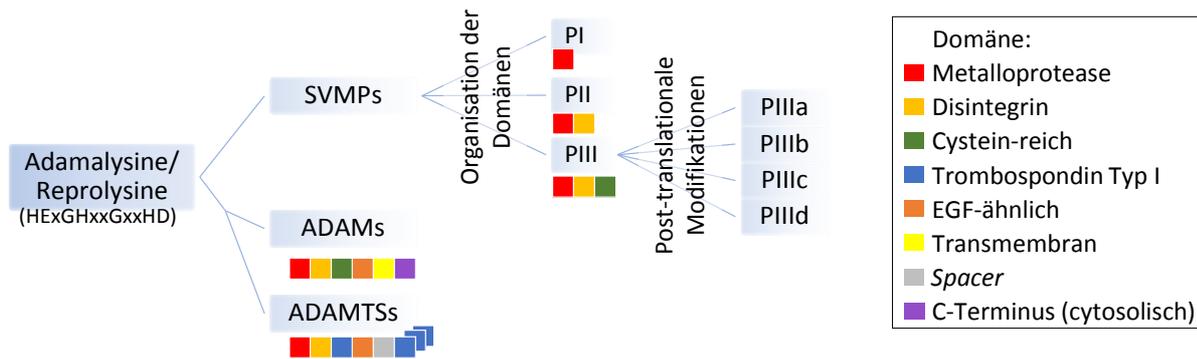


Abbildung 2: Klassifikation der Adamalysine/Reprolysinen.

Konservierte Aminosäuren des Zink-bindenden Motivs, die Grundlage der Einteilung der SVMPs, sowie die charakteristischen Domänen sind angegeben. Diese Grafik wurde auf Grund der im Text zitierten Veröffentlichungen, insbesondere nach Takeda et al. (2012) und der Daten der UniProt-Datenbank (The UniProt Consortium, 2013) erstellt. SVMP = snake venom metalloproteinase; ADAM = a disintegrin and a metalloprotease, ADAMTS = ADAM mit Thrombospondin Motiv.

Die Domänenorganisation der Adamalysine ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Über die Disintegrin-Domäne wird die Zelladhäsion und durch die Cystein-reiche Domäne die Fusion von Zellen vermittelt (Black & White, 1998). Außerdem sind beide Domänen für die Substraterkennung notwendig (Reiss & Saftig, 2009). Der im Cytosol lokalisierte Carboxylterminus (C-Terminus) ist für die Übertragung von Signalen (Signaltransduktion) erforderlich.

ADAMs übernehmen verschiedenste Aufgaben im Organismus, zum Beispiel bei der Spermato-genese, bei der Bildung epidermalen Gewebes oder – ganz generell – durch die Entfernung von Rezeptoren von der Zelloberfläche (Killar et al., 1999; Edwards et al., 2008; Reiss & Saftig, 2009). Während der Immunantwort führt ADAM17 (TNF- α converting enzyme, TACE) durch die Prozessierung von Pro-TNF- α (tumor necrosis factor α) zu dessen Freisetzung (Amour et al., 1998). Auch ADAM10 ist dazu in der Lage. Darüber hinaus wirkt es im Gehirn als α -Sekretase, welche das APP (amyloid precursor protein) hydrolytisch spaltet und zur Freisetzung von löslichen APP α -Fragmenten führt (Fahrenholz et al., 2000). Die Aktivität dieser und weiterer ADAMs kann beispielsweise durch TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase) gehemmt werden (Amour et al., 1998; Fedak et al., 2006; Wisniewska et al., 2008).

Aus dem Serum von Grubenottern (*Crotalinae*), einer Unterfamilie der Vipern (*Viperidae*) wurden mit MSFs (*mamushi serum factors*) und HSF (*habu serum factor*) Inhibitoren der SVMPs isoliert, die aufgrund ihrer Sequenzmerkmale in die Fetuin-Familie (siehe 2.3.3.3) eingeordnet werden (Yamakawa & Otori-Satoh, 1992; Valente et al., 2001; Aoki et al., 2007; Aoki et al., 2008). Valente und Mitarbeiter schlugen einen Mechanismus vor, ähnlich der Inhibition durch TIMPs, mit direkter Bindung an das Zinkion im aktiven Zentrum (Valente et al., 2001). Bisher konnte der Bereich, der für die Inhibition notwendig ist, auf den N-terminalen Bereich der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne eingegrenzt werden. Die basischen Reste Lys¹⁵, Lys⁴¹ und Lys¹⁰³ sind vermutlich involviert oder stehen zumindest in direktem Kontakt mit der Proteinase (Aoki et al., 2007)

Während die vier verschiedenen TIMPs gegenüber ADAMs unterschiedliche Spezifitäten zeigen, werden **Matrix Metalloproteinasen (MMPs)**, eine weitere Familie der Metzinkin Superfamilie, ähnlich stark gehemmt (Edwards et al., 2008; Wisniewska et al., 2008). Durch ein ausgewogenes Zusammenspiel der Proteinase und ihrer Inhibitoren wird die Homöostase von Geweben sichergestellt. Denn es sind – wie der Name bereits vermuten lässt – hauptsächlich Bestandteile der

extrazellulären Matrix Substrate dieser Enzymfamilie. Diese wird aufgrund der Spezifitäten ihrer Mitglieder in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine unterteilt wird (Nagase *et al.*, 2006). Bis auf Matrilysin 1 und 2 (MMP7 und MMP26) besitzen alle Proteasen dieser Familie eine Hämpexindomäne, die carboxyterminal (C-terminal) der Proteasedomäne liegt.

Die *membrane type*-MMPs (MT-MMPs) bilden eine separate Unterfamilie. Sie besitzen im Anschluss an die Hämpexindomäne eine Transmembrandomäne oder einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker, wodurch sie in der Zellmembran fixiert sind. Das katalytische Zentrum mit der allgemeinen Konsensussequenz HEXXHXXGXXH benötigt für die Stabilität der Struktur und die Aktivität ein zweites Zinkion, sowie zwei bis drei Calciumionen (Nagase & Woessner, Jr., 1999; Gomis-Rüth, 2003). Wie bei den Adamalysinen erlangen auch die inaktiven MMP-Zymogene durch einen Cysteinswitch-Mechanismus proteolytische Aktivität (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990).

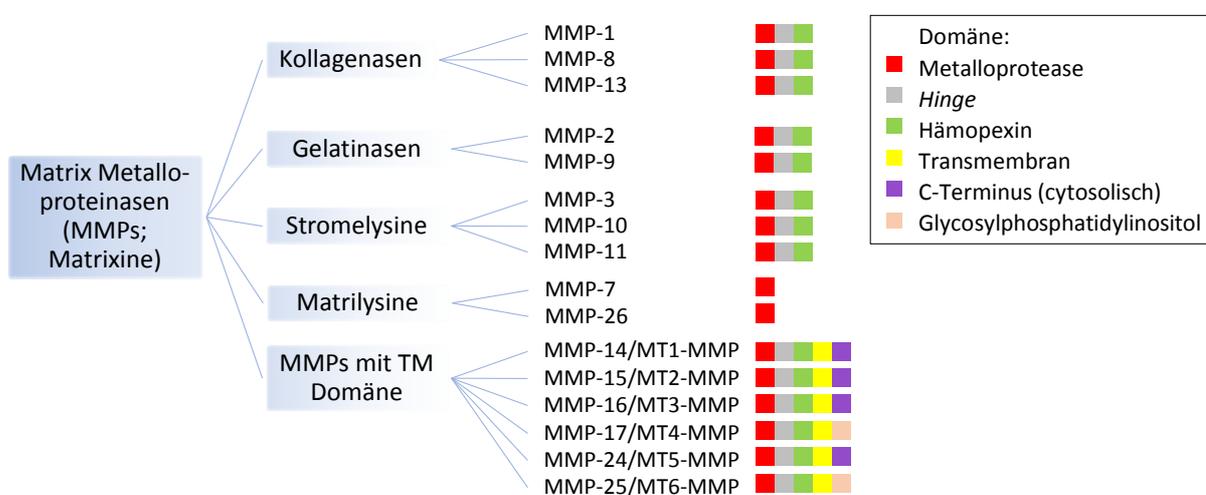


Abbildung 3: Übersicht über die Gliederung der Matrix Metalloproteinasen und schematische Darstellung ihrer Domänenorganisationen.

Diese Grafik wurde auf Grund der im Text zitierten Veröffentlichungen und der Daten der UniProt-Datenbank (The UniProt Consortium, 2013) erstellt.

Zu den MMP-Substraten zählen nicht nur Matrixproteine. CTGF (*connective tissue growth factor*), ein Wachstumsfaktor, oder auch der Inhibitor Fetuin-A werden durch MMP-1 und -7, bzw. MMP-3 und -7 hydrolytisch gespalten (Hashimoto *et al.*, 2002; Schure *et al.*, 2013). In diesen Fällen hat die proteolytische Aktivität der MMPs Auswirkungen auf die Angiogenese, bzw. die Kalzifizierung von Geweben.

2.2 ASTACIN FAMILIE

Aus dem Magensaft des Edelkrebse *Astacus astacus* L. (*Astacus fluviatilis* F.) wurde eine Protease isoliert, deren Aminosäuresequenz von Titani und Mitarbeitern aufgeklärt wurde (Titani *et al.*, 1987). Diese Peptidase mit einer Masse von 22614 Da wurde näher charakterisiert und erhielt den Namen Astacin (EC 3.4.24.21) (Stöcker *et al.*, 1988; Stöcker *et al.*, 1993). 1991 diente dieses Verdauungsenzym als Namensgeber für eine neue Familie, in der Proteinase aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten, insbesondere des verlängerten Zink-bindenden Motives HEXXHXXGXXHE XXXRXDR zusammengefasst wurden (Dumermuth *et al.*, 1991; Bond & Beynon, 1995). Im Gegensatz zu anderen Metzinkinen weisen Astacine einen sehr langen Bereich in der C-terminalen Hälfte der Aminosäuresequenz auf, der zwar hoch geordnet ist, aber nur wenige reguläre Sekundärstruktur-

elemente enthält (Gomis-Rüth, 2003). Astacine können neben der Proteasedomäne weitere Domänen besitzen, aufgrund derer sie in BMP1-Tolloid-Proteasen (BTPs), Meprine und *hatching* Enzyme gruppiert werden (Sterchi *et al.*, 2008). Diese Domänen sind zum Beispiel für die Substraterkennung oder die Verankerung an der Zellmembran verantwortlich.

Mitglieder dieser Familie konnten bisher in Bakterien, Pilzen, Invertebraten und Vertebraten, jedoch nicht in Viren und Pflanzen identifiziert werden (Sterchi *et al.*, 2008). Wie alle Metzinkine werden diese Proteinase als inaktive Prä-Pro-Enzyme (Zymogene) synthetisiert und sezerniert. Das heißt, ihre enzymatische Aktivität erlangen sie erst durch die Entfernung des Propeptids.

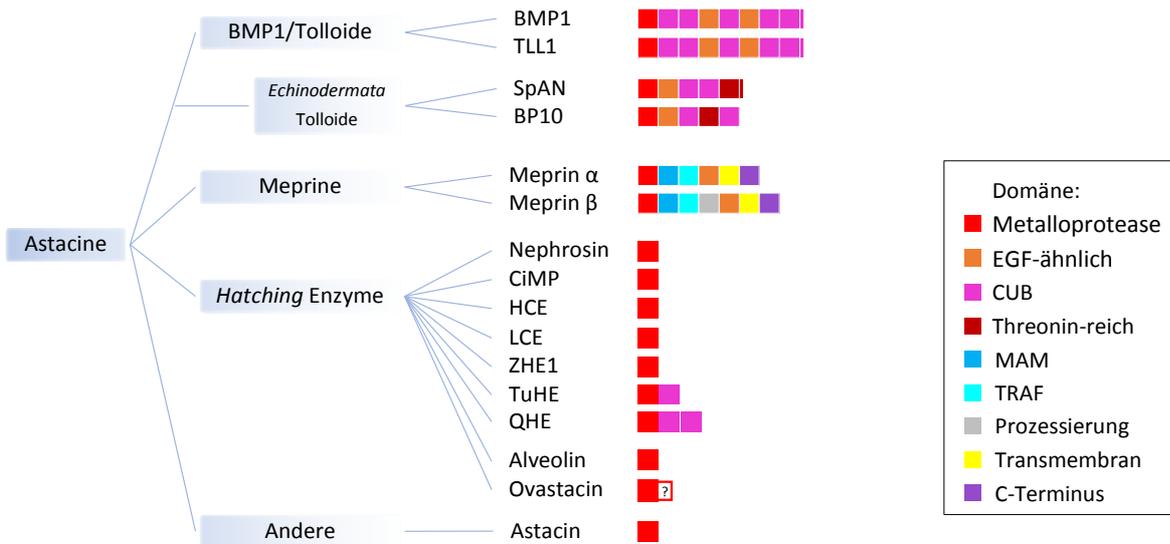


Abbildung 4: Gliederung der Astacinfamilie und schematische Darstellung ihrer Domänenorganisation.

Diese Grafik wurde auf Grund der im Text zitierten Veröffentlichungen und der Daten der UniProt-Datenbank (The UniProt Consortium, 2013) erstellt. SpAN und BP10 (blastula protease 10) spielen während der Entwicklung der Stachelhäuter eine Rolle (Lepage *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1992). Sie besitzen Domänen, welche denen der BMP1/Tolloid-Proteasen der Mammalia ähneln und wurden daher als gesonderte Gruppe in diese Grafik aufgenommen. Diese Beziehung wird von Quesada *et al.* (2004) dargestellt. Sterchi *et al.* (2008) wiesen auf eine Beziehung zu den Meprinen hin. Das [?] verdeutlicht einen Sequenzbereich des Ovastacins, dessen Funktion bisher ungeklärt ist. BMP1 = bone morphogenetic protein 1; TLL1 = mammalian tolloid like 1; CiMP = cichlid metalloprotease; HCE = high choriolytic enzyme; LCE = low choriolytic enzyme; ZHE1 = zebrafish hatching enzyme 1; TuHE = turtle hatching enzyme; QHE = quail hatching enzyme; EGF = epidermal growth factor; CUB = complement-UEGF-BMP-1; MAM = meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ; TRAF = tumor necrosis factor receptor-associated factor (auch als MATH = meprin- and tumor necrosis factor receptor associated factor bezeichnet).

2.2.1 Astacin

Astacin wird in seiner inaktiven Form als Proastacin von den F-Zellen des *Astacus Hepatopankreas* in die Tubuli der Drüse sezerniert (Vogt *et al.*, 1989; Stöcker *et al.*, 1997). Die Latenz dieser Proteinase wird durch ein 34 Aminosäuren (AS) langes Propeptid erreicht, welches den substratbindenden Spalt zwischen der C-terminalen Einheit und der N-terminalen Einheit des Astacins ausfüllt und blockiert (Guevara *et al.*, 2010). Verglichen mit einem Substrat ist es in umgekehrter Orientierung im aktiven Zentrum platziert. Auf dem Weg durch die Tubuli der Mitteldarmdrüse bis zu dem Zielorgan, dem Kaumagen, wird dieses Propeptid entfernt und dadurch das inaktive Proastacin in das aktive Astacin umgewandelt (Yiallourous *et al.*, 2002).

Im katalytischen Zentrum des aktiven Astacines binden drei Histidinreste das Zn²⁺, zusammen mit einem Wassermolekül, welches über Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu⁹³ in Position gehalten

bezeichnet (Gomis-Rüth *et al.*, 2012b). Diese Aktivierung wird mit einem initialen Schnitt zwischen Arg^{32P} und Val^{33P} durch das ko-sezernierte Trypsin ausgelöst, wonach die beiden verbleibenden Reste Val^{33P}-Gly^{34P} autokatalytisch entfernt werden und Astacin seine proteolytische Aktivität erlangt (Yiallourous *et al.*, 2002). Zwischen der Ammoniumgruppe des neu gebildeten N-Terminus (Ala¹) und der Carboxylgruppe des Glu¹⁰³ des aktiven Zentrums wird eine Salzbrücke ausgebildet, die zur Stabilisierung der Tertiärstruktur beiträgt (Bode *et al.*, 1992; Yiallourous *et al.*, 2002).

2.2.2 BMP1-Tolloid-Proteasen (BTPs)

Im Genom des Menschen kodieren drei Gene für die vier BTPs: BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*), mTld (*mammalian tolloid*), Tll1 und Tll2 (*tolloid like 1 und 2*). Dabei sind BMP1 und mTld Splicevarianten desselben Gens (Takahara *et al.*, 1994). Tolloide spielen bei der dorso-ventralen Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten eine wichtige Rolle (Goodman *et al.*, 1998; Dale *et al.*, 1998). Sie werden auch in adulten Wirbeltieren exprimiert und können dort Zellmatrixbestandteile spalten, wodurch sie unter anderem zur Assemblierung der extrazellulären Matrix beitragen. Daher rührt die Bezeichnung Prokollagen C-Proteasen (PCP). Ihre Aktivität wird durch PCPEs (*PCP enhancer*) verstärkt (Kronenberg *et al.*, 2009).

Die beiden Astacine aus Seeigeln, SpAN und die Blastula-Protease 10 (BP10), spielen ebenfalls eine Rolle während der Embryogenese (Lepage *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1992). Sie weisen eine ähnliche Domänenzusammensetzung wie die BTPs auf (Abbildung 4). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Domänen für die Substraterkennung bzw. die Kontrolle der proteolytischen Aktivität von Bedeutung sind (Sieron *et al.*, 2000; Hintze *et al.*, 2006; Wermter *et al.*, 2007).

2.2.3 Meprine

Eine weitere Gruppe innerhalb der Astacinfamilie bilden die Meprine. Bei Säugern kodieren zwei verschiedene Gene für Meprin α bzw. Meprin β . Beide Proteasen können oligomerisieren und dabei Homo- und Heterodimere bilden (Bond & Beynon, 1995; Becker *et al.*, 2003). Sie besitzen im Anschluss an das Signalpeptid, das Propeptid und die katalytische Domäne jeweils eine MAM- (*meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ*), TRAF²- (*tumor necrosis factor receptor associated factor*), EGF-ähnliche und Transmembran-Domäne. Der C-Terminus liegt daher im Cytosol.

Meprin α besitzt in dem Bereich zwischen der TRAF- und der EGF-ähnlichen Domäne eine Schnittstelle für Furin-ähnliche Proproteinkonvertasen. Deren Prozessierung führt zur Sekretion von Meprin α in Zellen, die kein Meprin β exprimieren. Vorhandensein von Meprin β bedingt die nichtkovalente Retention von Meprin α im α/β -Heterooligomer.

ADAM 10 und ADAM 17 (TACE) können Meprin β von der Membranoberfläche lösen (*shedding*) und in den extrazellulären Raum entlassen (Hahn *et al.*, 2003). Meprin β kann dann im Gegenzug ADAM 10 aktivieren (Jefferson *et al.*, 2011). Außerdem kann Meprin β das Amyloidvorläuferprotein (APP) hydrolytisch spalten und wirkt dabei als β -Sekretase (Bien *et al.*, 2012).

Des Weiteren sind Meprine an der Bildung von Kollagenfibrillen beteiligt. Sie können nicht nur – wie etwa BMP1 – die C-Propeptide der Prokollagene I und III entfernen, sondern auch die N-Propeptide

² Für die TRAF-Domäne ist außerdem die Bezeichnung als MATH - (*meprin- and tumor necrosis factor receptor associated factor*) Domäne gebräuchlich

(Kronenberg *et al.*, 2010; Broder & Becker-Pauly, 2013). Meprin α und β werden sowohl in der humanen Epidermis als auch (wenn auch schwächer) von Fibroblasten der Dermis exprimiert (Becker-Pauly *et al.*, 2007; Kronenberg *et al.*, 2010). Weitere Expressionsorte der Meprine sind die Membranen der Bürstensaummikrovilli des Darms und der Nierentubuli, aber auch Leukozyten und Krebszellen (Beynon *et al.*, 1981; Lottaz *et al.*, 1999; Becker-Pauly *et al.*, 2007).

Wie die BTPs zeigen auch die Meprine eine Präferenz für Substrate, die in der P1' Position eine negativ geladene Aminosäure aufweisen. Zudem kann Meprin β Sequenzen hydrolytisch spalten, die eine Folge von diesen sauren Resten besitzen. Außer Prokollagen und weiteren Membranproteinen gehören auch Hormone, Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und andere Proteasen zu den Meprin Substraten (Yamaguchi *et al.*, 1994; Pankow *et al.*, 2007; Hedrich *et al.*, 2010; Schütte *et al.*, 2010; Addison *et al.*, 2011; Becker-Pauly *et al.*, 2011; Geurts *et al.*, 2012; Jefferson *et al.*, 2013).

2.2.4 Hatching Enzyme

Als *hatching* Enzyme (Schlüpfenzyme) werden jene Astacinproteinasen zusammengefasst, die in den N-terminalen Regionen von *Zona pellucida* (ZP) Proteinen der embryonalen Eihüllen spalten können, so zum Anschwellen der Chorionschicht (Eihülle) führen und dadurch den Schlüpfprozess (*hatching*) ermöglichen. Zu den *hatching* Enzymen zählen z.B. die EHE (*eel hatching enzyme*) des Aals, ZHE 1 (*zebrafish hatching enzyme 1*) von *Danio rerio*, sowie Medaka HCE 1 und 2 (*high choriolytic enzymes 1 und 2*) (Kawaguchi *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2010; Sano *et al.*, 2011). Durch Genduplikation besitzen *Euteleostei* mit LCE (*low choriolytic enzyme*) eine zweite Gruppe von Schlüpfenzymen, welche zwischen den ZP Domänen schneiden und zum Aufbrechen der angeschwollenen Hülle führen (Yasumasu *et al.*, 1992). ZHE 1, dessen Struktur 2010 aufgeklärt wurde, kann die beiden Chorionproteine *Zona pellucida* Glykoprotein 2 und 3 (ZP₂, ZP₃) spalten (Okada *et al.*, 2010).

Das *Xenopus* Schlüpfenzym zum Abbau der Vitellinschicht der Eihülle wurde ebenfalls in zwei Formen nachgewiesen: während XHE (*xenopus hatching enzyme*) zusätzlich zu seiner katalytischen Domäne zwei CUB Domänen besitzt, wurden diese C-terminalen Domänen im UVS.2 autokatalytisch entfernt (Katagiri *et al.*, 1997; Fan & Katagiri, 2001). Die *hatching* Enzyme der Wachtel (QHE, *quail hatching enzyme*) und der Chinesischen Weichschildkröte *Pelodiscus sinensis* (TuHE, *turtle hatching enzyme*) weisen dagegen nur eine CUB Domäne auf (Yasumasu *et al.*, 2005).

Es konnten aber auch Proteinase identifiziert werden, die durch ihre Aktivität zu einer Festigung der Eihülle beitragen und somit Polyspermie verhindern. Im Bezug auf oben beschriebenen Enzyme, welche die Eihülle abbauen, könnte diese Untergruppe als „*hardening* Enzyme“ zusammengefasst werden. Die Kortikalgranula der Eizelle des Reiskärpflings (Medaka, *Oryzias latipes*) sezernieren Alveolin. Dieses führt durch die Prozessierung der Glykoproteine Choriogenin H und Choriogenin Hminor zur Härtung des Chorions (Shibata *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2012).

Im Säuger konnte diese Aufgabe dem Ovastacin zugeschrieben werden (Quesada *et al.*, 2004). Es wird in den Kortikalgranula der Eizelle gespeichert und bei der Befruchtung während der Kortikalreaktion ausgeschüttet. Ovastacin schneidet dann das ZP₂ Glykoprotein der *Zona pellucida* wodurch diese Hülle verhärtet und die Bindung weiterer Spermien an die Eizelle verhindert wird (Burkart *et al.*, 2012). Dabei ist das Zusammenspiel mit dem Inhibitor Fetuin-B von entscheidender Bedeutung (Dietzel *et al.*, 2013).

Reifes Ovastacin besitzt eine Astacin-typische Proteasedomäne mit einer Länge von ca. 200 Aminosäuren. Daran schließt ein C-terminaler Sequenzbereich von ca. 150 Aminosäuren an, der bei Sequenzvergleichen keine Homologie zu bekannten Domänen zeigt (Abbildung 4). Die Funktion dieser Domänen ist derzeit unbekannt.

2.2.4.1 Nephrosin

Hung *et al.* isolierten Nephrosin 1997 aus der Kopfniere des Karpfens (*Cyprinus carpio*) und wiesen seine Existenz in den weiteren lymphohämatopoetischen Organen Niere und Milz sowie in den Kiemen nach. Es wird mit einem Signalpeptid, einem Propropeptid und einer fast 200 Aminosäuren langen Proteasedomäne exprimiert. Die aktive Protease besitzt eine Größe von ca. 23 kDa.

Die größte Ähnlichkeit weist es zu der Gruppe der *hatching* Enzyme der Astacinproteasen auf (Hung *et al.*, 1997; Kijimoto *et al.*, 2005; Sterchi *et al.*, 2008). Während Hung *et al.* (1997) keine Expression von Nephrosin im Embryo oder der *hatching* Flüssigkeit detektierten, konnten Song *et al.* (2004) die spezifische Nephrosinexpression durch neutrophile Granulozyten im Zebrafischembryo nachweisen. Die zum Nephrosin sehr eng verwandte Astacinmetalloproteinase der Buntbarsche (*Cichlidae*) CiMP 1 wird während der Embryogenese in der Kopfregion dieser Fische exprimiert (Kijimoto *et al.*, 2005). Daher wird vermutet, dass auch Nephrosin eine Rolle während der embryonalen Entwicklung spielt. Da Membranbestandteile zu den Nephrosinsubstraten gehören, wurde eine Rolle während der Migration von Makrophagen vermutet (Hung *et al.*, 1997). Der *Knockdown* von Nephrosin in Zebrafischembryonen hat diese Theorie jedoch widerlegt (Zhang *et al.*, 2008). Dennoch läßt die Synthese von Nephrosin in den blutbildenden Organen und Granulozyten auf eine immunologische Funktion dieser Proteinase schließen. Auch die verstärkte Nephrosinexpression während der Immunantwort stützt diese These (Boutet *et al.*, 2006; Darawiroj *et al.*, 2008).

Bisher wurden Fibronectin, Gelatine, Substanz P und Bradykinin als Nephrosinsubstrate identifiziert (Hung *et al.*, 1997). Auffällig ist, dass Nephrosin keine Präferenz für Aspartat in P1', aber für Prolin in P2' zu haben scheint (Hung *et al.*, 1997).

Astacinproteasen übernehmen also vielfältige Aufgaben. Ihre Aktivität kann über die kontrollierte Expression, Aktivierung und Inhibition reguliert werden. Es sind jedoch kaum endogene Inhibitoren für diese Metallproteasen bekannt. Im Gegensatz zu Adamalysinen und Matrix Metalloproteinasen werden sie nicht durch TIMPs gehemmt (Wang *et al.*, 2006; Gomis-Rüth *et al.*, 2012b). Astacinproteasen wie Astacin (Stöcker *et al.*, 1991a; Meier *et al.*, 1994), BMP1 (Zhang *et al.*, 2006) und Ovastacin (Konstantin Karmilin, persönliche Mitteilung), aber nicht die Meprine (Kruse *et al.*, 2004), werden in der Käfigstruktur des α_2 -Makroglobulins gefangen und ihre Aktivität wird gehemmt. Im *Xenopus* Embryo wurde *sizzled* mit seiner *frizzled*-Domäne als Xlr-Inhibitor identifiziert und spielt damit eine Rolle während der Musterbildung der Morphogenese (Lee *et al.*, 2006; Ploper *et al.*, 2011). Während auch das Tolloid BMP1 durch *sizzled* gehemmt wird, sind humane sFRPs (*secreted frizzled-related proteins*) dazu nicht in der Lage (Bijakowski *et al.*, 2012). Der endogene Nephrosin-Inhibitor Fisch-Fetuin-A wurde erstmals im Komplex mit Nephrosin aus dem hämatopoetischen Gewebe des Karpfens *Cyprinus carpio* isoliert (Tsai *et al.*, 2004). Dieser Inhibitor wird in die Fetuin-Familie der Typ III Cystatine der Cystatin-Superfamilie eingeordnet und ist Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

2.3 CYSTATIN-SUPERFAMILIE

Zielenzyme dieser Inhibitor-Klasse sind hauptsächlich Cysteinproteasen, welche reversibel, aber sehr fest gebunden werden (*tight-binding* Inhibitoren). Cystatine sind ubiquitär zu finden (Abe *et al.*, 1987; El-Halawany *et al.*, 2004; Khaznadji *et al.*, 2005; Rawlings *et al.*, 2012). Sie alle weisen mehr oder weniger konservierte Motive und sehr ähnliche Domänenstrukturen auf (Abbildung 6). Vertreter dieser Superfamilie können auch Proteasen anderer Klassen, wie beispielsweise die SVMPs (*snake venom metalloproteases*, aus der Familie der Adamalysine) (Yamakawa & Omori-Satoh, 1992; Aoki *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2009) oder die Astacinprotease Nephrosin (Tsai *et al.*, 2004) hemmen.

1985 wurden die Inhibitoren der Cysteinproteinasen, die Ähnlichkeiten zum Cystatin des Hühner-eiklars (*chicken egg white cystatin*) aufweisen, in drei Familien (Stefin-, Cystatin- und Kininogen-Familie) gegliedert und in der Cystatin-Superfamilie zusammengefasst (Barrett *et al.*, 1986). Aufgrund zusätzlicher Erweiterungen der einzelnen Familien war die Gliederung nach Aminosäuresequenzhomologien nicht mehr ausreichend. Es wurde schließlich die Einteilung in drei Typen etabliert, deren Grundlage die Anzahl der Cystatin-ähnlichen Domänen, die Ausbildung von Disulfidbrücken, sowie deren Vorkommen im Organismus ist (Schägger *et al.*, 1988; Abrahamson *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). In der MEROPS Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) sind sie in den Unterfamilien I25A-C der Familie I25 (*Cystatin family*) des IH Stamms (*Clan*) klassifiziert (Rawlings *et al.*, 2012).

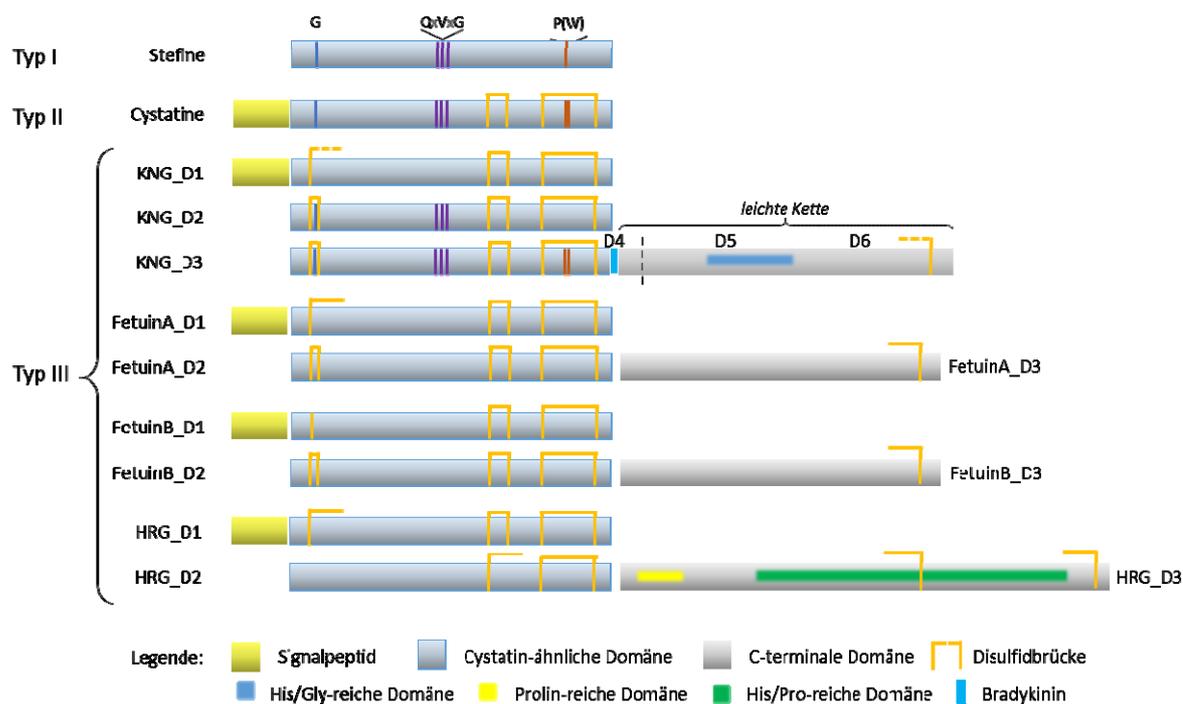


Abbildung 6: Übersicht über die Domänen einiger Mitglieder der Cystatin-Superfamilie.

Die Positionen der konservierten Aminosäuren (Gly; Gln, Val, Gly; Pro, Trp), die für die Inhibition von Papain-ähnlichen Proteasen durch Cystatine und Stefine essentiell sind, sind in blau, violett und grün dargestellt. Die einzelnen Domänen sind mit D1 bis D6 gekennzeichnet. Alle Fetuin-ähnlichen Domänen sind untereinander angeordnet. Ebenso ist die Lage konservierter, Disulfidbrücken-ausbildender Cysteinreste angegeben. Im Kininogen bilden die Domänen 1 bis 3 die schwere Kette. Die gestrichelte Linie in der D5 markiert das Ende der leichten Kininogenform (L-KNG). Die Variante mit vollständiger D5 und D6 wird entsprechend als H-KNG (high molecular weight kininogen) bezeichnet. KNG = Kininogen; HRG = Histidin-reiches Glykoprotein (verändert nach Lee *et al.*, 2009).

Durch Kristallstrukturanalysen verschiedener Stefine und Cystatine konnte deren sehr ähnliche Faltung der Polypeptidketten nachgewiesen werden (Bode *et al.*, 1988; Stubbs *et al.*, 1990; Janowski *et al.*, 2001; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2005; Kotsyfakis *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2011). Fünf antiparallele β -Faltblätter sind um eine zentrale α -Helix gelegt (Abbildung 7). Durch diese Faltung werden Haarnadelschleifen (*hairpin loops*) ausgebildet, die unter anderem für die Inhibition von Papain-ähnlichen Proteasen verantwortlich sind.

2.3.1 Typ I: Stefine

Cysteinprotease Inhibitoren der Typ I Cystatine (Stefine) enthalten meist nur ca. 100 Aminosäuren, welche die Cystatin-ähnliche Domäne bilden. Ihnen fehlt ein Signalpeptid, weshalb sie in gesundem Gewebe cytosolisch vorkommen (Abrahamson *et al.*, 1986). Des Weiteren besitzen sie keine konservierten Cysteinreste und daher auch keine Disulfidbrücken (Elzanowski *et al.*, 1988).

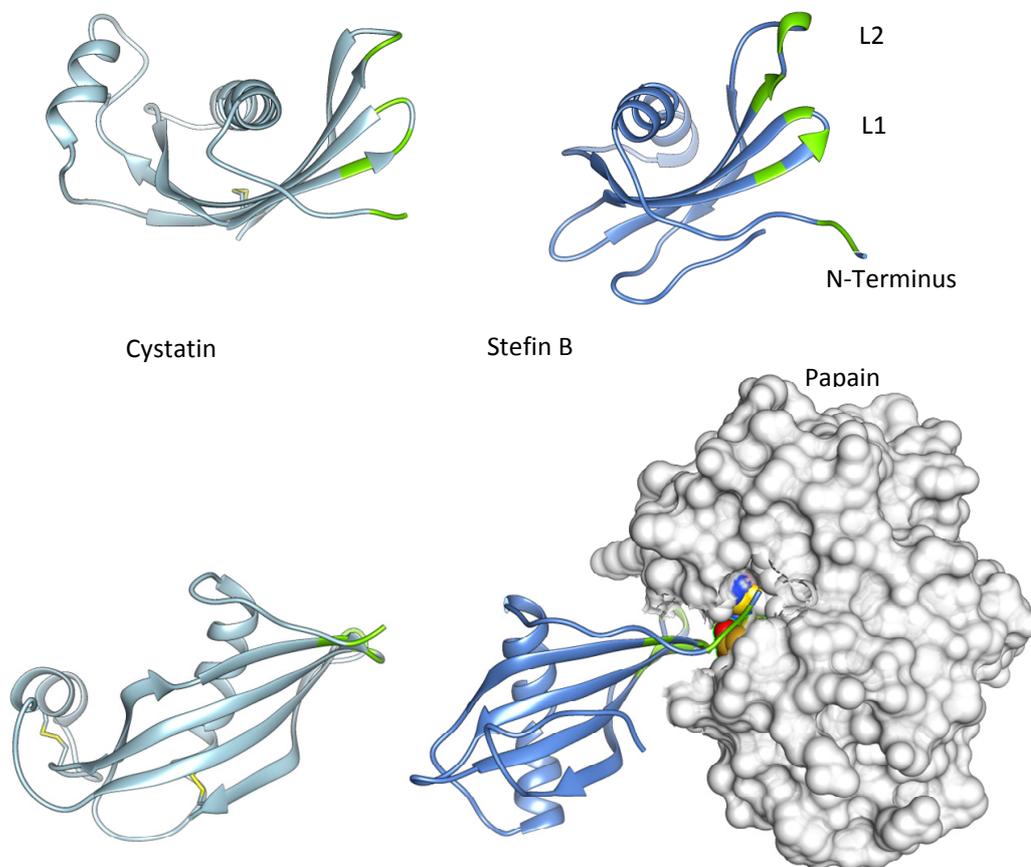


Abbildung 7: Darstellung von Cystatin aus dem Hühnereiklar (links) und Stefin B mit Papain (rechts).

Da die Bindung des N-terminalen Bereichs des Inhibitors an Papain dargestellt werden soll, ist die Proteinasen 180° um die horizontale Achse gedreht. Auf der dem Betrachter zugewandten Seite befinden sich die sogenannten „non-primed“ Bindungsstellen (subsites S_1 , S_2 , usw.). Die im Hintergrund dargestellten β -Haarnadelschleifen (loops) L_1 und L_2 binden in den primed subsites S_1' , S_2' , usw. der Substratbindungsregion des aktiven Zentrums. Konservierte Aminosäuren der Typ I und II Cystatine, die für die Inhibition von Papain-ähnlichen Proteasen wichtig sind, sind in grün markiert. Sie liegen aminoterminal, sowie in den L_1 und L_2 . Die Inhibitoren haben jeweils die gleiche Ausrichtung. Dargestellt sind Cystatin aus dem Hühnereiklar (chicken egg white cystatin, PDB Datei: 1CEW, Bode *et al.*, 1988) und rekombinantes humanes Stefin B (Cystatin B) im Inhibitionskomplex mit Papain (PDB Datei: 1STF, Stubbs *et al.*, 1994). Erstellt mit Chimera 1.8 (Pettersen *et al.*, 2004).

Bei der Inhibition spielen verschiedene Bereiche des Inhibitors eine Rolle. Über die N-terminalen Aminosäurereste Met⁷, Ser⁸ und Gly⁹ kann Stefin B an die Protease Papain binden (Stubbs *et al.*, 1990). Die Seitenketten des ersten *loops* Gln⁵³, Val⁵⁴, Val⁵⁵ und Ala⁵⁶ stehen in Kontakt mit Aminosäuren im aktiven Zentrum des Papains und sind somit für die Inhibition verantwortlich. Des Weiteren spielen aber auch die Aminosäurereste des zweiten *loops* (Gln¹⁰¹, Ser¹⁰² und His¹⁰⁴) und Tyr¹²⁴ und Phe¹²⁶ am C-Terminus eine Rolle bei der Inhibition (Stubbs *et al.*, 1990).

2.3.2 Typ II: Cystatine

Typ II Cystatine besitzen ein Signalpeptid und werden aus der Zelle ausgeschleust. Ein weiterer Unterschied zu den Stefinen ist das Vorhandensein von zwei konservierten Disulfidbrücken (Elzanowski *et al.*, 1988; Grzonka *et al.*, 2001).

Die Kristallstruktur des Cystatins aus dem Hühnereiklar hat erstmals gezeigt, dass der N-Terminus, zusammen mit zwei *loops* auf einer Seite liegt und diese zusammen eine keilartige Struktur bilden (Abbildung 7), die komplementär zur aktiven Spalte des Papains ist (Bode *et al.*, 1988). Über die N-terminalen Reste Leu⁸, Gly⁹ und Ala¹⁰ erfolgt die Bindung an Papain (Abrahamson *et al.*, 1987; Machleidt *et al.*, 1989). Die erste β -Haarnadelschleife wird unter anderem von den konservierten Aminosäurereste Gln⁵³, Val⁵⁵ und Gly⁵⁷ ausgebildet. Die in der Gruppe der Typ II Cystatine weitgehend konservierten Aminosäurereste Pro¹⁰³ und Trp¹⁰⁴ bilden den zweiten *loop*. Im Cystatin C ist dieser *loop* für die Stabilität des Inhibitionskomplexes essentiell (Abrahamson *et al.*, 1987; Turk & Bode, 1991).

Alvarez-Fernandez und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die heterolog exprimierten humanen Cystatine C, E/M und F nicht nur Papain-ähnliche Cysteinproteasen hemmen können, sondern auch das Legumain, eine Cystein-Endopeptidase eines völlig anderen Typs (Alvarez-Fernandez *et al.*, 1999). Als hauptsächlich verantwortlichen Aminosäurerest identifizierten sie im humanen Cystatin C Asn³⁹ (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2005). Dieses Asparagin befindet sich nicht innerhalb der drei, für die Inhibition von Papain-ähnlichen Proteasen verantwortlichen Strukturen (N-Terminus, *loop* 1 und *loop* 2), sondern in einer diametral entgegengesetzt lokalisierten Struktur, im sogenannten *back side loop* (BSL), der auf die α -Helix folgt und in den ersten β -Strang mündet. Dies erklärt auch, warum beispielsweise dimerisiertes Cystatin C Legumain hemmen kann, das die Fähigkeit zur Inhibition von Papain verloren hat (Ekiel *et al.*, 1997; Janowski *et al.*, 2001; Janowski *et al.*, 2005).

2.3.3 Typ III: Kininogene, Histidin-reiche Glykoproteine und Fetuine

Die dritte Familie der Cystatin-Superfamilie bilden die multidomänen Plasmaproteine Kininogen, Histidin-reiches Glykoprotein (*histidine-rich glycoprotein*, HRG) und die Fetuine (Lee *et al.*, 2009). Im menschlichen Genom werden sie alle auf dem Chromosom 3, in unmittelbarer Nähe zueinander, codiert (Rizzu & Baldini, 1995; Lee *et al.*, 2009).

2.3.3.1 Kininogen

Die verschiedenen Kininogene (KNG) sind Produkte verschieden gespleißter Transkripte eines Gens (Abbildung 6). Sie besitzen drei Cystatin-ähnliche Domänen (D₁ bis D₃), die zusammen die schwere Kette (*heavy chain*) bilden (Ohkubo *et al.*, 1984; Salvesen *et al.*, 1986). Während die beiden C-terminalen Cystatin-ähnlichen Domänen Cystein-Proteasen hemmen können, ist diese Fähigkeit in der N-terminal gelegenen ersten Domäne verloren gegangen (Salvesen *et al.*, 1986; Turk & Bode, 1991). Außerdem fehlt dieser Domäne der Glycinrest, welcher im N-terminalen Bereich der homologen Peptidketten von Stefinen und Cystatinen konserviert ist. Die anschließende D₄ ist die

kürzeste Domäne der Kininogene. Sie beinhaltet die neun Aminosäuren umfassende Sequenz des Hormons Bradykinin, welches durch die Serinprotease Kallikrein freigesetzt wird (Mombouli & Vanhoutte, 1992). Es bewirkt unter anderen die Vasodilatation und erhöht die Permeabilität von Membranen während entzündlicher Prozesse (Elliott *et al.*, 1960; Fox *et al.*, 1961). Bei der L-KNG (*low molecular weight kininogen*) *splice*-Variante bildet der hier nur sehr kurze Bereich der leichten Kette (*light chain*) den C-Terminus des Proteins. Die leichte Kette des H-KNG (*high molecular weight kininogen*) besitzt zudem zwei weitere Domänen (D5 und D6). D5 ist reich an Histidin- und Glycin-Resten und wirkt der Proliferation von Endothelzellen durch Induktion der Apoptose entgegen (Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002).

2.3.3.2 Histidin-reiches Glykoprotein

Das Histidin-reiche Glykoprotein (HRG, *histidine-rich glycoprotein*) ist ein Plasmaprotein von Vertebraten, welches in der Leber synthetisiert wird (Koide *et al.*, 1986; Poon *et al.*, 2011). Es besitzt N-terminale Cystatin-ähnliche Domänen, die jedoch keine Cysteinproteasen hemmen (Koide & Odani, 1987). Die dritte Domäne besitzt eine Prolin-reiche und eine Histidin- und Prolin-reiche Region, die wahrscheinlich für die Bindung von Metallionen, sowie die Interaktion mit anderen Proteinen, beispielsweise dem Antikoagulant Heparin, verantwortlich sind (Lijnen *et al.*, 1983). Als Negativ-Akut-Phase Protein wird die Expression von HRG bei der Immunantwort herab reguliert (Jones *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde HRG auch mit der Inhibition der Kalzifizierung in Verbindung gebracht (Jahnen-Dechent *et al.*, 1997; Schinke *et al.*, 1997).

2.3.3.3 Fetuine

Aus Kälberserum wurde ein Protein isoliert, dessen Plasmakonzentration im Fötus auffallend hoch war und mit zunehmendem Alter abnahm. Daher wurde es Fetuin genannt (Pedersen, 1944). Spiro konnte durchschnittlich 6 mg/ml Fetuin aus fötalem Kälberserum isolieren (Spiro, 1960). In der Maus beträgt die Fetuin-Konzentration im fötalen Serum 2 bis 4 mg/ml. Im adulten Tier hat diese Konzentration um 80 % auf 0,4 bis 0,6 mg/ml abgenommen (Dziegielewska *et al.*, 1998). Neben diesem Fetuin-A wurde das paraloge Fetuin-B-Gen in adulten Säugetieren nachgewiesen (Olivier *et al.*, 1999; Olivier *et al.*, 2000). Beide Fetuine werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert, sind aber ubiquitär im Extrazellulärraum verbreitet. N-terminal besitzen sie zwei Cystatin-ähnliche Domänen (D1 und D2), auf die eine C-terminale Domäne (D3) folgt, welche keine Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweist (Abbildung 6) (Brown *et al.*, 1992; Olivier *et al.*, 2000). D1 des Fetuins-A enthält das Fetuin-A-typische Motiv DXLETXCHLDPTP, welches in der Fetuin-B D1 Sequenz C-terminal um vier Aminosäuren verkürzt ist (Olivier *et al.*, 2000). Auf Grund dessen können Fetuine dem Typ A oder B zugeordnet werden (Liu *et al.*, 2008). Dieses Fetuin-Motiv beinhaltet den zweiten konservierten Cysteinrest der extrazellulären Cystatine.

Fetuin-A ist außerdem unter den Bezeichnungen α_2 -Heremans-Schmid-Glykoprotein (AHSG), *bone sialic acid-containing protein* (BSP), Countertrypin oder *rat tyrosine kinase inhibitor* (PP63) in der Literatur zu finden (Haasemann *et al.*, 1991; Ohnishi *et al.*, 1991; Goto *et al.*, 1997). Auf Proteinebene konnte es bisher während der Entwicklung von Niere, Milz und Knochenmark nachgewiesen werden (Dziegielewska *et al.*, 1996; Terkelsen *et al.*, 1998). Im Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) wurde Fetuin-A mRNA unter anderem im Magen, Pankreas, Darm und Gehirn, aber nicht in der Lunge nachgewiesen (Yoshida *et al.*, 1999). Auf Grund der hohen Fetuin-A mRNA Level während der Embryogenese liegt die Vermutung nahe, dass Fetuin-A mit der Entwicklung von Organen und Geweben assoziiert ist. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass dieses Fetuin als Antagonist von TGF- β (*transforming growth factor*- β) die Proliferation beeinflusst (Demetriou *et al.*,

1996; Nawratil *et al.*, 1996; Abali *et al.*, 2013). Bei Anwesenheit von Zinkionen hingegen, kann Fetuin-A die Apoptose von Krebszellen induzieren (Yu & Tsai, 2001). Fetuin-A gilt als Negativ-Akut-Phase Protein (Lebreton *et al.*, 1979). Das heißt, seine Konzentration im Serum wird während der Immunantwort reduziert. Dziegielewska und Mitarbeiter beobachteten bei Anwesenheit von hohen Fetuin-A-Konzentrationen eine geringere Ausschüttung des Cytokins Interleukin-1 β (IL-1 β), sowie eine geringere Stickstoffoxidproduktion durch Makrophagen, die mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden (Dziegielewska *et al.*, 1998). Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise Sepsis, wird das humane Fetuin-A, durch die Entfernung des sogenannten *connecting* Peptids in zwei Ketten prozessiert, die über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft bleiben (Lee *et al.*, 1987; Kellermann *et al.*, 1989). Weitere posttranslationale Modifikationen sind Glykosylierungen und Phosphorylierungen (Jahnen-Dechent *et al.*, 1994).

Schon vor zwanzig Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen einem Ungleichgewicht im Fetuin-Haushalt und der Entstehung von Diabetes beschrieben. Dabei fungiert Fetuin-A als spezifischer Inhibitor der Tyrosin-Kinaseaktivität des Insulin Rezeptors (Srinivas *et al.*, 1993). Des Weiteren können freie Fettsäuren durch Fetuin-A gebunden werden, welches dann wiederum an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bindet. Nach Pal *et al.* (2012) wird dadurch ein Mechanismus ausgelöst, der dann zur Entstehung von *Diabetes mellitus* Typ 2 führen kann.

Fetuin-A *knock out* Mäuse (Fetuin-A^{-/-}) leiden unter einer sehr starken ektopischen Kalzifizierung von Geweben (Jahnen-Dechent *et al.*, 1997). Offenbar besteht eine der Aufgaben des Fetuins-A darin, Calciumapatit-Kristallite zu binden und dadurch deren weitere Aggregation zu verhindern. Für diese Bindung ist vermutlich die erste Cystatin-ähnliche Domäne des Fetuins-A verantwortlich (Schinke *et al.*, 1996; Heiss *et al.*, 2003). Die Bindung von Ca₃(PO₄)₂ durch Fetuin-A spiegelt sich auch in einer besonders hohen Fetuin-A-Konzentration im Knochen wider (Mbuyi *et al.*, 1982).

Wie HRG und Fetuin-A, so zählt auch Fetuin-B beim Menschen (nicht bei der Maus) zu den seltenen Negativ-Akut-Phase Proteinen und wird bei entzündlichen Erkrankungen vermindert exprimiert (Lebreton *et al.*, 1979; Olivier *et al.*, 1999; Olivier *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2005). Als Inhibitor der Calciumphosphat-Präzipitation ist Fetuin-B weniger effektiv als Fetuin-A (Denecke *et al.*, 2003). Außerdem wurde für Fetuin-B eine Funktion als Tumorsuppressor vermutet (Hsu *et al.*, 2004).

Mit der Isolierung eines Inhibitionskomplexes von Nephrosin und Fetuin-A aus hämatopoetischen Organen des Karpfens wurde klar, dass Proteasen der Astacinfamilie durch Fetuin gehemmt werden können (Tsai *et al.*, 2004). Dies war ein unerwarteter Befund. Zwar waren viele Mitglieder der Cystatin-Superfamilie als Hemmstoffe von Proteinasen bekannt, doch handelte sich dabei in der Regel um Cysteinproteinasen, die einen völlig anderen Katalysemechanismus aufweisen als die Metalloproteinasen der Astacinfamilie. Neben dem Nachweis eines Fetuins auf Proteinebene, konnten Tsai und Mitarbeiter zwei verschiedene Fetuin-cDNAs isolieren, die sich in der Länge ihrer codierenden Nukleotidsequenzen unterschieden und daher als Fetuin L (*long*) und Fetuin S (*short*) bezeichnet wurden (Tsai *et al.*, 2004). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen außerdem siebzehn Substitutionen auf, welche über die gesamten Sequenzen verteilt sind. Für den isolierten aktiven Inhibitor codiert die lange cDNA Variante. Damit war anzunehmen, dass es sich hier nicht um Spleißvarianten ein und desselben Gens handelte, sondern um die Produkte verschiedener Gene.

Neben den beiden N-terminalen Cystatin-ähnlichen Domänen liegt auch im 448 Aminosäuren umfassenden unreifen Fetuin des Karpfens eine dritte Domäne vor, die – wie in den *Danio rerio* und

Xenopus Fetuinsequenzen – im Vergleich zu den entsprechenden D₃ der Säuger-Fetuine um rund einhundert Aminosäurereste länger ist und sich durch einen hohen Gehalt an Histidin- und Prolinresten auszeichnet. Die dritte Domäne des unreifen Proteins beinhaltet ein 164 Aminosäurereste langes inseriertes Segment, welches durch dreimal wiederholte HRP₃GHGPP- und viermal wiederholte AGRDPKDKTPDLRGHPEH-Sequenzmotive gekennzeichnet ist. Die lange Form des Fetuins weist drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (¹¹¹NVT, ²⁰⁶NCT und ²⁵³NIT) sowie drei potentielle O-Glykosylierungsstellen (Ser⁴¹¹, Ser⁴¹⁵ und Thr⁴³⁹) auf. Dieses Fetuin wird von der Leber des Karpfens synthetisiert und in die Blutbahn sezerniert. In den Nieren, der Kopfniere und den Kiemen wird diese Vorstufe zu seiner aktiven Form durch eine unbekannte Peptidase prozessiert. Dabei werden N-terminal vier bis fünf Aminosäuren entfernt. Auch C-terminal wird das Protein prozessiert. Den Abschätzungen von Tsai und seinen Mitarbeitern zufolge ist Gly²⁸² der C-Terminus des reifen Inhibitors (Tsai *et al.*, 2004).

Wie die Säugetier-Fetuine enthält auch das Fischfetuin konservierte Cysteinreste, sowie das teilweise konservierte Sequenzmotiv EETECHIVNPKP (Tsai *et al.*, 2004).

2.4 ZIEL DIESER ARBEIT

Die Intention der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Inhibition von Astacinproteasen durch Inhibitoren vom Typ des Fisch-Fetuins aufzuklären. Dazu mussten zunächst die Astacine identifiziert werden, welche besonders stark bzw. gar nicht durch Fisch-Fetuin-A gehemmt werden. Zudem sollte die Inhibition weiterer Proteasen anderer Klassen geprüft werden. Die Analysen sollten mit Hilfe verschiedener fluorogener und chromogener Substrate durchgeführt werden. Zudem sollten kinetische Parameter bestimmt werden. Um nähere Aussagen über den möglichen Mechanismus der Inhibition machen zu können, wurde außerdem eine D¹⁴⁴A-Mutante generiert und getestet.

Für die Charakterisierung der Inhibition durch Fisch-Fetuin-A standen verschiedene protein-biochemische Methoden zur Verfügung. Die Interaktion zwischen Inhibitor und Proteasen konnte beispielsweise mit Hilfe von SDS PAGE, Western Blot und Zymographie überprüft werden. Außerdem sollten bioinformatische Methoden hinzu gezogen werden. So können nicht nur der phylogenetische Zusammenhang der Cystatin-ähnlichen Domänen der Cystatin-Superfamilie beleuchtet werden, sondern auch die Substratbindungsregion des Karpfen Nephrosins im Vergleich zum Nephrosin des Zebrafisches analysiert werden. Ein wichtiger Bereich dieser Arbeit sollte außerdem die Analyse der möglichen Strukturen der Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine sein. Dadurch sollten mögliche inhibitorische Bereiche als reaktive Zentren identifiziert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit hochgereinigtem Wasser (*Aqua valde purificata*) hergestellt. Dies wird im Folgenden als „H₂O reinst“ abgekürzt. Die Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.2 MOLEKULARBIOLOGIE

Während dieser Arbeit wurde das Plasmid, welches die Nukleotidsequenz des reifen Inhibitors enthielt, durch Hitzeschocktransformation in kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 Bakterienzellen eingebracht und amplifiziert. Als Kontrolle diente der pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektor, welcher kein Insert enthielt. Ausgehend von diesem Konstrukt, wurde auch die Mutagenese durchgeführt.

Die für diese gesamte Arbeit zugrunde liegende Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des Fisch-Fetuins-A sind im Anhang (Abbildung 48) aufgeführt, ebenso der verwendete pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektor der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland; Abbildung 49).

Die Ausgangssequenz des Fisch-Fetuins-A wurde uns von Dr. Xosé S. Puente und Prof. Dr. F.X. Gomis-Rüth zur Verfügung gestellt. Der für den reifen Inhibitor kodierende Bereich (813 bp) wurde von Elena Frerick in die Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) des Expressionsvektors pQE-TriSystem His-*Strep* 2 (5796 bp; Qiagen, Hilden, Deutschland) einkloniert (Frerick, 2006) und mir zur Verfügung gestellt.

Durch die enthaltenen Promotoren des Vektors soll eine Proteinexpression in drei verschiedenen Systemen möglich sein: in Bakterien (T5 Promotor), Insektenzellen (p10 Promotor) und Säugerzellen (CAG Promotor) (Qiagen, 2003). Der Versuch, den Inhibitor mit Hilfe des Baculovirus-Systems in Insektenzellen zu exprimieren blieb jedoch erfolglos (Lin, 2007).

Durch die Klonierung in die MCS des Vektors wird der Inhibitor bei der Proteinsynthese mit einem N-terminalen *Strep-tag* und einem C-terminalen 8x His-*tag* exprimiert. Diese Markierungen werden bei der Nickel-Chelat-affinitätschromatographischen Proteinreinigung (*nickel-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA; Qiagen, Hilden, Deutschland) und dem immunologischen Nachweis durch Chemolumineszenz auf Western Blot Membranen zu Nutze gemacht.

3.2.1 Bakterienstämme

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet (Tabelle 1).

Sowohl *E. coli* JM109 als auch *E. coli* XL1-Blue Stämme besitzen die *lac I^f* Mutation des *lac I* Gens (Qiagen, 2003). Dies hat die Produktion von Lac-Repressorproteinen zur Folge, die hauptsächlich im Operator des Lac Operons binden und so die Transkription von Sequenzbereichen, die in 5' Richtung des Promotors gelegen sind, verhindern (Reznikoff et al., 1974). In den *E. coli* M15[pREP4] Zellen sorgt zusätzlich die permanente Produktion von Lac-Repressorproteinen durch das *low copy* pREP4 Plasmid für hohe Konzentrationen und die effiziente Blockade der Transkription.

Werden die Repressorproteine beispielsweise durch Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase (IPTG) abgefangen, kann die *E. coli* RNA Polymerase an den T₅ Promotor, durch den sehr hohe Transkriptionsraten erzielt werden können, binden und die Sequenz in der MCS transkribieren (Qiagen, 2003). Zusätzlich zu dem *lac I* Gen, besitzt das pREP4 Plasmid das *neo* Gen, welches den Zellen Kanamycin-Resistenz verleiht (Farabaugh, 1978).

Tabelle 1: *Escherichia coli* Stämme, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

E. coli Stamm	Verwendung	Resistenz	Bezugsquelle
JM109 (<i>high efficiency competent cells</i>)	Plasmid Amplifikation	-	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
M15[pREP4]	Proteinexpression	Kanamycin	Qiagen (Hilden, Deutschland)
XL1-Blue (<i>supercompetent cells</i>)	Mutagenese	Tetracyclin	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)

3.2.2 Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung

Tabelle 1 zeigt, dass schon der verwendete Bakterienstamm eine eigene Antibiotikaresistenz besitzen kann. Zudem werden während der Hitzeschocktransformation durch das verwendete Plasmid (weitere) Resistenzen eingeführt. Durch den pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektor erhielten alle Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, eine Ampicillin-Resistenz. Da *E. coli* M15[pREP4] das pREP4 Plasmid enthalten, besitzen diese Zellen außerdem eine Kanamycin-Resistenz.

In der Tabelle 2 sind die Zusammensetzungen aller Lösungen aufgelistet, die für die Kultivierung der, mit dem pQE-TriSystem His-*Strep*-Fisch-Fetuin-A Plasmidvektoren bzw. den Leervektoren transformierten, Bakterienstämme verwendet wurden.

Tabelle 2: Lösungen für die Kultivierung der verschiedenen Bakterienstämme.

Für die Sterilfiltration wurden 0,22 µm Filter (Sarstedt, Nümbrecht, D) verwendet. IPTG = Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase; LB = lysogeny broth; X-Gal = 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Galactosidase.

Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin	100 mg Ampicillin/ml H ₂ O reinst, sterilfiltriert
Kanamycin	50 mg Kanamycin/ml H ₂ O reinst, sterilfiltriert
X-Gal	50 mg X-Gal/ml DMF
IPTG [1,05 M]	250 mg/ml in H ₂ O reinst, sterilfiltriert
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl in 950 ml H ₂ O reinst gelöst 10 ml 250 mM KCl-Lösung pH 7,0 (NaOH) ad 1 l H ₂ O reinst autoklaviert; kurz vor Gebrauch Zugabe von 5 ml 2 M MgCl ₂ -Lösung (steril)
SOC-Medium	1 l SOB-Medium (autoklaviert, auf ca. 60 °C abgekühlt) 20 ml steril filtrierte Glukoselösung (18 g/100 ml)
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt ad 1 l H ₂ O reinst pH 7,5 (NaOH), autoklaviert
LB-Agar	15 g Agar / 1 l LB-Medium, autoklaviert
LB-Amp-Agar	Auf ca. 55 °C abgekühlter, autoklavierter LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp/Kan-Agar	Auf ca. 55 °C abgekühlter, autoklavierter LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin 50 µg/ml Kanamycin
LB-Amp/X-Gal/IPTG-Agar	20 g Agar / 1 l LB-Medium (pH 7,0 mit 5 N NaOH), autoklaviert 100 µg/ml Ampicillin 80 µg/ml X-Gal 20 mM IPTG
NZY ⁺ Medium	5 g NaCl 10 g NZ Amin 5 g Hefeextrakt ad 1 l H ₂ O reinst pH 7,5 (NaOH), autoklaviert 12,5 ml 1 M MgCl ₂ , sterilfiltriert 12,5 ml 1 M MgSO ₄ , sterilfiltriert 20 ml 20 % (w/v) Glukose, sterilfiltriert

3.2.3 Hitzeschocktransformation und Bakterienkultivierung

Zu 100 µl kompetenten *E. coli* JM109 Zellen wurden 200 bis 600 ng Plasmid-DNA gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für eine Minute im 42 °C warmen Wasserbad gehalten, dann wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt und schließlich jeweils 1 ml SOC-Medium hinzu gefügt. *E. coli* XL1-Blue, in die die Vektor-DNA mit dem mutierten Insert eingeschleust werden sollte, wurden mit 500 µl NZY⁺ Nährmedium versetzt.

Nach der ein- bis dreistündigen Inkubation der transformierten Zellen bei 37 °C und ständigem Schütteln bei 180 U/min, wurden die Zellen für zwei Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. 900 µl des Überstands wurde verworfen. Mit den verbliebenen 100 µl SOC-Medium wurden die Zellpellets resuspendiert um sie anschließend auf Antibiotika-haltigen Agarplatten auszustreichen. Diese Platten wurden dann bei 37 °C gelagert bis Bakterienkolonien zu erkennen waren.

Um die Klone einzelner Kolonien zu vermehren, wurden diese unter sterilen Bedingungen isoliert, in Antibiotika-haltiges LB-Medium (*lysogeny broth*; Bertani, 1951; Bertani, 2004) überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min geschüttelt (Certomat®R, B. Braun Biotech International, Sartorius Group, Göttingen, Deutschland). Dabei wurden transformierte *Escherichia coli* JM109 und XL1-Blue in 5 ml Medium vermehrt.

Für die Proteinexpression wurden die Übernachtskulturen der *E. coli* M15[pREP4] Zellen in 25 ml LB-Amp/Kan-Medium angesetzt.

3.2.4 Plasmidisolierung und Konzentrationsbestimmung

Die Plasmide wurden aus den Übernachtskulturen mit dem *Nucleo spin*® Kit (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland), nach dem Protokoll für *high copy* Plasmide isoliert.

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA wurden mit dem *NanoDrop ND-2000* UV/Vis-Spektralphotometer von peqLab (Erlangen, Deutschland) bestimmt. Dabei wurden jeweils 1,5 µl der isolierten DNA-Proben eingesetzt.

3.2.5 Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Nach der Plasmidamplifikation in *E. coli* JM109 wurde die isolierte DNA durch Restriktionsanalyse auf das korrekte Insert geprüft. Dazu wurden die Restriktionsendonukleasen *Xma* I (10000 U/ml) und *Pml* I (20000 U/ml) der Firma *New England Biolabs* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt.

Für die Linearisierung des Insert-tragenden Vektors wurden 0,25 µl *Xma* I und 200 bis 300 ng Plasmid DNA eingesetzt. Die Doppelrestriktion wurde mit jeweils 0,5 µl der Restriktionsenzyme *Xma* I und *Pml* I und der 400 – 600 ng Plasmid DNA durchgeführt. Zu beiden Restriktionsansätzen wurden jeweils 1 µl, mit BSA versetzter 10 x NEB Puffer 4 gegeben und die Volumina mit sterilem Reinstwasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden für eineinhalb bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Restriktion auf 1 %igen Agarosegelen.

Die Insertregion des pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektors einzelner Proben wurde außerdem, ausgehend von den Primern *pQEfor* und *pQErev* (Tabelle 3), durch die Firma Starseq (Mainz, Deutschland) sequenziert.

3.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen

Die Proben des Restriktionsansatz, sowie der PCR wurden mit Hilfe analytischer Agarosegele aufgetrennt. Dazu wurde 1 % Agarose in TAE Puffer (40 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0 mit Eisessig eingestellt) durch Erwärmen gelöst und in die horizontale Gelelektrophorese-Apparatur der Firma Hanischmacher (Kassel, Deutschland) gegossen, in die zuvor 2 µl Ethidiumbromidlösung (0,05 µg/ml TAE Puffer) pipettiert wurden.

Die Proben wurden mit 10x Probenpuffer (0,02 % Bromphenolblau; 50 % Glycerin; 1 % SDS) versetzt, aufgetragen und durch eine Spannung von 120 V aufgetrennt.

3.2.7 Primer

Mit Hilfe des Programms Oligo (Kibbe, 2007) wurden die Primer designt, die bei der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bestellt wurden. Anders als in dem *QuickChange II* Mutagenese Kit von *Agilent Technologies* (Böblingen, Deutschland) empfohlen, wurden die Primer nicht durch HPLC (*high pressure liquid chromatography*) gereinigt.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Die Primer pQEfor und pQErev dienen als Sequenzierungsprimer. NI2011_4s und _2as wurden für die Mutagenese mit dem *QuickChange II* Mutagenese Kit (*Agilent Technologies*, Böblingen, Deutschland) eingesetzt. Die Nukleotide, die die Punktmutation einführen sind fett gedruckt und unterstrichen. Die Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. ΣNt = Summe der Nukleotide, T_m = Schmelztemperatur

Bezeichnung	Sequenz	ΣNt	GC-Gehalt	T_m
pQEfor	5'-gttattgtgtctcat-3'	19	42 %	39,0 °C
pQErev	5'-tcgatctcagtggattttgtg-3'	21	42 %	47,0 °C
NI2011_4s	5'-cttgtgacaaaatgcctg <u>ctg</u> ccccggctgctg-3'	36	61 %	81,0 °C
NI2011_2as	5'-gcagg <u>gcagg</u> gcattttg-3'	17	58 %	52,0 °C

3.2.8 D¹⁴⁴A Mutagenese

Da überprüft werden sollte, ob der konservierte Aspartatrest Asp¹⁴⁴ eine entscheidende Rolle bei der Inhibition von Astacinproteinasen durch Fisch-Fetuin-A spielt, sollte dieser durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht werden. Die Mutagenese wurde von Malin Preiß im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Preiß, 2011). Als Ausgangsmaterial wurde der pQE-TriSystem His-*Strep* Vektor 2 mit dem Insert der reifen Fisch-Fetuin-A Sequenz verwendet. Dieses Plasmid wurde zuvor durch Plasmidpräparation aus *E. coli* JM109 Bakterienzellen gewonnen. Primer, die die Punktmutation einfügen sollten, wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Primer und ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Für den Austausch wurde das *QuickChange II* Mutagenese Kit von *Agilent Technologies* (Böblingen, Deutschland) verwendet. Die Amplifikation der veränderten Plasmide erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA Polymerase. Im Protokoll des *Quick Change* Mutagenese Kits wird eine etwa sechsmal fehlerfreiere DNA Synthese durch diese DNA Polymerase als durch die *Taq* DNA Polymerase angegeben (*Agilent Technologies*, 2013). Während der PCR werden – ausgehend von den beiden Primern, die beide die Mutation tragen und jeweils komplementär zu den Strängen der Ausgangsequenz sind – beide Stränge repliziert.

Um mutierte und nicht-mutierte DNA voneinander zu trennen, wurden im Anschluss an die PCR 1 µl des Restriktionsenzym *Dpn I* (10 U/µl) zu den abgekühlten Proben geben und für eine Stunde bzw. über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dies führte zu einem Abbau von methylierter und hemimethylierter Eltern-DNA durch die Endonuklease. Der Einbau der Primer in die Vektoren hat zu versetzt angeordneten „Kerben“ (engl.: *staggered nicks*) in der mutierten Vektor-DNA geführt. Um diese nicht vollständig geschlossenen DNA-Stränge zu reparieren wurde deshalb das PCR Amplifikat – entsprechend der *QuickChange II* Mutagenese Kit Herstellerempfehlung (Agilent Technologies, 2012) – in superkompetente *E. coli* XL1-Blue eingebracht. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen auf LB-Amp/X-Gal/IPTG-Agar-Platten kultiviert und blau/weiß selektioniert. Kolonien, die das Plasmid aufgenommen hatten, erschienen weiß, da hier das *lacZ* Gen unterbrochen wurde. Blaue Kolonien exprimierten durch das intakte *lacZ* Gen das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase und konnten dadurch das Substrat X-Gal umsetzen.

3.3 HETEROLOGE EXPRESSION DES REKOMBINANTEN FISCH-FETUIN-A

Mit dem pQE-TriSystem His-*Strep 2* (mit und ohne Fetuin-A-Insert) Vektor transformierte *E. coli* M15[pREP4] wurden durch Kultivierung auf LB-Amp/Kan-Agarplatten selektiert. Einzelne Klone wurden, wie bereits beschrieben (Abschnitt 3.2.3), isoliert und in 25 ml LB-Amp/Kan-Medium (LB-Medium mit 100 µl/ml Ampicillin und 50 µl/ml Kanamycin) überführt. Die transformierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 U/min kultiviert. Für eine größere Gesamtausbeute wurden die Übernachtskulturen in vorgewärmte Kolben mit jeweils 50 ml LB-Amp/Kan-Medium überführt und weiter bei 37 °C und 180 U/min auf einem Schüttelinkubator (Certomat®R, B. Braun Biotech International, Sartorius Group, Göttingen, Deutschland) geschwenkt. Jeweils 25 ml dieser Kulturen wurden dann auf vorgewärmte 1 l Kulturkolben, die jeweils 250 ml, auf 37 °C temperiertes, LB-Amp/Kan-Medium enthielten, überführt und weiterhin bei 37 °C und 180 U/min im Schüttelinkubator Innova® 44 (New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Dabei wurde deren Zelldichte stetig kontrolliert. Dies erfolgte durch Absorptionsmessung mit Hilfe des *Ultrospec pro UV/Visible* Spektrometer (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) von 1 ml Zellmedium bei einer Wellenlänge von 600 nm. Lag der Wert zwischen 0,7 und 0,9, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. IPTG bindet an das Lac-Repressorprotein, welches in großen Mengen durch das pREP4 Plasmid exprimiert wird, und verhindert so dessen Bindung an den Operator des Lac-Operons (Qiagen, 2003; Reznikoff *et al.*, 1974). Dies ermöglicht die Bindung der RNA Polymerase und damit die Transkription der inserierten Fisch-Fetuin-A Sequenz, sowie die anschließende Translation zu dem gewünschten rekombinanten Inhibitor. Die Kolben wurden für weitere vier Stunden inkubiert. Stündlich genommene 1 ml Proben aus einer Kultur von *E. coli* M15[pREP4], die mit dem pQE-Tri System His-*Strep 2* Vektor mit dem Fisch-Fetuin-A Insert transformiert wurden, sowie aus einer *E. coli* Kultur die mit dem Leervektor (pQE-TriSystem His-*Strep 2* Vektor ohne Insert, Kontrolle) transformiert wurden, wurden im Anschluss durch Western Blot und Immunodetektion analysiert.

3.4 PROTEINBIOCHEMIE

3.4.1 Nachweismethoden

Um den Erfolg der heterologen Expression sowie der Nickel-NTA Affinitätschromatographischen Reinigung zu überprüfen, wurden die durch SDS PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennten und durch Western Blot auf eine PVDF Membran übertragenen Proteine mit Hilfe der Chemilumineszenz immunologisch nachgewiesen. Nach jedem Reinigungsschritt wurde dessen Erfolg durch SDS PAGE und Coomassie Brilliant Blau (CBB)-Färbung dargestellt.

3.4.1.1 Konzentrationsbestimmung

Konzentrationen der verwendeten Proteasen, Inhibitoren und Substrate wurden auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt.

Monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt eine Probe mit einer Schichtdicke von 1 cm. Durch die Absorption, d.h. die Energieaufnahme der Moleküle in der Lösung, und die Streuung, nimmt die Intensität der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung mit der durchdrungenen Wegstrecke exponentiell ab. Dies kann durch die folgende Formel beschrieben werden.

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \quad (1)$$

Dabei steht I_0 für die Intensität des einfallenden monochromatischen Lichts, I für die Intensität nach der Absorption, ε für den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, c für die Stoffmengenkonzentration und d für die Schichtdicke. Durch Umformung gelangt man zu der folgenden Beziehung, die wegen $d = 1$ cm bereits gekürzt wurde

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c = E \quad (2)$$

Die Effekte der Absorption und Streuung werden als Extinktion (E) beschrieben. Die optische Dichte (OD) wurde mit dem Cary300 Bio Spektrometer (Varian, Darmstadt, D) und der dazu gehörigen CaryWin UV Software bestimmt. Der für die Konzentrationsbestimmung notwendige Extinktionskoeffizient der verschiedenen Proteine wurde mit Hilfe des ProtParam Programms (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005) ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren vorwiegend die Indolgruppe der Aminosäure Tryptophan ($\varepsilon_{280\text{nm}} 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und die Phenolgruppe der Aminosäure Tyrosin ($\varepsilon_{280\text{nm}} 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Der proteinspezifische Extinktionskoeffizient ist die Summe aus der Anzahl der Chromophore, die mit ihrem entsprechenden Extinktionskoeffizienten multipliziert wurden (Pace *et al.*, 1995).

Auf Grund von ε und E kann nun die in der Lösung enthaltene Stoffmenge berechnet werden:

$$c = \frac{E}{\varepsilon} \quad (3)$$

3.4.1.2 TCA-Fällung

Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) wurde eingesetzt, um Proteine in Lösung durch Fällung zu reinigen. Die Proteine wurden durch TCA irreversibel deaturiert und quantitativ aus einer Lösung gefällt. So konnten beispielsweise Proben mit geringen Konzentrationen konzentriert werden oder/und Wasch- und Elutionsfraktionen der Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA) Affinitätschromatographie von Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) befreit werden. Letzteres war notwendig, da GuHCl zu einem Ausfällen der Proben führt, sobald sie auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

Zu der Proteinlösung aus der affinitätschromatographischen Reinigung wurde TCA zu einer Endkonzentration von 5 % gegeben und das Gemisch für mindestens zwanzig Minuten auf Eis gefällt. Die stündlich genommenen 1 ml Proben aus der bakteriellen Proteinexpression (Abschnitt 3.3) wurden mit TCA zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. In beiden Fällen wurden die Ansätze dann für 15 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Pellets wurden mit eiskaltem Ethanol *p.a.* überschichtet und erneut und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein- bis dreimal wiederholt. Anschließend wurden die getrockneten Pellets im Verhältnis 1:1 in Disulfidbrücken-reduzierendem Probenpuffer (Abschnitt 3.4.1.3, Tabelle 4) aufgenommen und für die SDS PAGE vorbereitet. Proteinlösungen, die konzentriert werden sollten, wurden dabei in einem zwei- bis fünfmal geringerem Probenpuffervolumen aufgenommen.

3.4.1.3 SDS PAGE

Proteingemische wurden durch die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS PAGE) nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Alle, für die SDS PAGE benötigten Puffer sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Für die elektrophoretische Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurden die Proben mit DTT zu einer Endkonzentration von 40 mM versetzt (Cleland, 1964). Die Proteingemische wurden durch Anlegen einer Spannung von 200 Volt über 30 Minuten aufgetrennt.

Als Proteinstandards für Polyacrylamidgele, die im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blau Färbelösung behandelt werden sollten, wurden der *Broad Range ColorPlus Prestained Protein Marker* (7-175 kDa; „P7 Marker“, NEB, Frankfurt am Main, D) bzw. der *Broad Range Protein Marker*, (2-212 kDa; „PM Marker“, NEB) aufgetragen. Sollten die aufgetrennten Proteine anschließend durch das Western Blot Verfahren auf PVDF-Membranen übertragen werden, so wurde der *MagicMark™ XP* (Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet. Die Laufstrecken der Proteinbanden wurden ausgemessen und den relativen Molekularmassen zugeordnet (GelAnalyzer2010a; Lazar, 2010).

Tabelle 4: Puffer für die SDS Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970).

Rotiphorese® Gel30 ist eine gebrauchsfertige und gasstabilisierte Acrylamidlösung, die von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen wurde.

Puffer	Reagenzie	pH-Wert
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS	6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS	8,8
Rotiphorese® Gel30	30 % (w/v) Acrylamidösung 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	
Elektrodenpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,2 % SDS	8,3 – 8,4
3-fach Probenpuffer (3x PP)	188,3 mM Tris/HCl 9 % SDS 30 % Glycerin 0,001 % Bromphenolblau ad 85 ml H ₂ O reinst	6,8
reduzierender 3-fach Probenpuffer (3x PP+DTT)	850 µl 3x PP 150 µl 0,8 M DTT	
nicht reduzierender 3-fach Probenpuffer (3x PP-DTT)	850 µl 3x PP 150 µl H ₂ O reinst	

Tabelle 5: Pipettierschema für die Gelherstellung für die SDS PAGE nach Laemmli (1970).

Während Laemmli ein 3 % Sammelgel einsetzte, wurde hier ein 3,8 % Gel verwendet. Es sind jeweils die Mengen für zwei Gele angegeben. TEMED = Tetramethyldiamin; APS = Ammoniumperoxodisulfat

	Trenngele					Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	14 %	20 %	3,8 %
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	1 ml
H ₂ O reinst	3,64 ml	3,214 ml	2,68 ml	2,15 ml	0,54 ml	2,44 ml
Rotiphorese® Gel30	2 ml	2,666 ml	3,2 ml	3,73 ml	5,34 ml	0,506 ml
10 % (v/v) TEMED	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl
10 % (v/v) APS	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl

3.4.1.4 Coomassie-Färbeprotokoll

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische aus der SDS PAGE wurde durch Coomassie Brilliant Blau (CBB) nach dem Protokoll von Kang und seinen Mitarbeitern angefärbt (Kang *et al.*, 2002). Die Gele wurden für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in der Färbelösung (0,02 % CBB G250; 5 % Aluminiumsulfat-Hydrat; 10 % Ethanol; 2 % *ortho*-Phosphorsäure) inkubiert und anschließend mindestens ein halbe Stunde in Entfärbelösung (10 % Ethanol; 2 % *ortho*-Phosphorsäure) entfärbt.

3.4.1.5 Western Blot

Durch die Verwendung des pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektorsystems wurden Markierungen (8x His-tag und Strep-tag II) angefügt. Dies ermöglichte nicht nur die affinitätschromatographische Reinigung des Fisch-Fetuins-A, sondern auch dessen immunologische Detektion mittels Chemolumineszenz nach dem Western Blot.

Durch SDS PAGE aufgetrennte Proteingemische wurden mit Hilfe des *semi dry* Blotverfahrens (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Immobilon®-FL Transfer Membran, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Eschborn, D) übertragen. Jeweils vier, auf Gelgröße geschnittene Chromatographiepapiere (3 MM Whatman®-Papier, Schleicher und Schuell, Dassel, D) wurden in Anoden- bzw. Kathodenpuffer (Tabelle 6) getränkt.

Tabelle 6: Materialien und Puffer für das *semi dry* Blotverfahren (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984)

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer	300 mM Tris/HCl 20 % Ethanol pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl 40 mM Glycin 20 % Ethanol pH 8,0

Die kathodenpuffergetränkten Papiere wurden auf die kathodische Graphitplatte der Western Blot Apparatur (Biotec Fischer, Reiskirchen, D) gelegt. Auf diese wurde das Polyacrylamidgel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemischen, die PVDF Membran, welche durch Schwenken in Ethanol *p.a.* aktiviert und kurz mit Reinstwasser gespült wurde, und schließlich die anodenpuffergetränkten Whatmann®-Papiere gelegt. Nach Ausschluss von Luftblasen wurde die Apparatur durch Auflegen der anodischen Graphitplatte geschlossen. Der Proteintransfer wurde durch Anlegen der Spannung von 20 Volt gestartet und dauerte 30 Minuten. Als Proteinstandard für die Western Blot Analyse der Proteingemische wurde der *MagicMark™ XP* der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) eingesetzt.

3.4.1.6 Immunodektion mittels Chemiluminiszenz

Da das heterolog exprimierte Fisch-Fetuin-A mit einem N-terminalen Strep-tag und einem C-terminalen His-tag versehen ist, können diese Markierungen durch die monoklonalen Maus-Antikörper, die gegen die Epitope WSH PQFEK (Strep-tag II) bzw. HHHHH (*penta*-His-tag) gerichtet sind, nach dem *blotting*-Verfahren auf der PVDF Membran gebunden werden. Durch einen zweiten, polyklonalen Antikörper, der gegen die Immunglobuline Gamma (IgG) der Maus gerichtet ist und an den die Peroxidase des Meerrettichs (POX) gekoppelt ist,

können die primären Antikörper, aber auch die Proteine des *MagicMark™ XP* Protein-standards, mit Hilfe einer Luminol-H₂O₂-Lösung (Roti®-Lumin, Carl Roth, Karlsruhe, D) und der Chemolumineszenzreaktion spezifisch nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Puffer für den immunologischen Nachweis von Strep-tag markierten Proteinen mittels Chemilumineszenz.

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl
PBS- 0,1 % -Tween-Puffer	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
PBS- 0,5 % -Tween-Puffer	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20
Blockierungspuffer	3 % BSA in PBS-0,5% -Tween

Tabelle 8: Puffer für den immunologischen Nachweis von His-tag markierten Proteinen mittels Chemilumineszenz.

Puffer	Zusammensetzung
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween-Triton-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 0,2 % (v/v) Triton X-100
Blockierungspuffer	3 % BSA in TBS

Tabelle 9: Reagenzien für die Detektion von Strep-tag und His-tag markierten Proteinen.

Die Antikörper (AK) aus der Maus (primärer AK) und der Ziege (sekundärer AK) wurden von den Firmen Qiagen (Hilden, D) bzw. Dianova (Hamburg, D) bezogen. Gegen den Strep-tag gerichtete AK detektieren den N-Terminus von rekombinantem Fisch-Fetuin-A, anti-His-tag AK sind für den Nachweis des C-Terminus geeignet. BSA = Rinder-Serumalbumin, POX = Meerrettich-Peroxidase

Antikörper	Verdünnung	Zusammensetzung
1. AK anti-Strep-tag II	1 : 2000	1 % BSA in PBS-0,1% Tween
1. AK anti-penta-His-tag	1 : 1000	3 % BSA in TBS
2. AK ^{POX} anti-Maus	1 : 10000	10 % Magermilchpulver in PBS

Tabelle 10: *Behandlungsprotokoll der Membranen für die Immunodetektion des Strep-tags, bzw. His-tags.*
 AK = Antikörper, RT = Raumtemperatur

Dauer	Strep-tag	His-tag	Bedingungen
2 x 10 min	PBS	TBS	RT
	Blockierungspuffer	Blockierungspuffer	über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT
2 x 10 min	PBS-0,1% Tween	TBS-T	RT
1 x 10 min	PBS	TBS	RT
1 h	1. AK (anti-strep-AK)	1. AK (anti-his-AK)	RT
2 x 10 min	PBS-0,1% Tween	TBS-T	RT
1 x 10 min	PBS-0,1% Tween	TBS	RT
1 h	2. AK ^{POX} (anti-Maus-AK)	2. AK ^{POX} (anti-Maus-AK)	RT
2 x 10 min	PBS-0,1% Tween	TBS-T	RT
2 x 10 min	PBS	TBS-T	RT

Nachdem die PVDF-Membranen entsprechend des Protokolls (Tabelle 10) behandelt wurden, erfolgte die Detektion der markierten Proteine. Dazu wurden die Membranen für ein bis drei Minuten mit der Roti®-Lumin-Arbeitslösung (1:1 Gemisch der Roti®-Lumin Komponenten A und B) inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte dann auf Röntgenfilm (Belichtung 3 bis 5 min).

Ablösung der Antikörper von den Membranen

Mittels des sogenannten "*stripping* Puffers" wurden die Antikörper von den Membranen gelöst, um die Proteine auf den Membranen anschließend mit einem anderen Antikörper zu detektieren. Dazu wurden die Membranen für fünf Minuten in diesem Puffer geschwenkt.

Tabelle 11: *Zusammensetzung des stripping Puffers.*

Konzentration	Agens
0,05 M	Glycin pH 10,8
7 M	GuHCl
0,05 mM	EDTA
0,1 M	KCl
0,02 M	β-Mercaptoethanol

3.4.2 Reinigung des Fisch-Fetüins-A

In der Diplomarbeit über die „Heterologe Expression und funktionelle Analyse des Nephrosin-Inhibitors aus *Cyprinus carpio*“ (Meyer, 2009) wurde bereits gezeigt, dass die Reinigung des Fisch-Fetüins-A nur unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden kann.

Um die Vergleichbarkeit beider Konstrukte – dem Wildtyp und der D¹⁴⁴A-Variante – sicherzustellen, wurden sie parallel, unter gleichen Bedingungen aus den Bakterienpellets der heterologen Expressionen durch Zellyse und Nickel-NTA Affinitätschromatographie gewonnen.

3.4.2.1 Lyse der bakteriellen Zellen

Ein wichtiger Bestandteil des Lysepuffers ist Guanidiumhydrochlorid (GuHCl). Es stört die geordnete Struktur der Wassermoleküle durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen. Durch diese chaotrope Eigenschaft wird die Zusammenlagerung hydrophober Bestandteile gelockert und deren Löslichkeit erhöht (Creighton, 1999).

Tabelle 12: Lysepuffer für die Herstellung von Bakterienlysaten unter denaturierenden Bedingungen.

Konzentration	Agenz
6 M	GuHCl
0,1M	NaH ₂ PO ₄
0,01 M	Tris, pH 8
1 µM	Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor)
2 µM	E6 ₄ (Cysteinproteaseinhibitor)
500 µM	PMSF (Serinproteaseinhibitor)
	pH 8,0

Zunächst wurden die *E. coli* Zellen lysiert und die Einschlusskörper (*inclusion bodies*), die durch die bakterielle Überexpression in den Zellen angefallen sind, aufgeschlossen. Dazu wurden den Bakterienpellets, welche ein Gewicht zwischen 3 und 3,5 g aufwiesen, 70 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt und für drei Minuten durch vorsichtiges Rühren homogenisiert. Während das Homogenat kontinuierlich über zwei Stunden gerührt wurde, wurden insgesamt 50 ml Lysepuffer (Tabelle 12) sequentiell hinzugegeben. Dabei wurden der zeitliche Abstand der Zugabe, sowie das Puffervolumen nach und nach ausgeweitet. Abschließend folgte die Zentrifugation des Zellysats für zehn Minuten bei 9500 x g in der *Centrifuge 5804 R* (Eppendorf AG, Hamburg, D), um das Lysat von den Zellresten zu trennen.

3.4.2.2 Nickel-NTA Affinitätschromatographie

Da beide Varianten des Fisch-Fetüins-A für die Expression in *Escherichia coli* M15[pREP₄] in den pQE-TriSystem His-*Strep 2* Vektor inkloniert wurden, tragen die gewonnenen Proteine N-terminal einen *Strep-tag* und C-terminal einen 8xHis-*tag*. Aufgrund der Kompatibilität der Lyse- und Reinigungspuffer wurden die Inhibitoren zunächst mittels der Nickel-Chelat Affinitätschromatographie (*nickel-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA) gereinigt. Nachdem 3 ml des Säulenmaterials (*superflow*; Qiagen, Hilden, D) mit Auftragspuffer (Tabelle 13) äquilibriert waren, wurden die C-terminal mit acht Histidinen markierten, rekombinant gewonnenen Inhibitoren im *batch*-Verfahren an die Matrix gebunden. Da die Imidazol-Stickstoffatome bei

einem pH-Wert von 8,0 überwiegend deprotoniert vorliegen, können jeweils zwei Histidine an ein Nickelion binden, welches durch die Nitriloessigsäure an die *superflow*-Matrix gekoppelt ist (Qiagen, 2003). Die Bindung erfolgte durch Inkubation des Lysats direkt mit dem Säulenmaterial unter ständiger, langsamer Rotation (*batch*). Es wurde über Nacht bei 4°C oder über 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte mittels schrittweisen Absenkens des pH-Wertes durch den Einsatz mehrerer Elutionspuffer (Tabelle 13). Die Proteine, die an das Säulenmaterial gebunden haben, wurden somit protoniert, folglich gelöst und eluiert. Das rekombinante Fusionsprotein Fisch-Fetuin-A sollte aufgrund seines achtfachen His-tags besonders fest an die Säule gebunden haben und erst mit dem letzten Elutionspuffer, bei einem pH-Wert von 4,5, von dem Säulenmaterial gelöst werden.

Tabelle 13: Puffer für die Nickel-Chelat Affinitätschromatographie.

Alle Puffer hatten die gleiche Zusammensetzung und unterschieden sich nur in ihren pH-Werten.

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
Auftragspuffer (A)	6 M GuHCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris	pH 8,0
Elutionspuffer (B)	6 M GuHCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris	pH 6,4
Elutionspuffer (C)	6 M GuHCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris	pH 5,9
Elutionspuffer (D)	6 M GuHCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris	pH 4,5

Bei der parallelen Reinigung der Fisch-Fetuin-A Varianten wurden Pumpen verwendet, mit denen die Puffer mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min in die Säulen eingetroppt wurden. Es wurden 2 ml Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurden stichprobenartig Fraktionen durch TCA-Fällung vom GuHCl befreit (Abschnitt 3.4.1.2) und gleichzeitig konzentriert, um die Reinigung des rekombinanten Proteins durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse zu überprüfen.

3.4.2.3 Proteinfaltung, Dialyse und Konzentration

Durch das im Lysepuffer enthaltene GuHCl und dessen chaotrope Eigenschaft, sowie die reduzierende Agenz β -Mercaptoethanol sind die nativen Strukturen aller im Zellysat enthaltener Proteine verloren gegangen. Mit Hilfe der Nickel Chelat Affinitätschromatographie wurde das denaturierte Fisch-Fetuin-A aus dem Lysat gereinigt und konzentriert. Um diesen nun wieder in seine native, d.h. aktive Form zu überführen, wurden die Proteinlösungen langsam in Faltungspuffer eingetroppt. Der Renaturierungserfolg wird grundlegend durch den Einsatz möglichst reiner Proteinfractionen, dem schnellen Entzug denaturierender Pufferbestandteile und einer hohen Verdünnung des zu faltenden Proteins bestimmt (Rehm & Letzel, 2010).

Für die Faltung der denaturierten Fisch-Fetuin-A Proteine wurden Puffer D-Elutionsfraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie gewählt, die in den Faltungspuffer (Tabelle 14) zu einer Endkonzentration von 10 μ g/ml Protein, mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min eingetroppt wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass in allen Faltungsansätzen die gleiche GuHCl Endkonzentration von 300 mM vorlag. Die Faltung erfolgte unter ständigem Rühren bei 4 °C über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden.

Tabelle 14: Faltungspuffer für die Renaturierung der rekombinanten Proteine.

Konzentration	Chemikalie
50 mM	Hepes
800 mM	L-Arginin Hydrochlorid
0,3 mM	oxidiertes Glutathion
3,0 mM	reduziertes Glutathion
400 mM	Saccharose
	pH 9,0

Tabelle 15: Endkonzentrationen im Faltungsansatz der rekombinanten Proteine.

Chemikalie	Konzentration
Hepes	47,5 mM
L-Arginin-Hydrochlorid	760 mM
oxidiertes Glutathion	285 μ M
reduziertes Glutathion	2,85 mM
Saccharose	380 mM
GuHCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	5 mM
Tris	0,5 mM

Im Anschluss an die Faltung wurde die Proteinlösung gegen 50 mM Hepes, pH 8 bzw. pH 7,5 dialysiert. Der pH-Wert war von dem Enzym abhängig, dessen proteolytische Aktivität nach Inkubation mit dem Inhibitor geprüft werden sollte (zB. pH 8 für Nephrosin und pH 7,5 für Meprine).

Für die Dialyse wurde Dialyseschlauch aus regenerierter Cellulose (Visking Typ 1-7/8 ss inch) der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D), mit einem Durchmesser von 49 mm und einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 14000 Da verwendet. Es wurde über mindestens 42 Stunden dialysiert. Dabei wurde der Dialysepuffer mehrmals ausgetauscht. Durch die auftretende Osmose hat sich das Volumen der proteinhaltigen Lösung verdoppelt und musste für weitere Analysen reduziert werden.

Daher wurde das Dialysat durch Zentrifugation mit Amicon Ultra-15 Zentrifugationfiltereinheiten (Ultracel-10 Membran, MWCO 10 K; Millipore, Schwalbach, D) eingengt. Die Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C in der 5804 R-Eppendorfzentrifuge, mit einem Ausschwingrotor bei 3500 x g durchgeführt. Ein alternativer Versuch das Volumen durch das Angleichen der Ionenstärke mit 15 % PEG 20000 im Dialysepuffer zu reduzieren war nicht erfolgreich.

Anschließend wurde die inhibitorische Aktivität des gewonnenen Fisch-Fetuin-A durch vergleichende Aktivitätsmessungen von 5 nM Meprin α mit 1 μ M Inhibitor kontrolliert. Dabei wurde der Umsatz von 10 μ M eines FRET-Substrates (Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-

Lys(Dnp)NH₂; Peptanova, Sandhausen, D) am LS-50B Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer, Rodgau, D) verfolgt.

3.4.2.4 Affi-Gel® Blau Affinitätsgelchromatographie

Inhibitor-Chargen, in welchen durch Coomassiefärbung im SDS Polyacrylamidgel noch Fremdproteine nachweisbar waren, wurden über eine Affi-Gel® Blau Affinitätsgelchromatographie Säule (*Affi-Gel® blue affinity chromatography gel* von Bio-Rad, München, D) nachgereinigt. Die Trägermatrix ist ein Agararogel, an das der Farbstoff Cibracron *blue F3-GE* kovalent gebunden ist. Durch seine ionischen und hydrophoben Eigenschaften ist dieser für die Reinigung von Serum- und Plasmaproteinen geeignet (Gianazza & Arnaud, 1982a; Gianazza & Arnaud, 1982b).

Das Probenvolumen betrug dabei 1/50 des Säulenvolumens. Als Auftragspuffer wurde 50 mM Hepes (pH 7,5) eingesetzt. Die Probe wurde nach dem ersten Auftragen aufgefangen und noch viermal über die Säule gegeben. Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration im Auftragspuffer von 0 M auf 2 M wurde eluiert. Anschließend wurden Fraktionen der einzelnen Elutionsschritte durch Zentrifugation in Amicon® Ultra 0,5 – 3 K Zentrifugationfiltergefäßen (Millipore, Schwalbach, D) konzentriert, durch SDS PAGE aufgetrennt und auf Reinheit überprüft.

3.4.3 Native Elektrophorese

Durch die native Gelelektrophorese, d.h. ohne SDS und reduzierende Agenzien, sollten Enzym-Inhibitor-Komplexe nachgewiesen werden. Enzym und der Inhibitor Fisch-Fetuin-A wurden zusammen bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde inkubiert und anschließend mit dem Probenpuffer für native Gele versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte mit oder ohne Sammelgel bei 180 Volt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Western Blot mit Anti-Strep-tag- bzw. Anti-His-tag-Antikörpern,

Tabelle 16: Puffer für die native Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung
5fach Probenpuffer (für native Gele)	4,00 mM Tris 60 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau pH 6,8
Polyacrylamidgel Puffer	1,5 M Tris pH 10,0
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin pH 8,3 oder pH 9 (mit Eisessig eingestellt)

3.4.3.1 Zymographie nach Troeberg & Nagase (2003)

Mit Hilfe der Zymographie kann die enzymatische Aktivität einer Protease sichtbar gemacht werden. Dazu wurde ein Substrat (0,1 % Gelatine, w/v) in ein Polyacrylamidgel einpolymerisiert welches durch die aufgetragene Protease abgebaut werden kann. Durch

anschließende Färbung des Gels werden die aktiven Enzyme anhand der entstehenden Lysehöfe detektiert (Troberg & Nagase, 2003).

Da die Proteine ihre native Konformation beibehalten sollten, wurden sie nicht durch Aufkochen denaturiert. Zudem wurde dem Probenpuffer kein Dithiothreitol zugesetzt, um die vorhandenen Disulfidbrücken zu erhalten. Nachdem die Proben mit dem 4fach-Probenpuffer versetzt wurden, wurden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das im Probenpuffer enthaltende SDS wurde im Anschluss an den Gellauf durch einstündige Inkubation im Waschpuffer (2,5 % Triton-X 100) entfernt. Außerdem wurden Zymographien mit dem 5fach-Probenpuffer für native Gele durchgeführt. Bevor die Zymographiegele mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt wurden, wurden die Gele über Nacht bei 25 °C in 50 mM Hepes Puffer gelegt, um eine Rückfaltung der durch das SDS möglicherweise denaturierten Proteine sowie die Hydrolyse des Substrates zu ermöglichen.

Tabelle 17: Zusammensetzung eines Zymographiegels.

Rotiphorese® Gel30 wurde von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D) als gebrauchsfertige, gasstabilisierte 30 % (w/v) wässrige Acrylamidstammllösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid bezogen.

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (3,8 %)
Gelatine	0,1 %	-
1,5 M Tris, pH 10,0	1 ml	0,5 ml
H ₂ O reinst	1,34 ml	1,22 ml
Rotiphorese® Gel30	1,6 ml	0,253 ml
10 % (v/v) Tetramethylethylenediamin (TEMED)	30 µl	15 µl
10 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	30 µl	15 µl

Tabelle 18: Puffer für die Zymographie und die native Gelektrophorese.

Es wurden Zymographien mit dem 4x PP sowie dem 5x PP (für native Gele, siehe Tabelle 16) durchgeführt.

Puffer	Zusammensetzung
4fach Probenpuffer (für die Zymographie)	320 mM Tris 8 % SDS 20 % Glycerin 0,04 % Bromphenolblau pH 6,8
Polyacrylamidgel Puffer	1,5 M Tris pH 10,0
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin pH 8,3 (mit Eisessig eingestellt)

3.4.4 Spaltung des Fisch-Fetuin-A durch Proteasen

Um zu prüfen, ob Fisch-Fetuin-A ein Substrat für Proteasen der Astacinfamilie ist, wurden 2 μM des Inhibitors mit 17,3 nM rekombinant gewonnenen Meprin α , bzw. Meprin β , sowie aus dem Magensaft des Flußkrebse (*Astacus astacus* L.) gereinigtem Astacin für zwölf Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kontrollprobe, dem Inhibitor ohne Protease, wurde ebenso verfahren. Anschließend wurden die Proben auf einem 20 %, einem 10 %, sowie einem 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden dann dem Western Blot Verfahren unterzogen.

Die Tatsache, dass der Inhibitor durch zwei verschiedene Markierungen (*tags*) flankiert wird, sollte für die Darstellung möglicher Prozessierungen genutzt werden. Dafür wurden die Membranen nach den Protokollen für die Strep-*tag*- und die His-*tag*-Detektion behandelt. Die PVDF Membran, auf die die aufgetrennten Proteine des 7,5 %igen Geles übertragen wurden, wurde zuerst mit dem anti-Strep-*tag* Antikörper behandelt und anschließend, nach dem *strippen* der Membran, der anti-His-*tag* Detektion unterzogen. Die Membran des Blots des 20 %igen Gels wurde zuerst dem Detektionsprotokoll für den anti- His-*tag* Antikörper unterzogen, dann durch Behandlung mit dem *stripping*-Puffer von den anti-His-*tag* Antikörpern befreit und schließlich mit dem anti-Strep-*tag* Antikörper behandelt.

3.5 HEMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VERSCHIEDENER PROTEASEN DURCH FISCH-FETUIN-A

3.5.1 Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Proteasen und Fisch-Fetuin-A

Der Einfluss des rekombinanten Fisch-Fetuin-A auf die Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener Proteasen wurde durch Detektion der hydrolytischen Spaltung verschiedener Substrate untersucht. Bevor auf die Einzelheiten der spezifischen Meßreihen eingegangen wird, werden zunächst die allgemeinen Bedingungen erläutert.

Da in dieser Arbeit die inhibitorische Aktivität eines Proteins aus dem wechselwarmen Karpfen bestimmt werden sollte, wurden alle Kinetiken bei einer Temperatur von 25 °C, und nicht bei 37 °C, durchgeführt.

Substrate, die in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) vorlagen, mussten vorsichtig so verdünnt werden, dass die Enzymaktivität durch das DMSO nicht beeinträchtigt wurde, aber gleichzeitig hohe Konzentrationen an Substrat in Lösung blieben. Für die Messungen der Umsatzgeschwindigkeiten wurde nach Vergleich verschiedener Versuchsmessungen eine DMSO Konzentration von 0,5 % gewählt. Während der zehninütigen Vorinkubation von Inhibitor und Protease befand sich kein DMSO im Ansatz. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch auf 25 °C temperiert. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wurde das Enzym-Inhibitorgemisch in der temperierten Küvette vorgelegt.

Durch die Zugabe des Substrats wurde die Reaktion gestartet. Da das Volumen der Substratlösung möglichst groß gehalten wurde, konnte während des Zupipettierens eine bessere Durchmischung in der Küvette erzielt werden. Die Zeit von der Zugabe des Substrats bis zum Start der Aufzeichnung wurde für jede Messung gestoppt und dauerte durchschnittlich 18

Sekunden. Dadurch war es bei der Datenauswertung möglich, einen genaueren Startwert, und so die minimale Fluoreszenzintensität, zu ermitteln.

Die verwendeten Küvetten wurden vor jeder Messung mit Wasser und anschließend mit 70 %igem Ethanol gespült, um sicherzugehen, dass keine Protease-Rückstände der Totalumsatzbestimmung des Substrates der vorangegangenen Probe die neuen Messergebnisse verfälschen würden. Anschließend wurden die Küvetten mehrmals mit hochgereinigtem Wasser gespült, mit Stickstoff trocken gepustet und auf 25 °C temperiert.

Alle verwendeten Puffer wurden durch 0,22 µm Filter (Sarstedt, Nümbrecht, D) filtriert, um sie von Schwebstoffen zu befreien.

3.5.1.1 Substrate

Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität der unterschiedlichen Proteasen, mit und ohne Inhibitor, wurden verschiedene Substrate eingesetzt. Dabei beruht der Nachweis auf unterschiedliche Mechanismen, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll. Die für die Konzentrationsbestimmungen verwendeten Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Substrate sind dem Anhang zu entnehmen (7.5).

Chromogene Substrate

An eine Peptidsequenz ist C-terminal *para*-Nitroanilid (pNA) gekoppelt. Die Absorption des freigesetzten Nitroanilins kann bei einer Wellenlänge von 405 nm aufgezeichnet werden. Der Extinktionskoeffizient des Nitroanilins beträgt bei dieser Wellenlänge $10200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (De Young *et al.*, 1978). Diese Substrate besitzen am N-terminalen Ende eine Succinyl-Schutzgruppe.

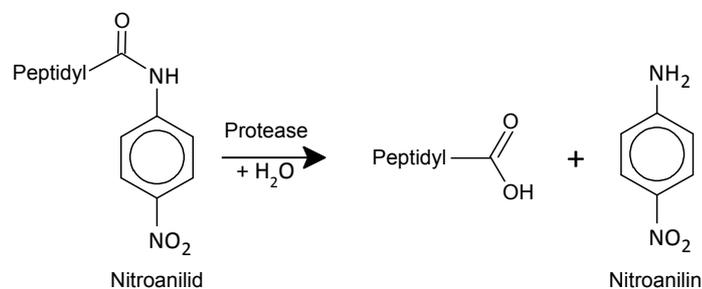


Abbildung 8: Hydrolyse des chromogenen *para*-Nitroanilid (pNA) Substrates.

Von dem *para*-Nitroanilid Substrat wird durch enzymatische Hydrolyse *para*-Nitroanilin abgespalten. Verändert nach Brousseau *et al.* (2012) und erstellt mit ACD/ChemSketch 12.1 (ACD/Labs, 1994-2010, www.acdlabs.com).

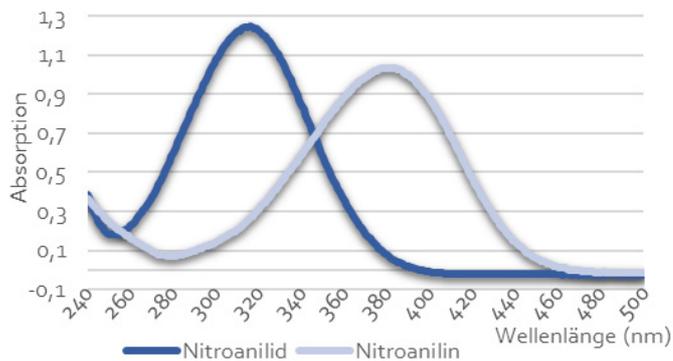


Abbildung 9: Absorptionsspektren von *p*-Nitroanilid und *p*-Nitroanilin.

Während das Absorptionsmaximum von Peptidyl-*p*-Nitroanilid bei 315 nm liegt, verschiebt sich der Peak nach proteolytischer Freisetzung des Nitroanilins in den langwelligeren Bereich, auf 380 nm. Bei dieser Wellenlänge überlappen beide Absorptionsspektren, so dass die *p*-Nitroanilin-Freisetzung bei 410 oder 405 nm gemessen wird (Erlanger et al., 1961; Stöcker et al., 1991b).

Das Substrat wurde in 50 mM Hepes Puffer (pH 8,0) gelöst. Nach den Aktivitätsmessungen wurde das Substrat durch Zugabe von 2 µl 10 M Natronlauge (NaOH) vollständig hydrolysiert, um die maximalen Produktkonzentrationen der einzelnen Proben zu bestimmen. Dadurch konnten mögliche Pipettierfehler während den Messreihen ausgeschlossen werden.

Die chromogenen Substrate Suc-Ala-Ala-Phe-pNA und Suc-Ala-Ala-Ala-pNA wurden für die Aktivitätsbestimmungen von Astacin verwendet.

FRET Substrate

Die Abkürzung „FRET“ steht für die englische Bezeichnung „*fluorescence resonance energy transfer*“. In älteren Publikationen wird auch die Bezeichnung „*radiationless energy transfer*“ (RET) für diese Energieübertragung verwendet (Lobb & Auld, 1984). Substrate dieser Klasse enthalten eine fluorogene Gruppe, deren Elektronen durch die Absorption eines Lichtquants einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Während des Rückfalls in den Grundzustand wird Fluoreszenzstrahlung emittiert. Im intakten Substrat wird die Energie strahlungsfrei auf ein Chromophor (Akzeptor) übertragen, welches einige Aminosäuren entfernt von der Donorgruppe – dem zumeist N-terminal lokalisierten Fluorophor – gekoppelt ist. Dazu muss das Spektrum emittierter Lichtquanten mit dem Wellenlängenbereich überlappen, welcher von der chromophoren Gruppe absorbiert werden kann (Förster, 1948). Da die Energie nicht an die Umgebung abgegeben, sondern von einer zweiten Gruppe aufgenommen wird, spricht man von einer Fluoreszenzlöschung oder dem *quenching*-Effekt. Analog dazu wird der Akzeptor als *quencher* bezeichnet (Stryer, 1978; Winter & Noll, 1998).

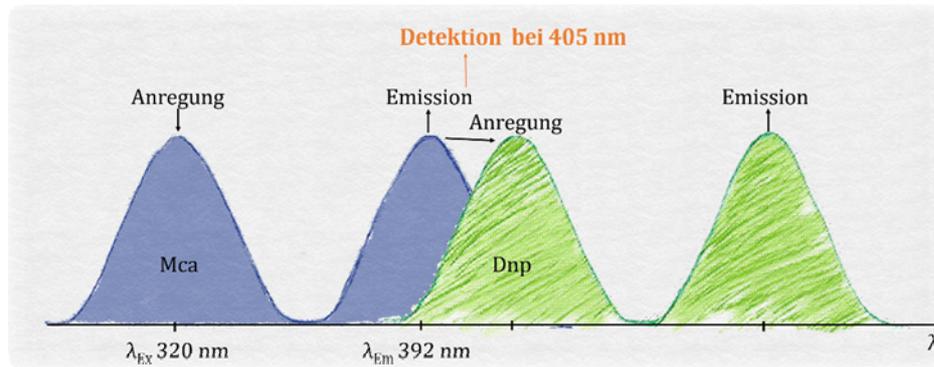


Abbildung 10: Schema des Funktionsprinzips von FRET-Substraten am Beispiel Mca/Dnp.

Durch Überlagerung des Emissionsspektrums von (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl (Mca) mit dem Absorptionsspektrum des 2,4-Dinitrophenyl (Dnp) wird die emittierte Energie des Mca von der Dnp-Gruppe aufgenommen (gequencht) und bei einer höheren Wellenlänge als Fluoreszenz abgegeben. FRET = fluorescence resonance energy transfer

Wird das Substrat innerhalb der Aminosäuresequenz, welche Donor und Akzeptor in Nähe zueinander bringt, geschnitten, so können sich beide Gruppen voneinander entfernen. Die Energie kann nun nicht mehr strahlungsfrei übertragen werden und wird als Fluoreszenzstrahlung emittiert.

Als FRET-Substrate wurden an Peptidketten gekoppelte Mca/Dnp-, Edans/Dabcyl- oder Trp/Dansyl-Paare eingesetzt. Bei Verwendung dieser Substrate ist darauf zu achten, dass zu viel Substrat im Ansatz die Ergebnisse verfälschen kann, da es zum intermolekularen *quenching* kommen kann. Hier wird dann die Energie, welche von einer freigesetzten fluorogenen Gruppe emittiert wird, durch umliegende Akzeptorgruppen abgefangen und kann nicht mehr als Proteolyseprodukt aufgezeichnet werden. Daher ist es immer notwendig die maximale Fluoreszenzintensität (maximale Quantenausbeute, Totalumsatz) des in der Probe vorhandenen Substrates zu bestimmen.

Dazu wurde den Proben, falls nicht anders angegeben, 1 μl Proteinase K zu einer Endkonzentration von 10 bis 13 μM zugesetzt und die Fluoreszenz bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität (Int_{max}) aufgezeichnet. Da bei den einzelnen Messungen die Zeit des Aufeinandertreffens von Protease und Substrat bis zum Start der Aufzeichnung gestoppt wurde, war auch die Anfangsintensität (Int_{min}) bekannt und die einzelnen Fluoreszenzausbeuten (ΔInt) konnten bestimmt werden.

Tabelle 19: Beispiele von FRET-Substraten, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Das Fluorophor (Donorgruppe) ist in fett, und das Chromophor (Akzeptor, Quencher) in kursiv hervorgehoben. Die Abkürzung Mca ist gleichbedeutend mit der außerdem gebräuchliche Abkürzung MOCAc. Beides steht für (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl; Bachem - Glossary & Abbreviations; <https://www.bachem.com/>, 7.8.2013). ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; λ_{Ex} = Anregungswellenlänge; λ_{Em} = Emissionswellenlänge

	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{Ex}	λ_{Em}
Mca -Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(<i>Dnp</i>)NH ₂	$\epsilon_{410 nm}$ 7500	320 nm	405 nm
Ac-Arg-Glu(Edans)-Asp-Arg-Nle-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys(<i>Dabcyl</i>)-Amid	$\epsilon_{453 nm}$ 32000	350 nm	520 nm
<i>Dansyl</i> -Pro-Lys-Arg-Ala-Pro- Trp -Val-OH	$\epsilon_{340 nm}$ 4300	280 nm	350 nm

Während die Mca/Dnp und Edans/Dabcyl Substrate in 100 % DMSO gelöst wurden, konnte das Dansyl-Substrat in Puffer (50 mM Hepes, pH 8,0) gelöst werden. Das Dansyl-Substrat (Dns-PKRAPWV) wurde von der Intavis AG (Reutlingen, D) synthetisiert.

Inhibitoren aus unterschiedlichen Reinigungen wurden mit Hilfe des FRET-assays miteinander verglichen. Dabei wurde die Hydrolyse von 10 μ M Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ Substrat durch 5 nM Meprin α , welches mit 1 μ M Fisch-Fetuin-A gehemmt wurde, mit der proteolytischen Aktivität der ungehemmten Protease verglichen. Nach Anregung bei einer Wellenlänge von 320 nm wurde die emittierte Fluoreszenzstrahlung bei 405 nm über eine Zeitspanne von 300 Sekunden aufgezeichnet. Die enzymatische Aktivität von ungehemmten Meprin α entsprach 100 %. Demnach gab die Aktivität der Protease in Anwesenheit eines Inhibitors die verbleibende Restaktivität an.

Fluorogene Substrate

Aufgrund der Schreibweise können FRET Substrate mit einer Mca-Gruppe leicht mit fluorogenen Substraten, die eine MCA-Gruppe tragen, verwechselt werden. Das Fluorophor „Methyl-Cumaryl-Amid“ (MCA) ist an das Carboxyl-Ende eines Peptids gekoppelt. Wird diese Gruppe freigesetzt, so nimmt bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm die Fluoreszenz, welche bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm aufgezeichnet wird, drastisch zu. Die freigesetzte fluorogene Gruppe wird nun als AMC (7-Amido-4-methylcoumarin) bezeichnet. Da es hier zu keinem *quenching*-Effekt innerhalb des Substrates kommt, handelt es sich hier nicht um ein FRET Substrat.

Solch ein Substrat wurde beispielsweise für die Aktivitätsmessung von Serinproteasen eingesetzt. Das Boc-Phe-Ser-Arg-MCA Substrat (Peptanova, Sandhausen, D) wurde mit einer Wellenlänge von 380 nm angeregt und die Lichtemission bei 460 nm aufgezeichnet. Es ist auch möglich, den Umsatz von Substraten dieser Klasse photometrisch zu bestimmen, denn anders als die MCA-Gruppe, kann die AMC-Gruppe Licht der Wellenlänge von 370 nm absorbieren.

Für die Konzentrationsbestimmung des Substrats ist der Extinktionskoeffizient des Amins, d.h. der AMC-Gruppe, bei 343 nm mit $25500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sowie bei 370 nm mit $7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bekannt (www.bachem.com/, 7.8.2013). Die t-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) am N-Terminus dient zum Schutz des Selbigen vor Degradation. Dieses Substrat lag ebenfalls in 100 % DMSO vor und wurde unmittelbar vor den Messungen mit dem entsprechenden Puffer verdünnt.

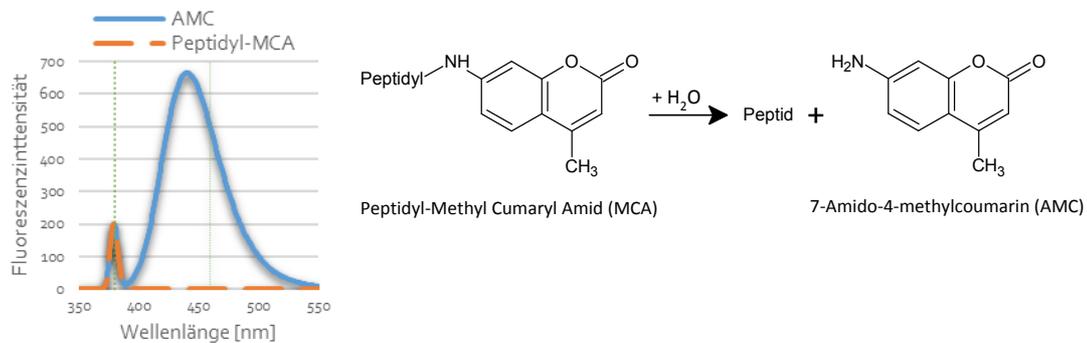


Abbildung 11: Fluoreszenzspektren der fluorogenen Gruppe MCA und des AMCs nach proteolytischer Abspaltung von einer Peptidkette (links) und Strukturformeln (rechts)
Die senkrechten Linien markieren die Anregungswellenlänge λ_{ex} bei 380 nm und die Emissionswellenlänge λ_{em} bei 460 nm (verändert nach Brousseau et al., 2012).

3.5.1.2 Geräte und Einstellungen/Programme für die Bestimmung proteolytischer Aktivitäten

Die Wahl des Messgerätes ist immer eng an die Bedingungen, unter denen die Untersuchungen durchgeführt werden sollen, sowie das eingesetzte Substrat geknüpft. Es standen drei verschiedene Geräte zur Verfügung, die alle für unterschiedlichste Messungen oder Vergleichsmessungen zum Einsatz kamen.

Cary 300 BioUV-Visible Spektrophotometer

Das Carry 300 Bio UV-Visible Spektrophotometer der Firma Varian (Darmstadt, D) ist für Absorptionsmessungen entwickelt worden. Der Küvettenhalter ist durch das Peltierelement des Gerätes temperierbar. Die Daten wurden mit Hilfe der CaryWinUV Software aufgezeichnet.

Das Gerät wurde für Konzentrationsbestimmungen, sowie kinetische Messungen mit dem *para*-Nitroanilid Substrat eingesetzt. Durch den integrierten Zellenwechsler war es möglich, während jeder Kinetik eine Referenzprobe mitzumessen und so direkt eine Korrektur durch eine Leerprobe vorzunehmen. Es wurden Küvetten mit einem Fassungsvermögen von mindestens 60 μl verwendet.

Varioskan Flash Fluoreszenz Spektrometer

Mit dem Varioskan® Flash von Thermo Scientific (Langensfeld, D) kann die Absorption, Fluoreszenz oder Luminiszenz gemessen werden. Der entscheidende Vorteil dieses Gerätes ist die Verwendung von 96-well Mikrotiterplatten und damit die Möglichkeit der zeitnahen Messung von mehreren Proben. Die Messung erfolgte von oben in die Vertiefungen, die die 100 μl Messansätzen enthielten. Das Varioskan® Flash Gerät wird durch die SkanIt® Software (Version 2.4) gesteuert. Die Messdaten werden von diesem Programm angezeigt und können für die weitere Analyse als Excel Datei exportiert werden.

LS 50B Lumineszenz Spektrometer

Das LS-50B Lumineszenz Spektrometer der Firma Perkin Elmer (Rodgau, D) ist mit einem temperierbaren Küvettenhalter ausgestattet. Dabei erfolgt die Temperierung über ein Wasserbad. Für die Einzelmessungen wurden 100 µl Quarzküvetten (Hellma Analytics, Müllheim, D) verwendet. Das Volumen der Proben betrug 105 µl.

Die Steuerung des Gerätes erfolgte über die FL WinLab Software (Perkin Elmer, Rodgau, D) und die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden mit den „TimeDrive“-Programm aufgezeichnet. Für die Anregungs- und Emmisionswellenlängen wurden jeweils Spaltbreiten von 0 nm oder 2,5 nm gewählt. Den Angaben des Herstellers zufolge ist die Auflösung bei einer Spaltbreite von 0 nm kleiner als 2 nm. Die Wahl einer größeren Spaltbreite bewirkte eine Verringerung des Rauschens, aber auch höhere Werte der maximalen Intensitäten. Bei hohen Substratkonzentrationen wurde daher der detektierbare Intensitätsbereich (bis 999,99) überschritten.

3.5.1.3 Bestimmung kinetischer Parameter

Die enzymatische Katalyse kann im einfachsten Fall mit folgendem Reaktionsschema beschrieben werden:



Dabei steht E für Enzym, S für Substrat, ES für den Enzym-Substrat-Komplex, k_1 für die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation des Enzyms mit dem Substrat, k_{-1} für die Dissoziation und k_2 für die Umsetzung des Substrats zum Produkt. k_2 ist oft der geschwindigkeitsbestimmende Parameter und wird auch als k_{cat} bezeichnet (Cornish-Bowden, 1995).

Die Messdaten wurden mit Microsoft Excel 2010 ausgewertet. Dabei wurde zuerst die Fluoreszenzzunahme pro Sekunde (Int/t) im linearen Anfangsbereich ermittelt. Diese Steigung (m) ist proportional zu der Produktbildung pro Sekunde (P/t), also der Umsatzgeschwindigkeit, und wird in M/s angegeben.

$$\frac{dInt}{dt} = \frac{dP}{dt} \sim m \quad (5)$$

Für fluorogene Substrate wurde außerdem die maximale Fluoreszenzausbeute (Int_{max}) über eine zur Zeitachse parallele Tangente, im Bereich der maximalen Produktkonzentration ermittelt. Durch Berücksichtigung der Dauer vom Start der Reaktion bis zum Start der Aufzeichnungen wurde die anfängliche Fluoreszenzintensität (Int_{min}) ermittelt. Die Fluoreszenzausbeute für eine bestimmte Substratkonzentration (ΔInt) ergibt sich aus der Differenz:

$$Int_{max} - Int_{min} = \Delta Int \quad (6)$$

Diese Fluoreszenzintensität wird ins Verhältnis zur Substratkonzentration [S] (in M) gesetzt und mit der Fluoreszenzzunahme m multipliziert. Man erhält die Geschwindigkeit für den Umsatz eines fluorogenen Substrates zum Produkt pro Zeiteinheit (M/s).

$$\frac{[S]}{\Delta \text{Int}} \cdot m = \text{Umsatzgeschwindigkeit} \quad (7)$$

Mit Hilfe der Umsatzgeschwindigkeiten konnten dann Konstanten, wie die Michaelis-Menten Konstante (K_M) und die Inhibitionskonstante (K_i), für die jeweilige Protease ermittelt werden. Dafür wurde die Erithacus Software Grafit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) verwendet.

Michaelis-Menten Konstante (K_M)

Die Michaelis-Menten Konstante (K_M) gibt die Substratkonzentration (M, mol/l) an, bei der das Enzym die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit aufweist (Michaelis & Menten, 1913). Für die Ermittlung der Umsatzgeschwindigkeiten wird der lineare Anfangsbereich (*initial rate*) der Kurven (Produktbildung/Zeit) verwendet. Die folgende Formel gibt die Michaelis-Menten Gleichung wieder (Briggs & Haldane, 1925).

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Durch den Term K_M wird in dieser Formel nicht nur die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und dessen Dissoziation berücksichtigt, sondern auch die Umsetzung des Substrats zum Produkt (Bisswanger, 1994).

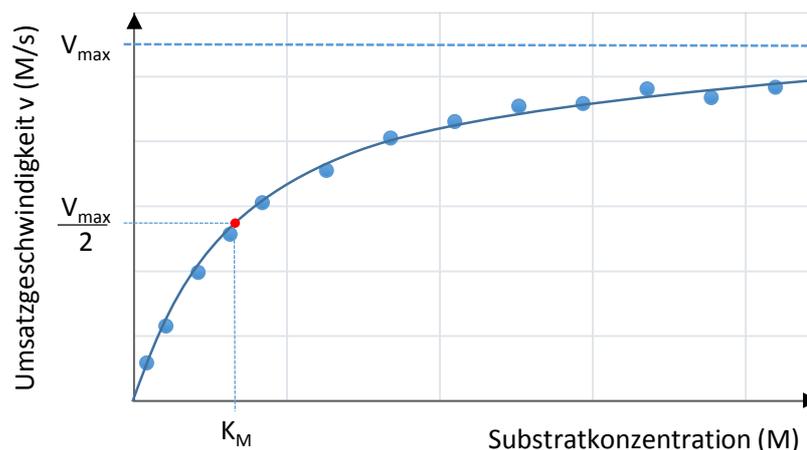


Abbildung 12: Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante K_M .

Die Umsatzgeschwindigkeit (v) wird gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Dabei verläuft die Umsatzgeschwindigkeit bei $[S] \rightarrow \infty$ gegen einen maximalen Wert (V_{\max}). Bei halber Umsatzgeschwindigkeit ist die Hälfte aller aktiven Zentren mit Substrat gesättigt. K_M ist erreicht. Ein kleiner K_M Wert zeigt an, dass das Substrat eine hohe Affinität zum Enzym besitzt.

Abbildung 12 stellt den Zusammenhang der Umsatzgeschwindigkeit und der Substratkonzentration graphisch dar. Bei einer unendlich hohen Substratkonzentration nähert sich die Umsatzgeschwindigkeit (v) asymptotisch dem maximalen Wert (V_{\max}) an. Dann sind alle aktiven Zentren der Protease mit Substratmolekülen gesättigt. Durch die Bestimmung der halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}/2$) wird die Substratkonzentration ermittelt, bei der die Hälfte der verfügbaren aktiven Zentren mit Substrat besetzt ist. Dieser Wert wird, wie bereits oben erwähnt, als Michaelis-Menten Konstante (K_M) bezeichnet und unabhängig von der Enzymkonzentration.

Nach Lineweaver und Burk (Lineweaver & Burk, 1934) erhält man bei Verwendung der reziproken Michaelis-Menten-Gleichung eine Gerade mit dem y-Abschnitt $1/V_{\max}$ und der

Steigung K_m/V_{max} . Bei dieser Auftragungsweise ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Werte bei niedrigen Substratkonzentrationen, mit einem großen Fehler behaftet sind.

Wechselzahl (k_{cat})

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{cat} , die auch als katalytische Konstante, *turnover*- oder Wechselzahl bekannt ist, gibt die Zahl der Substratmoleküle an, die pro Zeiteinheit im katalytischen Zentrum eines Enzyms bei maximaler Substratsättigung umgesetzt werden. Man erhält k_{cat} durch Division von V_{max} durch die eingesetzte Enzymkonzentration. Seine Einheit wird in s^{-1} angegeben.

$$V_{max} = k_{cat} \cdot [E] \tag{9}$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \tag{10}$$

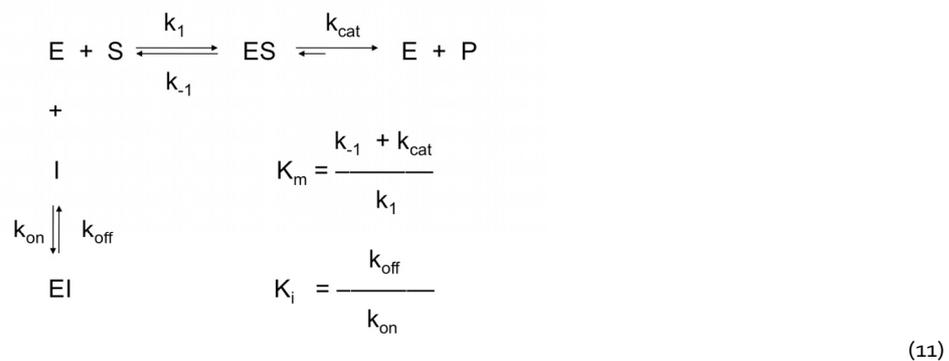
Durch den Kehrwert von k_{cat} kann auf die Dauer geschlossen werden, die für die Katalyse der Umsetzung eines Substratmoleküls benötigt wird.

Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_M)

Setzt man die Wechselzahl k_{cat} und die Michaelis-Menten Konstante K_M zueinander ins Verhältnis, so gibt diese Spezifitätskonstante Informationen über die katalytische Aktivität der untersuchten Protease (Wilkinson *et al.*, 1983; Copeland, 2000).

Inhibitionskonstante (K_i)

Bei Anwesenheit eines Inhibitors erweitert sich das Reaktionsschema im einfachsten Fall der kompetitiven Hemmung dahingehend, dass eine weitere Gleichgewichtskonstante ($K_i = k_{off}/k_{on}$) für die Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor eingeführt werden muss.



Mit der Formel 12 nach Bieth und mit Hilfe des GraFit 4.0.21 Programmes (Leatherbarrow, 1989-2004, www.erithacus.com/grafit) wurden die Inhibitionskonstanten für die Inhibition durch Fisch-Fetuin-A bestimmt. Dabei ist v_i die Geschwindigkeit der Reaktion in Anwesenheit des Inhibitors und v_0 die Geschwindigkeit in seiner Abwesenheit.

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E] + [I] + K_i - \sqrt{([E] + [I] + K_i)^2 - 4 \cdot [E] \cdot [I]}}{2 \cdot [E]} \tag{12}$$

Durch die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes kann eine Aussage über die Affinität eines Inhibitors zu einem bestimmten Enzym getroffen werden (Bieth, 1984). Je niedriger diese Inhibitionskonstante K_i ist, desto höher ist die

Affinität und desto besser wird die Aktivität der Protease durch den Inhibitor gehemmt. Eine geringere Inhibitorkonzentration wird dann benötigt, um die Umsatzrate zu senken.

3.5.2 Hemmung verschiedener Proteasen durch Fisch-Fetuin-A

Der Einfluss des rekombinant gewonnenen Fisch-Fetuin-A auf verschiedene Proteasen wurde überprüft. Diese werden in der Tabelle 20, zusammen mit den verwendeten Puffern, Substraten und entsprechenden Konzentrationen aufgelistet. Die rekombinanten Proteasen wurden mit Hilfe des *Bac-to-Bac* Baculovirus Expressionssystem gewonnen. Dabei wurden die Viren in *Sf9* Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) amplifiziert und anschließend für die Transfektion von BTI-TN-5B1-4 Insektenzellen (*high five* Zellen aus *Trichoplusia ni*) verwendet. BMP1 wurde in HEK 293 EBNA Zellen exprimiert. Diese Proteine wurden mir von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Während den Meßreihen wurden die Enzymkonzentration, sowie die Inhibitorkonzentration konstant gehalten. Die Konzentration des Substrats wurde variiert.

Für die Enzymkinetiken mit Astacin wurden 10 nM Protease ohne, mit 100 nM und mit 1 µM Fisch-Fetuin-A inkubiert. Die Aktivität wurde dann mit dem Substrat Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val-OH (Intavis AG, Reutlingen, D) mit Konzentrationen von 1 µM bis 750 µM bestimmt.

Als Substrat für die Bestimmung kinetischer Parameter der Inhibition von Meprin α durch Fisch-Fetuin-A kam das FRET Substrat MOCAC-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ (PeptaNova, Sandhausen, D) zum Einsatz. Die proteolytische Aktivität von 5 nM Meprin α , inkubiert mit 180 nM und 720 nM Fisch-Fetuin-A, sowie ohne Inhibitor, wurde bei Substratkonzentrationen von 1,3 µM bis 42,5 µM über einen Zeitraum von 180 Sekunden aufgezeichnet. Die Totalhydrolyse des Substrats erfolgte dann durch die Zugabe von Proteinase K zu einer Endkonzentration von 6,5 µM. Auch für die Reduktion der proteolytischen Aktivität von 5 nM Meprin β durch 264 nM bzw. 469 nM Fisch-Fetuin-A wurde das FRET Substrat MOCAC-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ verwendet. Die Substratkonzentration umfasste dabei den Bereich von 1,5 µM bis 48,7 µM. Für die Ermittlung der Umsatzgeschwindigkeiten wurden jeweils die ersten 180 Sekunden der Reaktionen ausgewertet. Die vollständige Hydrolyse des Substrates wurde ebenfalls mit einer Endkonzentration von 6,5 µM Proteinase K erreicht.

Tabelle 20: Auflistung der getesteten Proteasen und der Bedingungen während des Aktivitätstests

Ac = acetyl; Boc = t-Butyloxycarbonyl; Dabcyl = 4-(4-Dimethylaminophenylazo)-benzoyl; Dnp = 2,4-Dinitrophenyl; Edans = 5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalen-1-Sulfonsäure; FRET = fluorescence resonance energy transfer; MCA = 4-methyl-coumaryl-7-amid; Mca = (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl; Nle = L-Norleucyl (L-2-Aminohexanoyl); pNA = p-Nitroanilid; Suc = 3-Carboxy-propionyl; tPA = tissue-type plasminogen activator; ZK = Zellkultur.

Protease	Ursprung / Lieferform	Literatur/ Lieferant	Bedingungen während des Aktivitätstests		Substrat
			Konz.	Puffer	
Astin	<i>Astacus astacus</i> L. Magensaft	(Stöcker & Zwilling, 1995)	10 nM-1 µM	50 mM HEPES; pH 8,0	Suc-AAF-pNA;
			10 nM		
Meprin α	<i>Homo sapiens</i> , ZK	(Becker-Pauly et al., 2007)	5 nM	50 mM HEPES; pH 7,5	Mca-YVADAPK(Dnp)NH ₂
Meprin β	<i>Homo sapiens</i> , ZK	(Becker et al., 2003)	5 nM	50 mM HEPES; pH 7,5	Mca-YVADAPK(Dnp)NH ₂
Nephrosin	<i>Danio rerio</i> ; ZK	(Olf, 2012)	10 nM	150 mM NaCl; 50 mM Tris; pH 7,4	Mca-GSPAFLAK(Dnp)-dR-NH ₂
BMP1	<i>Homo sapiens</i> , ZK	(Kronenberg, 12.05.2010)	10 nM	150 mM NaCl; 50 mM HEPES; 5 mM CaCl ₂ ; 0,04 % Octyl-β-D-Glucopyranosid; pH 7,4	Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPYK(Dabcyl)-Amid
α-Chymotrypsin	Rinderpankreas	Serva	40 nM	50 mM HEPES; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,5	Suc-AAF-pNA
Trypsin	Schweinepankreas	Sigma	5 nM	50 mM HEPES; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,5	Boc-FSR-MCA
Plasmin	humanes Blutplasma	Haematologic technologies Inc.	50 nM	150 mM NaCl; 50 mM Tris; pH 7,4	Boc-FSR-MCA
tPA	<i>Mus musculus</i> , ZK	Abcam	50 nM	50 mM HEPES; pH 7,5	Boc-FSR-MCA
Papain	<i>Carica papaya</i>	AppliChem	75 nM	50 mM HEPES; pH 7,5	Boc-FSR-MCA
Proteinase K	<i>Tritirachium album</i>	AppliChem	740 µM	50 mM HEPES; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,5	Für die Totalhydrolyse von FRET Substraten

3.6 BIOINFORMATIK

Die *universal protein resource* Datenbank (UniProt, <http://www.uniprot.org>) bietet eine Übersicht und Informationsquelle über Aminosäuresequenzen von Proteinen und weist über 450000 Einträge auf (The UniProt Consortium, 2013). UniProt ist eine Metadatenbank, die zu den jeweiligen Einträgen Querverweise zu anderen Datenbanken, die die Proteinstruktur, codierende DNA, Expressionsort u. v. m. referenzieren, beinhaltet. Die für die Sequenzalignments, sowie Strukturvorhersagen verwendeten Aminosäuresequenzen wurden aus dieser Datenbank bezogen. Eine Übersicht der Sequenzen ist im Anhang (7.2) aufgeführt.

3.6.1 Sequenzalignments

Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe der ClustalX 2.1 Software (Thompson *et al.*, 1997) erstellt und deren Darstellung mit dem Programm GeneDoc (Nicholas, 2006; Nicholas & Nicholas, Jr., 1997) bearbeitet. Für die multiplen Alignments wurden die Standard-einstellungen verwendet.

3.6.2 Strukturvorhersagen

Grundlegend für funktionsfähige Proteine ist deren korrekte Faltung. Dabei spielen zum einen intra- und intermolekulare Wechselwirkungen einer, bzw. mehrerer Polypeptidkette/n eine wichtige Rolle. Zum anderen ist auch das Rückgrat der Polypeptidkette von nicht zu vernachlässigender Wichtigkeit. Für ein besseres Verständnis dieser Tatsache, ist in der Abbildung 13 ein Tripeptid schematisch dargestellt. Die Peptidbindungen sind aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters relativ starr und können daher auch als planare Flächen dargestellt werden (siehe Abbildung). Die weiteren Bindungen innerhalb des Rückgrates der Peptidkette hingegen sind beweglich. Die Konformation der Polypeptidkette wird durch die beiden Torsionswinkel Phi (ϕ) und Psi (ψ [bzw. ϕ' nach Ramachandran *et al.*, 1963]) bestimmt. ϕ beschreibt die Rotation um die Bindung zwischen dem Stickstoffatom und dem C_α -Atom. Die Rotation um die $C_\alpha - C$ -Bindung wird mit dem Winkel ψ beschrieben. Durch sterische Hinderungen sind nicht alle Winkel innerhalb der Polypeptidkette und somit nicht alle Konformationen möglich. Sekundärstrukturen, d.h. α -Helices und β -Faltblätter, weisen immer charakteristische Winkelwerte auf.

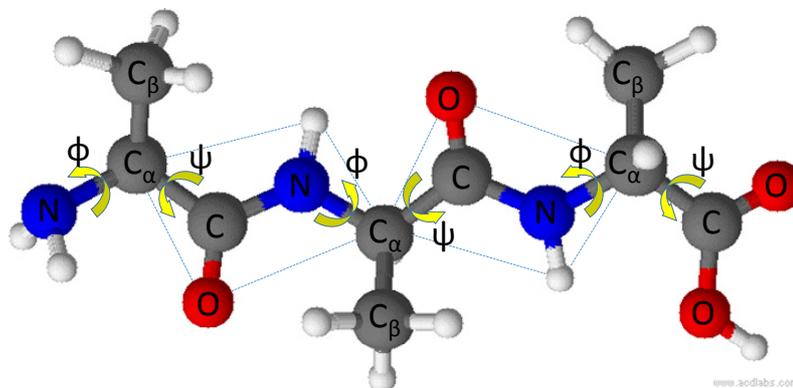


Abbildung 13: Darstellung einer Tripeptidkette mit seinen Peptidbindungen und Torsionswinkeln.

In mitten der angedeuteten planaren Ebenen liegen die Peptidbindungen. Die Rotation der $N-C_\alpha$ -Bindung wird mit dem Torsionswinkel Phi beschrieben. Psi gibt die Torsion der $C_\alpha-C$ -Bindung an. (Erstellt mit ACD/Labs, 1994-2010, www.acdlabs.com)

Mit dem Ramachandran Diagramm werden alle Torsionswinkel einer gefalteten Polypeptidkette angegeben (Ramachandran *et al.*, 1963). Dies ist ein geeignetes Werkzeug zur Kontrolle von modellierten Strukturen, da hier alle Aminosäuren der Polypeptidkette mit ihren ϕ und ψ Winkelwerten dargestellt werden (Abbildung 14). Sind Sekundärstrukturen vorhanden, so konzentrieren sich die jeweiligen Reste auf bestimmte Bereiche des Diagramms. Ebenso sind leicht Aminosäuren zu identifizieren, deren Winkelwerte sterisch nicht erlaubte Rotationswinkel angenommen haben. Je mehr von ihnen angezeigt werden, desto unwahrscheinlicher ist es, dass das native Protein diese Konformation annimmt. Diese Proteinbereiche sollten dann überarbeitet werden.

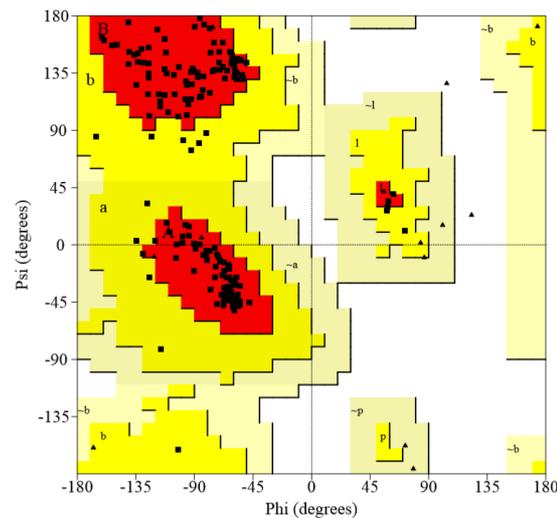


Abbildung 14: Ramachandran Diagramm für ZHE1 (3LQB.pdb).

Die Winkel ϕ und ψ geben die Rotation der $N-C_{\alpha}$ - bzw. $C_{\alpha}-C$ -Bindung an. Das Diagramm wurde mit dem Programm Procheck (Laskowski, 2009) erstellt.

Die Modellierungen wurden mit Modeller 9.12 (Šali, 2013) durchgeführt. Für jede zu ermittelnde Struktur wurden jeweils zwanzig mögliche Strukturen berechnet, aus denen dann die Wahrscheinlichste durch Vergleich der Plot-Dateien, sowie durch die interaktive Analyse durch PdbSum und ProCheck (Laskowski, 2009) ermittelt wurde. Die Darstellung der modellierten Strukturen erfolgte mit UCSF Chimera 1.8 (Pettersen *et al.*, 2004).

3.6.3 Stammbaumanalyse der Cystatin-Superfamilie

Für die Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Mitglieder der Cystatin-Superfamilie wurden die einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen von Stefinen, Cystatinen, Kininogenen, Histidin-reichen Glykoproteinen, Fetuinen A und B auf Proteinebene mit dem Programm Clustal X2 (Thompson *et al.*, 1997) miteinander verglichen. Die Berechnung des Stammbaumes erfolgte dann mit Hilfe des Programms MrBayes Version 3.12 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist *et al.*, 2012). Dabei wurden insgesamt 500000 Durchläufe berechnet. Nach Verwerfung der ersten 125000 berechneten Stammbäume, wurde aus den verbleibenden Daten ein Stammbaum berechnet, der dann mit dem Programm Dendroscope (Version 3.2.10) dargestellt wurde (Huson & Scornavacca, 2012).

4 ERGEBNISSE

4.1 DIE VERWENDETE INHIBITORSEQUENZ

Die Ausgangssequenz des Karpfen-Fetuin-A (*Cyprinus carpio*, *cca*) wurde von F. Xavier Gomis-Rüth (Barcelona) zur Verfügung gestellt. Tsai und Mitarbeiter hatten gezeigt, dass der aktive Inhibitor von der *cca*Fetuin L Form abgeleitet ist und N- und C-terminal prozessiert vorliegt (Tsai *et al.*, 2004). Dieser Sequenzbereich, der vermutlichen reifen, d.h. aktiven Form des Inhibitors wurde für die bakterielle Expression von Elena Frerick und Yan Lin in den pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektor eingebracht (Frerick, 2006; Lin, 2007). Das Fusionsprodukt wird daher von einem N-terminalen *Strep-tag* und einem C-terminalen achtfachen His-*tag* flankiert. Diese Markierungen ermöglichen die affinitätschromatographische Reinigung des Fisch-Fetuin. Zudem kann der heterolog gewonnene Inhibitor mit Hilfe von Antikörpern, die gegen die Epitope WSH PQFEK (*Strep-tag* II) bzw. HHHHH (*penta*-His-*tag*) gerichtet sind, im Western Blot identifiziert werden.

Im Anhang ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Karpfen Fetuin L und S sowie des verwendeten Fetuin-Konstrukts (Fisch-Fetuin-A) dargestellt (Abbildung 47). Zwischen *cca*Fetuin-L und der verwendeten Sequenz des reifen Inhibitors (Fisch-Fetuin-A) liegt an der Position des Ser¹²² ein Austausch zu Alanin vor. In der kurzen Variante, dem Fetuin-S, ist an dieser Stelle die Aminosäure Glutamat lokalisiert.

Mit Hilfe des chromogenen Substrates Azocasein konnte bereits gezeigt werden, dass die reife Fisch-Fetuin-A Sequenz aus dem pQE-TriSystem His-*Strep* Vektor 2 die Aktivität der Proteasen Meprin α und Meprin β besser hemmt, als der Inhibitor, welcher durch die Expression im pQE-TriSystem His-*Strep* Vektor 1 System gewonnen wurde und beide Markierungen C-terminal trägt (Meyer, 2009). Da in der vorliegenden Arbeit die Inhibition weiterer Proteasen getestet werden sollte, wurde mit dem Konstrukt aus dem pQE-TriSystem His-*Strep* Vektor 2 gearbeitet.

4.2 EXPRESSION DES INHIBITORS FETUIN-A AUS CYPRINUS CARPIO

Die Sequenzen des reifen Fisch-Fetuin-A, bzw. des (D¹⁴⁴A)-mutierten Fisch-Fetuin-A wurden mit Hilfe des pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektorsystems in kompetenten *Escherichia coli* M15[pREP4] exprimiert. Zur Kontrolle des Expressionserfolgs wurden *E. coli* M15[pREP4] mit dem pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektor ohne Insert transformiert. Die vierstündige Proteinexpression wurde mit Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase (IPTG) induziert. Anschließend wurden die stündlich genommenen Proben durch SDS PAGE und Western Blot analysiert. Abbildung 15 zeigt exemplarisch eine solche Proteinexpression anhand eines Coomassieblau gefärbten SDS Gels.

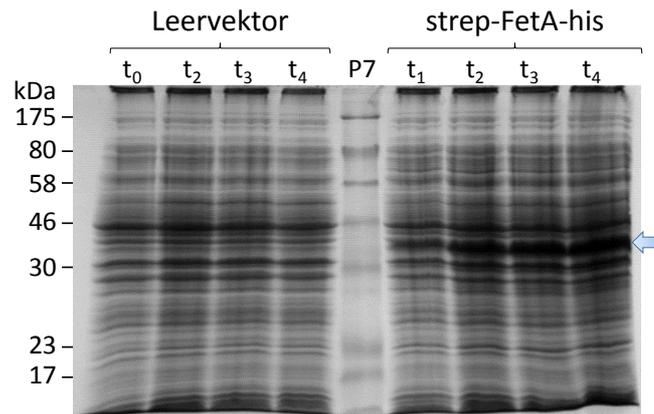


Abbildung 15: Kontrolle der heterologen Expression des reifen Fisch-Fetuin-A in *E. coli* M15[pREP4].

Als Kontrolle wurden *E. coli* des gleichen Stamms mit dem pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektor ohne Insert (Leervektor) transformiert. t_0 bis t_4 geben den Zeitpunkt der stündlichen Probenahme während der Expression an. Pelletierte 1 ml Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen, auf einem 12 %igen SDS Gel aufgetrennt und durch die Coomassie Färbemethode nach Kang et al. (2002) angefärbt. Als Proteinstandard wurden 8 μ l des P7 ColorPlus prestained (NEB, Frankfurt am Main, D) aufgetragen. Der Pfeil weist auf das exprimierte Fisch-Fetuin-A (strep-FetA-his) hin.

Fisch-Fetuin-A konnte erfolgreich in *E. coli* M15[pREP4] eprimiert werden (Abbildung 15). Die Anreicherung von Fisch-Fetuin-A im Laufe der Expression ist in den Proben rechts des Proteinstandards im Coomassie-gefärbten SDS Gel (Abbildung 15) sowie auf dem Western Blot, nach der Detektion des His-tags, zu beobachten. Im SDS Gel ist diese Zunahme der Banden in der Höhe von ca. 34 kDa besser zu erkennen als auf der Blotmembran, wo weitere Proteine detektiert wurden. Die Proben der Leervektor-Expression zeigen im SDS Gel wie auch im Blot zwei, drei und vier Stunden nach der Induktion (t_0) keine Veränderungen von Bandenstärken. Nickel-Chelat Affinitätschromatographie

Zellpellets der heterologen Expression wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und im *batch*-Verfahren an 3 ml Ni-NTA *superflow* Sepharose gebunden. Durch schrittweises Absenken des pH-Wertes wurden zuerst Proteine des Bakterienlysats, die unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben, von der Säule gelöst. Bei einem pH-Wert von 4,5 sollte dann das Expressionsprodukt, Fisch-Fetuin-A, welches C-terminal acht Histidinreste (His-tag) besitzt, in möglichst reiner Form von der Säule gelöst werden. Die folgende Abbildung 16 zeigt die Elutionsprofile der parallelen Reinigung von Fisch-Fetuin-A und dessen Asp¹⁴⁴ \rightarrow Ala¹⁴⁴-mutierten Variante (Fet A*).

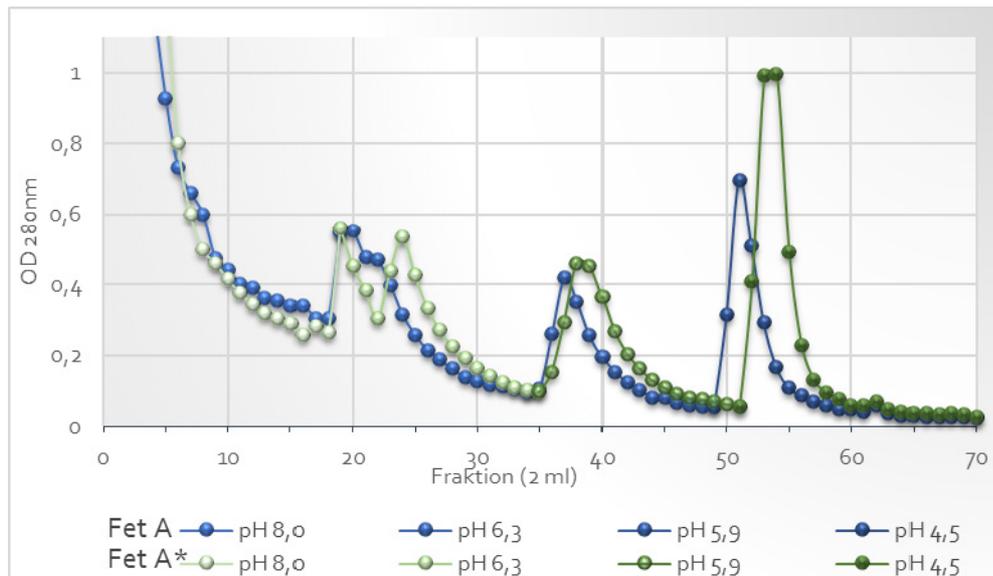


Abbildung 16: Ni-NTA Elutionsprofile der parallelen Reinigung von Fisch-Fetuin-A (Fet A, blau) und der (¹⁴⁴A)-mutierten Variante (Fet A*, grün).

Alle verwendeten Puffer enthielten 6 M GuHCl, 100 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Tris. Sie unterschieden sich lediglich in ihren pH-Werten (Siehe Legende in der Abbildung). Die Puffer wurden mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min eingetropt. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug jeweils 2 ml.

Fraktionen, die durch hohe OD_{280nm} Werte einen hohen Proteingehalt anzeigten, wurden durch TCA-Fällung (*trichloroacetic acid*) von Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) befreit und, sofern erforderlich, konzentriert. Dann erfolgte die Auftrennung der Proben auf 12 % SDS Gelen, um Verunreinigungen durch weitere Proteine ausschließen zu können. Durch die Western Blot Analyse wurde sichergestellt, dass die Bindung der His-markierten Proteine des Zelllysats erfolgreich war.

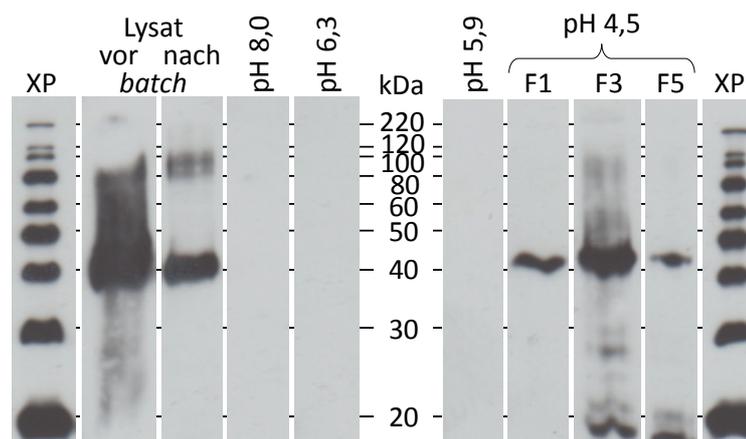


Abbildung 17: Kontrolle des Reinigungserfolgs nach der Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Einzelne Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung des Fisch-Fetuin-A mittels Ni-NTA superflow Sepharose (Qiagen, Hilden, D) wurden TCA gefällt und auf einem 12 %igem SDS Gel aufgetrennt. Im Anschluß an den Western Blot wurden die His-markierten Proteine auf den Membranen detektiert. Als Proteinstandard wurden jeweils 5 µl MagicMark XP aufgetragen. F = Fraktion

Der Inhibitor besitzt auf der Basis der Markerproteine eine Molekülmasse von ca. 40 kDa (Abbildung 17), wodurch frühere Ergebnisse bestätigt wurden (Meyer, 2009). Fisch-Fetuin-A

wurde bei einem pH-Wert von 4,5 von der Säulenmatrix eluiert. In den Fraktionen 3 und 5 wurden außerdem weitere Signale verschiedener Molekulargewichte detektiert. Diese Verunreinigungen wurden im weiteren Vorgehen aus den Lösungen entfernt (Abschnitt 4.5). Der spezifische Nachweis des Proteins, vor und nach der Bindung an die Säulenmatrix, weist auf eine Erschöpfung der Säulenkapazität hin.

4.3 DER INHIBITOR NACH DER REINIGUNG

Das gewonnene Fisch-Fetuin-A, bzw. dessen Mutante, wurden mit Hilfe eines Faltungspuffers in deren native Konformation überführt und anschließend dialysiert. Durch Zentrifugation in Amicon-Zentricons wurde das Volumen des Dialysats um das Einhundertfache reduziert. Schließlich wurde überprüft, ob während des Faltungsschritts tatsächlich intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet wurden. Dazu wurde der Inhibitor mit 3x Probenpuffer (PP) versetzt, der die Disulfidbrücken-reduzierende Agens Dithiothreitol (DTT) enthält. Als Vergleich diente die gleiche Menge Inhibitor der gleichen Charge, welche mit 3x PP ohne DTT versetzt worden war.

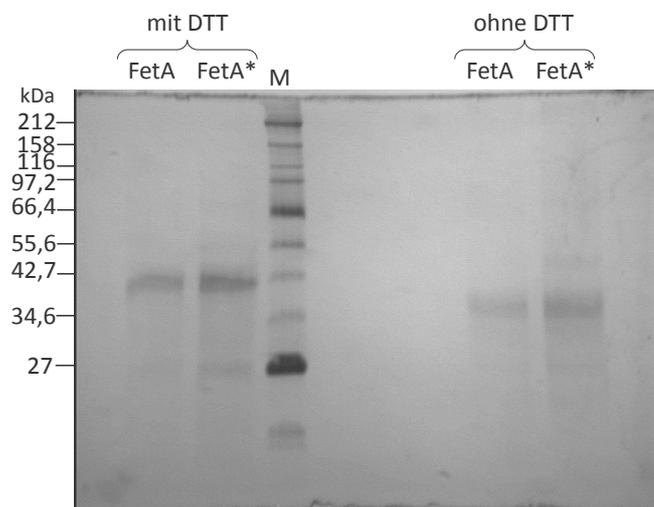


Abbildung 18: Kontrolle der Faltung des Fisch-Fetuiins-A (FetA), sowie des D144A- Fisch-Fetuiins-A (FetA*).

Nach der Dialyse und Konzentrierung der Inhibitorvarianten, wurden diese unter Disulfidbrücken-reduzierenden (mit DTT) und nicht-reduzierenden (ohne DTT) Bedingungen auf einem 12 % SDS Gel aufgetrennt. Für die Analyse wurden jeweils 14 µl der fertig eingeeengten Proteinlösungen verwendet. Es wurden 10 µl des 2-212 kDa Broad Range Proteinmarker von NEB (Frankfurt am Main, D) eingesetzt.

Das SDS Gel der Abbildung 18 zeigt im Vergleich zum umreduzierten Zustand eine deutlich verkürzte Laufstrecke des reduzierten Fisch-Fetuiins-A. Dies spricht für die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken, die zu einer Strukturänderung des Inhibitors führten und folglich auch das Laufverhalten im SDS Gel veränderten. Gleichzeitig kann die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist durch dieses Gel auch die Reinheit des isolierten und in den nativen Zustand überführten Proteins ersichtlich.

4.4 KONTROLLE DES GEWONNENEN FISCH-FETUINS-A

Die Reinheit der Inhibitorchargen aus verschiedenen Präparationen wurden mit Hilfe der SDS PAGE überprüft (

Abbildung 19), wobei unter 1-4 gleiche Konzentrationen aufgetragen wurden. Nummer (5) war eine bereits getestete Inhibitorcharge. Hier wurde eine größere Menge aufgetragen, um eventuelle Verunreinigungen besser nachzuweisen.

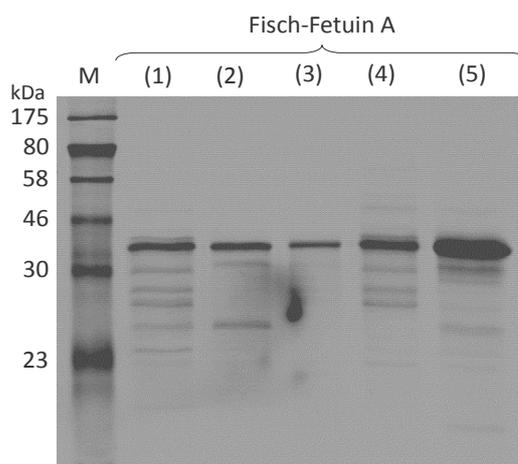


Abbildung 19: Vergleich verschiedener Fisch-Fetuin-A Chargen per SDS PAGE.

Die Proben wurden auf einem 12 % SDS Gel aufgetrennt und mit der Coomassie Färbelösung nach Kang et al. (2002) angefärbt. Als Proteinstandard (M) wurden 10 μ l P7 ColorPlus prestained aufgetragen. In den Taschen (1) bis (4) wurden 142 ng, in (5) 346 ng Fisch-Fetuin-A aufgetragen.

Offensichtlich sind Banden unterschiedlich stark und auch heterogen verteilt. Die Chargen (1) und (4) sowie (2) und (5) sind sich ähnlich. Da alle Proteinlösungen Fragmente, mit relativen Molmassen unter 34 kDa aufweisen, handelt es sich hier wahrscheinlich um proteolytisch entstandene Abbauprodukte. Dafür sprechen die ähnlichen Bandenmuster der Chargen (1) und (4), sowie (2) und (5).

Die inhibitorische Kapazität der verschiedenen Fisch-Fetuin-A Chargen wurde mit der Astacinprotease Mep α überprüft (Abbildung 20).

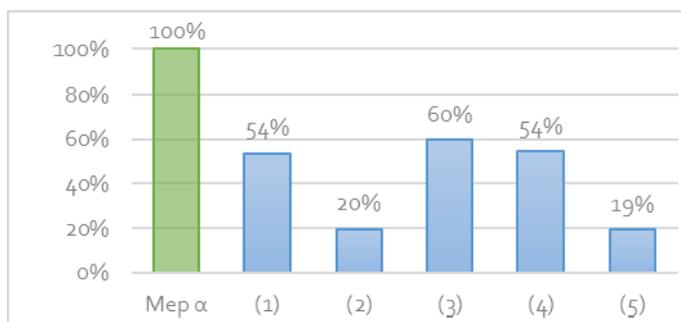


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Aktivität verschiedener Fisch-Fetuin-A Chargen per FRET assay.

Die Nummerierungen entsprechen den Fisch-Fetuin-A Chargen in der Abbildung 19. 5 nM Mep α wurde mit jeweils 1 μ M rekombinatem Fisch-Fetuin-A gehemmt. Es wurde für 10 Minuten bei 25 °C vorinkubiert. Als Substrat wurden 10 μ M des FRET Substrats Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ eingesetzt (λ_{Ex} = 320 nm; λ_{Em} = 405 nm).

Die Chargen (2) und (5) besaßen die stärkste Hemmwirkung; die Restaktivität der Protease nur noch 20 %, bzw. 19 % betrug. Alle anderen Fisch-Fetuin-A Chargen waren mit Meprin α -Restaktivitäten zwischen 54 % und 60 % deutlich weniger effektiv. Für die weiteren Hemmversuche wurden daher ausschließlich die Inhibitorchargen (2) und (5) verwendet.

4.5 AFFI-GEL® BLAU AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die offensichtlich vorhandenen Verunreinigungen sollten durch Affinitätschromatographie über Affi-Gel® Blau entfernt werden (Abbildung 21). Dieses immobilisierte Cibacron Blau F3-GA Gel war bereits erfolgreich für die Isolierung von Plasmaproteinen verwendet worden (Gianazza & Arnaud, 1982a).

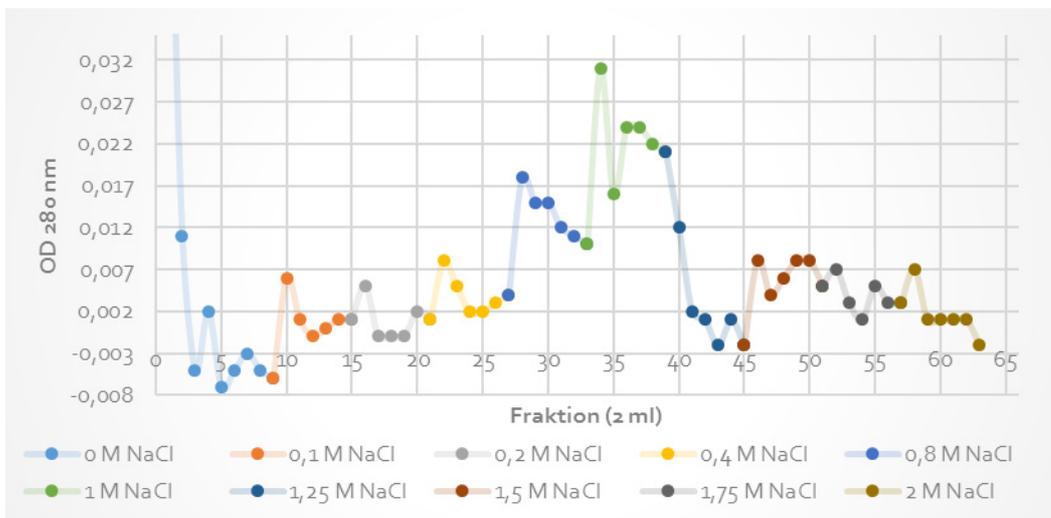


Abbildung 21: Elutionsprofil der Affi-Gel® Blau Affinitätschromatographie.

Der Puffer enthielt 50 mM HEPES und steigende NaCl Konzentrationen (pH 7,5). Das Säulenvolumen betrug 1 ml. Es wurden jeweils 2 ml Fraktionen aufgefangen.

Nach der Affi-Gel® Blau Affinitätschromatographie war der Inhibitor reiner und besaß erhöhte inhibitorische Aktivität. Als Kontrolle wurde eine bereits überprüfte Fisch-Fetuin-A Charge verwendet (Abbildung 22).

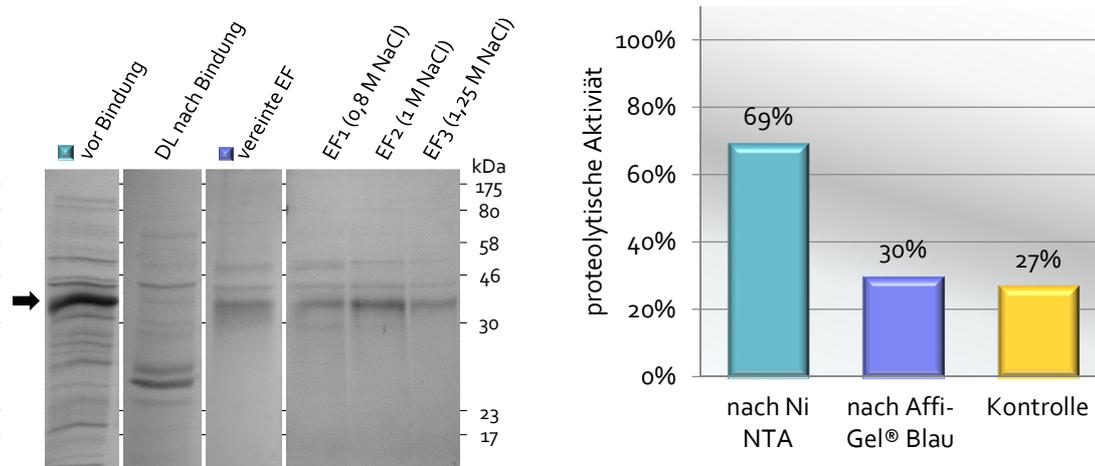


Abbildung 22: Kontrolle von Affi-Gel® Blau-Elutionsfraktionen durch SDS PAGE und Vergleich der inhibitorischen Aktivität des Fisch-Fetuin-A aus verschiedenen affinitätschromatographischen Reinigungen.
links: Auftrennung der Proben vor und nach der Bindung des Fisch-Fetuin-A an die Affi-Gel® Blau Säule und Elutionsfraktionen (EF). Fraktionen, die mit dem gleichen Puffer eluiert wurden, wurden vereint und konzentriert. 12 % SDS Gel, Coomassie Blau-Färbung; Proteinstandard 10 µl P7 ColorPlus prestained.
rechts: Die proteolytische Aktivität von 5 nM Meprin α (100 %) wurde mit jew. 1 µM rekombinantem Fisch-Fetuin-A (siehe Balkenunterschrift) gehemmt. Es wurde für 10 Min bei 25 °C vorinkubiert. Als Substrat wurden 10 µM Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ eingesetzt.

4.6 UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION DES INHIBITORS MIT DER ASTACIN-PROTEASE NEPHROSIN

4.6.1 Native Gelelektrophorese von Fisch-Fetuin-A und Nephrosin

Da Nephrosin mit Fisch-Fetuin-A einen stabilen Komplex bildet, der im Fischblut nachweisbar ist (Tsai *et al.*, 2004), sollte dieser Komplex in der nativen Gelelektrophorese dargestellt werden. Abbildung 23 zeigt ein natives Polyacrylamidgel Gel (ohne SDS und reduzierende Agenzien, pH 10,0). Nephrosin konnte in diesem Gelsystem nicht nachgewiesen werden und zwar weder durch Coomassie Färbung noch durch Western Blot und Immunnachweis mit einem Anti-Strep-tag Antikörper. Aufgrund des pH-Wertes des Laufpuffers, welcher nahe am isoelektrischen Punkt der Protease liegt, könnte Nephrosin in Richtung Katode aus dem Gel gelaufen sein. In jedem Fall war keine Veränderung des Bandenmusters zu erkennen. Allerdings wurde in der Laufspur, die Nephrosin und Fisch-Fetuin-A enthielt, immer ein deutlich schwächeres Fisch-Fetuin-A Signal beobachtet, als in der Kontrolle.

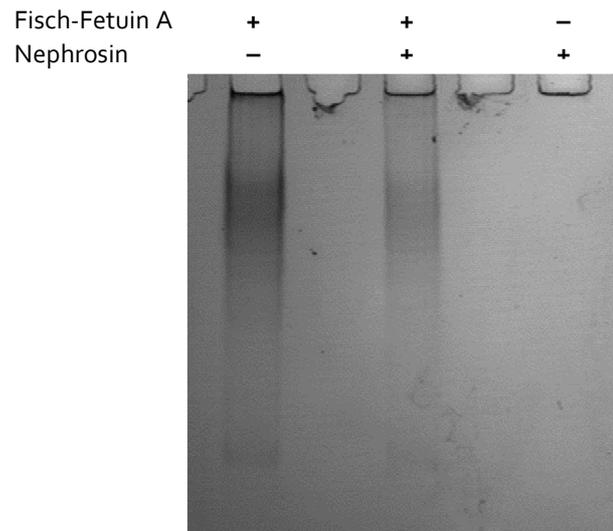


Abbildung 23: Native Gelelektrophorese von Fisch-Fetuin-A und autoaktiviertem Nephrasin.

Der pH-Wert des Gels betrug pH 10,0. Es wurden jeweils 620 ng autoaktiviertes Nephrasin und 12,8 µg Fisch-Fetuin-A eingesetzt. Die für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten Proben wurden mit 5fach- Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden nach der Auftrennung mit Coomassie Blau nach der Methode von Kang et al. (2002) angefärbt.

4.6.2 Gelatine-Zymographie

Anhand der Zymographie sollte der Abbau der Gelatine durch das rekombinante, aus Insektenzellen (*high five*) gewonnene und autokatalytisch aktivierte Nephrasin des Zebra-
bärlings (*Danio rerio*), sowie dessen Inhibition durch Fisch-Fetuin-A nachgewiesen werden.

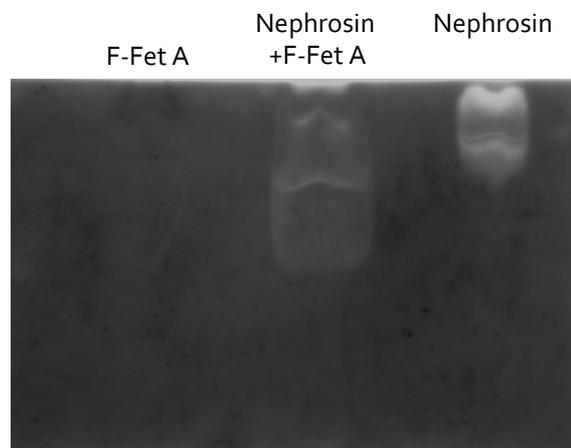


Abbildung 24: Gelatine-Zymographie von Nephrasin und Fisch-Fetuin-A.

0,1% Gelatine wurden in ein 12%iges SDS Gel einpolymerisiert. Die entsprechenden Taschen enthielten 6,4 µM Fisch-Fetuin-A und/oder 3,1 µM Nephrasin. Die Proteinlösungen wurden 20 Minuten und nach Zugabe des 4x Probenpuffers für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einstündigem Waschen in 2,5% Triton-X100 Puffer wurde das Gel über Nacht bei 25 °C in 50 mM Hepes (pH 8,0) inkubiert. Anschließend erfolgte die Coomassie Blau Färbung. Das Trenngel, welches keine Gelatine enthielt, und in dem auch keine Proteine angefärbt wurden, wurde für die Darstellung entfernt.

In die erste Tasche (Abbildung 24) wurden 6,4 µM Inhibitor aufgetragen (Fisch-Fetuin-A Kontrolle). In dieser Spur ist kein Gelatineabbau festzustellen, allerdings ist der angefärbte Inhibitor (dunkler Bereich zu Beginn des Trenngels) erkennbar. Rechts wurden 3,1 µM

Nephrosin als Kontrolle aufgetragen. Die in das Gel einpolymerisierte Gelatine wurde besonders stark zu Beginn des Trenngels abgebaut.

In der mittleren Spur wurden Inhibitor und Protease mit den gleichen Konzentrationen wie in den entsprechenden Kontrollen aufgetragen. Die Lysebanden des Nephrosins liegen hier weiter unten im Trenngel.

4.7 PROZESSIERUNG DES FISCH-FETUINS-A DURCH PROTEASEN

Tsai et al. (2004) hatten die Vermutung geäußert, Fisch-Fetuin-A könnte von seiner Zielprotease Nephrosin proteolytisch gespalten und dadurch in die inhibitorisch aktive Konformation umgewandelt werden (Tsai et al., 2004). Daher sollte geklärt werden, ob Fisch-Fetuin-A auch durch andere Proteasen der Astacinfamilie gespalten werden kann. Es wurden verschiedene Astacine mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend durch SDS PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 25).

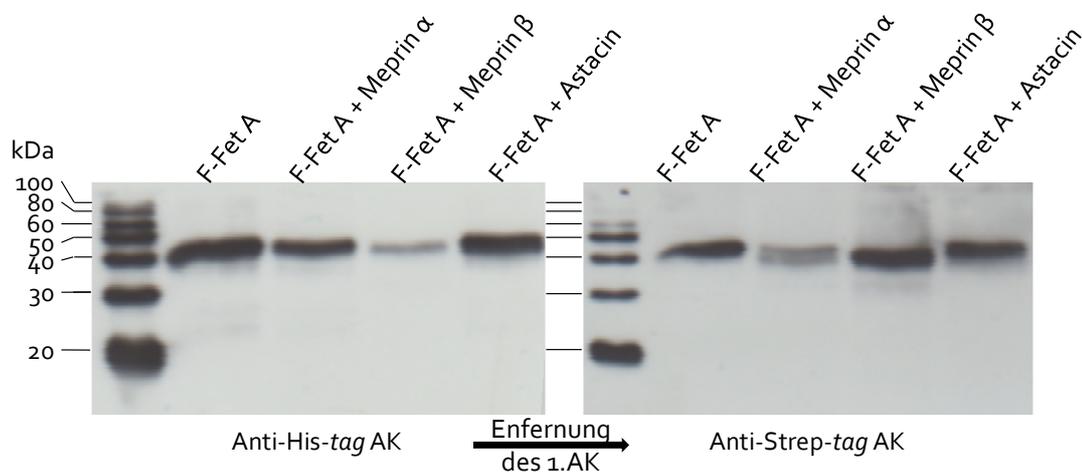


Abbildung 25: Fisch-Fetuin-A nach der Prozessierung durch Proteasen der Astacinfamilie.

$2 \mu\text{M}$ Fisch-Fetuin-A, über 12 Stunden bei 37°C ohne und mit $1,7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ Meprin α , Meprin β bzw. Astacin inkubiert, wurden auf einem 20 %igem SDS Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferriert (Western Blot). Nach der Detektion des C-terminalen $8 \times \text{His-tag}$ des Fisch-Fetuin-A wurde der Antikörper (AK) durch Stripping Puffer von der Membran gewaschen. Es folgte die Detektion des N-terminalen Strep-tags. Als Proteinstandard wurden jeweils $5 \mu\text{l}$ MagicMark XP aufgetragen.

Nach Inkubation mit Astacin war kein Abbau der Fisch-Fetuin-Bande im SDS-Gel und Western Blot erkennbar. Demnach ist Fisch-Fetuin-A kein Substrat für Astacin.

Durch Meprin α und Meprin β hingegen wird die Intensität der Hauptbande, die mit dem MagicMark XP (Invitrogen, Karlsruhe, D) Proteinstandard bei ca. 43 kDa detektiert wird, verringert und es treten neue Banden bei kleineren relativen Molekülmassen auf (Abbildung 25). Dabei scheint Meprin α im N-terminalen Bereich zu spalten, Meprin β dagegen im C-terminalen Bereich. Dafür sprechen die Western Blots mit Antikörpern gegen den N-terminalen Strep-tag und den C-terminalen His-tag, denn Meprin α schwächt das Strep-tag Signal, Meprin β hingegen das His-tag Signal ab. In allen Ansätzen wurde Fisch-Fetuin-A deutlich schneller durch Meprin β als durch Meprin α prozessiert.

Kleinere Prozessierungsprodukte konnten auch mit Hilfe des engmaschigen 20 % SDS Gels nicht nachgewiesen werden. Die schwache Bande bei 31 kDa in der Spur von Fisch-Fetuin-A und Meprin β ist kein Resultat der Meprinaktivität, denn bei längerem Belichten und längerer Entwicklungszeit des belichteten Röntgenfilms, war auch in anderen Spuren in dieser Höhe ein schwaches Signal zu erkennen.

Die Verschiebung der Banden (Banden *shift*) konnte außerdem durch Auftrennung der Proteingemische in unterschiedlich stark konzentrierten Polyacrylamid-SDS Gelen (10 % und 7,5 %) dargestellt werden. Die Größenbestimmung des durch Meprin β abgespaltenen Fragments ergab mit dem Programm „GelAnalyzer2010a“ (Lazar, 2010) ca. 3 kDa und mit Hilfe einer Eichgeraden ca. 5 kDa. Die Bandenverschiebung durch Meprin α ist nur geringfügig kleiner.

Aufgrund der Substratpräferenz der Meprine wurde eine essentielle Rolle einer negativ geladenen Aminosäure während der Inhibition durch Fisch-Fetuin-A vermutet. Dabei stand zunächst der konservierte Aspartatrest Asp¹⁴⁴ im Fokus näherer Untersuchungen. Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde im, für die Aminosäure Aspartat kodierendem, Basentriplett GAC das Nukleotid Adenin durch Punktmutation durch ein Cytosin ausgetauscht (Preiß, 2011). Bei der Translation wurde daher statt des Aspartats Alanin in die Polypeptidkette eingebaut. Die Punktmutation in der Nukleotidsequenz des reifen Fisch-Fetuin-A wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Da D¹⁴⁴A-Fisch-Fetuin-A mit dem Wildtyp verglichen werden sollte, wurden beide Konstrukte nach der Expression in kompetenten *E. coli* M15[pREP4] parallel aus den Bakterienpellets durch Zelllyse und Nickel-NTA Affinitätschromatographie isoliert. Anschließend wurden die Eigenschaften des mutierten Inhibitors wie die des Wildtyps analysiert (Siehe folgenden Abschnitt 4.8.1).

Die Inkubation des mutierten D¹⁴⁴A-Fisch-Fetuin-A mit Meprin α und Meprin β zeigte in den Blots die gleichen Banden, wie sie auch mit unmutiertem Fisch-Fetuin-A zu beobachten sind. Auch war die Prozessierung durch Meprin β schneller als durch Meprin α .

4.8 HEMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VERSCHIEDENER PROTEASEN DURCH FISCH-FETUIN-A

4.8.1 Vergleich von Fisch-Fetuin-A (wt) und der (D¹⁴⁴A) Mutante

Aus *E. coli* Bakterienpellets der heterologen Expressionen von Fisch-Fetuin-A und dessen, durch Austausch des Asp¹⁴⁴ mit einem Alaninrest, mutierte Form wurden die Inhibitoren unter exakt den gleichen Bedingungen gewonnen. Die Isolierung erfolgte durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie. Im Anschluss an die Faltung, Dialyse und Konzentrierung, wurde das inhibitorische Potential der beiden Formen durch Hemmung von Meprin α ermittelt.

In dieser Messreihe setzte ungehemmtes Meprin α das Substrat MOCac-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ mit einer Geschwindigkeit von rund 10 nM/s um (100 %). Fisch-Fetuin-A reduzierte die Meprin α Aktivität auf 66 %. Fisch-(D¹⁴⁴A)-Fetuin-A zeigte mit einer Restaktivität von 64,1 % eine sehr ähnliche Hemmung.

Da beide Formen des Inhibitors die Protease im gleichen Ausmaß hemmten, scheint der Rest Asp¹⁴⁴ nicht für inhibitorische Aktivität des Fetuins gegenüber den Meprinen verantwortlich zu sein.

4.8.2 Inhibition von Astacinproteasen durch Fisch-Fetuin-A

4.8.2.1 Nephrosin und Fisch-Fetuin-A

Die Hydrolyse des MOCac-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys(Dnp)-DArg-NH₂ FRET-Substrates durch 10 nM autoaktivierte Nephrosin (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Mario Olf, Mainz) wurde durch 0,5 μ M und 1 μ M Fisch-Fetuin-A um 87 % bzw. fast 95 % gehemmt (Abbildung 27). Für die Bestimmung eines verlässlichen K_i-Wertes standen jedoch zu wenige Messdaten zur Verfügung. Nach vorsichtiger Abschätzung und im Vergleich mit den Messwerten für Meprin α (Tabelle 22) liegt der K_i für Nephrosin sicher unter 100 nM. Damit ist Nephrosin die durch Fisch-Fetuin-A am effektivsten gehemmte Astacinproteinase.

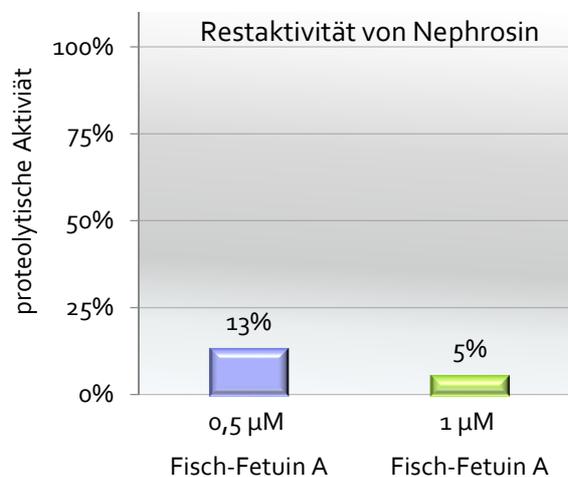


Abbildung 26: Der Einfluß von Fisch-Fetuin-A auf die Nephrosin-Aktivität.

Die Aktivität von 10 nM Nephrosin wurde mit dem Substrat MOCac-GSPAFLAK(Dnp)D-R-NH₂ (7,5 μ M), welches ohne, sowie mit 500 nM und 1 μ M Fisch-Fetuin-A inkubiert wurde, wurden eingesetzt.

4.8.2.2 Astacin und Fisch-Fetuin-A

Für die Detektion der Aktivität des Flußkrebstastacins wurde das Substrat Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val-OH verwendet (Stöcker *et al.*, 1990). Die Detektion des Substratumsatzes durch Astacin ist bei dem FRET Substrat deutlich sensitiver als bei dem alternativen chromogenen Substrat Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid (Stöcker *et al.*, 1991b) und es können geringere Substrat- und Enzymkonzentrationen eingesetzt werden. Allerdings ist für die korrekte Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit die Totalhydrolyse des Substrates notwendig.

Es wurden Enzymkinetiken mit 10 nM Astacin ohne, mit 100 nM und mit 1 μ M Fisch-Fetuin-A bei Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val-OH-Substratkonzentrationen von 1 μ M bis 750 μ M bestimmt. Die ermittelten Daten lagen alle sehr dicht beieinander. Dennoch ist eine schwache Hemmung des Flußkrebstastacins durch Fisch-Fetuin-A zu beobachten. Die mit dem GraFit 4.0.21 Programm analysierten Daten und die ermittelten Konstanten werden in der Tabelle 21 bzw. Abbildung 27 aufgeführt. Für die Inhibition von Astacin durch Fisch-Fetuin-A

wurde die Inhibitionskonstante (K_i) **3,49 μM** ermittelt. Dabei ist der ermittelte Fehler mit $\pm 1,1 \mu\text{M}$ sehr hoch.

Tabelle 21: Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Astacin mit und ohne Fisch-Fetuin-A, durch den Umsatz des FRET Substrates Dns-PKRAPVV.

Die Konstanten wurden mit dem Program GraFit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) ermittelt. Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei **3,49 μM** ($\pm 1,1 \mu\text{M}$).

10 nM Astacin	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
ohne Fisch-Fetuin-A	$2,82 \cdot 10^{-4} \pm 4,7 \cdot 10^{-5}$	102,70	$3,64 \cdot 10^5$
mit 100 nM Fisch-Fetuin-A	$2,13 \cdot 10^{-4} \pm 7,0 \cdot 10^{-7}$	107,40	$5,04 \cdot 10^5$
mit 1 μM Fisch-Fetuin-A	$3,12 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-5}$	98,91	$3,17 \cdot 10^5$

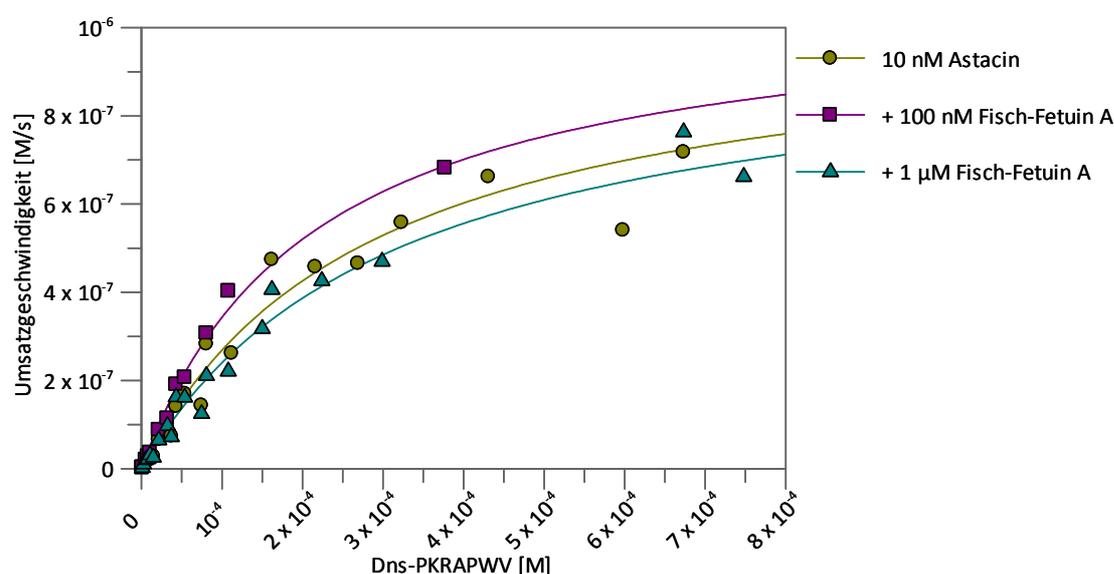


Abbildung 27: Enzymkinetik von Astacin mit Fisch-Fetuin-A.

Die Vorinkubationszeit betrug 10 Minuten. Die Inkubationen, sowie die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Der Substratumsatz von 10 nM ungehemmten Astacin, sowie gehemmt durch 100 nM und 1,0 μM Fisch-Fetuin-A wurde mit Hilfe des Programms Grafit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) analysiert und dargestellt. Es wurden Konzentrationen des Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val-OH (Intavis AG, Reutlingen, D) Substrates von 1,1 bis 748 μM eingesetzt (x-Achse). Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei **3,49 μM** ($\pm 1,1 \mu\text{M}$). ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 350 \text{ nm}$)

4.8.2.3 Meprin α und Fisch-Fetuin-A

Für die Bestimmung kinetischer Parameter der Inhibition von Meprin α durch Fisch-Fetuin-A wurden 1,3 μM bis 42,5 μM des FRET Substrates MOCAC-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ eingesetzt.

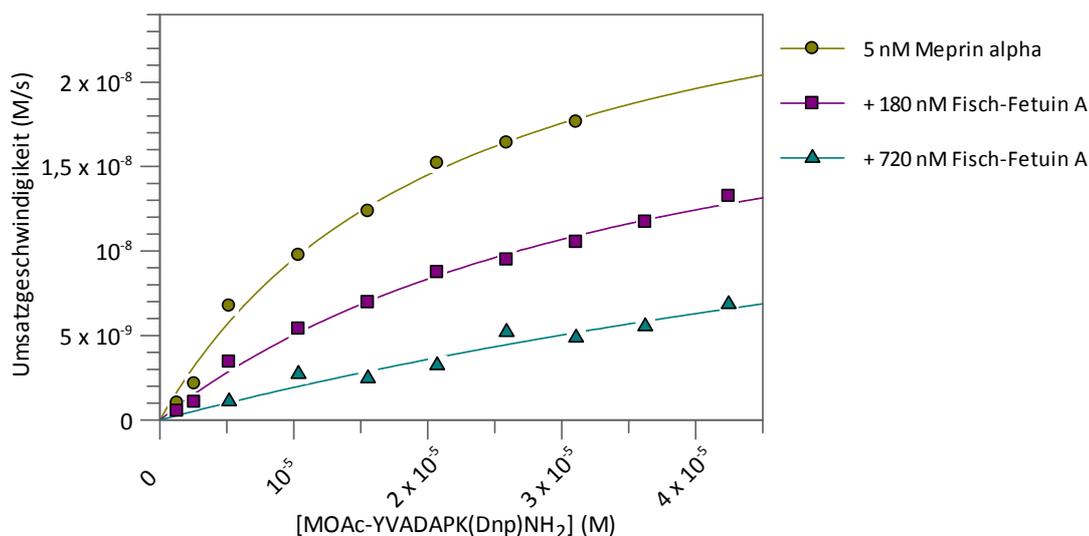


Abbildung 28: Darstellung der Inhibitionskinetiken von Meprin α mit Fisch-Fetuin-A.

Der Substratumsatz von 5 nM ungehemmten Meprin α , sowie gehemmt durch 180 nM und 720 nM Fisch-Fetuin-A wurden mit Hilfe des Programms Grafit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) analysiert. MOAc-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ wurde von 1,3 bis 42,5 μ M eingesetzt (x-Achse). ($\lambda_{Ex} = 320$ nm; $\lambda_{Em} = 405$ nm)

Die in der Abbildung 28 dargestellten Punkte der einzelnen Umsatzgeschwindigkeiten von Meprin α mit und ohne Fisch-Fetuin-A sind in der Abbildung 29 doppelt-reziprok nach Lineweaver und Burk aufgetragen (Lineweaver & Burk, 1934). Diese Darstellung lässt auf eine kompetitive Hemmung von Meprin α durch Fisch-Fetuin-A schließen. Während die maximale Umsatzgeschwindigkeit annähernd gleich bleibt, nimmt der K_M mit steigender Inhibitor-Konzentration zu (Tabelle 22). Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei **115 nM**.

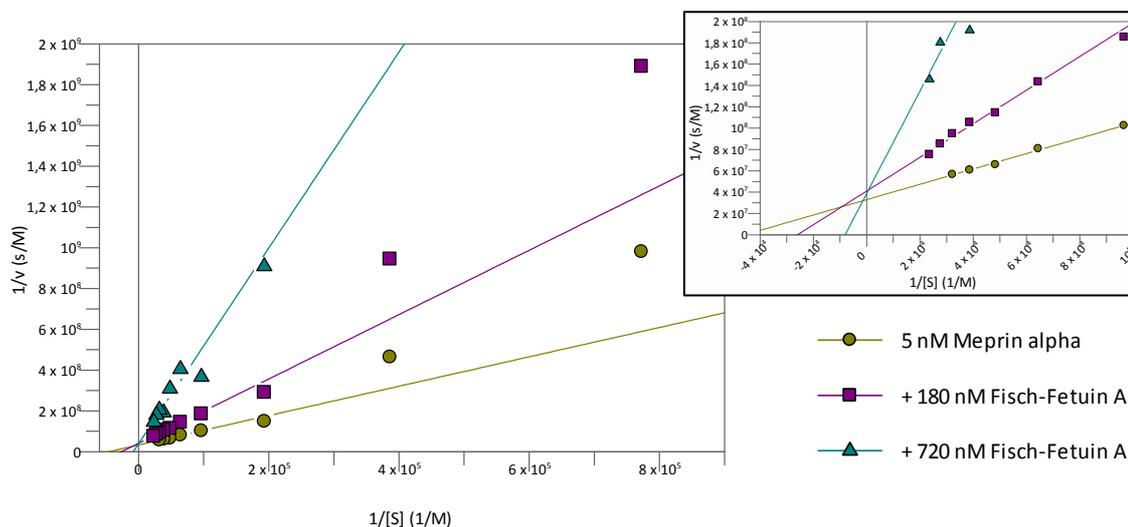


Abbildung 29: Doppelt-reziproke Auftragung aller Werte der Inhibition von Meprin α durch Fisch-Fetuin-A nach Lineweaver und Burk.

Auftragung der Werte aus Abbildung 28 nach Lineweaver und Burk (Lineweaver & Burk, 1934). Eine Vergrößerung des Geradenschnittpunkts auf der rechten Seite dargestellt. Es wurden Substratkonzentrationen von 1,3 bis 42,5 μ M eingesetzt. Aus den Schnittpunkten mit der x-, bzw. y-Achse kann K_M , bzw. V_{max} abgeleitet werden (Lineweaver & Burk, 1934). v = Umsatzgeschwindigkeit, $[S]$ = MOAc-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ Konzentration

Tabelle 22: Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Meprin α mit und ohne Fisch-Fetuin-A, durch den Umsatz des FRET Substrates MOCAc-YVADAPK(Dnp)NH₂. Die Konstanten wurden mit dem Programm Grafit 4.0.21 ermittelt. Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei 115 nM ($\pm 8,3$ nM).

5 nM Meprin α	K_M (M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
ohne Fisch-Fetuin-A	$2,19 \cdot 10^{-5} \pm 3,9 \cdot 10^{-6}$	6,1	$2,78 \cdot 10^5$
+ 180 nM Fisch-Fetuin-A	$3,85 \cdot 10^{-5} \pm 5,8 \cdot 10^{-6}$	4,9	$1,27 \cdot 10^5$
+ 720 nM Fisch-Fetuin-A	$1,24 \cdot 10^{-4} \pm 1,0 \cdot 10^{-4}$	5,2	$4,16 \cdot 10^4$

4.8.2.4 Meprin β und Fisch-Fetuin-A

Auch für die Reduktion der proteolytischen Aktivität von 5 nM Meprin β durch 264 nM, bzw. 469 nM Fisch-Fetuin-A wurde das FRET Substrat MOCAc-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ verwendet. Die Substratkonzentrationen umfassten dabei den Bereich von 1,5 μ M bis 48,7 μ M.

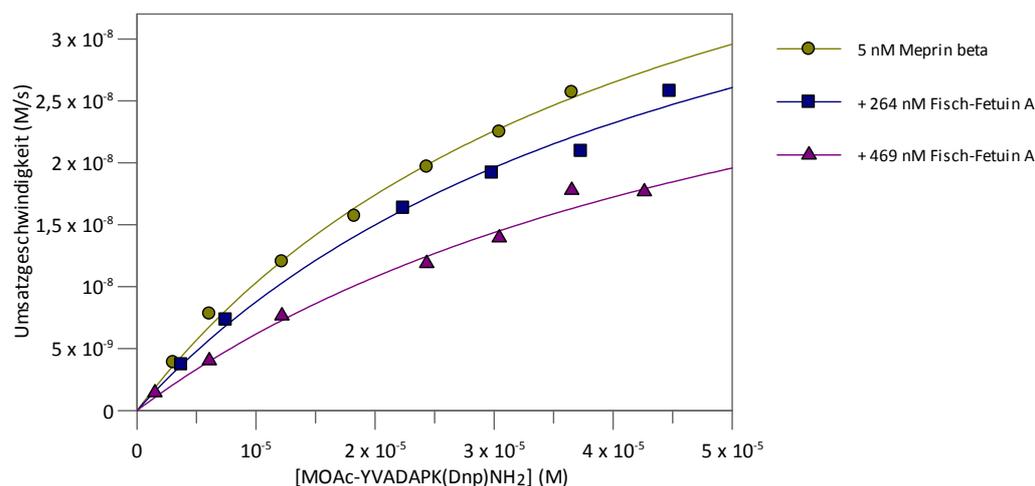


Abbildung 30: Darstellung der Inhibitionskinetiken von Meprin β mit Fisch-Fetuin-A.

Der Substratumsatz von ungehemmten Meprin β (5 nM), sowie gehemmt durch 264 nM und 469 nM Fisch-Fetuin-A wurden mit Hilfe des Programms Grafit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) analysiert. MOCAc-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ wurde in Konzentrationen von 1,5 bis 48,7 μ M eingesetzt. ($\lambda_{Ex} = 320$ nm; $\lambda_{Em} = 405$ nm)

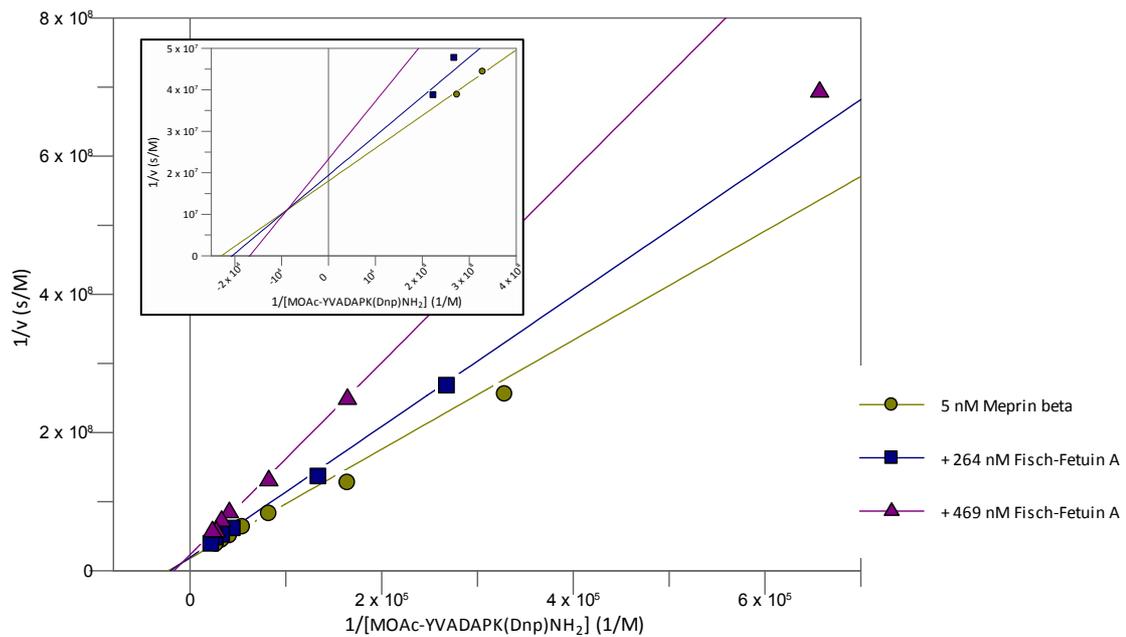


Abbildung 31: Doppelt-reziproke Auftragung aller Werte der Inhibition von Meprin β durch Fisch-Fetuin-A. Auftragung der Werte aus Abbildung 30 nach Lineweaver und Burk (Lineweaver & Burk, 1934). Eine Vergrößerung des Geradenschnittpunkts ist in der kleinen Grafik dargestellt. Es wurden Substratkonzentrationen von 1,5 bis 48,7 μM eingesetzt. v = Umsatzgeschwindigkeit.

Die Inhibition von Meprin β durch rekombinantes Fisch-Fetuin-A fällt mit einem K_i von 556 nM schwächer aus, als bei Meprin α (Abbildung 30, Tabelle 23).

Tabelle 23: Messwerte und kinetische Konstanten für die Aktivität von Meprin β mit und ohne Fisch-Fetuin-A. Die Konstanten wurden mit dem Programm GraFit 4.0.21 (Leatherbarrow, 1989-2004) ermittelt. Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei 556 nM (± 69 nM).

5 nM Meprin β	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
ohne Fisch-Fetuin-A	$4,38 \cdot 10^{-5} \pm 6,6 \cdot 10^{-6}$	11,1	$2,53 \cdot 10^5$
+ 264 nM Fisch-Fetuin-A	$4,87 \cdot 10^{-5} \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$	10,3	$2,11 \cdot 10^5$
+ 469 nM Fisch-Fetuin-A	$5,96 \cdot 10^{-5} \pm 1,8 \cdot 10^{-5}$	8,6	$1,44 \cdot 10^5$

4.8.2.5 BMP1

10 nM rekombinantes humanes BMP1 wurde durch 1 μM Fisch-Fetuin-A nur geringfügig in seiner Aktivität beeinflusst (85,2% Restaktivität, gemessen mit dem Substrat (Ac-Arg-Glu(Edans)-Asp-Arg-Nle-Val-Gly-Asp-Asp-Pro-Tyr-Lys(Dabcyl)-Amid; 22 μM).

4.8.3 Inhibition von Serinproteasen durch Fisch-Fetuin-A

Die Inhibition von 5 nM Trypsin durch 500 nM Fisch-Fetuin-A wurde mit Hilfe des Substrats Boc-Phe-Ser-Arg-MCA bestimmt. Es wurden Vorinkubationszeiten von zehn und dreißig Minuten gewählt, um zu prüfen, ob eine verlängerte Inkubationszeit einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität des Fisch-Fetuin-A hat. Für den Umsatz dieses Substrates durch Trypsin ist bereits ein K_M von 0,8 μM und ein k_{cat} von $203,5 \text{ s}^{-1}$ veröffentlicht (Yang, 2009). Der vollständige Substratumsatz in den Ansätzen wurde durch die Zugabe von Trypsin zu einer Endkonzentration von 862 nM erreicht.

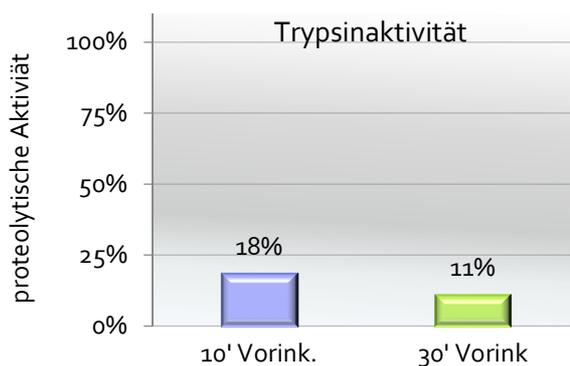


Abbildung 32: Der Einfluß von Fisch-Fetuin-A auf die Trypsinaktivität nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 5 nM Trypsin und 10 µM des Substrats Boc-Phe-Ser-Arg-MCA eingesetzt. In den Hemmansätzen befanden sich zusätzlich 500 nM Fisch-Fetuin-A.

Nach einer Vorinkubationszeit von zehn Minuten wurde die enzymatische Aktivität von 5 nM Trypsin durch 500 nM Fisch-Fetuin-A auf eine Restaktivität von 18 % reduziert. Bei einer längeren Vorinkubationszeit der Protease mit dem Inhibitor von insgesamt einer halben Stunde wurde eine etwas geringere Restaktivität (11 %) detektiert.

Des Weiteren wurden die Serinproteasen Chymotrypsin (40 nM), Plasmin (50 nM) und tPA (50 nM) auf Inhibition durch 500 nM Fisch-Fetuin-A untersucht (Abbildung 33). Bei keiner dieser Serinproteasen war eine Inhibition durch Fisch-Fetuin-A zu beobachten. Auffällig war allerdings die deutlich erhöhte enzymatische Aktivität bei Plasmin und tPA.

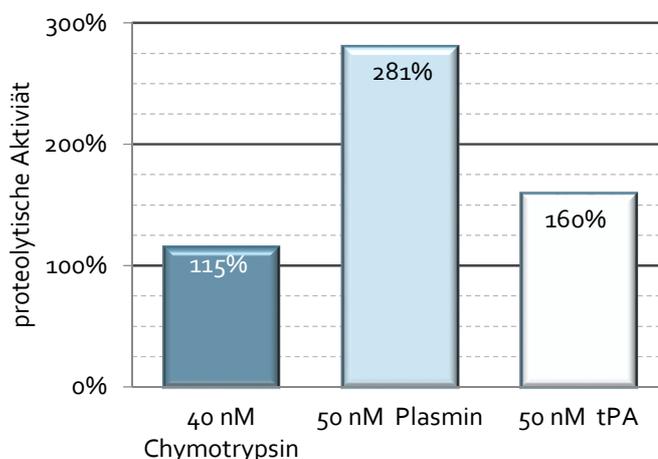


Abbildung 33: Der Einfluß von 500 nM Fisch-Fetuin-A auf die Aktivität von Serinproteasen. Für die Aktivitätsbestimmung von Plasmin und tPA wurden jeweils 10 µM Boc-Phe-Ser-Arg-MCA eingesetzt. Die Aktivität von Chymotrypsin wurde mit 1 mM Suc-Ala-Ala-Phe-pNA bestimmt.

4.8.4 Inhibition der Cysteinprotease Papain durch Fisch-Fetuin-A

Der Einfluss von 500 nM Fisch-Fetuin-A auf die Cysteinprotease Papain wurde mit 10 µM Boc-Phe-Ser-Arg-MCA mit dem LS-50B Lumineszenz Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und der Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Es konnte keine Inhibition festgestellt werden (281 % Aktivität). Auch mit 11 mg/ml Azocasein als Substrat, mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 25 °C wurden 100 nM Papain durch 1 µM Fisch-Fetuin-A nicht gehemmt werden. Nach der Inkubation wurden die Proben mit TCA gefällt

und für 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration an gespaltenem Substrat bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Hier lag die Aktivität des mit Fisch-Fetuin-A inkubierten Papains mit 138,25 % über der Aktivität von 100 nM Papain ohne Fisch-Fetuin-A.

4.9 BIOINFORMATISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.9.1 Astacine

4.9.1.1 Sequenzvergleich der Astacine

Abbildung 34 zeigt ein Sequenzalignment der Proteasedomänen verschiedener Astacine. Die Nephrosinsequenzen von Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Zebrafisch (*Danio rerio*) sind demnach zu 88 % identisch. Während das Karpfen Nephrosin eine 50 %ige Sequenzidentität zu dem Zebrafisch-*hatching*-Enzym ZHE1 aufweist, liegt die Sequenzidentität zwischen Zebrafisch Nephrosin und ZHE1 bei 46 %. Im Vergleich mit der *Astacus astacus* Astacinsequenz hat *Danio rerio* Nephrosin mit 34 % eine etwas höhere Sequenzidentität als *Cyprinus capio* Nephrosin, welches mit Astacin 31 % identische Aminosäuren hat.

In der Abbildung 34 sind im N-terminalen Sequenzbereich die Cysteinreste gelb hervorgehoben. Die *hatching* Enzyme besitzen hier zwei zusätzliche Cysteinreste, die auch bei den Nephrosinen konserviert sind, nicht aber bei den übrigen Astacinen. Dies verdeutlicht die Ähnlichkeit des Nephrosins zu den *hatching* Enzymen der Fische.

Alle Astacine weisen das typische konservierte Zink-bindende Motiv HEXXHXXGXXHE (H, Histidin; E, Glutaminsäure, X beliebige Aminosäure) auf. Zudem besitzen sie die typische Sequenz des Met-*turns* SXXMY (S, Serin; M, Methionin; Y, Tyrosin; X, beliebig) die den fünften Zink-liganden, Tyrosin 149, enthält. In der Sequenz des *Danio rerio* Nephrosins liegt in diesem Motiv ein Austausch des Histidinrestes, welcher in 17 von 19 verglichenen Sequenzen vorhanden ist, gegen einen Glutaminrest vor.

Die meisten Astacine besitzen eine Präferenz für saure Aminosäureseitenketten in der P1' Position des Substrats (Becker-Pauly *et al.*, 2011). Die entsprechenden P1'-Seitenketten werden auf der Enzymseite in der S1'-Region des aktiven Zentrums gebunden. In der Abbildung 34 ist der Bereich der S1'-Substratbindungstasche rot hervorgehoben. Hier zeigt die Sequenz des *Astacus* Astacins deutliche Unterschiede zu den anderen Sequenzen. Der Pfeil in der Abbildung 34 markiert zusätzlich die Position von basischen Resten, mit denen die Präferenz der meisten Astacine für negativ geladene Reste in der P1' Substratposition begründet ist. Doch die Nephrosinsequenzen enthalten an dieser Position die kleine und hydrophobe Aminosäure Ala¹⁸¹. Während im ZHE1 die S1' Sequenz (Ile-Gly-Gln-Arg) sehr gut mit den Sequenzen der meisten Astacine übereinstimmt, folgt im Nephrosin statt des Glutaminrests eine saure Aminosäure (Glu¹⁸⁰). Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt 4.9.1.2 (3D-Modellierung) nochmals aufgegriffen.

	20	40	60	80	100							
ccaNpsn:	NADPCT--ARRGKWRKSRNGLVYV	* YKISNOYSPDEIKVIKQKNS	* TGISCIIRFVPHNG	* QRDFTNIQSDS	* CYSYLG-RQGGQVVSLQRRG	CYDY--I						
dreNpsn:	NADQCT--ARCGKDRSRDGLVYV	YO SRAYPPEVAVIEQOQS	SAVSCIRFVPHTG	ERNYNIKSES	CYSYLG-RIGGGQVVSLQRRG	VYFS--T						
dreZHE1:	NALICE--DKSGFWKKNANNIVEP	YVYSGEFINDKSVIANASIT	HAQTCIRFVPRSI	OADYSIENKD	CYSAIG-RTGGKQVVSLNRKGC	VYSG--IAQ						
olaHCE1:	NAMKW--SSCFWKKASNGLVV	YVYSSYSGEVATIEGAWAR	NGKTCIRFVRRTN	EYDFIVSVSKT	CYSELG-RKGGQQEELSINRGG	CYSG--I						
olaHCE2:	NAMKW--YNSCFWKKASNGFV	YVYSSQYSGEVATIEGAWAR	NGKTCIRFVRRTN	EYDFIVSVSKN	CYSELG-RKGGQQEELSINRGG	CYSG--I						
olaLCE:	NAMKCFGAPSRPKSNGFVYV	YVYSDNESDEKETIRNAKBE	AEKTCIHFVPRNN	ERAYLSLEPRF	CKSMAG-YVGDQKVVVLQRF	GCIKHA--V						
ggaALMP:	SAINCR--NCFWQSRDGIVR	YVYDPTYEENHVKGIREMAE	ETLTCINFKRKT	ERDYIIRSAD	CWSNYG-KVGGGTIVSMKGG	CMWKG--I						
hsaOvas:	--LSAT--SNKWPMSGGVVEV	FLI SSKYDEPSRQVILEALAE	ERSTCIRFVTYQD	QRDFIIPMX	CFSVGR-RSGGMQVVSUAP	TCLQKGRGIVL						
spuSPAN:	-ATIYE--SOFWSYG--	--IIPYIESSSSG-OSSLIRE	AMVDEQNTCLRFEPLT	SSHSSRLGHTSYISF	FRNGCWSHVGRSF-TNQ	QVLSIGPCGYFG--T						
linALMP:	NAVKYD--QALWPK--	EIVYIE SPGLRQ-YEQIIRE	AMVDEQNTCLRFEPLT	EDNTEIKRFRRTN	CYSRCKSFRGGPQPLSLGRG	CTDFG--T						
aaasEAAs:	NAG--G--	YVYTDQYDKENIDIAIDAAE	DEITCVRFVPRRT	--ETDFTLIDRS	CKSIIG-KLGLQKISLEKMG	CMNTG--I						
hsaMep1:	--IIGE--KYRWPHT--	IIPYIEDSLEMNAKGVILN	FERRLKTCIDFKPWAG	ETNYISVFKGS	CWSVGNRVKQELSIGA	NCDRIA--T						
hsaMep2:	NGLRDP--NTRWTFP--	IIPYLADNLGLNAKGAIIY	FEMERLKSVDFKPYEG	--ESSYIFQQFD	CWSEVGDQHVQ-QNISIQ	G-CAYKA--I						
aaasTa:	AAIIGD--EYIWSGG--	VIPYIFAG-VSGADQSAI	LSGQLELEKTCIRFVPRIT	--ESDYVEIFTSGS	CWSYVG-RISGAQQVSLQANG	CVYHG--T						
hsaBMP1:	AATSRT--ERWMPDG--	VIPYVGGNFTGSORAMFKQ	AMRHEKHTCVTF	LETD	EESYIVFTYRPC	CYSVGRG-GGPQALSIGKN						
hsaTLL1:	AATSRT--ERIWPGG--	VIPYVGGNFTGSORAMFKQ	AMRHEKHTCVTF	LETD	EESYIVFTYRPC	CYSVGRG-GGPQALSIGKN						
dreTLL1:	AATSRA--EKIWPGG--	VIPYVGGNFTGSORAMFKQ	AMRHEKHTCVTF	LETD	EESYIVFTYRPC	CYSVGRG-GGPQALSIGKN						
hsaTLL2:	ATTSRT--ERIWPGG--	VIPYVGGNFTGSORAMFKQ	AMRHEKHTCVTF	LETD	EESYIVFTYRPC	CYSVGRG-GGPQALSIGKN						
pteTld1:	AATARP--ERLWDKA--	VIPYVESNFSGDHRAIFKQ	AMRHEKHTCVTF	LETD	HPNYIVFTRPC	CYSFVGRG-NGPQALSIGKN						
	a	6p5	a	3C6 F	180	* 200	* 220	C				
ccaNpsn:	LHALGFHHEQNSDRDKHILFQ	* IIPQOEHFKRKT--NNIGTPY	DINSVMHYSRFA	* FKNN-EPTMIP	IPNPN--	VVIGEARKMS	PNDILRINRLYCR	198				
dreNpsn:	LHALGFHHEQNSDRDNHILYO	* IIPAQOYFNKQNT--NNIGTPY	DINSVMHYSRFA	* FKMSN-QPTMVP	VPNAN--	VVIGEAQMS	PNDILRINRLYCN	198				
dreZHE1:	NHALGFYHEQNSDRDQYVRINWN	* IISPGWAYFLKQKT--NNQNTFY	DYSGLSMHYGKTAF	AIQPGLETITP	IPDEN--	VQIGQRGLSKID	LGINKLYG	199				
olaHCE1:	NHALGFQHEQNSDRDSYVRINWEN	* IIPASAYENKHT--NNNTFY	DYSSIMHYGRDAF	IAYGRDSITP	IPNPN--	VPIGRNGMS	RWDITRINVLNCR	200				
olaHCE2:	NHALGFQHEQNSDRDSYVRINWQ	* IIPASAYENKHT--NNNTFY	DYSSIMHYGRDAF	IAYGRDSITP	IPNPN--	VPIGRNGMS	RWDITRINVLNCR	200				
olaLCE:	LHALGFYHEHURDRDQHVKINWEN	* IKDPTHNFDKNDT--DNIGTPY	DYGSIMHYGRDAF	EKDR-KETITP	IPNPK--	AAIGQTERMS	DIILRVNKLK	200				
hsaOvas:	MVILGFWHEHURDRDYIRVNWNE	* ILPFEINFIKQS--SNLTFY	DYSSVMHYGLAF	--RRGLPTITP	IPWAPS--	VHIGORWNL	SADITRVLKLYG	197				
spuSPAN:	GHAIGFHEQNSDRDDEYINVHFEN	* VQSGREHFAKWTGVS	VTSNVEYVGSIMHYGGYGF	SNG-RPTITID	ERLN--	SRLGORTALS	AADIELANRIYE	202				
linALMP:	GHSVGFHEHURADRDEFLIHKEN	* IKNGSEHFDLWEN	TRTFC-PFDSDSIMY	GAYAFKDT--RKFKT	MEVPEP--	GLPMKSVI	OKGLSYDVKVKNLYK	201				
ggaALMP:	DHALGFLHEHURSDKYVRIWMEY	* IISPADRPFKFKENS--NNGLFY	DYSSVMHYGPHTF	NTTGKATIP	VPDGS--	VHIGORLGL	NLDVAKINRLYNSR	200				
aaasEAAs:	EHALGFYHEHURSDRDTYVKIMWEN	* IISPDNVRMFDKEMN--MQGLFY	EYTSIMHYARVY	S-IEGDES	IDP-AENGN	--VPIGORMD	FSDDLKLNLQLYNS	198				
hsaMep1:	LHALGFWHEQNSDRDQYVRIWDR	* ILSGREHENTYSDDIS	NSVYDTSVMHYSKTAF	QNGTEPTIVTR	SDFE--	DVIGORLDF	SALIELERLNMYN	196				
hsaMep2:	LHALGFYHEQNSDRDQYVRIWDDQ	* ILSGQHFNTYDSDSLITD	NTFYDYESLMHYQPFS	FKNASVPTITAK	IPFN--	SIIGORLDF	SALIELERLNMYN	196				
aaasTa:	MHAIGFYHEHURDRDNVYVINQ	* NVDSMTSNFDITYS--RYGEDY	OYYSIMHYGRYSF	IQWG--VLETIV	PLQN--	GIDLTD	PDYAHVLTQFANQINNL	200				
hsaBMP1:	GHVGFWHEHURDRDRHVISVREN	* IQOQOYELKMEPQEVES	GETYDFDSIMHYARN	TFRG--IFLDTI	VKEYE-VNG	VKPPIGOR	TRLSKGTQAARKLYCPA	201				
hsaTLL1:	GHVIGFWEHURDRDNDHVTIIREN	* IQOQOYELKMEPGEVNS	GERTYDFDSIMHYARN	TFRG--MFLDTI	LSRD-DNG	IRPAIGOR	TRLSKGTQAARKLYCPA	201				
dreTLL1:	GHVIGFWEHURDRDQHVTIIRDN	* IQOQOYELKMEPGDVNS	GERTYDFDSIMHYARN	TFRG--MFLDTI	LSRD-ENG	VRPAIGOR	TRLSKGTQAARKLYCPA	201				
hsaTLL2:	GHVIGFWEHURDRDQHVTIIREN	* IQOQOYELKMEAGEVSS	GETYDFDSIMHYARN	TFRG--VFLDTI	LEPRQ-DNG	VRPTIGOR	TRLSKGTQAARKLYCPA	201				
pteTld1:	GHVVGFWHEHURDRDKHVQIINK	* IMTGOEYFNKLT	EEVTSGLAYDYASIMHYARN	TFKS--TYLDTI	LEQEDPT	QRKRPEIGOR	TRLSKGTQAARKLYCPA	202				
	H	6GF HE	R DRD	6 6	n6	F k	5d S6Mhy	p	g	s	D	6Y c

Abbildung 34 (Seite 64): Sequenzvergleich der Proteasedomänen verschiedener Astacine.

Das Alignment wurde mit ClustalX2 (Larkin et al., 2007) erstellt und mit GeneDoc (Nicholas & Nicholas, Jr., 1997) dargestellt. Farblich hinterlegt sind die Sequenzabschnitte mit dem konservierten Zinkbindenden Motiv (blau), der Met-turn (grün) und der S1' Substratbindungstasche (rot, mit teilw. farbiger Schrift, Pfeil). Gelb hervorgehoben sind die Cysteinreste, die nur in der Gruppe der hatching Enzyme vorhanden sind und eine Disulfidbrücke ausbilden. Die potentiellen Heparinbindungsstellen nach Tsai et al. (2004) sind in der Nephrosinsequenz des Karpfens unterstrichen. **Swissprot/EMBL Zugangsnummern:** **ccaNpsn** = UniProt Nr. O42326 *Cyprinus carpio* Nephrosin; **dreNpsn** = Q8AYF4 *Danio rerio* Nephrosin; **dreZHE1** = Q75NR9 *Danio rerio* high choriolytic enzyme; **olaHCE1** = P31580 *Oryzias latipes* high choriolytic enzyme 1; **olaHCE2** = P31581 *Oryzias latipes* high choriolytic enzyme 2; **olaLCE** = P31579 *Oryzias latipes* low choriolytic enzyme; **ggaALMP** = PODJJ2 *Gallus gallus* astacin-like metalloendopeptidase; **hsaOvas** = Q6HA08 *Homo sapiens* astacin-like metalloendopeptidase; **spuSPAN** = P98068 *Strongylocentrotus purpuratus* protein SpAN; **linLALPT1** = A0FKN6 *Loxosceles intermedia* astacin-like metalloprotease toxin 1; **aasAEAs** = O44072 *Astacus astacus* astacus egg astacin; **hsaMepβ** = Q16820 *Homo sapiens* meprin A subunit beta; **hsaMepα** = Q16819 *Homo sapiens* meprin A subunit alpha; **aasAsta** = P07584 *Astacus astacus* astacin; **hsaBMP1** = P13497 *Homo sapiens* Bone morphogenetic protein 1; **hsaTLL1** = O43897 *Homo sapiens* Tolloid-like protein 1; **dreTLL1** = O57460 *Danio rerio* Dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1; **hsaTLL2** = Q9Y6L7 *Homo sapiens* tolloid-like protein 2; **pteTld** = Q75UQ6 *Parasteatoda tepidariorum* tolloid like (Fragment)

Tsai und Mitarbeiter vermuteten, dass die Sequenzabschnitte Arg8 – Arg16, Lys118 – Lys121 und Lys136 – Lys139 des Karpfen-Nephrosins (in der Abbildung 34 unterstrichen) als Bindungsstellen für Heparin fungieren könnten (Tsai et al., 2004). Im Vergleich dazu weist die Sequenz des *Danio rerio* Nephrosins an diesen Positionen deutlich weniger Reste mit positiver Ladung auf. Auch die Abbildung 35, in der die Positionen dieser basischen Aminosäuren blau hervorgehoben sind, verdeutlicht, dass das Nephrosin des Karpfens wahrscheinlich mehr positiv geladene Reste im Bereich dieser Heparinbindungsstellen exponiert als das Nephrosin des Zebrafischs. Diese Strukturen der aktiven Proteasen wurden mit Hilfe der Daten von zwei verschiedenen Kristallstrukturen berechnet (Siehe folgenden Abschnitt). In allen Modellen befinden sich die potentiellen Heparinbindungsstellen entlang der Seite des Nephrosins, welche an den "non-primed" Bereich der Substratbindungspalte grenzt.

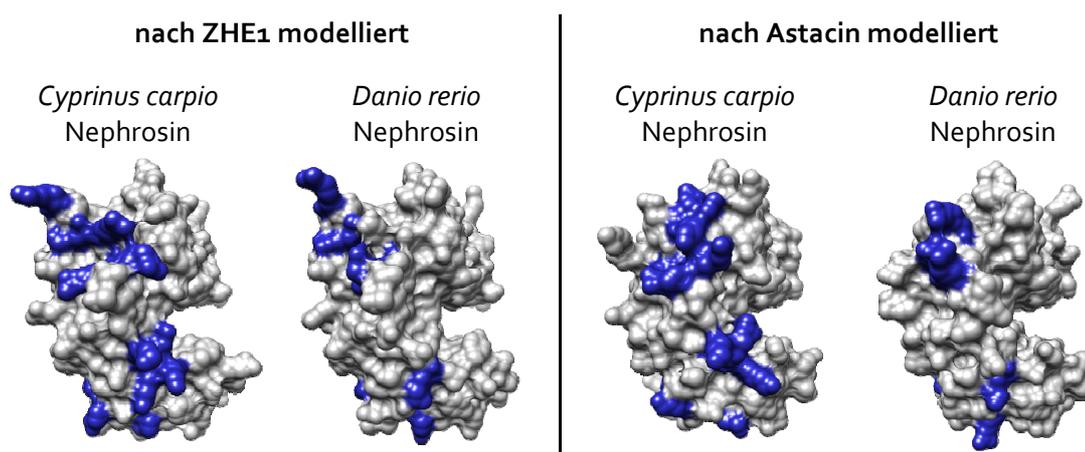


Abbildung 35: Basische Reste in hypothetischen Heparinbindungsstellen (blau) von Karpfen- und Zebrafisch-Nephrosin.

Alle Strukturen haben die gleiche Orientierung. Aufgrund der größeren Ähnlichkeit von Nephrosin und ZHE1 im Vergleich zu Astacin (Tabelle 24) sind die nach der ZHE1-Vorlage (3LQB.pdb) modellierten Strukturen (linke Seite) den nach Astacin (1AST.pdb) modellierten Strukturen zu bevorzugen. Näheres zur Strukturanalyse siehe folgenden Abschnitt.

4.9.1.2 Strukturvergleiche der Astacine

Die Proteasedomänen des *Cyprinus carpio* Nephrosins und des *Danio rerio* Nephrosins wurden auf Basis der Röntgenkristallstrukturen von *Astacus astacus* Astacin (PDB Code: 1AST; Bode *et al.*, 1992), sowie der Struktur des *hatching* Enzyms 1 (ZHE1) des Zebrafischlings (PDB Code: 3LQB; Tanokura *et al.*, 2010; Okada *et al.*, 2010) berechnet, um ein Bild der Substratbindungstaschen des Nephrosins zu erhalten. ZHE1 wird wie Nephrosin in die Gruppe der *hatching* Enzyme eingegliedert. Aufgrund dessen wurde die Struktur von Nephrosin mit Hilfe dieses Enzyms bestimmt. Im Laufe der Arbeiten mit Nephrosin hat sich herausgestellt, dass diese Protease, anders als beispielsweise ZHE1, keine Präferenz für Substrate mit einer negativ geladenen Aminosäure in P1' Position aufweist (persönliche Mitteilung von Mario Olf, Mainz). Aus diesem Grund wurde außerdem Astacin als Modellierungsvorlage verwendet. Diese Protease besitzt ebenfalls keine Präferenz für saure Aminosäuren in P1'.

Aus jeweils zwanzig modellierten Strukturen wurden die energetisch günstigsten Strukturen ausgewählt, und durch das Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1997) überprüft. Die Daten aus den Ramachandran Diagrammen dieser Analysen sind im Folgenden einander gegenübergestellt.

Tabelle 24: Daten aus den Ramachandran Diagrammen für die Bewertung der modellierten Nephrosin-Strukturen. Als Vorlagen für die Vorhersagen wurden die PDB-Dateien 1AST des Astacins (1,80 Å) und 3LQB des Zebrafisch *hatching* Enzyms 1 (ZHE1, 1,10 Å) verwendet. cc = *Cyprinus carpio*; dr = *Danio rerio*

	Vorlage 3LQB.pdb (ZHE1)	ccNephrosin modelliert nach 3LQB.pdb	drNephrosin modelliert nach 3LQB.pdb	Vorlage 1AST.pdb (Astacin)	ccNephrosin modelliert nach 1AST.pdb	drNephrosin modelliert nach 1AST.pdb
AS Anzahl	198	198	198	200	198	198
Reste in ... bevorzugten	91,4 %	90,2 %	94,3 %	89,2 %	82,7 %	87,9 %
zusätzlich erlaubten	8,6 %	9,8 %	5,7 %	10,2 %	14,5 %	9,8 %
noch erlaubten	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,7 %	1,7 %
nicht erlaubten ... Regionen	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,6 %	1,2 %	0,6 %

In die ersten Zeile der Abbildung 36 sind die Strukturen der beiden Vorlagen für die Modellierungen dargestellt. Durch Pro¹⁷⁶ fällt die S1' Region des Astacins flacher aus. An entsprechender Position ist im ZHE1 Arg¹⁸¹ lokalisiert, wodurch eine positive Ladung eingeführt wird.

Aufgrund der größeren Ähnlichkeit der Sequenzen und Strukturmodelle werden im Weiteren die ZHE1-basierten Modelle der Nephrosine des Karpfens und des Zebrafisches für die Analyse der Substratbindungsregion herangezogen. Durch den verlängerten, sogenannten *170-loops* kommt es bei den Astacin-basierten Modellen zu stärkeren Abweichungen (Tabelle 24, Abbildung 36). In der ZHE1-Röntgenstruktur bilden die Aminosäuren Ile⁹⁶, Gly⁹⁵ und Arg¹⁸² einen wesentlichen Teil der S1'-*subsite*. Der Argininrest ist mit seiner positiven Ladung für die Bevorzugung negativ geladener Reste, insbesondere Asp, in der Position P1' verantwortlich. In den ZHE1-abgeleiteten Modellen der Nephrosine von Karpfen und Zebrafischling

entspricht dies den Positionen Ile⁹⁶, Tyr⁹⁵, Ala¹⁸¹ (*Cyprinus carpio*) und Thr⁹⁶, Tyr⁹⁵, Ala¹⁸¹ (*Danio rerio*).

Sowohl der Austausch Arg gegen Ala als auch der Austausch Gly gegen Tyr lassen gravierende Unterschiede in der primären Substratspezifität der Nephrosine im Vergleich zu Asp (P1')-spezifischen Astacinen erwarten.

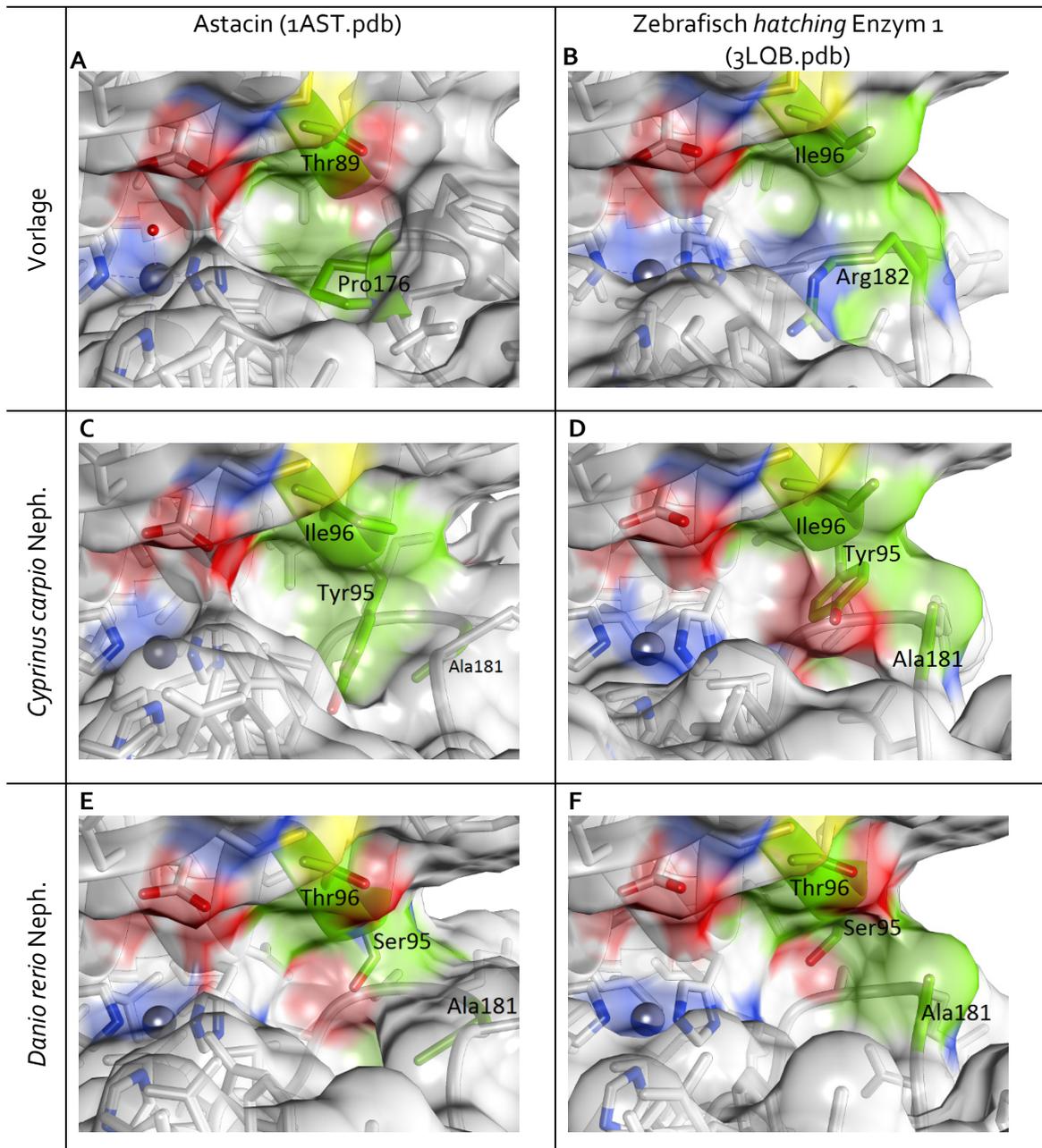


Abbildung 36: Gegenüberstellung der S1' Substratbindungstaschen der modellierten Nephrosinstrukturen.

Sowohl Astacin (1AST.pdb, Bode et al., 1992; A) als auch ZHE1 (3LQB.pdb; Tanokura et al., 2010; B) wurden als Vorlage für die Modellierung des Karpfen-Nephrosins (C,D) und des Zebrafisch-Nephrosins (E,F) verwendet. Die Modellierungen wurden mit Modeller 9.12 (Šali, 2013) durchgeführt. Die Darstellung erfolgt mit Chimera 1.8 (Pettersen et al., 2004). Zum besseren Vergleich sind einige Aminosäuren, die vermutlich Einfluss auf die Substratbindung haben, grün hervorgehoben. (rot = Sauerstoffatome, blau = Stickstoffatome, gelb = Schwefelatome).

4.9.2 Fetuine

4.9.2.1 Sequenzvergleiche verschiedener Fetuine

Mit Hilfe von multiplen Sequenzvergleichen sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Fetuinen herausgestellt werden. Dies sollte Rückschlüsse auf definierte Aminosäureseitenketten, die spezifische Wechselwirkungen mit entsprechenden Bindungsarealen der Astacine erlauben könnten ermöglichen. Alle verwendeten Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die vollständigen Aminosäuresequenzen, inklusive der Signalpeptide. Der Vergleich Cystatin-ähnlicher Domänenbereiche verschiedener Mitglieder der Cystatin-Superfamilie hat gezeigt, dass die Angaben von Tsai *et al.* (2004) korrigiert werden müssen. Ein Sequenzvergleich vollständiger Fetuin-Sequenzen ist aufgrund seines Umfangs im Anhang (7.1; Abbildung 46) dargestellt. Dabei wurden fetuin-ähnliche SVMP-(*snake venom metalloproteinase*)-Inhibitoren aus dem Serum von Giftschlangen, mit einbezogen.

Wie die Fetuin-L- und Fetuin-S-Sequenzen des Karpfens, sind auch die Fetuinsequenzen der Jararaca-Lanzenotter (*Bothropoides jararaca*) BJ46a und die Serumfaktoren HSF und HLP der Gelben Baumviper (Habu Schlange; *Protobothrops flavoviridis*) dem Fetuin-A ähnlicher als dem Fetuin-B. Das Fetuin-A des Elefanten-/Geister-Hais (*Callorhynchus milii*) aus der Klasse der Knorpelfische (*Chondrichthyes*) weist ausgeprägte Unterschiede zu den Fetuinen der Knochenfische auf, wird aber mit den Fetuinen-A gruppiert. Die Cystatin-ähnlichen Domänen wurden mit dem Programm Clustal X2 (Thompson *et al.*, 1997) verglichen. Die erste Cystatin-ähnliche Domäne des Fetuins-A aus dem Karpfen zeigt mit 24 % eine höhere Sequenzähnlichkeit zur ersten Domäne des humanen Fetuin-A als zu der des Fetuins-B (15 %). Ebenso weist auch die zweite Domäne des Fisch-Fetuins-A mit 32 % eine höhere Identität mit der entsprechenden Fetuin-A-Domäne auf. Mit der zweiten Domäne des humanen Fetuin-B hat die Domäne des Fisch-Fetuins nur 14 % identische Aminosäuren.

Viele Astacinproteinasen besitzen eine Substratspezifität für saure Aminosäuren in der P1' Position (Becker-Pauly *et al.*, 2011). Außerdem konnten Dietzel *et al.* (2013) und Karmilin *et al.* (unveröffentlicht) experimentell zeigen, dass Astacine durch Säuger-Fetuin-B, nicht aber durch Säuger-Fetuin-A gehemmt werden. Es lag daher nahe, in den Fetuinen nach konservierten sauren Aminosäureresten zu durchsuchen. Positionen, an denen die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure (Asp, D) und Glutaminsäure (Glu, E) in den verschiedenen Fetuin-Typen, konserviert sind, wurden in dem Vergleich der vollständigen Sequenzen der Fetuine (Abbildung 46 im Anhang, 7.1) rot markiert. Positionen, die nur in den Fetuinen-A der *Teleostei* und den Fetuinen-B der *Mammalia* konserviert erscheinen, sind mit einem roten Pfeil über den Sequenzen hervorgehoben. Die entsprechenden Positionen sind in den Modellen der Abbildung 38 dargestellt.

Im Sequenzalignment sticht der besonders hohe Gehalt an negativ geladenen Resten im Bereich des Fetuin-Motivs (DXLETXCHLDPTP) der ersten Domäne (D1) der Säuger-Fetuin-A hervor Aminosäuren D und E, Abbildung 37 und Abbildung 46). Im entsprechenden Sequenzabschnitt der Cypriniden-Fetuin-A sind deutlich weniger negativ geladene Reste enthalten.

Typ I Cystatine (Stefine), Typ II Cystatine, die Cystatin-Domänen D2 und D3 der Kininogene besitzen als gemeinsames Merkmal das Sequenzmotiv Gln-XXX-Val-XXX-Gly (QXVXG; Abbildung 37) im sogenannten *hairpin-loop* 1 (Stubbs *et al.*, 1990). Nur für diese Cystatin-Domänen war bisher eine Protease-hemmende Funktion nachgewiesen worden (Salvesen *et al.*, 1986; Rawlings & Barrett, 1990).

Im Fall der Fetuine ist dieses Sequenzmotiv nur in der Knorpelfisch-Fetuin-A-Domäne 2 und in der zweiten Cystatin-Domäne der Fetuine-B der Säuger vollständig vorhanden (Abbildung 37). Bei den Fetuinen der Knochenfische (*Teleostei*) weist nur die Domäne 2 des Fetuins-B aus dem amerikanischen Flussbarsch *Perca flavescens* (*pf1FetB_2*) dieses Motiv im Ganzen auf.

Allen anderen entsprechenden Sequenzabschnitten fehlt mindestens eine Aminosäure des QXVXG-Motivs. Die Sequenzen der zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen der Schlangenfetuine und der *Cypriniden* Fetuine A haben mit Glutamin (Q¹⁸⁸ in *ccaFetA_2*) nur noch einen dieser konservierten Reste. Den meisten ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der betrachteten Fetuine fehlt dieses Motiv gänzlich.

Außer dem QXVXG Motiv spielt auch das PW Motiv in Typ II Cystatinen eine inhibitorische Rolle (Turk & Bode, 1991). Bei den Typ III Cystatinen ist dieses Motiv nur in den Cystatin-Domänen 3 der Kininogene enthalten.

In der ersten Domäne der Säuger Fetuine-A folgt C-terminal des rudimentär vorhandenen QXVXG-Motivs, im Abstand von sieben Aminosäureresten, das konservierte, sogenannte „Fetuin-Motiv“, welches in der entsprechenden Domäne von Fetuin-B vier Aminosäuren kürzer ist (Siehe 2.3.3.3). Die für dieses Motiv charakteristischen Aminosäuren sind in der Abbildung 37 fett gedruckt. Es wird deutlich, dass dieses Motiv ausschließlich in den ersten Domänen (D1) der Fetuine ausgeprägt ist und nur vereinzelt konservierte Reste dieses Motivs in den zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen, sowie den Domänen anderer Typ III Cystatine enthalten sind. Zudem fehlt in den Sequenzen der Fisch-Fetuine A der N-terminal gelegene, konservierte Aspartatrest. In der Sequenz des Knorpelfischs befindet sich mit Glu⁸⁴ ebenfalls eine negativ geladene Aminosäure an dieser Position. Die Fetuinsequenzen der Schlangensera weisen an dieser Position die Aminosäure Asparagin auf. In dem Leu-Glu-Thr (LET) Sequenzabschnitt der *Teleostei* Fetuine-A ist ein zusätzlicher Glutamatreue inseriert.

Typ II und Typ III Cystatine weisen 6 charakteristische Disulfidbrücken auf. Die 12 konservierten Cysteinreste sind im Sequenzvergleich der Abbildung 46 (Anhang 7.1, ab Seite 126) gelb hervorgehoben. Dabei bildet der erste Cysteinrest der Domäne D1 mit dem zwölften Cysteinrest, der im C-terminalen Bereich der Domäne (D3) im Motiv CPG positioniert ist, eine Disulfidbrücke aus, die das gesamte Protein wie einen Ring verbindet. Dieses C-terminale in allen verglichenen Sequenzen konserviert, mit Ausnahme derjenigen des Zackenbarsches *Epinephelus coioides*. Weitere vorhandene Cysteinreste sind nur in einzelnen Subgruppen konserviert.

Fisch Fetuine A ccaFetA_1: EKKTDPC ⁸⁵ EVVIGIT LETECH I ⁸⁵ VNPKP dreFetA_1: EKKADSC ⁸⁵ EVVFGVT LETECH I ⁸⁵ VNPKP		ccaFetA_2: ¹⁸⁸ QW ¹⁸⁸ MFSGQSFFSQFA METN C ²⁰⁷ TNKEAPQ dreFetA_2: ¹⁸⁸ QW ¹⁸⁸ MPMQSYFTQFA METN C ²⁰⁷ TKKDAPO	
Schlangen Fetuine gbljMSF_1: PWNGDLVAVF ⁸⁵ KLN LETECH VLDPTP gbrcMSF_1: PWNGDLVAVF ⁸⁵ KLN LETECH VLDPTP tflHSF_1: PWNGDLVAVF ⁸⁵ ELN LETECH VLDPTP bJBJ46a_1: PWDGDWVAVF ⁸⁵ KLN LETECH VLDPTP tflHLP_1: PSDGRSVIFHFNLN LETECH VLDSTP		gbljMSF_2: ¹⁸⁸ QHKYEPEAFY ¹⁸⁸ EFA IV EVN ²⁰⁷ CTAQEAHD gbrcMSF_2: ¹⁸⁸ QHKYEPEAFY ¹⁸⁸ EFA IV EVN ²⁰⁷ CTAQEAHD bJBJ46a_2: ¹⁸⁸ QHKYEPEAYY ¹⁸⁸ EFA IV EVN ²⁰⁷ CTAQELHD tflHSF_2: ¹⁸⁸ QHKYEPEAYY ¹⁸⁸ EFV IV EVN ²⁰⁷ CTAQEAHD tflHLP_2: ¹⁸⁸ QHKYEPEAYY ¹⁸⁸ EFV IV EVN ²⁰⁷ CTAQEAHD	
Knorpelfisch Fetuin A cmiFetA_1: -GKGGSSSLF ⁸⁴ EFE LET R CH SLNPKP		cmiFetA_2: ¹⁸⁸ QI V A K -NVF ¹⁸⁸ EFA IV EVN ²⁰⁷ CTAQEAHD	
Säuger Fetuine A hsaFetA_1: - ⁸⁹ QPS ⁸⁹ CELFE ⁸⁹ EIDT LETT CHVLDPTP btaFetA_1: -RRPT ⁸⁹ CEVYD ⁸⁹ EIDT LETT CHVLDPTP rnoFetA_1: SRRPF ⁸⁹ CEVYE ⁸⁹ EIDT LETT CHALDPTP mmuFetA_1: SRRPF ⁸⁹ GVVYE ⁸⁹ EVD LETT CHALDPTP		hsaFetA_2: ²⁰⁸ QLVPLPPSTY ²⁰⁸ EFTVSGTDCVAKEATE btaFetA_2: ²⁰⁸ QFVPLPVSVS ²⁰⁸ EFAVAATDCIAKEVVD rnoFetA_2: ²⁰⁸ QNVPPFVSTL ²⁰⁸ EFVAAATDCGTQEVTD mmuFetA_2: ²⁰⁸ QNVPLPVSTL ²⁰⁸ EFVAAATDCAKEVTD	
Säuger Fetuine B hsaFetB_1: RRGGL ⁹³ CSLFY ⁹³ TLD LETD CHVLRKKA btaFetB_1: QEAGL ⁹³ CSLFYFTLD LETD CHVLSRST rnoFetB_1: - ⁹³ QEDM ⁹³ CSLFY ⁹³ TLD LETD CHVLSRKA mmuFetB_1: - ⁹³ QEDM ⁹³ CSLFY ⁹³ TLD LETD CHVLSRKA		hsaFetB_2: ²¹⁶ QWV ²¹⁶ CP-SYF ²¹⁶ EYL IKESP CTK-SQAS btaFetB_2: ²¹⁶ QWV ²¹⁶ CP-AYF ²¹⁶ EYL IKESP CVK-SEGS rnoFetB_2: ²¹⁶ QWV ²¹⁶ CP-SYF ²¹⁶ EYL IKESP CTQ-SQDS mmuFetB_2: ²¹⁶ QWV ²¹⁶ CP-AYY ²¹⁶ EYL IKESP CTK-SQAS	
Fisch Fetuine B dreFetB_1: KHGET ⁹³ CIVFY ⁹³ TLD LETK CHVLSKPK cgiFetB_1: KHGET ⁹³ GVVFY ⁹³ TFD LETK CHTISKKN pflFetB_1: EKEKG ⁹³ CSLYK ⁹³ TID METR CHITSRKP ecoFetB_1: QHGENSEMVFY ⁹³ TMD IV ETNCSVLSKKE		dreFetB_2: ²¹⁶ SLHL CR -FYTAEFT IV ETV CS SKTKDVS cgiFetB_2: ²¹⁶ QRDF CR -FYS ²¹⁶ EFT IV ETV CS SKKNNTA pflFetB_2: ²¹⁶ QWV ²¹⁶ CP-SYF ²¹⁶ EFT IV ETV CS SKTKDVS ecoFetB_2: ²¹⁶ AGMAMSMYYN ²¹⁶ EYA IV ETV CS GQGTDTQ	
Säuger Kininogene hsaKNG_1: -TVGSDTFY ⁹³ SFKYE ⁹³ KEGD CPVQSGKT btaKNG_1: -MDNPDTFY ⁹³ S ⁹³ KYQ ⁹³ KEGD CPFQSNKT mmuKNG_1: -TDGSPTFY ⁹³ SFKYL ⁹³ KEGN CSAQSGLA rnoKNG_1: -KDGSKTFY ⁹³ SFKYQ ⁹³ KEGN CSVQSGFA rnoTKNG_1: -KDGAETLY ⁹³ SFKYQ ⁹³ KEGN CSVQSGLT		hsaKNG_2: ²¹⁶ QVVA CL -NFR ²¹⁶ TYS IV Q TNC SKENFLF btaKNG_2: ²¹⁶ QVVS GW -NYE ²¹⁶ NYS IAQ T NC SKEEFSF rnoKNG_2: ²¹⁶ QVVA CM -NYQ ²¹⁶ IYS IV Q TNC SKEDFPS mmuKNG_2: ²¹⁶ QVVA CL -NFD ²¹⁶ TYT IV Q TNC SKERFPS rnoTKNG_2: ²¹⁶ QVVA CM -NYK ²¹⁶ IYS IV Q TNC SKEDFPS hsaKNG_3: ²¹⁶ QVVA CK -KYF ²¹⁶ DFVARE TT CSKESNEE btaKNG_3: ²¹⁶ QVVA CL -KYS ²¹⁶ VFIARE TT CSKGSNEE rnoKNG_3: ²¹⁶ QVVA CT -KYV ²¹⁶ EFIARE TK CSKESNAE mmuKNG_3: ²¹⁶ QVVA CT -KYV ²¹⁶ EFIARE TK CSKESNTE rnoTKNG_3: ²¹⁶ QVVA CV -IYV ²¹⁶ EFIARE TK CSKQSKTE	
Säuger Histidin-reiche Glykoproteine hsaHRG_1: -RVENTTVYY ⁹³ LVLD QESD CVLSRKY btaHRG_1: -KVESIAVYY ⁹³ LV--- ESD CPVLSRKH rnoHRG_1: -RVETATYY ⁹³ LVLD VESD CWVLSSTKA mmuHRG_1: -RAGTATVYY ⁹³ ALD VIESD CWVLSSTKA		rnoHRG_2: RGGERT-SYF ⁹³ EFS ⁹³ VR-- NC STQH FPR mmuHRG_2: RGGERT-NYY ⁹³ EFS ⁹³ VR-- NC STQH FPR hsaHRG_2: RGGERT-GYF ⁹³ DFS ⁹³ VR-- NC PRHH FPR btaHRG_2: RGGERT-SYF ⁹³ DFS ⁹³ VR-- NC SSH FPR	

Abbildung 37: Ausschnitte aus Sequenzvergleichen verschiedener Cystatine.

Der dargestellte Bereich umfasst den inhibitorischen loop L1 von Papain-hemmenden Cystatinen (QXVXG – Motiv, in blau hervorgehoben) bis zum Ende des Fetuin-Motivs (in Fettdruck hervorgehoben). Die letzte Ziffer der Sequenzbezeichnungen steht für die entstprechende Domäne. Die Abkürzungen MSF bis HLP bezeichnen verschieden Fetuine, welche aus dem Serum giftiger Schlangen isoliert wurden (Legende siehe 7.1 und Tabelle 28). Weitere Abkürzungen: KNG = Kininogen, TKNG = T-Kininogen, HRG = Histidin-reiches Glykoprotein.

Die dritten Domänen der Fetuine (D₃) weisen sehr unterschiedliche Längen (siehe Sequenzvergleich im Anhang 7.1, Abbildung 46). Die D₃ der *Cypriniformes* (Karpfenartige) sind sowohl im Fetuin-A, als auch im Fetuin-B am längsten. In den dritten Domänen der *Teleostei* sind Histidin und Prolin, sowie geladene Aminosäuren sehr häufig und erinnern an die D₃ der HRGs, die ebenfalls Prolin- und Histidin-reiche Sequenzen enthalten. Die D₃ der Schlangen-Fetuine sind hingegen durch viele Valin- und Histidinreste gekennzeichnet. Das Fetuin des Knorpelfischs enthält hauptsächlich basische Aminosäuren, Glycin und Prolin. Die D₃ der Säuger Fetuine A weisen sehr hohe Anteile an Prolin, Alanin, Valin und Glycin auf. Deren Fetuine B enthalten ebenfalls viele Prolinreste, aber auch viele negativ geladene Reste.

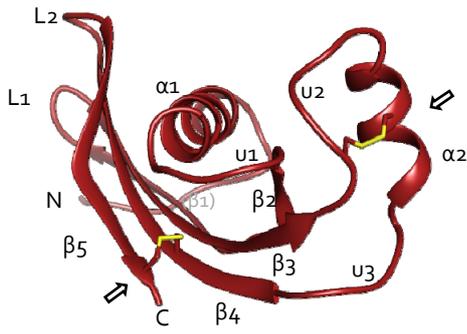
4.9.2.2 Homologiemodellierung der Cystatin-ähnlichen Domänen in Fetuinen

Die Sequenzvergleiche der Fetuin-Cystatindomänen ergaben Hinweise auf potentielle Interaktionsbereiche mit Astacinproteasen. Die entsprechenden Sequenzmotive wurden durch Homologiemodellierung anhand bekannter Cystatin-Kristallstrukturen verortet. Als Vorlagen dienten Cystatin aus dem Hühnereiklar (1CEW.pdb; Bode *et al.*, 1988) und humanes Cystatin D (1ROA.pdb; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2004). Ziel dieser Modellierungen war es, einen besseren Überblick über Bereiche zu erhalten, die durch ihre exponierte Lage für die Inhibition der Astacine in Frage kommen könnten.

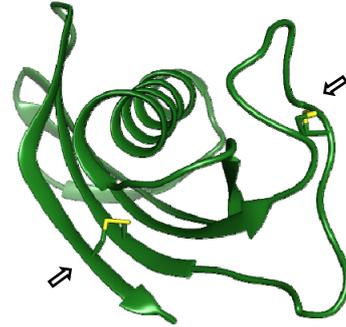
Für die Strukturvorhersage der Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine wurden zunächst die entsprechenden Domänen durch Sequenzalignments bzw. unter Verwendung der UniProt Datenbank (The UniProt Consortium, 2013) entnommenen Daten identifiziert. Demnach umfasst die erste Cystatin-ähnliche Domäne des *Cyprinus carpio* Fetuins-A den Sequenzbereich von Val²⁵ bis Asp¹²⁹ und die zweite Domäne den Sequenzbereich von Thr¹⁴⁰ bis Asn²⁵³. ProSite Scan (Sigrist *et al.*, 2013) ergab die Bereiche Ala¹⁷ bis Glu¹³¹ und Thr¹⁴⁰ bis Asn²⁵³. Da die verwendete Strukturvorlage des Hühnereiklar-Cystatins (1CEW.pdb) eine Aminosäure hinter dem letzten, Disulfidbrücken-ausbildenden Cysteinrestes endet, wurden die zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen der zu berechnenden Strukturen ebenfalls auf diese Positionen gekürzt. Die zweite Domäne des Fisch-Fetuin endet somit mit der Aminosäure Glu²⁴⁷.

Vorlagen

Cystatin aus Hühnereiklar
(1CEW.pdb)



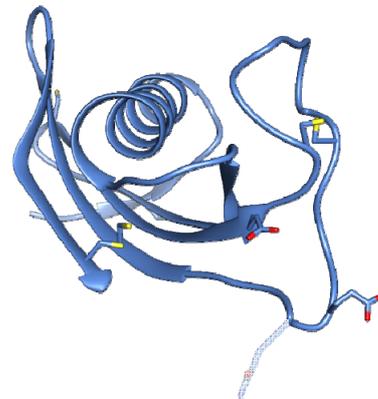
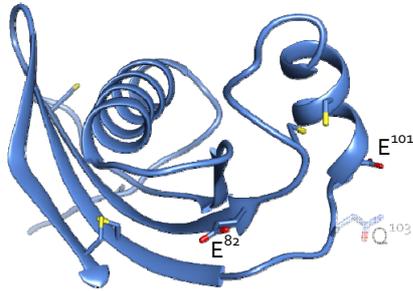
Humanes Cystatin D
(1ROA.pdb)



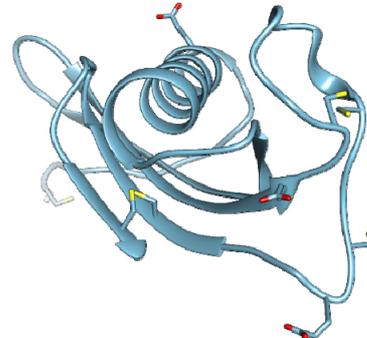
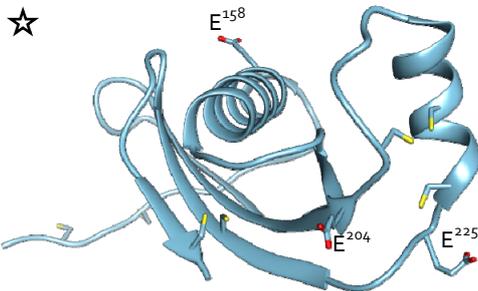
Anhand dieser Vorlagen berechnete Modelle

Cyprinus carpio Fetuin-A

Domäne 1



Domäne 2



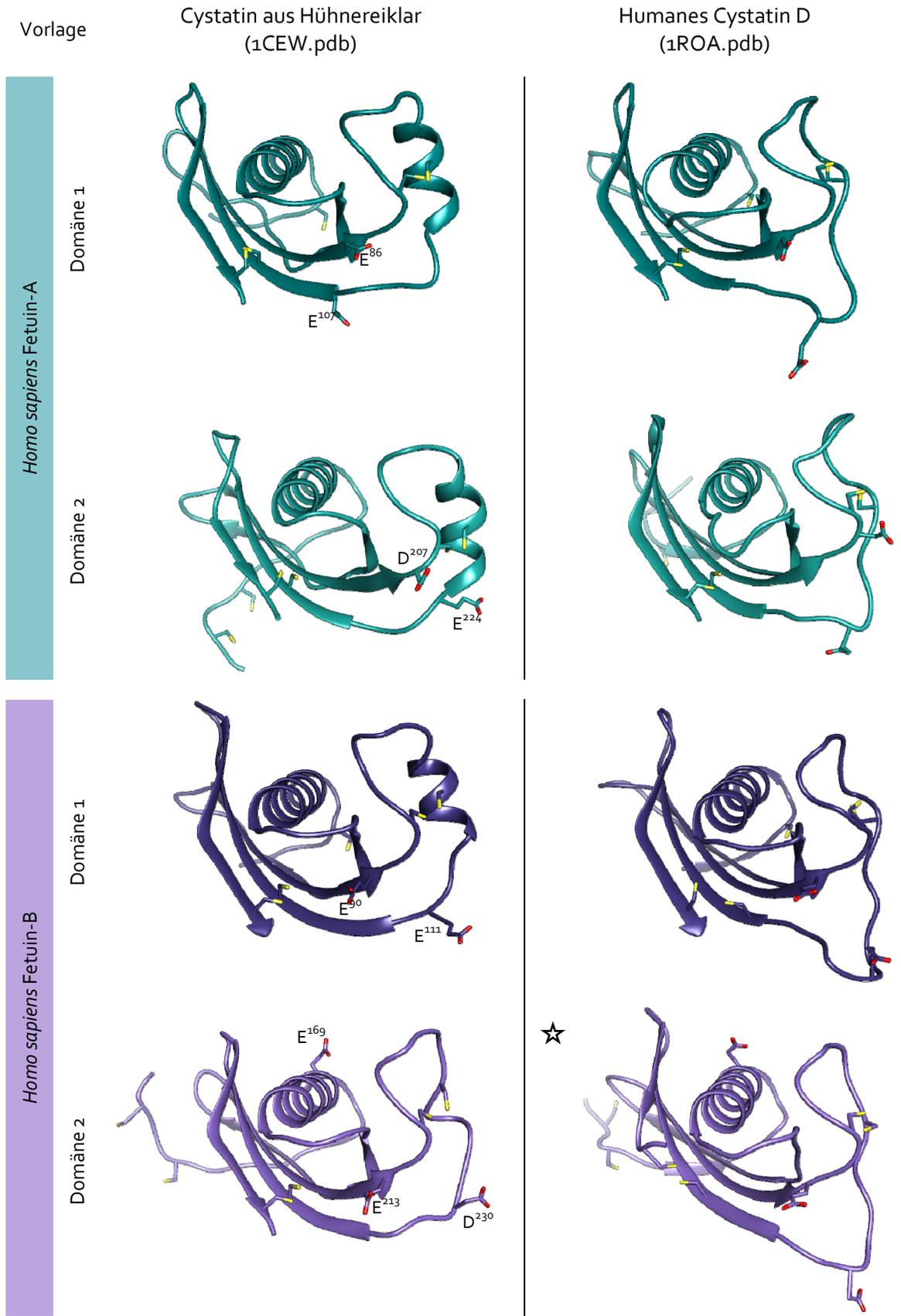


Abbildung 38 (vorherige Seiten): Gegenüberstellung der modellierten Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuinen.

Alle Bändermodelle haben die gleiche Ausrichtung. In der ersten Zeile sind die Vorlagen dargestellt, nach denen die Modellierungen durchgeführt wurden. Disulfidbrücken der Vorlagen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Positionen von negativ geladenen Resten in dem relativ ungeordneten Bereich u_3 sind durch Angabe der jeweiligen Aminosäure angegeben. Die Bezeichnungen der einzelnen Strukturen in der Darstellung des Cystatins aus Hühneiklar werden in der Abbildung 40 aufgegriffen. Die beiden markierten (★) Modelle sind in der 39 in der Seitenansicht dargestellt.

Alle mit dem Programm Modeller 9.12 modellierten Strukturen der einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen werden in der Abbildung 38 miteinander verglichen. Sie weisen alle die typische Faltung von Cystatinen auf. Außerdem sind die bereits angesprochen negativ geladenen Reste angezeigt (durch rote Pfeile im Sequenzvergleich 7.1 markiert). Die Sekundärstruktur ist den Sequenzpositionen in Abbildung 40 zugeordnet. Während die Cystatin D-Struktur (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2004) eine α -Helix aufweist, sind in der Hühnereiklar-Cystatin-Struktur (Bode *et al.*, 1988) zwei α -Helices enthalten. Bis auf die zweite Domäne des Fetuins-B weisen alle Strukturen, die mit dem Hühnerycystatin generiert wurden, ebenfalls zwei α -Helices auf. In allen anderen Modellen ist dieser Bereich eher ungeordnet, wird aber ebenfalls durch eine Disulfidbrücke des Cysteins aus dem „Fetuin-Motiv“ mit dem elf bis zwölf Reste entfernt liegendem, konserviertem Cysteinrest stabilisiert. In der zweiten Domäne des Fetuins-B liegen nur sieben Reste zwischen diesen beiden Cysteinen.

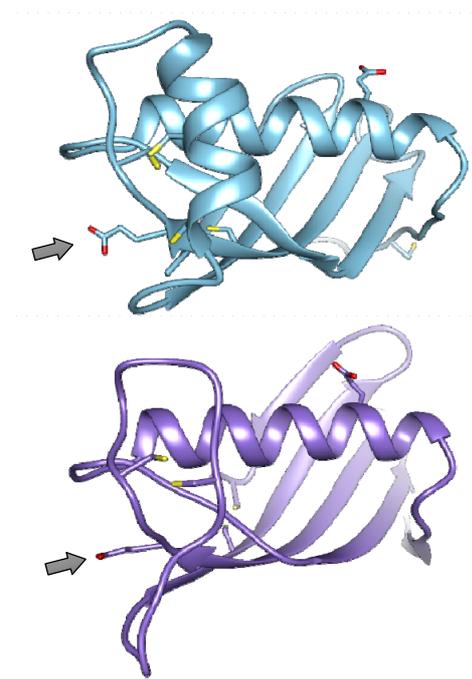


Abbildung 39: Seitenansicht der markierten Modelle aus der Abbildung 38.

Die Pfeile verweisen auf Glu^{204} der ccFet A-D2 (oben), bzw. Glu^{213} der hsFet B-D2 (unten).

Bei den Modellen ohne zweite α -Helix ist der u_3 -Bereich (vor dem β_4 -Faltblatt) nach außen gerichtet und enthält meist einen negativ geladenen Rest. In der D2 des Karpfen Fetuins-A, welche unter Verwendung der Cystatin D Vorlage modelliert wurde, liegt dort ein Glutaminrest (blass dargestellt in der Abbildung 38). Cystatin D besitzt an der entsprechenden Position ein Lysin. Im Cystatin des Hühnereiklars liegen an entsprechenden Positionen die unpolaren Aminosäuren Alanin und Methionin.

Im Abschnitt 4.9.2.1 wurden bereits konservierte negativ geladene Aminosäuren innerhalb des „Fetuin-Motivs“ beschrieben. Diese Reste (z.B. Glu^{82} und Glu^{204} im *Cyprinus*-Fetuin-A) sind außerdem im Sequenzvergleich der Abbildung 46 hervorgehoben. Innerhalb der Fetuin-Motive der D2-Domänen liegen Glutamatreste an konservierten Positionen, die in den Säuger-Fetuinen-A fehlen. Diese besitzen zwei Positionen N-terminal dieser Region stattdessen einen Aspartatrest.

Bez.	$\beta 1$	$\alpha 1$	u1	$\beta 2$	L1	$\beta 3$	u2	$\alpha 2$	u3	$\beta 4$	L2	$\beta 5$
1 CEW	GAPVVDENDEGLQRALQFAMAENRASN-DKYSRVRVRI	ISAKRQIVSGIKYILQVEIGRTTCTFKSSGDLQCE	FHDEPEMAK	YTTCTFWVYSIFWLNQIKLLESKCCQ								
1 ROA	GSIHATDLNDKSVQRALDFAISEYNKV	INKDEYYSRPLQVMAAYQOIVGGVNYFNVKFGRTTCTFKSQPNL	DNCF	ENDQPKLREFFCSQ	QINEVPWEDKISILINYKCRKV							
ccA1_1CEW	VYKCKQDKIATLEAESFINDDHRRHG	YKFKFVSQDSRS	SAEKKTDP	CEVV	LIGITLEETE	CHIVNPKPLDQCE	TRKETQTKVTAKCN	TVSS	VEGKASVKRYICD			
ccA1_1ROA	VYKCKQDKIATLEAESFINDDHRRHG	YKFKFVSQDSRS	SAEKKTDP	CEVV	LIGITLEETE	CHIVNPKPLDQCE	TRKETQTKVTAKCN	TVSS	VEGKASVKRYICD			
ccA1_1WNH	VYKCKQDKIATLEAESFINDDHRRHG	YKFKFVSQDSRS	SAEKKTDP	CEVV	LIGITLEETE	CHIVNPKPLDQCE	TRKETQTKVTAKCN	TVSS	VEGKASVKRYICD			
ccA2_1CEW	TKCPD	PGLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNKESDHKS	YFKLMEVGRISTQ	WMFSGQ	FFSQF	AIMETNCTNKEA	FQNEESKAL	CGEKARYGFC	CKSTKVGIEEPEVECE		
ccA2_1ROA	TKCPD	PGLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNKESDHKS	YFKLMEVGRISTQ	WMFSGQ	FFSQF	AIMETNCTNKEA	FQNEESKAL	CGEKARYGFC	CKSTKVGIEEPEVECE		
ccA2_1WNH	TKCPD	PGLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNKESDHKS	YFKLMEVGRISTQ	WMFSGQ	FFSQF	AIMETNCTNKEA	FQNEESKAL	CGEKARYGFC	CKSTKVGIEEPEVECE		
hsA1_1CEW	YRQPN	DDPETEEAALVAIDYINQNL	PWG	YKHTLNQID	EVKVM	PQ	QPSG	LEFE	IIDTLETTCHVLD	PTPVAR	CSVRQL	KEHAVEGDCDF
hsA1_1ROA	YRQPN	DDPETEEAALVAIDYINQNL	PWG	YKHTLNQID	EVKVM	PQ	QPSG	LEFE	IIDTLETTCHVLD	PTPVAR	CSVRQL	KEHAVEGDCDF
hsA2_1CEW	KVCQD	P	LLAPLNDTRVVHA	AKAALAAFN	QNNCS	NFQ	LEEISRAQIVPLP	PSTYVEFTVSGTDC	VAKEATEAAKNLLAEKQY	GFC	KATLSEK	LGGAEVAVTCT
hsA2_1ROA	KVCQD	P	LLAPLNDTRVVHA	AKAALAAFN	QNNCS	NFQ	LEEISRAQIVPLP	PSTYVEFTVSGTDC	VAKEATEAAKNLLAEKQY	GFC	KATLSEK	LGGAEVAVTCT
hsB1_1CEW	LLSRGC	NDS	DVIAVAGFAL	RDINKDRK	DGVYLR	LN	RVD	AEYRRGGL	SLFY	LTL	DVLETTDCHVLR	KKAWQDC
hsB1_1ROA	LLSRGC	NDS	DVIAVAGFAL	RDINKDRK	DGVYLR	LN	RVD	AEYRRGGL	SLFY	LTL	DVLETTDCHVLR	KKAWQDC
hsB2_1CEW	MTCPD	CPSS	IPTDSS	NHQVLEA	ATESLAKYNN	ENTS	KQYSLFKV	TRASSQ	WV	GPSY	FVEY	LIKE
hsB2_1ROA	MTCPD	CPSS	IPTDSS	NHQVLEA	ATESLAKYNN	ENTS	KQYSLFKV	TRASSQ	WV	GPSY	FVEY	LIKE

Abbildung 40: Sekundärstrukturen der modellierten Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine.

Für die Strukturvorhersagen mit dem Programm Modeller wurden Cystatin aus dem Hühnereiklar (1CEW.pdb, Bode et al., 1988), sowie humanes Cystatin D (1ROA.pdb, Alvarez-Fernandez et al., 2004) verwendet. Die jeweilige Sekundärstruktur ist oben aufgeführt. Die für die Inhibition von Cysteinproteinasen wichtigen Motive sind durch rote Rahmen hervorgehoben. Die entsprechenden Haarnadelschleifen (loops) sind durch L₁ und L₂ abgekürzt. Unter diesen Sequenzen sind die einzelnen Domänen D₁ und D₂ des Karpfen-Fetuin-A (ccA₁, ccA₂) und der humanen Fetuine A (hsA₁, hsA₂) und B (hsB₁, hsB₂) mit den entsprechend verwendeten Vorlagen angegeben. Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden, sind hervorgehoben. Ebenfalls hervorgehoben (★) sind zusätzliche Cysteinreste im Fisch-Fetuin-A. In der ersten Zeile sind die Bezeichnungen der antiparallelen β -Faltblätter (β_1 bis β_5) und α -Helices angegeben. Mit "u" sind Bereiche angegeben, die auf der gegenüberliegenden Seite von L₁ und L₂ liegen und keine α - oder β -Sekundärstrukturen aufweisen. Die konservierten Cysteine sind im Alignment (7.1) nummeriert. Fisch-Fetuin-A wurde außerdem anhand von murinem Latexin (1WNH.pdb, Aagaard et al., 2005a) modelliert. Die Sekundärstrukturen der einzelnen Domänen sind ebenfalls angegeben. Die beiden Pfeile markieren saure Seitenketten der α -Helices (Siehe 39).

Diese negativ geladenen Reste sind in den modellierten Strukturen in der Abbildung 38 dargestellt. Durch die Drehung der Modelle (39) wird deutlich, dass der Glutamatrest in einer geschützten Bucht liegt und daher die Bindung in der Substratbindungsspalte von Astacinen ohne Konformationsänderung kaum möglich erscheint.

Die D₂-Domänen des Fisch-Fetuin-A und des Säuger-Fetuin-B besitzen in der α -Helix (α_1) eine nach außen gerichtete negativ geladene Aminosäure, die in Säuger-Fetuin-A nicht enthalten ist. Sie stellt einen geeigneten Bindungspartner bei der Inhibition dar und könnte die die Hemmeigenschaft des Fisch-Fetuin-A im Gegensatz zum Säuger-Fetuin-A erklären.

Die im Sequenzalignment beobachteten weiteren negativ geladenen Reste der D₂-Domäne des Fisch-Fetuin-A sind zu einem großen Teil im β_5 -Faltblatt lokalisiert. Von allen verglichenen Sequenzen besitzen die Fetuine-A der echten Knochenfische an dieser Position die meisten konservierten negativ geladenen Reste. Demnach muss dieser Bereich eine bestimmte Funktion ausüben, welche näher zu analysieren ist. Dies beinhaltet auch die Klärung der Anordnung der einzelnen Domänen zueinander.

Die ermittelten Strukturen wurden mit dem Programm ProCheck (Laskowski et al., 1993) überprüft (Tabelle 25). Demnach wären bei den Fetuine-A-Domänen die Hühnerycystatin-basierten Modelle zu bevorzugen und bei den Fetuin-B-Domänen die Cystatin-D-basierten.

Tabelle 25: Bewertung der modellierten Strukturen der Cystatin-ähnlichen Domänen.

Die Modelle der einzelnen Domänen wurden nach den Vorlagen 1CEW (Cystatin aus dem Hühnereiklar; Bode et al., 1988) und 1ROA.pdb (Cystatin D; Alvarez-Fernandez et al., 2004) berechnet. Außerdem wurde ein Sequenzvergleich der einzelnen Domänen mit den Vorlagen durchgeführt. Mit Hilfe des ProCheck Scans (Laskowski et al., 1993) kann eine Aussage über die Güte der modellierten Strukturen getroffen werden. Werte, bei denen nicht mindestens 90 % der Aminosäuren (AS) in bevorzugten Regionen des Ramachandran Diagramms (Ramachandran et al., 1963) liegen, sind grau gedruckt. Der Anteil von AS in nicht erlaubten Regionen sollte idealerweise bei 0 % liegen. Die anhand dieser Daten zu bevorzugenden Modellierungsvorlagen sind fett gedruckt.

Fetuin-Domäne	pdb Vorlage	AS-Seq.Vgl. mit der Vorlage		Regionen der Reste			
		ident. AS	ähnl. AS	bevorzugt	zusätzl. erlaubt	noch erlaubt	nicht erlaubt
ccaFetuin-A_D1	1CEW	12 %	30 %	92,2 %	5,6 %	1,1 %	1,1 %
	1ROA	15 %	28 %	91,8 %	5,2 %	1,0 %	2,1 %
ccaFetuin-A_D2	1CEW	14 %	35 %	90,9 %	6,8 %	1,1 %	1,1 %
	1ROA	14 %	31 %	81,7 %	16,1 %	1,1 %	1,1 %
hsaFetuin-A_D1	1CEW	14 %	32 %	93,2 %	4,5 %	2,3 %	0,0 %
	1ROA	17 %	34 %	91,5 %	6,4 %	2,1 %	0,0 %
hsaFetuin-A_D2	1CEW	11 %	33 %	90,8 %	8,0 %	1,1 %	0,0 %
	1ROA	14 %	28 %	87,1 %	8,6 %	3,2 %	1,1 %
hsaFetuin-B_D1	1CEW	13 %	25 %	87,9 %	11,0 %	1,1 %	0,0 %
	1ROA	14 %	27 %	92,8 %	6,2 %	1,0 %	0,0 %
hsaFetuin-B_D2	1CEW	18 %	35 %	87,8 %	10,0 %	1,1 %	1,1 %
	1ROA	17 %	34 %	93,8 %	5,2 %	1,0 %	0,0 %

Die Cysteinreste, die in den bereits gezeigten Modellen so nahe beieinander liegen, dass sie Disulfidbrücken ausbilden könnten (unter 8 Å), sind in dem Alignment zur Darstellung der Sekundärstrukturen (Abbildung 40) hervorgehoben.

Modellierung des Fisch-Fetuin-A anhand der 3D Struktur des Latexins

Die Organisation des Fisch-Fetuin-A wurde mit Hilfe der Strukturdaten des murinen Latexins (1WNH.pdb) berechnet (Aagaard et al., 2005a). Dieser Carboxypeptidase A₄-Inhibitor gehört ebenfalls in die Cystatin-Superfamilie (Kordiš & Turk, 2009) und besitzt zwei Cystatin-ähnliche Domänen, die durch den α -Helix-ausbildenden Sequenzbereich NPDEEDNTFYQSLMSLRPL voneinander getrennt sind (Aagaard et al., 2005b). Für die Strukturbestimmung des Fisch-Fetuin-A wurde der nur halb so lange entsprechende Sequenzabschnitt (TEPASHEILV) durch die längere Sequenz ersetzt (Abbildung 41).

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen der einzelnen Domänen liegen nur geringe Übereinstimmungen vor (D1: 8 %; D2: 6 %). Von den 233 Aminosäuren der modellierten Struktur lagen 81,4 % der Reste in bevorzugten, 14,8 % in zusätzlich erlaubten und 3,3 % in noch erlaubten Regionen des Ramachandran Diagramms. Für einen Rest lagen die Torsionswinkel in einer nicht erlaubten Region des Diagramms. Die berechneten Sekundärstrukturen sind in der Abbildung 41 dargestellt. Da Latexin keine Disulfidbrücken besitzt, mussten die potentiellen Disulfidbrücken bei der Modellierung berücksichtigt werden. Dabei wurden die konservierten Cysteine entsprechend des Fetuin-typischen Musters (Kellermann et al., 1989; Aoki et al., 2007; Sigrist et al., 2013) miteinander verknüpft.

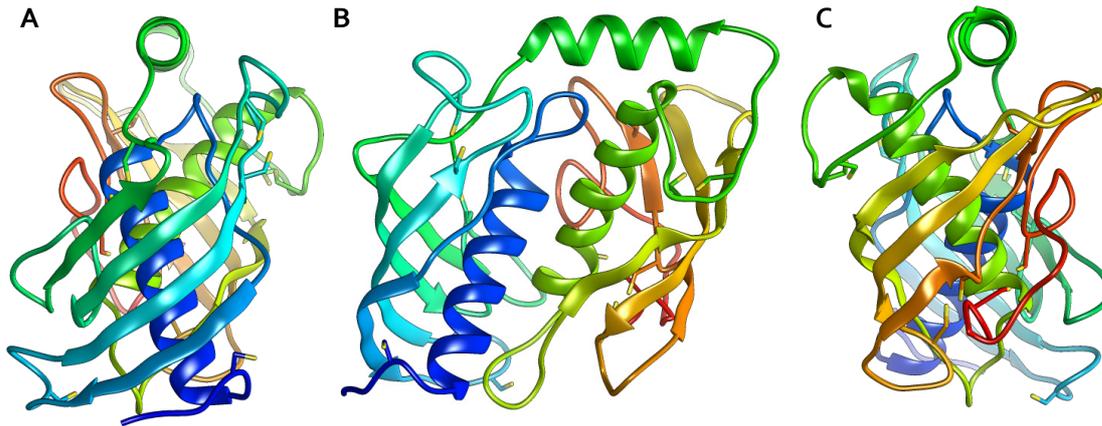


Abbildung 41: Latexin-ähnliche Anordnung beider Cystatin-ähnlicher Domänen des Fisch-Fetuiins-A.

Für die Strukturvorhersage wurde murines Latexin (1WNH.pdb, Aagaard et al., 2005a) verwendet. Dafür wurde der Sequenzbereich, welcher zwischen beiden Domänen liegt, durch den entsprechenden Bereich des Latexins (waagerechte grüne α -Helix in B) ausgetauscht. Der N-terminale Bereich mit der D1 ist blau bis grün gefärbt. D2 mit dem C-Terminus ist in grün bis rot dargestellt. A und C zeigen die Seitenansichten von links und rechts.

Die hochaufgelösten Kristallstrukturdaten des Inhibitionskomplexes der Carboxypeptidase A4 mit humanem Latexin zeigt, dass die Inhibition durch verschiedene *exosites* und dabei vor allem durch die zweite Cystatin-ähnliche Domäne erfolgt (Pallarés et al., 2005b). Ein *loop* des Enzyms wird durch zwei *loops* ($\beta 5\alpha 3$ und $\beta 7\beta 8$) des Inhibitors eingeklammert. Dabei spielt der $\beta 7\beta 8$ *loop* mit dem Gln¹⁹⁰ des Latexins (orange, Abbildung 42) aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine entscheidende Rolle. In der Struktur des Fisch-Fetuiins-A enthält der entsprechende Bereich in der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne den Aminosäurerest Glu²¹¹ an vergleichbarer Position.

Im Fisch-Fetuin-A fällt die Verbindung zwischen der eingefügten α -Helix-Sequenz und der Cystatin-Domänen-typischen α -Helix nicht so ausladend aus wie in den Latexinstrukturen. Zudem fehlt dem Fisch-Fetuin-A im Vergleich zu den Latexinstrukturen in diesen Bereich ein β -Strang (Abbildung 42D).

Die Reste Pro⁹² bis Gln⁹⁵ (zwischen den β -Faltblättern $\beta 3$ und $\beta 4$ in der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne) sind hingegen in einer exponierteren Schleife lokalisiert (Abbildung 42E).

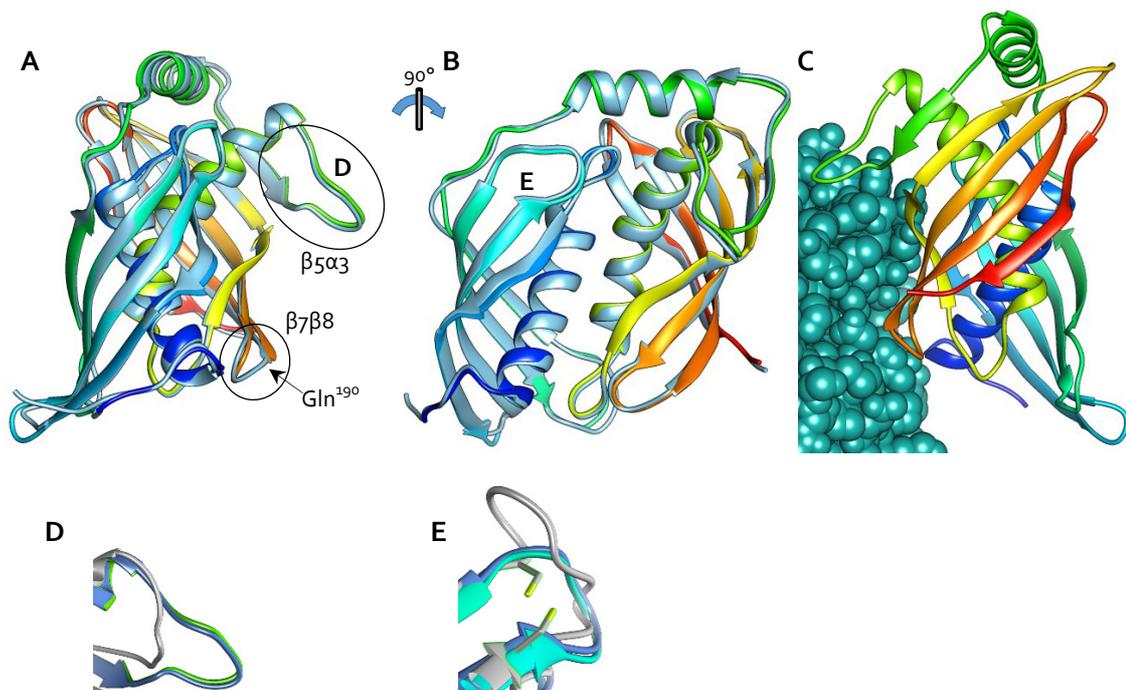


Abbildung 42: Latexin Strukturen (Bänderdarstellung).

In A und B sind humanes (blau bis rot, 2BO9.pdb, Pallarés et al., 2005a) und murines Latexin (hellblau, 1WNH.pdb, Aagaard et al., 2005a) dargestellt. In A sind die beiden loops, die für die Bindung der Metalloprotease A4 (C, cyan) besonders wichtig sind hervorgehoben. D und E zeigen Bereiche, in denen die Fisch-Fetuin-A Struktur (grau) größere Abweichungen aufweist.

4.10 PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM

Der evolutionäre Zusammenhang der einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen von Stefinen, Cystatinen, Kininogenen, Histidin-reichen Glykoproteinen (HRGs) und der Fetuine wurde untersucht (Abbildung 43). Für die Stammbaumanalyse wurden Aminosäuresequenzen von Cystatinen des Menschen, des Rinds, der Ratte und der Maus verwendet. Hinzu kamen vereinzelt weitere Säugetiersequenzen und für die verschiedenen Fetuine, Sequenzen von Vipern und echten Knochenfischen. Für die Analyse stand jeweils nur eine Fetuinsequenz eines Knorpelfisches zur Verfügung. Als Außengruppe des Phylogramms wurde Cystatin 1 der Maispflanze (*Zea mays*) eingesetzt.

Die **Typ I Cystatine (Stefine)** sind von allen verglichenen Domänen deutlich abgegrenzt und stellen eine separate Klade dar. Sie haben mit allen anderen verglichenen Cystatin-ähnlichen Domänen einen gemeinsamen Vorfahren. Der zweite Ast wird zunächst durch **Typ II Cystatine und Typ III Cystatine** gebildet, wobei die Cystatindomänen einmal und zweimal dupliziert wurden.

Ausgehend von den Cystatinen evolvierten vermutlich die Cystatin-ähnlichen Domänen der **Typ III Cystatine**. Dabei entwickelten sich die zweite und dritte Domäne der Kininogene wahrscheinlich gesondert von den ersten und zweiten Domänen der Fetuine und Histidin-reichen Glykoproteine (HRGs). Auffällig ist die Entwicklung der zweiten Domänen der HRGs, denn diese haben mit den ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Kininogene und Fetuine

einen gemeinsamen Ursprung. Die erste Domäne der HRGs steht der ersten Domäne der Fetuine B am nächsten.

Die Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine-A giftiger Schlangen stehen den entsprechenden Kladen der Säuger-Fetuine-A am nächsten. Zuvor erfolgte die separate Weiterentwicklung der Domänen der Fetuine echter Knochenfische.

Die Knorpelfisch-Fetuinsequenzen, insbesondere die zweite Fetuin-A Domäne, stehen separiert, etwas abseits im Stammbaum. Während sich die Fetuin-A-Domäne₁ des Elefantenhais als erste von der weiteren Entwicklung aller Fetuine A-D₁ – welche die größte Distanz zum Ursprung des Phylogramms aufweisen – abgespalten hat, hat die Fetuin-B-D₁ nur mit den entsprechenden Sequenzen der Säuger-Fetuine B-D₁ einen gemeinsamen Vorfahren. Dies ist auch bei der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne des Knorpelfisch-Fetuiins-B der Fall. Dem Phylogramm zufolge hat sich die zweite Fetuin-A Domäne des Elefantenhais von den anderen zweiten Domänen gesondert entwickelt.

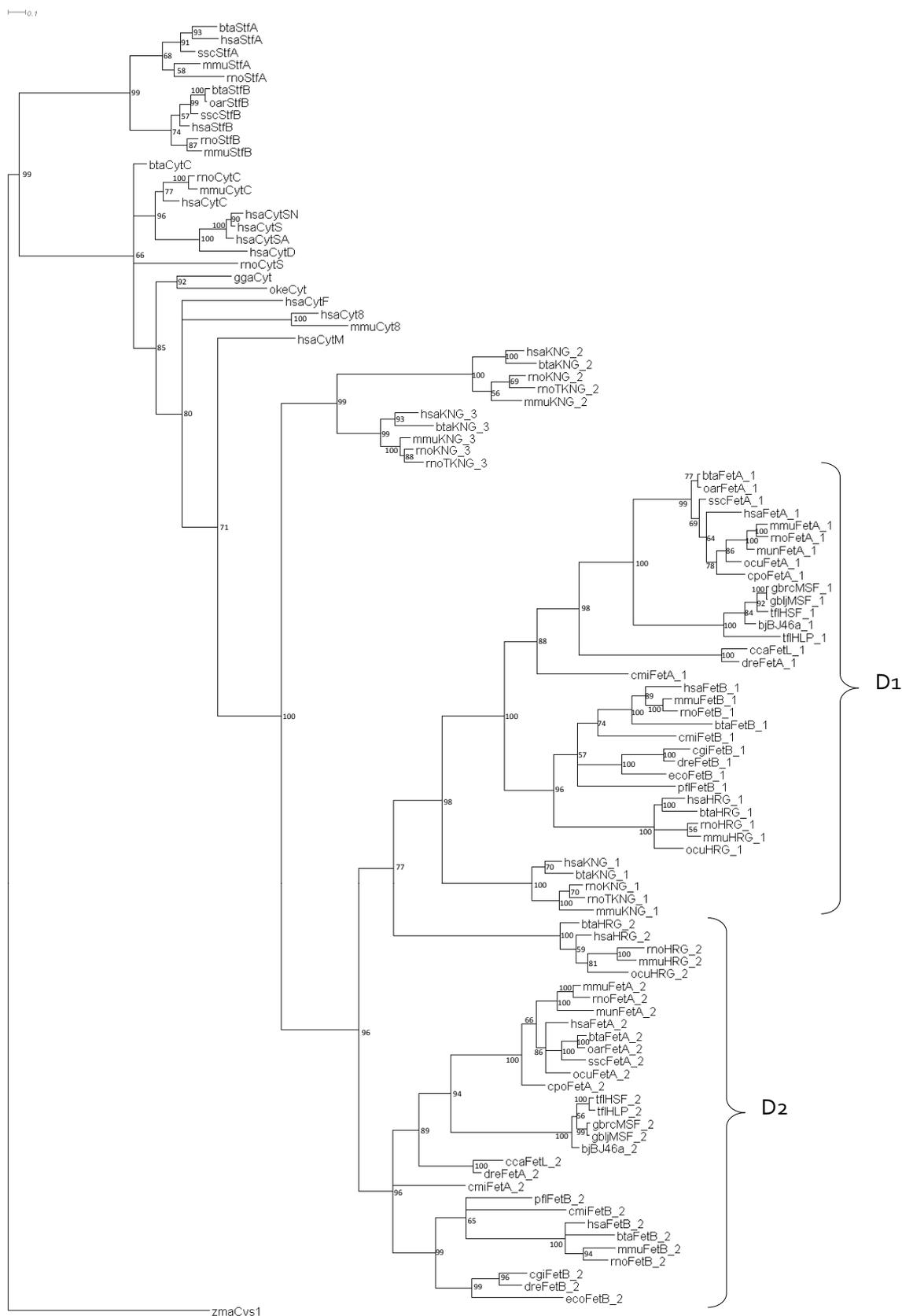


Abbildung 43: Phylogenetischer Stammbaum einzelner Cystatin-ähnlicher Domänen von Mitgliedern der Cystatin-Superfamilie.

Der Stammbaum wurde mit MrBayes (Ronquist et al., 2012) berechnet und mit Dendroscope (Huson & Scornavacca, 2012) dargestellt. Außengruppe: Zea Mays Cystatin 1. _1 bis _3 bzw. D1 und D2 bezeichnen die jew. Cystatin-ähnliche Domäne. Zur Legende siehe Anhang 7.3, Tabelle 28.

5 DISKUSSION

Fisch-Fetuin wurde erstmals 2004 als endogener Inhibitor der Astacinprotease Nephrosin aus den blutbildenden Organen des Karpfens isoliert (Tsai *et al.*, 2004), doch seine Funktion ist bisher noch ungeklärt. Die Spaltung von Fibronektin und Gelatine durch Nephrosin weist auf eine Funktion des Enzyms im Rahmen der Remodellierung der extrazellulären Matrix hin. Allerdings werden diese Substrate von vielen Proteasen *in vitro* gespalten, ohne dass dies eine physiologische Relevanz hätte. Einige Autoren vermuteten eine Funktion im Rahmen der Immunabwehr hin (Hung *et al.*, 1997; Boutet *et al.*, 2006). Allerdings wurden Spekulationen, dass durch die proteolytische Aktivität von Nephrosin die Migration von Makrophagen durch die extrazelluläre Matrix ermöglicht wird, in Zweifel gezogen (Zhang *et al.*, 2008). Eine bessere Kenntnis der Substratspezifität von Nephrosin würde zweifellos Aufschlüsse mögliche Funktionen dieser Protease zulassen.

Ein Schlüssel zur Funktion der Enzyme im extrazellulären proteolytischen Netzwerk war auch aus dem Hemmspektrum des Inhibitors Fisch-Fetuin zu erwarten. Hier schienen vergleichende Analysen mit Säugerproteasen und den entsprechenden Säugerhemmstoffen sinnvoll. Denn wenn es Inhibitor-Enzym-Wechselwirkungen gab, würden sich daraus vermutlich Einblicke in die physiologischen Funktionsbeziehungen erschließen lassen. Vor der Entdeckung des Nephrosin-Inhibitors Fisch-Fetuin gab es keinerlei Hinweise auf andere endogene, spezifische Inhibitoren von Proteasen der Astacinfamilie. Der einzige bekannte natürliche Inhibitor war bislang der unspezifische Hemmstoff alpha₂-Makroglobulin (Stöcker *et al.*, 1991a; Zhang *et al.*, 2006). Daher war die Untersuchung des Fisch-Fetuius von großem Interesse für die Aufklärung der natürlichen selektiven Regulation von Astacinproteasen auch bei Säugern.

Das Zielenzym Nephrosin wird im Zebrafisch von Granulozyten exprimiert (Song *et al.*, 2004). Ein homologes Enzym konnte in höheren Wirbeltieren bislang nicht identifiziert werden. Alle diesbezüglichen Informationen stammen aus echten Knochenfischen (*Teleostei*) wie Karpfen (Hung *et al.*, 1997), Zebrafisch (Song *et al.*, 2004), europäischem Wolfsbarsch (Boutet *et al.*, 2006), Regenbogenforelle (Kirchner *et al.*, 2007), Ayu (Kawaguchi *et al.*, 2006), Gelbschwanzmakrele (Darawiroj *et al.*, 2008) und Aal (Kalujnaia *et al.*, 2007). Die parallele Untersuchung der Enzyme und ihrer Hemmstoffe bei Fischen und Säugern erschien daher als vielversprechende Strategie zur Aufklärung der physiologischen Funktionen von Astacinen und ihrer spezifischen Antagonisten.

5.1 HETEROLOGE EXPRESSION VON FISCH-FETUIN-A

Tsai und Mitarbeiter konnte zeigen, dass der Inhibitor erst durch die Prozessierung seiner Proform aktiv wird (Tsai *et al.*, 2004). N-terminal werden die Aminosäuren Ala-Ser-Leu-Pro-(Thr) entfernt, so das aktive Fisch-Fetuin-A mit den Aminosäuren (Thr)-Gly-Thr-Asp-Val-Val-Tyr-Lys beginnt. Es ist unklar, ob Threonin oder Glycin die erste Aminosäure in der aktiven Form ist, denn Tsai *et al.* haben beide Aminosäuren N-terminal gefunden. Den C-Terminus konnten sie nicht bestimmen. Durch den Vergleich der deglykosylierten Proteingrößen – der isolierten Vorstufe und des prozessierten, aktiven Inhibitors – mit deren theoretisch ermittel-

ten Molekülmassen, ermittelten die Autoren Gly²⁸² als C-terminale Aminosäure des aktiven Inhibitors (Tsai *et al.*, 2004).

Da in dieser Arbeit die Inhibition verschiedener Proteasen durch Fisch-Fetuin-A analysiert werden sollte, wurde der Sequenzbereich, der die vermutete aktive Inhibitorform kodiert, mit Hilfe des pQE-TriSystem His-*Strep* Vektorsystems in Bakterien (*Escherichia coli* M15[pREP4]) exprimiert. Laut Hersteller ist dieser Vektor außerdem für die Expression in Insektenzellen und Säugerzellen geeignet (Qiagen, 2003). Diese eukaryontischen Expressionssysteme haben den Vorteil, dass bereits gefaltete und glykosylierte Proteine gewonnen werden können, die mit natürlichen Proteinen vergleichbar sind. Bisher ist es noch nicht gelungen, den Inhibitor aus transformierten Insektenzellen zu gewinnen (Lin, 2007).

Bakteriell gewonnenen Proteinen fehlen diese Glykosylierungen, die unter anderem wichtig für die korrekte Faltung und die Aktivität des Proteins sein können (Palomares *et al.*, 2004). Mit der schnelleren Expression und höheren Ausbeuten bietet die bakterielle Expression aber auch Vorteile (Demain & Vaishnav, 2009). Dennoch ist die Expression von Fisch-Fetuin-A in *E. coli* kritisch zu betrachten, denn die verwendete Fisch-Fetuin-A Sequenz enthält insgesamt vierzehn Cysteine. Der Vergleich mit anderen Fetuin-Sequenzen, in denen Disulfidbrückenbindungen nachgewiesen wurden (Kellermann *et al.*, 1989; Valente *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2007) lässt darauf schließen, dass während der Faltung des heterolog gewonnenen Fisch-Fetuin-A mindestens fünf Cystine ausgebildet werden müssen.

Durch die Einklonierung der Fisch-Fetuin-A cDNA in das pQE-TriSystem His-*Strep* 2 Vektorsystem und dem damit verbundenen Anhängen eines N-terminalen *Strep-tags* und eines C-terminalen His-*tags* wurden zusätzliche Aminosäuren zwischen den Inhibitor-Termini und den *tags* eingefügt (Abbildung 47), deren Auswirkungen auf die Aktivität des Inhibitors unbekannt sind. Zudem stellte sich die Frage, ob die Proform des Inhibitors C-terminal gekürzt wird, oder ob Bereiche der Insert-Region der dritten Domäne entfernt werden und das C-terminale Ende über eine Disulfidbrücke zum Cys²⁹ verknüpft bleibt (5.6 und Abbildung 46).

Da der in den nativen Zustand gefaltete Inhibitor trotz seiner *Strep-tag*-Markierung nicht an die *Strep* Tactin Säule bindet (Meyer, 2009), wurde in dieser Arbeit die Affi-Gel[®] Blau Säulenchromatographie als alternatives Verfahren für die Endreinigung angewendet (Abbildung 22).

Die verschiedenen Fisch-Fetuin-A Chargen wurden abschließend durch SDS PAGE (Abbildung 19) und anhand ihrer inhibitorischen Wirkung gegen Meprin α (Abbildung 20) überprüft. Die SDS Gele brachten Verunreinigungen in Form proteolytischer Abbaufragmente zutage. Dafür spricht die Tatsache, dass es sich um schneller wandernde Fragmente anodisch der Hauptbande handelte, die im Immunblot identifiziert werden konnten. Die am besten hemmende Charge 5 (Abbildung 20) wurde für die meisten der in dieser Arbeit beschriebenen Hemmexperimente eingesetzt.

5.2 HEMMUNG VON ASTACINPROTEASEN DURCH FISCH-FETUIN-A

Es konnte gezeigt werden, dass Fisch-Fetuin-A ein sehr guter Inhibitor der Astacinprotease Nephrosin ist. Aufgrund ungenügend verfügbarer Nephrosinmengen konnten während dieser Arbeit noch keine Hemmkonstanten durch Enzymkinetiken ermittelt werden. Zudem hat sich das eingesetzte FRET Substrat MOCAC-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys(Dnp)-DArg als ungeeignet für die Aktivitätsmessung von Nephrosin herausgestellt. Mit einer Geschwindigkeit von 3,3 nM/s wird es relativ langsam umgesetzt. Das Substrat MOCAC-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)NH₂ wurde gar nicht gespalten. Mit dem Substrat Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dpa-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂ konnte ein schnellerer Substratumsatz beobachtet werden (persönliche Kommunikation von Mario Olf).

Fisch-Fetuin-A zeigte zu rekombinantem Meprin α eine etwas höhere Affinität als zu rekombinantem Meprin β . Während die Inhibitionskonstante K_i für die Hemmung von Meprin α durch rekombinantes Fisch-Fetuin-A bei 115 nM lag, wurde für die Inhibition von Meprin β ein K_i von 556 nM ermittelt. Der Standardfehler war für die Meprin β Inhibition mit ± 69 nM deutlich höher als bei der Kinetik mit Meprin α ($\pm 8,3$ nM).

Die ermittelten Inhibitionskonstanten lagen um das Zwanzig- bzw. Hundertfache über den eingesetzten Enzymkonzentrationen, was darauf hinwies, dass es sich bei Fisch-Fetuin-A nicht um einen *tight binding* Inhibitor handelt (Goldstein, 1944). Daher konnte das Lineweaver-Burk Diagramm zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten herangezogen werden (Bieth, 1984). Dort lag der Schnittpunkt der Geraden der Meprin α -Inhibition (Abbildung 29) nahe der y-Achse, was für eine kompetitive Hemmung spricht (Lineweaver & Burk, 1934). Im Lineweaver-Burk Diagramm der Meprin β Inhibition lagen die Geraden der verschiedenen Inhibitorkonzentrationen sehr dicht beieinander und ihr Schnittpunkt könnte auch auf einen gemischten Hemmmechanismus hindeuten. Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Substrat und Inhibitor um das aktive Zentrum der aktiven Protease. Dabei bleibt V_{max} gleich, während der K_M mit zunehmenden Inhibitorkonzentrationen größer wird.

Diese ermittelten inhibitorischen Konstanten weisen Fisch-Fetuin-A als moderaten Inhibitor der humanen Meprine aus. Im Vergleich zu der Inhibition durch Actinonin, einem Inhibitor mit einer Hydroxamatgruppe, der von Gram-positiven Streptomyceten produziert wird (Attwood, 1969), ist die Affinität zu Meprin α etwas geringer ($K_i = 20$ nM), zu Meprin β jedoch deutlich besser ($K_i = 1,7$ μ M) (Kruse *et al.*, 2004).

Des Weiteren wurde in der Arbeit von Kruse *et al.* (2004) gezeigt, dass die sehr großen, oligomerisierten Meprine durch α_2 -Makroglobulin nicht gehemmt werden. Kleinere Vertreter der Astacinfamilie können hingegen in der Käfigstruktur dieses relativ unspezifischen Inhibitors gefangen werden (Marrero *et al.*, 2012). Dazu gehört auch Astacin (Stöcker *et al.*, 1991a). Im Gegensatz dazu erwies sich Fisch-Fetuin-A als schlechter Inhibitor für diese prototypische Astacinprotease, denn die Inhibitionskonstante war mit 3,5 μ M sehr hoch. Die einzeln ermittelten Substratumsatzgeschwindigkeiten lagen oft nahe beieinander (Abbildung 27). Entsprechend war auch der Standardfehler mit 1,1 μ M sehr hoch. Bereits der von mir durchgeführte Azocasein-assay mit Fisch-Fetuin-A und Astacin zeigte bei den eingesetzten Konzentrationen (94 nM Protease und 1,5 μ M Inhibitor) keine Inhibition

(Hedrich *et al.*, 2010). Im Verhältnis zu der Proteasekonzentration war die Inhibitor-konzentration zu gering. In dem gleichen Versuch wurden die Aktivitäten der rekombinanten Proteasen LAST und LAST_MAM durch Fisch-Fetuin-A auf 89 % bzw. 64 % reduziert (Hedrich *et al.*, 2010).

Rekombinantes humanes BMP1 wird durch α_2 -Makroglobulin inhibiert (Zhang *et al.*, 2006). Durch rekombinantes Fisch-Fetuin-A wird BMP1 jedoch nur so schwach gehemmt, dass die physiologische Relevanz dieser Inhibition als sehr gering einzuschätzen ist. Zwar ähnelt das BMP1 Substratspektrum aufgrund der Präferenz für negativ geladene Reste in der S₁' Position dem der Meprine (Becker-Pauly *et al.*, 2011), jedoch fällt in der Kristallstruktur (3EDH.pdb, Mac Sweeney *et al.*, 2008b), im sogenannten *edge strand*, oberhalb des aktiven Zentrums, eine höchst ungewöhnliche Disulfidbrücke auf, die wie eine Klappe vor dem aktiven Zentrum liegt und dieses blockiert (Mac Sweeney *et al.*, 2008a). Dies kann der Grund sein, warum Fisch-Fetuin-A kaum gebunden wird. Tolloid-ähnlichen Astacine besitzen ebenfalls diese zwei zusätzlichen benachbarten Cysteinreste, die eine entsprechende Disulfidbrücke ausbilden (Mac Sweeney *et al.*, 2008a).

Nephrosin ist das natürliche Zielenzym des Fisch-Fetuin-A. Die Bindung beider Partner ist so stark, dass es sogar möglich war, sie als Komplex aus der Kopfniere des Karpfens zu isolieren (Tsai *et al.*, 2004). Beide Proteine wurde außerdem in weiteren hämatopoetischen Organen und den Kiemen nachgewiesen (Hung *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 2004).

Die Aktivität von 10 nM rekombinanten *Danio rerio* Nephrosin konnte durch 1 μ M Fisch-Fetuin-A auf eine Restaktivität von 5 % reduziert werden. Für die Bestimmung eines verlässlichen K_i-Wertes standen jedoch zu wenige Messdaten zur Verfügung. Nach Vergleich mit den Messwerten für Meprin α (Tabelle 22) liegt der K_i für Nephrosin unter 100 nM. Damit ist Nephrosin die durch Fisch-Fetuin-A am effektivsten gehemmte Astacinproteinase.

Trotz intensiver Bemühungen gelang es mir nicht, den von Tsai *et al.* (2004) beobachteten Fetuin-Nephrosin-Komplex im durch nicht-denaturierende („native“) Elektrophorese darzustellen (Abbildung 23). Das verwendete autoaktivierte Nephrosin konnte in den nativen Gelen weder durch Coomassie-Färbung noch durch Immunodektektion des Strep-tags nach dem Western Blot nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Konzentration für eine Coomassie Färbung zu gering und/oder der Strep-tag war im Komplex für den Antikörper im Immunblot nicht erreichbar. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass Nephrosin aufgrund seines hohen isoelektrischen Punktes (pI 8,74) zur Kathode und somit nicht in das Gel eingewandert ist. Der Inhibitionskomplex könnte in höherer Konzentration vielleicht besser durch die Gelfiltration dargestellt werden, denn bei dieser Methode entfallen Einflussfaktoren wie die Ladung der Proteine und der pH-Wert (Jansson, 2002).

Die Zymographie (Abbildung 24) zeigte, dass in der Fisch-Fetuin-A Proteinlösung keine Gelatine-abbauende Protease enthalten ist. Dagegen hydrolysierte das autoaktivierte Nephrosin die Gelatine effektiv. Diese Aktivität wurde durch Fisch-Fetuin-A unter den gewählten Bedingungen deutlich reduziert. Dies belegt zumindest die Funktionalität der in der nativen Elektrophorese eingesetzten Proteine.

5.2.1 Inhibition von Proteinasen anderer mechanistischer Klassen

Schon in der ersten Erwähnung von Fetuin wurde eine Hemmung der Trypsinaktivität beschrieben, die jedoch auf andere Serumproteine als das isolierte Fetuin zurückgeführt wurde (Deutsch, 1954). Neun Jahre später konnten Green und Kay den Fetuinabbau durch die Serinproteasen Trypsin und α -Chymotrypsin nachweisen, insbesondere nachdem Sialylsäuren auf der Oberfläche des Fetuins entfernt wurden (Green & Kay, 1963). Entgegen dieser Beobachtung wurde Fetuin in den folgenden Jahrzehnten immer wieder als Trypsininhibitor beschrieben (Wallis *et al.*, 1969; Galembeck & Cann, 1974; Yoshida *et al.*, 1996; Ashida *et al.*, 2000) und für die Maus und Mongolische Wüstenrennmaus gar als Countertrypsin bezeichnet (Yamamoto & Sinohara, 1993; Goto *et al.*, 1997).

In dem von Galembeck und Cann (1974) verwendeten Assay stellte Fetuin-A das bevorzugte Substrat für Trypsin dar. Es handelt sich demnach um eine Substratkompetition, denn nach Vorinkubation von Fetuin-A und Trypsin ist keine Inhibition mehr zu beobachten (Galembeck & Cann, 1974). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, die Serinproteasen wie Trypsin als Werkzeuge zur limitierten Proteolyse von Fetuin einsetzten. So wird unter anderem das sogenannte *connecting* Peptid aus der dritten Domäne des humanen Fetuins-A durch Trypsin, Elastase, Chymotrypsin, Plasmin, Thrombin und Kallikrein herausgeschnitten (Nawratil *et al.*, 1996). Haglund und Mitarbeiter konnten durch Trypsinierung weitere post-translationale Modifikationen identifizieren (Haglund *et al.*, 2001).

Eine Inhibition der Cysteinproteinase Papain durch Fisch-Fetuin-A konnte nicht beobachtet werden. Dies kann auf die unzureichende Konservierung von Sequenzmotiven zurückzuführen sein, welche für die Inhibition von Cysteinproteinasen durch Cystatine essentiell sind (Ohkubo *et al.*, 1984; Abrahamson *et al.*, 1987; Turk & Bode, 1991). Für die Inhibition von Cysteinproteinasen durch Stefine und Cystatine sind N-terminale Sequenzbereiche, und zwei *loops* mit den konservierten Motiven QXVXG (L1, Abbildung 37) und PW (L2) notwendig. Zusammen bilden sie eine keilförmige Struktur, die komplementär zu der Substratbindungstasche der entsprechenden Zielenzyme ist. Das QXVXG-Motiv (Abbildung 37) ist in der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne des Fisch-Fetuins-A nicht enthalten und die zweite Domäne beinhaltet mit Gln¹⁸⁸ nur eine der drei Aminosäuren des Motivs. Demnach läge es nahe, die Inhibition der proteolytischen Aktivität des Papains der zweiten Domäne des bovinen Fetuins-A zuzuschreiben.

5.2.2 Vergleich von Fisch-Fetuin-A (wt) und der (D144A) Mutante

Aufgrund der Präferenz von Astacinproteasen für saure Aminosäureseitenketten C-terminal der Schnittstelle in Proteinsubstraten (Becker-Pauly-*et al.*, 2011) untersuchte ich die Bedeutung von Aspartat und Glutamatresten in den potenziell inhibitorischen reaktiven Domänen des Fisch Fetuins-A. Vor dem Hintergrund dieser Überlegung wurde die D¹⁴⁴A Mutante des Fisch-Fetuins generiert. Sie wurde unter denselben Bedingungen wie das Wildtypprotein isoliert, um eine optimale Vergleichbarkeit beider Inhibitorformen zu gewährleisten. Da beide rekombinantes Meprin α mit praktisch identischer Effizienz hemmten, und auch die Prozessierung von Fisch-(D¹⁴⁴A)-Fetuin-A durch Meprin α und Meprin β nach dem gleichen Muster wie beim Wildtyp erfolgte, kann vermutet werden, dass Asp¹⁴⁴ nicht an der Inhibition von Astacinproteasen beteiligt ist.

5.3 SPALTUNG DES FISCH-FETUINS-A DURCH ASTACINPROTEASEN

Im Gegensatz zu Flusskrebs-Astacin spalten Meprin α und Meprin β das rekombinante Fusionsprotein Fisch-Fetuin-A (Abbildung 25). Offenbar entfernt Meprin β den C-terminal lokalisierten His-tag des Fisch-Fetuin-A während Meprin α den N-terminalen Strep-tag abtrennt. Die in beiden Fällen entstehenden Fragmente von *circa* 3 - 5 kDa Masse konnte ich jedoch nicht nachweisen. Vermutlich wurden beide im Zuge der Proteaseinhibition proteolytisch degradiert.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann für die Inhibition der Astacinproteasen durch Fisch-Fetuin-A ein kanonischer Inhibitionsmechanismus, wie er beispielsweise bei Serinproteasen durch Ovomuroid oder BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) beobachtet wird (Bode *et al.*, 1986; Helland *et al.*, 1999), angenommen werden.

Diese meist kleinen Inhibitoren zeigen bis auf einen kanonisch geformten, exponierten *loop* keine Gemeinsamkeiten. Weder in ihren Sequenzen, noch ihren Strukturen (Bode & Huber, 1992). Der meist relativ flexible *loop* ist komplementär zur aktiven Spalte ihrer Zielenzyme und wird daher wie ein Substrat gebunden (Hubbard *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995). Dies hat dann eine Stabilisierung des *loops* zur Folge (Otlewski *et al.*, 2005). Zwar erfolgt die Bildung des Acyl-Enzym Intermediats sehr schnell, doch durch die feste Bindung der Abgangsgruppe kommt es kaum zu einer Deacylierung (Radisky & Koshland, 2002). Demnach erfolgt die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung nur sehr langsam und ist zudem reversibel (Ardelt & Laskowski, Jr., 1985; Huang *et al.*, 1995).

Dieser Mechanismus wurde außerdem für die Hemmung der Metalloprotease Thermolysin durch den spezifischen *Streptomyces* Metalloproteinase Inhibitor (SMPI) beobachtet (Murai *et al.*, 1985). Auch für diesen Inhibitor wurde die substratähnliche Bindung, sowie die Spaltung und Resynthese der Schnittstelle innerhalb des weniger flexiblen, exponierten *loops* nachgewiesen (Seeram *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1998, Tate *et al.*, 1998).

Für Fetuin-A wurden mit der TAILS-Methode (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) Schnittstellen direkt hinter der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne identifiziert (Jefferson *et al.*, 2013). Dieser Bereich muss demnach auf der Oberfläche - zugänglich für Proteasen - liegen. Diese These wird durch die Beobachtungen von Tsai und Mitarbeitern gestützt, die zusammen mit dem aktiven Inhibitor ein 26 kDa großes Fragment isoliert haben, dessen N-terminaler Bereich (H¹³⁵EILVT...) innerhalb der Sequenz zwischen den beiden Cystatin-ähnlichen Domänen liegt. Die Prozessierung des rekombinanten Fisch-Fetuin-A mit Meprin α , β und Astacin konnten die These einer für die entsprechenden Proteasen frei zugänglichen liegenden Schnittstelle zwischen der ersten und der zweiten Domäne jedoch nicht belegen (Abbildung 25).

5.4 ALIGNMENTS UND MODELLE

5.4.1 Nephrosin

Der Sequenzvergleich von Proteasedomänen verschiedener Astacine (Abbildung 34) zeigte, dass Nephrosin, genau wie die *hatching* Enzyme HCE und LCE, zusätzlich zu den vier konservierten Cysteinen zwei weitere Cysteine im N-terminalen Bereich der Proteinsequenz besitzt. In der Kristallstruktur des Zebrafisch *hatching* Enzyms 1 (ZHE1; Tanokura *et al.*, 2010) bilden diese Reste eine Disulfidbrücke aus. Kawaguchi *et al.* (2006) bezeichneten sie als Charakteristikum für *hatching* Enzyme der Astacinfamilie. Nephrosin konnte wie andere *hatching* Enzyme auch in embryonalen Geweben nachgewiesen werden (Song *et al.*, 2004; Kawaguchi *et al.*, 2006). Während jedoch LCE und HCE, zwei Paraloge des Nephrosins, spezifisch vor dem Schlüpfen des Embryos exprimiert werden, wird Nephrosin auch im hämatopoetischen Gewebe adulter *Teleostei* exprimiert (Hung *et al.*, 1997; Kawaguchi *et al.*, 2006).

Desweiteren deuten der Sequenzvergleich (Abbildung 34) und die Strukturberechnung von Nephrosin auf eine andere Komposition seiner Substratbindungsspalte, insbesondere der S1' Substratbindungstasche hin. Während die meisten Astacinproteinasen (darunter auch BMP1, ZHE1, Ovastacin und die Meprine) aufgrund eines Argininrests im Bereich der S1'-Tasche eine Präferenz für negativ geladene Reste in P1' aufweisen (Mac Sweeney *et al.*, 2008a; Okada *et al.*, 2010; Arolas *et al.*, 2012; Hildebrand, 2013), ist dies für Nephrosin, aber auch für Astacin, nicht der Fall (Krauhs *et al.*, 1982; Stöcker *et al.*, 1990; Guevara *et al.*, 2010). In dem Alignment der Abbildung 34 sind in den entsprechenden Positionen dieser beiden Sequenzen Ala¹⁸¹ bzw. Lys¹⁷⁹ zu finden. Damit liegt im Astacin zwar auch ein basischer Rest an dieser Position des Sequenzvergleichs, doch bevorzugt diese Protease eher kleine aliphatische Reste in der S1' Tasche. Grund dafür ist der sogenannte *170-loop* in der dreidimensionalen Struktur des Astacins, wodurch Pro¹⁷⁶ an dieser Stelle lokalisiert ist und Lys¹⁷⁹ eine andere Position einnimmt (Stöcker *et al.*, 1993; Gomis-Rüth *et al.*, 2012b; Abbildung 36). Zudem fällt diese Tasche aufgrund des Prolins deutlich flacher aus (Grams *et al.*, 1996; Gomis-Rüth *et al.*, 2012b).

Für die Strukturvorhersagen wurden mit dem Zebrafisch *hatching* Enzym 1 (3LQB.pdb; Tanokura *et al.*, 2010) und dem Astacin (1AST.pdb; Bode *et al.*, 1992) zwei Proteasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten gewählt. Durch seine Sequenzähnlichkeit mit Nephrosin hat sich ZHE1 für die Modellierung am besten geeignet erwiesen. Dies konnte durch die Ramachandran-Plots für ZHE1 und Astacin bestätigt werden (Tabelle 24). Die Modelle unterstrichen außerdem die Abhängigkeit der Güte der Strukturvorhersage von der verwendeten Modellierungsvorlage.

Die S'-Bindungstaschen der am Zebrafisch ZHE1 modellierten Strukturen (Abbildung 36 D, F) sind durch das Rückgrat der Aminosäuren Gly¹⁷⁹, Val¹⁵² und His¹⁵⁴ im *Cyprinus carpio* Nephrosin-Modell und im *Danio rerio* Nephrosin-Modell durch das Rückgrat des Met-*turn* bildenden Sequenzabschnitts von Val¹⁵² bis Gln¹⁵⁴, sowie dem Rückgrat von Gly¹⁷⁹ und Glu¹⁸⁰ ungeladen und hydrophil. Nur durch die Seitenketten von Tyr⁹⁵ (im ccNephrosin) bzw. Ser⁹⁵ (im drNephrosin), deren polare Hydroxylgruppen in die Bindungstasche ragen, erhalten diese

einen schwach-hydrophoben Charakter. Bei der Überlagerung der Modellierungen mit der Vorlage ZHE1, wird deutlich, dass die S1'-Region des Nephrosins eine größere Aminosäureseitenkette aufnehmen könnte als ZHE1. In der Struktur des ZHE1 wird diese Region unter anderem durch die bei Astacinen weitgehend konservierte Aminosäure Arg¹⁸² geformt. Im Nephrosin steht an dieser Position Ala¹⁸¹.

In den Astacin-basierten Modellen, wird durch das Rückgrat der Polypeptidkette eine enge, tunnelartige Struktur in der S1' Tasche geformt. Im Zebrafisch-Nephrosin ist dieser Tunnel durchgängig. Aus der α -Helix ist Tyr⁹⁵ (Karpfen-Nephrosin), bzw. Ser⁹⁵ (Zebrafisch-Nephrosin) in die Substratbindungstasche gerichtet. Während Tyr⁹⁵ vor dem Tunnelzugang liegt, ist die Serinseitenkette zu kurz, um den Zugang zu versperren. Aufgrund des Ser⁹⁵ bieten die S1' Substratbindungstaschen beider *Danio rerio* Nephrosinmodelle den meisten Platz im Vergleich zu den anderen betrachteten Strukturen. Auch hier haben die S1' Regionen einen ungeladenen, hydrophilen Charakter. Diese Daten legen eine Präferenz von Nephrosin für polare Seitenketten in P1' nahe.

Die von Tsai *et al.* beschriebenen Heparinbindungsstellen im Karpfen-Nephrosin (Tsai *et al.*, 2004) wurden in den Modellen lokalisiert. Dort erstrecken sich diese hypothetischen Bindungsstellen über die linke Hälfte des in der sogenannten Standardansicht betrachteten Proteins (Gomis-Rüth *et al.*, 2012a). Der Abstand zwischen den exponierten basischen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche beträgt im Durchschnitt 15 Å. Durch diese Bindungsstellen könnte Nephrosin beispielsweise über die Bindung von Heparansulfat an Zelloberflächenmoleküle binden. Die These wird durch den Nachweis von Nephrosin auf Epithelien innerer Organe, wie z.B. der Niere und der Milz in adulten Medaka *Oryzias latipes* gestützt (Kawaguchi *et al.*, 2006). Heparin kann die Aktivität verschiedener Wachstumsfaktoren verändern. Durch die Anwesenheit von Heparin kann beispielsweise der Wachstumsfaktor VEGF besser an seinen Rezeptor binden, oder die TGF- β 1 Aktivität kann durch Heparin verändert werden (Gitay-Goren *et al.*, 1992; McCaffrey *et al.*, 1992). Bekhouche *et al.* konnten zeigen, dass die NTR-Domäne von PCPE1 nur schwach an BMP1 bindet. Durch Heparin oder Heparansulfat wird diese Bindung jedoch begünstigt und die BMP1 Aktivität – und damit die Prokollagenprozessierung – nimmt deutlich zu (Bekhouche *et al.*, 2010). Des Weiteren kann die inhibitorische Wirkung des Serpins C1 Esterase-Inhibitor (C1-INH) auf die Serinproteinase C1 Esterase verstärkt werden (Nagaki & Inai, 1976; Rajabi *et al.*, 2012).

5.4.2 Fisch-Fetuin

Durch Sequenzvergleiche, insbesondere der einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen, konnte die Zuordnung von Fisch-Fetuin zu den Fetuinen A bestätigt werden (Tsai *et al.*, 2004). Die zweite Cystatin-ähnliche Domäne des Fisch-Fetuin-A weist zu der entsprechenden Domäne des humanen Fetuin-A mehr identische Reste auf, als zu der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne der *Homo sapiens* Sequenz (4.9.2.1). Im Zuge der Vergleiche der einzelnen Cystatin-ähnlichen Domänen wurden die von Tsai und Mitarbeitern angegebenen Sequenzbereiche Tyr²⁷ bis Asp¹⁴⁴ und Cys¹⁴⁵ bis His²⁶⁰ neu eingeteilt. Die erste Cystatin-ähnliche Domäne wird nun durch die Aminosäuren Val²⁵ bis Asp¹²⁹ gebildet. Die zweite Domäne umfassen die Reste Thr¹⁴⁰ bis Asn²⁵³.

Die ermittelten Modelle der Cystatin-ähnlichen Domänen stellen nur eine vage Strukturvorhersage dar, denn die Primärstrukturen dieser Domänen zeigen nur sehr geringe Sequenzidentitäten zu den verfügbaren Kristallstrukturen von Cystatinen und erreichen im besten Fall 18 %. Für den Erhalt vertrauenswürdiger Modelle sollte die Sequenzidentität mindestens 30 %, besser aber 35 bis 40 % betragen (Šali *et al.*, 2013). Da keine Strukturdaten von Cystatin-ähnlichen Domänen mit höherer Sequenzidentität zur Verfügung standen, wurden diese Modelle dennoch für die Bestimmung von Sekundärstruktur-ausbildenden Bereichen, sowie von Positionen bestimmter Seitenketten herangezogen, die eventuell einen Einfluss auf die Aktivität von Astacinproteasen haben könnten.

5.4.2.1 Disulfidbrücken in Fetuinen

Ein Charakteristikum der Fetuinfamilie sind zwölf konservierte Cysteinreste welche sechs Disulfidbrücken ausbilden (Kellermann *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1992; Valente *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2007; Sigrist *et al.*, 2013). Fünf dieser Disulfidbrücken treten innerhalb der Domänen D1 bzw. D2 auf. Die sechste Disulfidbrücke wird zwischen dem ersten konservierten Cysteinrest in D1 mit dem letzten konservierten Cysteinrest in D3 ausgebildet.

Im Vergleich der vollständigen Fetuin Sequenzen (7.1) liegen auch im Fisch-Fetuin-A alle Cysteinreste an konservierten Positionen oder zumindest in unmittelbarer Nähe dazu. In den modellierten Strukturen lassen die Abstände zwischen den konservierten Cysteinen darauf schließen, dass auch in den nativen Strukturen die Disulfidbrücken zwischen den konservierten Cysteinresten gebildet werden können. Während der Abstand zwischen den Cys²³²- und Cys²⁴⁶-C_α-Atomen der letzten hypothetischen Disulfidbrücke im Fisch-Fetuin-A(D2)-1CEW Modell in einem Abstand von 4,06 Å zueinander liegen, beträgt im favorisierten *hsFetuin-B(D2)*-Modell (d.h. modelliert mit Hilfe der Cystatin D Daten) der Abstand 7,41 Å. Für die Ausbildung von Disulfidbrücken sollte die Distanz zwischen den beiden C_α-Atomen zwischen 3,8 Å und 6,8 Å liegen (Fass, 2012). Demnach wird die letzte Disulfidbrücke in der zweiten Domäne des Fetuins-B wahrscheinlich nicht ausgebildet. Doch dieses Manko führe ich auf ungenügende Übereinstimmung mit der verwendeten pdb-Vorlage zurück. Durch die Bildung der letzten Disulfidbrücke in den zweiten Domänen der Fetuine A fällt der *hairpin loop* L2 – zwischen den β-Faltblättern β₄ und β₅ – deutlich kürzer aus. Diese Verkürzung ist nicht in der D2 des Fetuins-B-1ROA Modells zu beobachten, wodurch sich die beiden Cysteinreste auch nicht ausreichend annähern können. In dem Modell der 1CEW-Vorlage wäre dies der Fall.

Im den Fetuinen-A und -B der *Teleostei* sind ein, bzw. zwei zusätzliche Cysteinreste vorhanden. Diese könnten zu einer Modifikation des typischen Disulfidbrücken-Musters der Fetuine führen. Sie liegen in exponierten Positionen. Es ist vorstellbar, dass die einzelnen Domänen hier dimerisieren und dadurch eine höhere Stabilität der Struktur des nativen Proteins erzielt wird.

Wie oben bereits erwähnt, wurde für humanes Fetuin-A, sowie für das Schlangen-Fetuin HSF die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen dem ersten konservierten Cysteinrest in der ersten Domäne und dem zwölften konservierten Cystein im C-terminalen Teil der dritten Domäne nachgewiesen (Kellermann *et al.*, 1989; Aoki *et al.*, 2007). Somit sind beide Domänen kovalent miteinander verbunden. Die Fisch-Fetuin-A Sequenz weist ebenfalls diese konservierten Cysteinreste auf. Zudem befindet sich der letzte Cysteinrest in einem Motiv,

welches in allen Sequenzen, außer der des Zackenbarsches *Epinephelus coioides*, zu finden ist. Im Fetuin-A der Säuger, der Schlangen und des Knorpelfischs folgt auf die Cys-Pro-Gly-Sequenz eine basische Aminosäure. Bei den Fetuinen B der Säuger und des Amerikanischen Flussbarsches (*Perca flavescens*) folgt auf diese Sequenz ein Prolin. Von diesen vier Aminosäuren sind bei den Fetuinen der Karpfenartigen nur zwei oder drei konserviert. Dennoch kann angenommen werden, dass im Fisch-Fetuin-A diese Disulfidbrücke ebenfalls vorhanden ist.

5.4.2.2 Die dritte Domäne der Fetuine

Alle Fetuine besitzen eine dritte Domäne, deren Sequenzen keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweisen. Verglichen mit der Kapfen-Fetuin-A D₃-Sequenz fehlen innerhalb der Kapfen-Fetuin S D₃-Sequenz 164 Aminosäuren. Die letzten 36 Reste des C-terminalen Bereichs sind in beiden Fetuinformen – bis auf drei Austausch – identisch. Charakteristisch für diese inserierte Sequenz sind zwei sich wiederholende Motive (Tsai *et al.*, 2004) mit einem hohen Gehalt der Aminosäuren Pro (18,9 %), His (14,6 %), Gly (14,0 %), Asp und Glu (16,5 %), sowie Arg und Lys (17,7 %). Aufgrund des hohen Histidin- und Prolingehalts zeigen die dritten Domänen der *Teleostei* Fetuine eine größere Ähnlichkeit zu den dritten Domänen der Histidin-reichen Glykoproteine als die Fetuine der Säugetiere. Die Funktion dieser Region ist bisher noch ungeklärt. Für HRG wurde gezeigt, dass allein das His/Pro-reiche Fragment anti-angiogene Wirkung hat (Borza *et al.*, 1996; Olsson *et al.*, 2004; Rydengård *et al.*, 2007). Über komplexiertes Zn²⁺ Heparansulfate kann dieser Bereich an der Zelloberfläche von Endothelzellen binden und durch Induktion der Apoptose dieser Zellen der Angiogenese entgegen wirken (Juarez *et al.*, 2002; Doñate *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2004; Vanwildemeersch *et al.*, 2006). Zudem wird diesem Fragment eine antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien zugeschrieben (Bosshart & Heinzelmann, 2003; Rydengård *et al.*, 2007). Aus diesen Beobachtungen erwächst die Frage, ob nicht auch die Insertsequenz des Fisch-Fetuin-A eine bestimmte Funktion ausübt, welche außerdem während der Aktivierung des Inhibitors entfernt werden könnte (siehe 5.6).

5.4.2.3 Weitere Strukturmerkmale

Für die hemmende Wirkung der potenten Cysteinproteinaseinhibitoren, den Stefinen und Cystatinen, sind die beiden Haarnadelschleifen – mit den Motiven QXVXG in der Scheitelregion der ersten Haarnadelschleife des zentralen β -Faltblatts, sowie das PW-Motiv des zweiten *loops* – durch die Bindung in der Substratbindungsspalte von Cysteinproteinasen von entscheidender Bedeutung (Abrahamson *et al.*, 1987; Turk & Bode, 1991; Björk *et al.*, 1996). Das inhibitorische QXVXG-Motiv ist in den Cystatin-ähnlichen Domänen der Typ III Cystatine Fetuin-B (D₂) und Kininogen (D₂ und D₃) und teilweise in den D₂ der Säuger Fetuine A enthalten. In den ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Typ III Cystatine ist dieses Motiv gar nicht oder nur rudimentär vorhanden. In den Scheitelregionen der beiden Haarnadelschleifen L₁ und L₂ der Modelle sind hingegen oft geladene Reste zu finden. Beide *loops* der ersten Fisch-Fetuin-A Domäne, sowie L₂ der zweiten Domäne enthalten negativ geladene Reste. Letzterer *loop* ist besonders reich an Glutamatresten.

Aufgrund der Stammbaumanalyse kann man auf eine gemeinsame Vorstufe der Cystatin-ähnlichen Domänen schließen, welche bereits das QXVXG-Motiv enthielt. Es ist wahrscheinlich, dass dieses Motiv im Laufe der Evolution modifiziert wurde und schließlich

verloren gegangen ist, wie es in den meisten Cystatin-ähnlichen Domänen von Typ III Cystatinen, ausgenommen der zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen des Fetuins-B, sowie den D₂ und D₃ der Kininogene, die demnach die ursprünglicheren Formen darstellen, der Fall ist.

Für die Fetuine wird mit der Sequenz [ND]XLETXCHL ein anderes Motiv als charakteristisches Merkmal dieser Familie beschrieben (Olivier *et al.*, 2000; Sigrist *et al.*, 2013). Im Fetuin-A der Säuger ist dieses Motiv an der Bindung von Calcium-Phosphatkristalliten beteiligt und spielt bei der Mineralisierung eine Rolle. In anderen Fetuinen und Cystatinen ist diese Funktion nicht konserviert. Daher war eine starke Abgewandlung dieser Sequenz zu erwarten. Dennoch ist es aufgrund dieser Sequenz möglich, neue Vertreter dieser Familie den Fetuinen A oder B zuzuordnen (Olivier *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008). Zwar fehlt der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne der Fisch-Fetuin-A der N-terminale Aspartatrest, doch das verlängerte Fetuin-Motiv (DPTP) der Fetuin-A ist aufgrund der zwei konservierten Proline im Fisch-Fetuin-A vorhanden (Abbildung 37; Tsai *et al.*, 2004). Ebenso können die Fetuine aus Schlangengiften und aus dem Knorpelfisch den Fetuinen-A zugeordnet werden, wogegen die Cystatin-domänen der HRGs mehr den Domänen der Fetuin-B ähneln. Zumindest die erste Domäne der Fetuin-B und des HRGs hatten wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorläufer.

Wahrscheinlich ist dieses Fetuin-Motiv erst später, durch positive Selektion, entstanden. In den erstellten Strukturen ist dieses Motiv im C-terminalen Bereich des dritten β -Faltblattes lokalisiert. Der enthaltene Cysteinrest bildet wahrscheinlich eine Disulfidbrücke zu dem folgenden, in den Modellen sehr unterschiedlich strukturierten Bereich aus.

Je nach dem, welche Vorlage für die Vorhersage verwendet wurde, unterscheiden sich die modellierten Strukturen in dem *circa* 25 Aminosäuren umfassenden Bereich, der auf das Fetuin-Motiv folgt. Alle Strukturen, mit Ausnahme der zweiten Domäne des Fetuins-B, besitzen dort, zwischen den beiden β -Stängen β_3 und β_4 des Faltblattes, eine zweite α -Helix, welche in den mit Hilfe des Cystatins D berechneten Modellen fehlt (Abbildung 38). In letzteren Modellen ist dieser Bereich sehr ausladend und sollte daher von Außen leicht angreifbar sein. Zudem könnte dieser Bereich relativ flexibel sein. In allen Cystatin-ähnlichen Domänen der untersuchten Fetuine befindet sich in dieser Region ein negativ geladener Rest. In der ersten Domäne des Fetuins-A ist der Abstand von dem Glutamat bis zum Beginn des β_4 -Faltblattstrangs am geringsten. Daher erscheint dieser Bereich rigider, als in den ersten Domänen des Fisch-Fetuins-A oder des Fetuins-B.

Durch vielen, nach außen gerichteten, negativ geladenen Reste des β -Faltblatts in der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne, kann Säuger-Fetuin-A als Carrier für Calciumphosphat aus dem Serum fungieren (Heiss *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2003; Heiss *et al.*, 2008; Jahn-Dechent *et al.*, 2011). Fisch-Fetuin-A und Fetuin-B besitzen diese Eigenschaften nicht und übernehmen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit andere Aufgaben im Organismus.

Da Fisch Fetuin-A als Inhibitor der Meprine identifiziert werden konnte (Abbildung 28 und Abbildung 30; Hedrich *et al.*, 2010) und Meprine, wie die meisten Astacinproteasen, negativ geladene Reste in der S₁' Substratbindungstasche präferieren (Becker-Pauly *et al.*, 2011), wurden einige dieser Reste in den Modellen genauer betrachtet. In unserer Veröffentlichung wurde für die Inhibitionsversuche bovines Fetuin eingesetzt (Hedrich *et al.*, 2010). Dabei

handelte es sich jedoch um ein Gemisch aus Fetuin-A und Fetuin-B. Konstantin Karmilin konnte bereits zeigen, dass Fetuin-B, jedoch nicht Fetuin-A, Astacinproteinasen hemmt (Karmilin *et al.*, 2016; unveröffentlicht). Daher sollten im Sequenzvergleich die Positionen, die in den Fisch-Fetuin-A- und *hsFetuin-B*-Sequenzen negativ geladene Reste enthalten, aber keine geladenen Reste in der Säuger-Fetuin-A-Sequenz tragen, näher betrachtet werden.

Der im Fetuin-Motiv der zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen des Fisch-Fetuin-A und des humanen Fetuin-B liegende Glutamatrest (Glu²⁰⁴ im Fisch-Fetuin-A) wurde als möglicher Kandidat identifiziert. Die Strukturmodelle dieser Domänen zeigten jedoch, dass dieser Rest für eine Proteinase nicht zugänglich sein kann, wenn die Cystatin-ähnlichen Domänen wirklich diese Konformationen annehmen, da dieser Rest in einer Senke liegt, welche durch den C-terminalen Bereich der α 1-Helix und dem u₃-Bereich (zwischen der α 2-Helix und dem β ₄-Faltblatt) gebildet wird.

Zwei weitere Bereiche kommen für die inhibitorische Aktivität des Fisch-Fetuin-A in Frage. Zum einen weisen alle modellierten Domänen einen weiten Bereich ohne Sekundärstrukturen auf, der in allen Fällen einen Glutamat- oder Aspartatrest enthält. Zusätzlich liegt in dem Bereich in der Fisch-Fetuin-A-Sequenz ein Glutaminrest vor, welcher für die Inhibition von Nephrosin verantwortlich sein könnte. Zum andern weisen nur die α -Helices der zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen von Fisch-Fetuin-A und *hsFetuin-B* mit Glu¹⁵⁸, bzw. Glu¹⁶⁹ nach außen gerichtete, negativ geladene Reste auf.

Für letztere These spricht die Beobachtung von Tsai und Mitarbeitern, dass bestimmte Bereiche des Fisch-Fetuin-A im Komplex mit Nephrosin nicht zugänglich für Trypsin sind (Abbildung 44). Folglich müssen diese Schnittstellen im Inhibitionskomplex im engen Kontakt mit Nephrosin vorliegen.

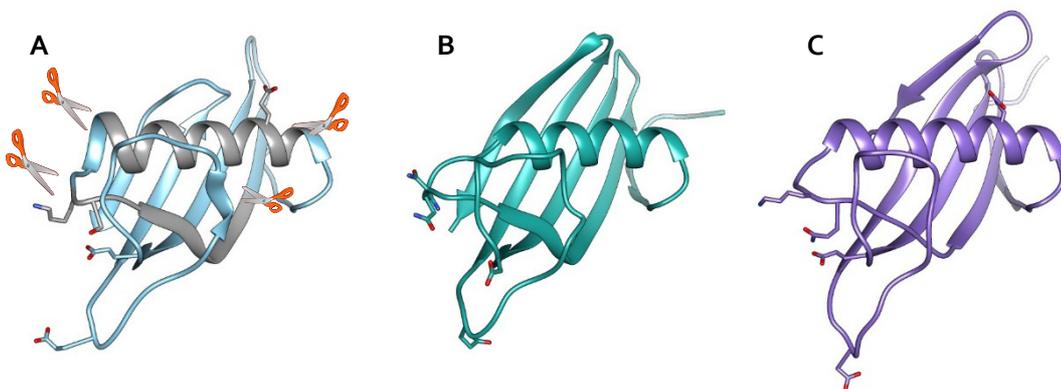


Abbildung 44: Schnittstellen der zweiten Fisch-Fetuin-A Domäne, die im Komplex mit Nephrosin nicht durch Trypsin hydrolysiert werden.

Tsai et al. konnten durch Trypsinierung von nativem Fisch-Fetuin-A und des Inhibitionskomplexes mit Nephrosin die Fragmente Lys¹⁵⁵ - Lys¹⁶⁶, Lys¹⁶¹ - Lys¹⁶⁹ und Lys¹⁷⁴ - Arg¹⁸⁴ nur in ungebundenem Fetuin-A nachweisen (*Tsai et al.*, 2004). Schnittstellen sind in Form von Scheren dargestellt. Zum Vergleich sind die D₂ von humanem Fetuin-A (B) und humanem Fetuin-B (C) in gleicher Orientierung wie Fisch-Fetuin-A-D₂ (A) dargestellt

5.4.2.4 Mögliche Anordnungen der Domänen zueinander

Die modellierten Strukturen der einzelnen Domänen können zwar Anhaltspunkte auf mögliche inhibitorische Bereiche bieten, sollten aber dennoch kritisch betrachtet werden. Zum einen ist die geringe Sequenzähnlichkeit zu den verwendeten Vorlagen zu berücksichtigen, wodurch einzelne Bereiche in ihrer räumlichen Anordnung von den bisher bekannten Strukturen abweichen können. Dies kann sich beispielsweise in der Verkürzung der einzelnen *loops* widerspiegeln, wie es auch in einigen Modellen der Fall war. Zum anderen ist unklar, wie sich die Domänen in der nativen Faltung zueinander anordnen.

Latexin, ein anderes Mitglied der Cystatin-Superfamilie, besitzt ebenfalls zwei Cystatin-ähnliche Domänen, die sich so zusammen lagern, dass beide α -Helices gegenläufig zueinander liegen (Aagaard *et al.*, 2005a; Pallarés *et al.*, 2005a). Die β -Faltblätter liegen nach außen gerichtet und schirmen die beiden Helices vom Außenmilieu ab. Die Region zwischen diesen beiden Domänen ist um zehn Reste länger als bei Fetuinen und bildet eine α -Helix aus. Durch den Austausch dieser Region im Fisch-Fetuin-A konnte dessen Domänenorganisation der beiden Cystatin-ähnlichen Domänen nach der Latexinstruktur modelliert werden. Allerdings weist der Metalloprotease-Inhibitor Latexin keine Cysteinreste in Positionen auf, die denjenigen der konservierten Cysteine der Typ II und III Cystatine vergleichbar wären. Dies wurde bei der Strukturmodellierung berücksichtigt. Aufgrund der nicht vorhandenen Cysteine im Latexin, sowie des Austauschs des Bereichs, der die beiden Domänen miteinander verbindet, ist dieses Modell nur als grobe Skizze einer eventuellen Domänenanordnung in den Fetuinen anzusehen. Sollte sich beide Cystatin-ähnlichen Domänen ähnlich wie im Latexin anordnen, so wäre die negativ geladene Seitenkette (Glu¹⁵⁸) in der α -Helix der zweiten Domäne höchst wahrscheinlich ins Innere des Inhibitors gerichtet und könnte daher keine inhibitorische Funktion ausüben.

Eine weitere Möglichkeit der Anordnung der Cystatin-ähnlichen Domänen zueinander wäre die dimerisierter Cystatine. Durch eine "Öffnung" der Struktur fehlt ihnen der erste *loop* (L1), wodurch die Fähigkeit zur Inhibition von C1 Cysteinproteinasen, wie beispielsweise Papain, verloren geht. Hier liegt der Bereich, der sonst β_2 des β -Faltblatts ausbildet parallel zu den β_3 und β_4 des zweiten Cystatins. Mit dieser Anordnung der Domänen zueinander hätte Fisch-Fetuin-A eine weniger globuläre Form und mehr Aminosäuren wären auf der Oberfläche des Inhibitors exponiert. Die Trypsinschnittstellen (Abbildung 44) sind in diesem Modell über die ganze Struktur verteilt. Daher sehe ich diese Konformation als weniger wahrscheinlich an.

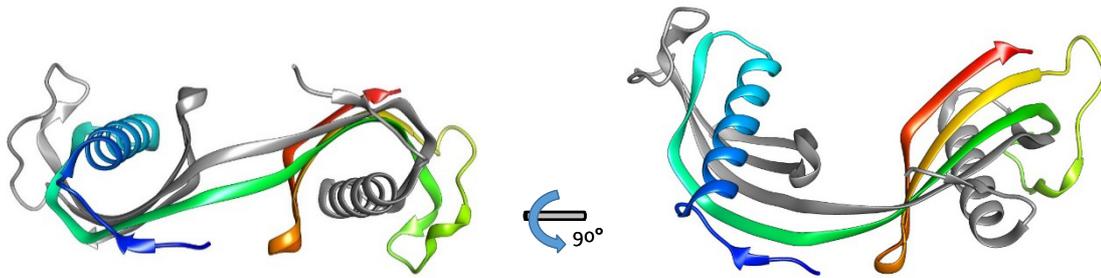


Abbildung 45: Bänderdarstellung von dimerisiertem humanem Cystatin C.

Dargestellt sind zwei N-terminal trunke Cystatin C Moleküle (1R4C.pdb, Janowski et al., 2004). Dabei ist ein Molekül von seinem N- bis zu seinem C-Terminus von blau bis rot gefärbt. Das zweite Molekül ist in grau gehalten

5.5 STAMMBAUMANALYSE

Für die Stammbaumanalyse (Abbildung 43) wurde die Fetuin-S Sequenz des Karpfens nicht berücksichtigt, denn sie weist eine hohe Sequenzidentität zum Fetuin-L des Karpfens auf. Beide Fetuine unterscheiden sich durch siebzehn Aminosäureaustausche, die über die ganzen Sequenzen verteilt sind. Daher kann es sich hier nicht um verschiedene Splicevarianten eines Gens handeln. Vermutlich ist die zweite Fetuin-Form aus einer Verdopplung des Karpfengenoms hervorgegangen (Chistiakov & Voronova, 2009).

In dem Stammbaum bilden die intrazellulären Stefine eine einzelne Klade. Da sie aus nur einer Domäne bestehen und außerdem kein Signalpeptid und auch keine konservierten Cystine aufweisen, werden sie als sehr ursprüngliche Formen der Cystatine angesehen (Bobek & Levine, 1992; Kordiš & Turk, 2009; Rawlings & Barrett, 1990). Der gezeigte Stammbaum bestätigt dies. Die Typ I Cystatine repräsentieren ursprünglichen Proteasehemmstoffe und es ist davon auszugehen, dass alle Domänen ursprünglich Hemmstoffe waren, doch einige diese Eigenschaft im Laufe der Evolution verloren haben.

Cystatine des zweiten Typs, die mit den Stefinen einen unmittelbaren gemeinsamen Vorläufer haben, werden mit Hilfe ihrer Signalpeptide aus den Zellen ausgeschleust und besitzen wie die Stefine das Cystatin-Motiv QXVXG. Sie sind in verschiedenen Geweben oder Körperflüssigkeiten zu finden, wo sie unterschiedliche Aufgaben übernehmen (Abrahamson et al., 2003). Ihnen sind konservierte, Disulfidbrücken-ausbildende Cysteine gemein. Die Cystatine C verschiedener Säugetiere bilden eine eigene Klade. Dabei steht bovines Cystatin C separat, denn der verwendeten Sequenz fehlen im Vergleich zu den anderen Cystatinen C N-terminal einige Aminosäuren. Cystatin C ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, dessen Konzentration in der Samenflüssigkeit und der Cerebrospinalflüssigkeit am höchsten ist (Barrett et al., 1984; Abrahamson et al., 1986).

Anders, als in dem von Abrahamson und Mitarbeitern veröffentlichten Stammbaum, in dem sich im Laufe der Evolution zuerst Cystatin D und erst anschließend Cystatin C von den Cystatinen SN, SA und S entfernt hat (Abrahamson et al., 2003), steht in der Abbildung 43 Cystatin D den Cystatinen S, SN und SA näher. Cystatin D wird von der Ohrspeicheldrüse als Speichel sezerniert und konnte außerdem in der Tränenflüssigkeit detektiert werden (Freije et al., 1991; Freije et al., 1993). Auch die Cystatine S, SN und SA wurden aus diesen Körperflüssigkeiten isoliert (Isemura et al., 1984; Saitoh & Isemura, 1993; Dickinson, 2002).

Aufgrund der Expressionsorte dieser Cystatine erscheint die hier dargestellte evolutionäre Entwicklung als naheliegender. Von diesen vier Inhibitoren wurden nur humane Cystatine für die Stammbaumerstellung verwendet.

Das Glykoprotein Cystatin F hat aufgrund seiner Expression durch hämatopoetische Zellen eine immunologische Funktion (Halfon *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2000). Cystatin E/M ist ebenfalls glykosyliert wird von epidermalen Keratinocyten und in Schweißdrüsen exprimiert (Ni *et al.*, 1997; Stenman *et al.*, 1997; Zeeuwen *et al.*, 2001). Es konnte beispielsweise in der Leber und dem Ovar nachgewiesen werden. Daher wird ihm eine Schutzfunktion während der fötalen Entwicklung zugeschrieben (Ni *et al.*, 1997). In dem Phylogramm (Abbildung 43) hat Cystatin M einen gemeinsamen Vorläufer mit den Domänen der Typ III Cystatine. Auch diese Domänen weisen konservierte Disulfidbrücken auf. Dies könnte ein Anhaltspunkt für die ursprüngliche Funktion dieser Cystatine sein.

Da die Typ II und Typ III Cystatine ein gemeinsames Vorläuferprotein haben und sie alle über konservierte Disulfidbrücken verfügen, kann der gezeigte Stammbaum die These widerlegen, dass die Disulfidverknüpfungen der Typ II und III Cystatine unabhängig voneinander entstanden sein sollen (Rawlings & Barrett, 1990). Zudem wird die Aussage von Wong und Mitarbeitern gestützt, dass einmal erworbene Disulfidbrücken-ausbildende Cysteinreste evolutionär stark konserviert sind (Wong *et al.*, 2011). Während Typ II Cystatine vier konservierte Cysteinreste aufweisen, sind es in den ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Typ III Cystatine fünf und in deren zweiten Domänen sogar sechs konservierte Cysteine. Die zweite Domäne der HRGs stellt mit nur drei konservierten Resten eine Ausnahme dar. Aufgrund einer auffallenden Lücke innerhalb dieser Sequenzen im Alignment kann man auf eine Deletion und den damit verbundenen Verlust des einen konservierten Cysteinrestes schließen.

Die beiden Cystatin-ähnlichen Domänen D2 und D3 der Kininogene stehen getrennt von den Domänen aller anderen Typ III Cystatine. Das Cystatin typische PW Motiv ist in der dritten Cystatin-ähnlichen Domäne von Kininogenen zu finden. In ihrer zweiten Domäne hingegen, ist das Typ II-typische QXVXG-Motiv der Cystatine enthalten. Durch die konservierten Cysteine und das daraus resultierende mögliche Disulfidbrückenmuster (Abbildung 6) zeigen Kininogene eine sehr große Ähnlichkeit zu den zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen anderer Typ III Cystatine.

Gleiches gilt für die zweiten Domänen der Fetuine B. Auch diese Domänen haben im Laufe der Evolution weniger Veränderungen erfahren; sie besitzen das unveränderte QXVXG-Motiv und drei Disulfidbrücken. Der Stammbaum zeigt, dass diese Domänen ein gemeinsames Vorläuferprotein mit den zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine A haben. Gemeinsam haben sie sich zuvor in ihrer Entwicklung von der Evolution der Domänen der HRGs und der ersten Domänen der Fetuine A und B entfernt.

Die ersten, zweiten und dritten Cystatin-ähnlichen Domänen der Typ II Cystatine (Fetuine, HRGs und Kininogene) bilden in dem dargestellten Stammbaum (Abbildung 43) Cluster. Das heißt, sie sind sich ähnlicher, als die einzelnen Domänen innerhalb eines dieser Proteine. Den ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Kininogene fehlen die QXVXG und PW Motive. Im Vergleich der Kininogen-Domänen untereinander, hat die D1 die meisten Veränderungen im

Laufe der Evolution erfahren ($D_3 < D_2 < D_1$). Viele Veränderungen weisen auf eine Spezialisierung einer Funktion hin (persönliche Mitteilung von Dr. Holger Herlyn). Alle ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Typ III Cystatine zeigen keine inhibitorische Aktivität gegenüber Cysteinproteinasen wie beispielsweise Papain (Salvesen *et al.*, 1986 und Abschnitte 4.8.4 und 5.2.1). Demnach sind sie wahrscheinlich auf andere Aufgaben spezialisiert. Die ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Schlangen- und Säuger-Fetuine A weisen die größte Distanz um Ursprung des Phylogramms auf und haben demnach die meisten Austausche im Laufe der Evolution erfahren. Auch die Abbildung 37 zeigt, dass diese Domänen nur noch geringe Ähnlichkeit zu ursprünglicheren Sequenzen, wie beispielsweise der Kininogen-D₃, aufweisen. Da den ersten Domänen der Schlangen Fetuin A eine inhibitorische Aktivität gegenüber den SVMPs der Adamalysinfamilie nachgewiesen werden konnte (Aoki *et al.*, 2007) und diese Klade in dem dargestellten Phylogramm in enger Verwandtschaft zu den ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Säuger-Fetuine-A stehen, sollte eine Hemmung von verschiedenen Adamalysinen durch Fetuin-A geprüft werden. Proteasen der Astacinfamilie kann das Fetuin-A der Säuger nicht hemmen. Mit seiner ersten Cystatin-ähnlichen Domäne ist es jedoch in der Lage die Kalzifizierung von Gewebe zu unterbinden (Schinke *et al.*, 1996).

In dem dargestellten Stammbaum haben die zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen der Histidinreichen Glykoproteine einen gemeinsamen Ursprung mit den ersten Domänen der Typ III Cystatine. Im Folgendem haben sich dann die ersten Cystatin-ähnlichen Domänen der Kininogene gesondert entwickelt.

Die ersten Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuin-B und HRG stehen in engerer Verwandtschaft zueinander als zu der entsprechenden Domäne von Fetuin-A. Dies wurde bereits von Hsu heraus gestellt und kann durch diesen Stammbaum bestätigt werden (Hsu *et al.*, 2004). Auf den Chromosomen der Maus (Chromosom 16) und des Menschen (Chromosom 3) liegen die Gene für Kininogen, HRG, Fetuin-B und Fetuin-A in der genannten Reihenfolge neben einander (Lee *et al.*, 2009). Durch Genduplikation kann es zu der Bildung dieser Typ III Cystatine, und insbesondere die enge Beziehung zwischen Fetuin-B und dem Histidinreichen Glykoprotein gekommen sein. Warum jedoch genau dieser Bereich mehrfachen Genduplikationen unterlag, die schließlich zu diesen mehr oder weniger eng verwandten Proteinen führte, ist unklar.

Innerhalb der ersten und zweiten Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine ist eine klare Differenzierung zwischen den einzelnen Klassen der verglichenen Spezies zu erkennen. Der Stammbaum der Fische von Betancur-R. weist die Gruppe der Barschartigen als eine eher junge Gruppe aus, von der die Abspaltung der *Cypriniformes* relativ früh erfolgte (Betancur-R *et al.*, 2013). Diese Beziehung wird durch die zweite Cystatin-ähnliche Domäne der Fetuine B in der Abbildung 43 widerspiegelt, wo die Fetuine der Karpfenartigen gruppiert werden und sich die Sequenzen der weitläufigen Gruppe der *Percomorpharia* abgespalten haben. Am Ursprung der Entwicklung der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne des Fetuins-A hat sich als erstes die Fetuinsequenz des Knorpelfischs abgespalten. Auch dies entspricht Beschreibungen anderer Veröffentlichungen (Sidow, 1996; Donoghue & Purnell, 2005). Es folgte die gesonderte Evolution der Knochenfisch-Fetuine. Erst dann gliedern sich die

Cystatin-ähnlichen Domänen der Fetuine A in die beiden Kladen der *Mammalia* und der *Lepidosauria*-Fetuine A-D2 bzw. D1 auf.

Da hier verschiedene Domänen verschiedener Proteinfamilien verglichen wurden, von denen nicht in jedem Fall entsprechenden Proteine der gleichen Spezies vorlagen (die Fetuine der Schlangen ähneln den Fetuinen-A, jedoch keines dem Fetuin-B), ist die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes schwierig. Auch unterschiedliche Sequenzlängen, wie bei bovinem Cystatin F, bovinem HRG (Domäne 2) oder der zweiten Fetuin-B Domäne des Amerikanischen Flußbarsches *Perca flavescens*, können sich auf die Eingliederung in den Stammbaum ausgewirkt haben. Ebenso kann der Verlust eines Sequenzbereichs der HRG-D2 (s.o.) die Bestimmung der Position im Stammbaum erschweren oder gar verfälschen.

Neu ist die Beobachtung, dass die Domänen der Typ III Cystatine einen gemeinsamen Ahnen mit dem Cystatin E/M haben könnten. Zwar hat dieses Cystatin eine immunologische Funktion und auch den Typ III Cystatinen wird aufgrund ihrer Regulation als Negativ-Akut-Phase Proteine eine Funktion in der Immunabwehr unterstellt, doch wurde dies bisher in keinem mir bekannten Stammbaum gezeigt.

Brown und Dziegielewska äußerten die Vermutung, dass der Ahne der Fetuine ein zwei-Domänen Protein mit Cystatin-Aktivität war (Brown & Dziegielewska, 1997). Wahrscheinlich kam es erst zu einer Duplikation dieser Typ III-Urdomäne. Dabei entspricht die zweite Cystatin-ähnliche Domäne im größeren Maße dieser Urform, als die D1, denn in den modernen Typ III D2 sind meist noch mehr Aminosäuren des QXVXG Motivs vorhanden (Abbildung 37). Aus dem Gen des Mehrdomänen-Proteins haben sich dann die verschiedenen Typ III Cystatine entwickelt. Für diese These spricht die Beobachtung, dass die ersten Domänen der Fetuine in allen Fällen etwas mehr Veränderungen in ihren Sequenzen erfahren haben, als ihre zweiten Domänen. Außerdem besitzen alle Typ III Cystatine das CPG-Motiv im C-terminalen Bereich der Primärstruktur. Im C-terminalen Bereich von Typ II Cystatinen kann höchstens CP gefunden werden. Auch in der Veröffentlichung von Kordiš und Turk, die vollständige Sequenzen verglichen haben, werden die hier beobachteten Verwandtschaftsverhältnisse der Fetuine und HRGs, insbesondere bei den D1, dargestellt (Kordiš & Turk, 2009).

5.6 FAZIT

In dieser Arbeit wurde Fisch-Fetuin-A des Karpfens auf seine inhibitorische Aktivität gegenüber Proteasen der Astacinfamilie und anderer Proteaseklassen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das heterolog exprimierte Protein inhibitorisch aktiv war, am besten gegen die physiologische Zielprotease Nephrosin. Darüberhinaus werden auch, andere Mitglieder der Astacinprotease-Familie gehemmt, nämlich Meprin α , Meprin β und Astacin.

Aufgrund der starken Bindung von Nephrosin ist anzunehmen, dass Fisch-Fetuin-A im Organismus die spezifische Regulation dieser Astacinprotease übernimmt.

Der Mechanismus der Hemmung ist noch unbekannt. Erste Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass es sich vermutlich nicht um den klassischen Cystatin Mechanismus handelt. Demnach besitzen Typ II Cystatine wie Fetuine offenbar noch andere, bislang unbekannte reaktive Zentren zur Inaktivierung proteolytischer Enzyme.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard, Anna; Listwan, P.; Cowieson, N.; Huber, Thomas; Ravasi, T.; Wells, Christine A.; Flanagan, J. U.; Hume, D. A.; Kobe, B.; Martin, J. L. (2005a) Crystal structure of mouse Latexin (tissue carboxypeptidase inhibitor).
- Aagaard, Anna; Listwan, Pawel; Cowieson, Nathan; Huber, Thomas; Ravasi, Timothy; Wells, Christine A.; Flanagan, Jack U.; Kellie, Stuart; Hume, David A.; Kobe, Bostjan; Martin, Jennifer L. (2005b) An Inflammatory Role for the Mammalian Carboxypeptidase Inhibitor Latexin: Relationship to Cystatins and the Tumor Suppressor TIG1. *Structure (London, England : 1993)* 13 (2), 309–317.
- Abali, Remzi; Celik, Cem; Tasdemir, Nicel; Guzel, Savas; Alpsoy, Seref; Yuksel, Aytac; Celik, Elcin (2013) The serum protein α 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-a concentration and carotid intima-media thickness in women with polycystic ovary syndrome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 169 (1), 45–49.
- Abe, K.; Emori, Y.; Kondo, H.; Suzuki, K.; Arai, S. (1987) Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *The Journal of biological chemistry* 262 (35), 16793–16797.
- Abrahamson, Magnus; Alvarez-Fernandez, Marcia; Nathanson, Carl-Michael (2003) Cystatins; Review. *Biochemical Society symposium* (70), 179–199.
- Abrahamson, Magnus; Barrett, Alan J.; Salvesen, Guy S.; Grubb, A. (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *The Journal of biological chemistry* 261 (24), 11282–11289.
- Abrahamson, Magnus; Ritonja, A.; Brown, M. A.; Grubb, A.; Machleidt, W.; Barrett, Alan J. (1987) Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *The Journal of biological chemistry* 262 (20), 9688–9694.
- ACD/Labs (1994-2010) ACD/ChemSketch. Version 12.01. Advanced Chemistry Development, Inc., www.acdlabs.com.
- Addison, Melisande L.; Minnion, James S.; Shillito, Joy C.; Suzuki, Keisuke; Tan, Tricia M.; Field, Benjamin C T; Germain-Zito, Natacha; Becker-Pauly, Christoph; Ghatei, Mohammad A.; Bloom, Stephen R.; Murphy, Kevin G. (2011) A role for metalloendopeptidases in the breakdown of the gut hormone, PYY 3-36. *Endocrinology* 152 (12), 4630–4640.
- Agilent Technologies (2012) QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit - Instruction Manual Revision DAgilent Technologies, <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200518.pdf>, 25.09.2013.
- Agilent Technologies (2013) QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit - Instruction Manual Revision D.01Agilent Technologies, <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200523.pdf>, 17.09.2013.

- Alvarez-Fernandez, Marcia; Barrett, Alan J.; Gerhartz, Bernd; Dando, Pam M.; Ni, Jian; Abrahamson, Magnus (1999) Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins is Due to a Novel Second Reactive Site. *The Journal of biological chemistry* 274 (27), 19195–19203.
- Alvarez-Fernandez, Marcia; Liang, Y. H.; Abrahamson, Magnus; Su, Xiao-Dong (2004) Structure of human cystatin D.
- Alvarez-Fernandez, Marcia; Liang, Yu-He; Abrahamson, Magnus; Su, Xiao-Dong (2005) Crystal Structure of Human Cystatin D, a Cysteine Peptidase Inhibitor with Restricted Inhibition Profile. *The Journal of biological chemistry* 280 (18), 18221–18228.
- Amour, Augustin; Slocombe, Patrick M.; Webster, Ailsa; Butler, Michael; Knight, C. G.; Smith, Bryan J.; Stephens, Paul E.; Shelley, Chris; Hutton, Mike; Knäuper, Vera; Docherty, Andrew J.; Murphy, Gillian (1998) TNF- α Converting Enzyme (TACE) is Inhibited by TIMP-3. *FEBS letters* 435 (1), 39–44.
- Aoki, Narumi; Deshimaru, Masanobu; Kihara, Kenji; Terada, Shigeyuki (2009) Snake fetuin: isolation and structural analysis of new fetuin family proteins from the sera of venomous snakes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 54 (4), 481–490.
- Aoki, Narumi; Deshimaru, Masanobu; Terada, Shigeyuki (2007) Active Fragments of the Antihemorrhagic Protein HSF from Serum of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 49 (5), 653–662.
- Aoki, Narumi; Tsutsumi, Kadzuyo; Deshimaru, Masanobu; Terada, Shigeyuki (2008) Properties and cDNA cloning of antihemorrhagic factors in sera of Chinese and Japanese mamushi (*Gloydius blomhoffii*). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 51 (2), 251–261.
- Ardelt, Wojciech; Laskowski, Michael, Jr. (1985) Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same ...Leu18-Glu19 ... reactive site. *Biochemistry* 24 (20), 5313–5320.
- Arolas, Joan L.; Broder, Claudia; Jefferson, Tamara; Guevara, Tibisay; Sterchi, Erwin E.; Bode, Wolfram; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph; Gomis-Rüth, F. Xavier (2012) Structural Basis for the Sheddase Function of Human Meprip Metalloproteinase at the Plasma Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (40), 16131–16136.
- Ashida, H.; Yamamoto, K.; Kumagai, H. (2000) Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo- α -N-acetylgalactosaminidase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64 (10), 2266–2268.
- Attwood, M. M. (1969) An investigation into the mode of action of actinonin. *Journal of general microbiology* 55 (2), 209–216.
- Barrett, Alan J.; Davies, M. E.; Grubb, Anders (1984) The Place of Human Gamma-Trace (Cystatin C) Amongst the Cysteine Proteinase Inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 120 (2), 631–636.

- Barrett, Alan J.; Fritz, Hans; Grubb, Anders; Isemura, Satoko; Järvinen, Mikko; Katunuma, Nobuhiko; Machleidt, Werner; Müller-Esterl, Werner; Sasaki, Makoto; Turk, Vito (1986) Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *The Biochemical Journal* 236 (1), 312.
- Barrett, Alan J.; McDonald, J. K. (1986) Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *The Biochemical journal* 237 (3), 935.
- Barrett, Alan J.; Rawlings, Neil D.; Woessner, J. F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes, Vol-1, 2nd London. Elsevier Academic Press. ISBN 9780120796113.
- Becker, Christoph; Kruse, Markus-N; Slotty, Kristina A.; Kohler, Danny; Harris, J. R.; Rosmann, Sandra; Sterchi, Erwin E.; Stöcker, Walter (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biological chemistry* 384 (5), 825–831.
- Becker-Pauly, Christoph; Barré, Olivier; Schilling, Oliver; auf dem Keller, Ulrich; Ohler, Anke; Broder, Claudia; Schütte, André; Kappelhoff, Reinhild; Stöcker, Walter; Overall, Christopher M. (2011) Proteomic Analyses Reveal an Acidic Prime Side Specificity for the Astacin Metalloprotease Family Reflected by Physiological Substrates. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10 (9), M111.009233.
- Becker-Pauly, Christoph; Bruns, Bernd C.; Damm, Olga; Schütte, André; Hammouti, Kada; Burmester, Thorsten; Stöcker, Walter (2009) News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. *Journal of molecular biology* 385 (1), 236–248.
- Becker-Pauly, Christoph; Höwel, Markus; Walker, Tatjana; Vlad, Annica; Aufenvenne, Karin; Oji, Vinzenz; Lottaz, Daniel; Sterchi, Erwin E.; Debela, Mekdes; Magdolen, Viktor; Traupe, Heiko; Stöcker, Walter (2007) The α and β Subunits of the Metalloprotease Meprin Are Expressed in Separate Layers of Human Epidermis, Revealing Different Functions in Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 127 (5), 1115–1125.
- Bekhouche, Mourad; Kronenberg, Daniel; Vadon-Le Goff, Sandrine; Bijakowski, Cécile; Lim, Ngee H.; Font, Bernard; Kessler, Efrat; Colige, Alain; Nagase, Hideaki; Murphy, Gillian; Hulmes, David J. S.; Moali, Catherine (2010) Role of the Netrin-like Domain of Procollagen C-Proteinase Enhancer-1 in the Control of Metalloproteinase Activity. *The Journal of biological chemistry* 285 (21), 15950–15959.
- Bertani, Giuseppe (1951) Studies on Lysogenesis - I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 62 (3), 293–300.
- Bertani, Giuseppe (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P₁, P₂, and other experimental systems. *Journal of bacteriology* 186 (3), 595–600.

- Betancur-R, Ricardo; Broughton, Richard E.; Wiley, Edward O.; Carpenter, Kent; Lopez, J. A.; Li, Chenhong; Holcroft, Nancy I.; Arcila, Dahiana; Sanciangco, Millicent; Cureton II, James C.; Zhang, Feifei; Buser, Thaddaeus; Campbell, Matthew A.; Ballesteros, Jesus A.; Roa-Varon, Adela; Willis, Stuart; Borden, W. C.; Rowley, Thaine; Reneau, Paulette C.; Hough, Daniel J.; Lu, Guoqing; Grande, Terry; Arratia, Gloria; Orti, Guillermo (2013) The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS currents* 5 .
- Beynon, Robert J.; Shannon, J. D.; Bond, Judith S. (1981) Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *The Biochemical Journal* 199 (3), 591–598.
- Bien, Jessica; Jefferson, Tamara; Čaušević, Mirsada; Jumpertz, Thorsten; Munter, Lisa; Multhaupt, Gerd; Weggen, Sascha; Becker-Pauly, Christoph; Pietrzik, Claus U. (2012) The Metalloprotease Meprin Generates Amino Terminal-truncated Amyloid Peptide Species. *The Journal of biological chemistry* 287 (40), 33304–33313.
- Bieth, Joseph G. (1984) In vivo significance of kinetic constants of protein proteinase inhibitors. *Biochemical medicine* 32 (3), 387–397.
- Bijakowski, Cécile.; Vadon-Le Goff, Sandrine; Delolme, Frédéric; Bourhis, Jean-Marie; Lecorche, Pascaline; Ruggiero, Florence; Becker-Pauly, Christoph; Yiallourous, Irene; Stöcker, Walter; Dive, Vincent; Hulmes, David J. S.; Moali, Catherine (2012) Sizzled Is Unique among Secreted Frizzled-related Proteins for Its Ability to Specifically Inhibit Bone Morphogenetic Protein-1 (BMP-1)/Tolloid-like Proteinases. *The Journal of biological chemistry* 287 (40), 33581–33593.
- Bisswanger, Hans (1994) Enzymkinetik, 2., völlig neu bearbeitete Aufl. Weinheim, New York. VCH. ISBN 3-527-30032-5.
- Björk, I.; Brieditis, I.; Raub-Segall, E.; Pol, E.; Håkansson, K.; Abrahamson, Magnus (1996) The importance of the second hairpin loop of cystatin C for proteinase binding. Characterization of the interaction of Trp-106 variants of the inhibitor with cysteine proteinases. *Biochemistry* 35 (33), 10720–10726.
- Black, Roy A.; White, Judith M. (1998) ADAMs: Focus on the Protease Domain; Review. *Current opinion in cell biology* 10 (5), 654–659.
- Bobek, L. A.; Levine, M. J. (1992) Cystatins--inhibitors of cysteine proteinases. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 3 (4), 307–332.
- Bode, Wolfram; Engh, Richard; Musil, Djordje; Thiele, Ulrich; Huber, Robert; Karshikov, Andrej; Brzin, Joze; Kos, Janko; Turk, Vito (1988) The 2.0 Å X-ray Crystal Structure of Chicken Egg White Cystatin and its Possible Mode of Interaction with Cysteine Proteinases. *The EMBO journal* 7 (8), 2593–2599.
- Bode, Wolfram; Gomis-Rüth, F. Xavier; Huber, Robert; Zwilling, Robert; Stöcker, Walter (1992) Structure of Astacin and Implications for Activation of Astacins and Zinc-Ligation of Collagenases. *Nature* 358 (6382), 164–167.

- Bode, Wolfram; Gomis-Rüth, F. Xavier; Stöckler, Walter (1993) Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS letters* 331 (1-2), 134–140.
- Bode, Wolfram; Huber, Robert (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry* 204 (2), 433–451.
- Bode, Wolfram; Wei, A. Z.; Huber, R.; Meyer, E.; Travis, J.; Neumann, S. (1986) X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. *The EMBO journal* 5 (10), 2453–2458.
- Bond, Judith S.; Beynon, Robert J. (1995) the Astacin Family of Metalloendopeptidases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 4 (7), 1247–1261.
- Borza, D. B.; Tatum, F. M.; Morgan, W. T. (1996) Domain structure and conformation of histidine-proline-rich glycoprotein. *Biochemistry* 35 (6), 1925–1934.
- Bosshart, Herbert; Heinzemann, Michael (2003) Endotoxin-neutralizing effects of histidine-rich peptides. *FEBS Letters* 553 (1-2), 135–140.
- Boutet, I.; Long Ky, C L; Bonhomme, F. (2006) A Transcriptomic Approach of Salinity Response in the Euryhaline Teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene* 379 , 40–50.
- Briggs, George E.; Haldane, John B.S. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *The Biochemical Journal* 19 (2), 338–339.
- Broder, Claudia; Becker-Pauly, Christoph (2013) The Metalloproteases Meprin Alpha and Meprin Beta: Unique Enzymes in Inflammation, Neurodegeneration, Cancer and Fibrosis; Review. *The Biochemical Journal* 450 (2), 253–264.
- Brousseau, B.; Coxon, P. Y.; Spatola, J.; Pennington, M. (2012) Enzyme Inhibitors and Substrates Section of Peptides International Catalog Peptides International Inc., www.pepnet.com/ShoppingUsers/PdfDocument.aspx?FileName=EnzymeInhibitorsandSubstrates.pdf, 25.10.2013.
- Brown, W. M.; Dziegielewska, K. M. (1997) Friends and Relations of the Cystatin Superfamily - New Members and Their Evolution. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6 (1), 5–12.
- Brown, W. M.; Dziegielewska, K. M.; Saunders, N. R.; Christie, D. L.; Nawratil, P.; Müller-Esterl, W. (1992) The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family. *European journal of biochemistry / FEBS* 205 (1), 321–331.
- Burkart, Anna D.; Xiong, Bo; Baibakov, Boris; Jimenez-Movilla, Maria; Dean, Jurrien (2012) Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *The Journal of cell biology* 197 (1), 37–44.
- Chistiakov, Dimitry A.; Voronova, Natalia V. (2009) Genetic evolution and diversity of common carp *Cyprinus carpio* L.; Review. *Central European Journal of Biology* 4 (3), 304–312.

- Chu, Ming-Hung; Liu, Kai-Lun; Wu, Hsin-Yi; Yeh, Kai-Wun; Cheng, Yi-Sheng (2011) Crystal structure of tarocystatin–papain complex: implications for the inhibition property of group-2 phytocystatins. *Planta* 234 (2), 243–254.
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* 3 (4), 480–482.
- Copeland, Robert A. (2000) *Enzymes*, 2nd ed New York. Wiley. ISBN 0-471-35929-7.
- Cornish-Bowden A. (1995) *Fundamentals of enzyme kinetics*. Portland Press Ltd., London
- Creighton, Thomas E. (1999) *Encyclopedia of Molecular Biology* New York / Chichester / Weinheim / Brisbane / Singapore / Toronto. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-15302-8.
- Dale, Leslie; Evans, Wayne; Goodman, Shelley A. (2002) Xolloid-related: a novel BMP1/Tolloid-related metalloprotease is expressed during early *Xenopus* development. *Mechanisms of development* 119 (2), 177–190.
- Darawiroj, Damri; Kondo, Hidehiro; Hirono, Ikuo; Aoki, Takashi (2008) Immune-related gene expression profiling of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) kidney cells stimulated with ConA and LPS using microarray analysis. *Fish & shellfish immunology* 24 (2), 260–266.
- De Young, L. M.; Richards, W. L.; Bonzelet, W.; Tsai, L. L.; Boutwell, R. K. (1978) Localization and significance of gamma-glutamyltranspeptidase in normal and neoplastic mouse skin. *Cancer research* 38 (11 Pt 1), 3697–3701.
- Demain, Arnold L.; Vaishnav, Preeti (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27 (3), 297–306.
- Demetriou, M.; Binkert, C.; Sukhu, B.; Tenenbaum, H. C.; Dennis, James W. (1996) Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *The Journal of biological chemistry* 271 (22), 12755–12761.
- Denecke, Bernd; Graber, Steffen; Schäfer, Cora; Heiss, Alexander; Woltje, Michael; Jahnen-Dechent, Willi (2003) Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *The Biochemical Journal* 376 (Pt 1), 135–145.
- Deutsch, H. F. (1954) Fetuin: the mucoprotein of fetal calf serum. *The Journal of biological chemistry* 208 (2), 669–678.
- Dickinson, D. P. (2002) Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making--but to what purpose? *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 13 (6), 485–508.
- Dietzel, Eileen; Wessling, Jennifer; Floehr, Julia; Schäfer, Cora; Ensslen, Silke; Denecke, Bernd; Rösing, Benjamin; Neulen, Joseph; Veitinger, Thomas; Spehr, Marc; Tropartz, Tanja; Tolba, René; Renné, Thomas; Egert, Angela; Schorle, Hubert; Gottenbusch, Yuliya; Hildebrand, André; Yiallourous, Irene; Stöcker, Walter; Weiskirchen, Ralf; Jahnen-Dechent, Willi (2013) Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein Is Essential for Fertilization. *Developmental cell* 25 (1), 106–112.

- Doñate, Fernando; Juarez, Jose C.; Guan, Xiaojun; Shipulina, Natalya V.; Plunkett, Marian L.; Tel-Tsur, Ziva; Shaw, David E.; Morgan, William T.; Mazar, Andrew P. (2004) Peptides derived from the histidine-proline domain of the histidine-proline-rich glycoprotein bind to tropomyosin and have antiangiogenic and antitumor activities. *Cancer Research* 64 (16), 5812–5817.
- Donoghue, Philip C.J.; Purnell, Mark A. (2005) Genome duplication, extinction and vertebrate evolution. *Trends in ecology & evolution* 20 (6), 312–319.
- Dumermuth, E.; Sterchi, E. E.; Jiang, W. P.; Wolz, R. L.; Bond, Judith S.; Flannery, A. V.; Beynon, Robert J. (1991) the Astacin Family of Metalloendopeptidases. *The Journal of biological chemistry* 266 (32), 21381–21385.
- Dziegielewska, K. M.; Andersen, N. A.; Saunders, N. R. (1998) Modification of Macrophage Response to Lipopolysaccharide by Fetuin. *Immunology letters* 60 (1), 31–35.
- Dziegielewska, K. M.; Brown, W. M.; Deal, A.; Foster, K. A.; Fry, E. J.; Saunders, N. R. (1996) The expression of fetuin in the development and maturation of the hemopoietic and immune systems. *Histochemistry and cell biology* 106 (3), 319–330.
- Edwards, Dylan R.; Handsley, Madeleine M.; Pennington, Caroline J. (2008) The ADAM metalloproteinases; Review. *Molecular aspects of medicine* 29 (5), 258–289.
- Ekiel, Irena; Abrahamson, Magnus; Fulton, D. B.; Lindahl, P.; Storer, A. C.; Levadoux, W.; Lafrance, M.; Labelle, S.; Pomerleau, Y.; Groleau, D.; LeSauter, L.; Gehring, K. (1997) NMR structural studies of human cystatin C dimers and monomers. *Journal of molecular biology* 271 (2), 266–277.
- El-Halawany, Medhat S.; Ohkouchi, Susumu; Shibata, Hideki; Hitomi, Kiyotaka; Maki, Masatoshi (2004) Identification of cysteine protease inhibitors that belong to cystatin family 1 in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biological chemistry* 385 (6), 547–550.
- Elliott, D. F.; Horton, E. W.; Lewis, G. P. (1960) Actions of Pure Bradykinin. *The Journal of physiology* 153 , 473–480.
- Elzanowski, Andrzej; Barker, Winona C.; Hunt, Lois T.; Seibel-Ross, Elizabeth (1988) Cystatin Domains in Alpha-2-HS-Glycoprotein and Fetuin. *FEBS letters* 227 (2), 167–170.
- Erlanger, Bernard F.; Kokowsky, Nicholas; Cohen, William (1961) The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95 (2), 271–278.
- Fahrenholz, F.; Gilbert, S.; Kojro, E.; Lammich, S.; Postina, Rolf (2000) Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920 , 215–222.
- Fan, T. J.; Katagiri, C. (2001) Properties of the hatching enzyme from *Xenopus laevis*. *European journal of biochemistry / FEBS* 268 (18), 4892–4898.

- Farabaugh, P. J. (1978) Sequence of the *lacI* Gene. *Nature* 274 (5673), 765–769.
- Fass, Deborah (2012) Disulfide Bonding in Protein Biophysics; Review. *Annual Review of Biophysics* 41 (1), 63–79.
- Fedak, Paul W.M.; Moravec, Christine S.; McCarthy, Patrick M.; Altamentova, Svetlana M.; Wong, Amy P.; Skrtic, Marko; Verma, Subodh; Weisel, Richard D.; Li, Ren-Ke (2006) Altered Expression of Disintegrin Metalloproteinases and Their Inhibitor in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 113 (2), 238–245.
- Förster, Th. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437 (1-2), 55–75.
- Fox, R. H.; Goldsmith, R.; Kidd, D. J.; Lewis, G. P. (1961) Bradykinin as a Vasodilator in Man. *The Journal of physiology* 157, 589–602.
- Freije, J. P.; Abrahamson, M.; Olafsson, I.; Velasco, G.; Grubb, A.; López-Otín, C. (1991) Structure and expression of the gene encoding cystatin D, a novel human cysteine proteinase inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 266 (30), 20538–20543.
- Freije, J. P.; Balbín, M.; Abrahamson, M.; Velasco, G.; Dalbøge, H.; Grubb, A.; López-Otín, C. (1993) Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the Escherichia coli expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. *The Journal of biological chemistry* 268 (21), 15737–15744.
- Frerick, Elena V. (2006) Heterologe Expression und Charakterisierung des Nephrosin-Inhibitors aus *Cyprinus carpio* Mainz: Johannes Gutenberg UniversitätHrsg.Fachbereich Biologie. Institut für Zoologie. Bachelorarbeit.
- Galembeck, Fernando; Cann, John R. (1974) Fetuin as a Trypsin Inhibitor. *Archives of biochemistry and biophysics* 164 (1), 326–331.
- Gasteiger, Elisabeth; Hoogland, Christine; Gattiker, Alexandre; Duvaud, S'everine; Wilkins, Marc R.; Appel, Ron D.; Bairoch, Amos; Walker, John M. (Hrsg.), Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (2005), 571–607. Humana Press. Totowa, NJ. 978-1-58829-343-5.
- Geurts, Nathalie; Becker-Pauly, Christoph; Martens, Erik; Proost, Paul; Van den Steen, Philippe E; Stöcker, Walter; Opdenakker, Ghislain (2012) Meprins process matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/gelatinase B and enhance the activation kinetics by MMP-3. *FEBS letters* 586 (24), 4264–4269.
- Gianazza, Elisabetta; Arnaud, Philippe (1982a) A General Method for Fractionation of Plasma Proteins. Dye-Ligand Affinity Chromatography on Immobilized Cibacron Blue F3-GA. *The Biochemical Journal* 201 (1), 129–136.
- Gianazza, Elisabetta; Arnaud, Philippe (1982b) Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction. *The Biochemical Journal* 203 (3), 637–641.
- Gitay-Goren, H.; Soker, S.; Vlodavsky, I.; Neufeld, G. (1992) The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *The Journal of biological chemistry* 267 (9), 6093–6098.

- Goldstein, A. (1944) the Mechanism of Enzyme-Inhibitor-Substrate Reactions - Illustrated by the Cholinesterase-Physostigmine-Acetylcholine System. *The Journal of General Physiology* 27 (6), 529–580.
- Gomis-Rüth, F. Xavier (2003) Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Molecular biotechnology* 24 (2), 157–202.
- Gomis-Rüth, F. Xavier (2009) Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. *The Journal of biological chemistry* 284 (23), 15353–15357.
- Gomis-Rüth, F. Xavier; Botelho, Tiago O.; Bode, Wolfram (2012a) A Standard Orientation for Metalloproteases; Review. *Biochimica et biophysica acta* 1824 (1), 157–163.
- Gomis-Rüth, F. Xavier; Stöcker, Walter; Huber, Robert; Zwilling, Robert; Bode, Wolfram (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. *Journal of molecular biology* 229 (4), 945–968.
- Gomis-Rüth, F. Xavier; Trillo-Muyo, Sergio; Stöcker, Walter (2012b) Functional and structural insights into astacin metalloproteases; Review. *Biological chemistry* 393 (10), 1027–1041.
- Goodman, S. A.; Albano, R.; Wardle, F. C.; Matthews, G.; Tannahill, D.; Dale, L. (1998) BMP1-related metalloproteinases promote the development of ventral mesoderm in early *Xenopus* embryos. *Developmental biology* 195 (2), 144–157.
- Goto, K.; Yoshida, K.; Suzuki, Y.; Yamamoto, K.; Sinohara, H. (1997) Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding plasma countertrypsin, a member of mammalian fetuin family, from the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Journal of biochemistry* 121 (3), 619–625.
- Grams, Frank; Dive, Vincent; Yiotakis, Athanasios; Yiallourous, Irene; Vassiliou, Stamatia; Zwilling, Robert; Bode, Wolfram; Stöcker, Walter (1996) Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor. *Nature structural biology* 3 (8), 671–675.
- Green, W. A.; Kay, C. M. (1963) The Influence of Organic Solvents and Enzymatic Modification on the Secondary Structure of Fetuin. *The Journal of biological chemistry* 238, 3640–3644.
- Grzonka, Zbigniew; Jankowska, Elżbieta; Kasprzykowski, Franciszek; Kasprzykowska, Regina; Łankiewicz, Leszek; Wiczak, Wiesław; Wieczerek, Ewa; Ciarkowski, Jerzy; Drabik, Piotr; Janowski, Robert; Kozak, Maciej; Jaskólski, Mariusz; Grubb, Anders (2001) Structural Studies of Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Acta biochimica Polonica* 48 (1), 1–20.
- Guan, Xiaojun; Juarez, Jose C.; Qi, Xiaoping; Shipulina, Natalya V.; Shaw, David E.; Morgan, William T.; McCrae, Keith R.; Mazar, Andrew P.; Doñate, Fernando (2004) Histidine-proline rich glycoprotein (HPRG) binds and transduces anti-angiogenic signals through cell surface tropomyosin on endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis* 92 (2), 403–412.
- Guevara, Tibisay; Yiallourous, Irene; Kappelhoff, Reinhild; Bissdorf, Steffen; Stöcker, Walter; Gomis-Rüth, F. Xavier (2010) Proenzyme Structure and Activation of Astacin Metalloprotease. *The Journal of biological chemistry* 285 (18), 13958–13965.

- Haasemann, M.; Nawratil, P.; Muller-Esterl, W. (1991) Rat tyrosine kinase inhibitor shows sequence similarity to human alpha 2-HS glycoprotein and bovine fetuin. *The Biochemical Journal* 274 (Pt 3), 899–902.
- Haglund, Åsa C.; Ek, Bo; Ek, Pia (2001) Phosphorylation of Human Plasma α_2 -Heremans-Schmid Glycoprotein (Human Fetuin) *in vivo*. *The Biochemical Journal* 357 (Pt 2), 437–445.
- Hahn, Dagmar; Pischitzis, Anastassios; Roesmann, Sandra; Hansen, Marianne K.; Leuenberger, Boris; Luginbuehl, Ursula; Sterchi, Erwin E. (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin beta metalloprotease. *The Journal of biological chemistry* 278 (44), 42829–42839.
- Halfon, S.; Ford, J.; Foster, J.; Dowling, L.; Lucian, L.; Sterling, M.; Xu, Y.; Weiss, M.; Ikeda, M.; Liggett, D.; Helms, A.; Caux, C.; Lebecque, S.; Hannum, C.; Menon, S.; McClanahan, T.; Gorman, D.; Zurawski, G. (1998) Leukocystatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* 273 (26), 16400–16408.
- Hashimoto, Gakuji; Inoki, Isao; Fujii, Yutaka; Aoki, Takanori; Ikeda, Eiji; Okada, Yasunori (2002) Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *The Journal of biological chemistry* 277 (39), 36288–36295.
- Hashimoto, S. I.; Suzuki, T.; Nagai, S.; Yamashita, T.; Toyoda, N.; Matsushima, K. (2000) Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 96 (6), 2206–2214.
- Hedrich, Jana; Lottaz, Daniel; Meyer, Katharina; Yiallourous, Irene; Jahnen-Dechent, Willi; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph (2010) Fetuin-A and Cystatin C are Endogenous Inhibitors of Human Meprin Metalloproteases. *Biochemistry* 49 (39), 8599–8607.
- Heiss, Alexander; DuChesne, Alexander; Denecke, Bernd; Grotzinger, Joachim; Yamamoto, Kazuhiko; Renné, Thomas; Jahnen-Dechent, Willi (2003) Structural Basis of Calcification Inhibition by α_2 -HS Glycoprotein/Fetuin-A. Formation of Colloidal Calciprotein Particles. *The Journal of biological chemistry* 278 (15), 13333–13341.
- Heiss, Alexander; Eckert, Thomas; Aretz, Anke; Richtering, Walter; van Dorp, Wim; Schäfer, Cora; Jahnen-Dechent, Willi (2008) Hierarchical Role of Fetuin-A and Acidic Serum Proteins in the Formation and Stabilization of Calcium Phosphate Particles. *The Journal of biological chemistry* 283 (21), 14815–14825.
- Helland, R.; Otlewski, J.; Sundheim, O.; Dadlez, M.; Smalås, A. O. (1999) The crystal structures of the complexes between bovine beta-trypsin and ten P1 variants of BPTI. *Journal of Molecular Biology* 287 (5), 923–942.
- Hildebrand, André (2013) Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung des Ovastacins *in vivo* und *in vitro* Mainz: Johannes Gutenberg Universität. Institut für Zoologie. Dissertation.

- Hintze, Vera; Höwel, Markus; Wermter, Carsten; Große Berkhoff, Eva; Becker-Pauly, Christoph; Beermann, Bernd; Yiallourous, Irene; Stöcker, Walter (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), 6741–6748.
- Hsu, Ssucheng J.; Nagase, Hiroki; Balmain, Allan (2004) Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada* 47 (5), 931–946.
- Huang, K.; Lu, W.; Anderson, S.; Laskowski, M.; James, M. N. (1995) Water molecules participate in proteinase-inhibitor interactions: crystal structures of Leu18, Ala18, and Gly18 variants of turkey ovomucoid inhibitor third domain complexed with *Streptomyces griseus* proteinase B. *Protein science : a publication of the Protein Society* 4 (10), 1985–1997.
- Hubbard, S. J.; Campbell, S. F.; Thornton, J. M. (1991) Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 220 (2), 507–530.
- Huber, Robert; Bode, Wolfram (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research* 11 (3), 114–122.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17 (8), 754–755.
- Hung, Ching-Hsiang; Huang, Hon-Ren; Huang, Chang-Jen; Huang, Fore-Lien; Chang, Geen-Dong (1997) Purification and Cloning of Carp Nephrosin, a Secreted Zinc Endopeptidase of the Astacin Family. *The Journal of biological chemistry* 272 (21), 13772–13778.
- Huson, Daniel H.; Scornavacca, Celine (2012) Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic biology* 61 (6), 1061–1067.
- IDT (2011) Fluorescence and Fluorescence Applications, www.eu.idtdna.com/pages/docs/technical-reports/fluorescence-and-fluorescence-applications.pdf.
- Isemura, S.; Saitoh, E.; Ito, S.; Isemura, M.; Sanada, K. (1984) Cystatin S: a cysteine proteinase inhibitor of human saliva. *Journal of biochemistry* 96 (4), 1311–1314.
- Jahnen-Dechent, Willi; Heiss, Alexander; Schäfer, Cora; Ketteler, Markus (2011) Fetuin-A Regulation of Calcified Matrix Metabolism; Review. *Circulation research* 108 (12), 1494–1509.
- Jahnen-Dechent, Willi; Schinke, Thorsten; Trindl, A.; Müller-Esterl, W.; Sablitzky, F.; Kaiser, S.; Blessing, M. (1997) Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *The Journal of biological chemistry* 272 (50), 31496–31503.
- Jahnen-Dechent, Willi; Trindl, A.; Godovac-Zimmermann, J.; Müller-Esterl, W. (1994) Posttranslational processing of human alpha 2-HS glycoprotein (human fetuin). Evidence for the production of a phosphorylated single-chain form by hepatoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 226 (1), 59–69.

- Janowski, Robert; Abrahamson, Magnus; Grubb, Anders; Jaskolski, Mariusz (2004) N-Truncated Human Cystatin C; Dimeric Form With 3D Domain Swapping.
- Janowski, Robert; Kozak, Maciej; Abrahamson, Magnus; Grubb, Anders; Jaskolski, Mariusz (2005) 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular beta-sheets. *Proteins* 61 (3), 570–578.
- Janowski, Robert; Kozak, Maciej; Jankowska, Elżbieta; Grzonka, Zbigniew; Grubb, Anders; Abrahamson, Magnus; Jaskólski, Mariusz (2001) Human Cystatin C, an Amyloidogenic Protein, Dimerizes Through Three-Dimensional Domain Swapping. *Nature structural biology* 8 (4), 316–320.
- Jansson, Rolf (2002) Gel Filtration - Principles and Methods; Amersham Biosciences; Uppsala, Schweden, http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf.
- Jefferson, Tamara; auf dem Keller, Ulrich; Bellac, Caroline; Metz, Verena V.; Broder, Claudia; Hedrich, Jana; Ohler, Anke; Maier, Wladislaw; Magdolen, Viktor; Sterchi, Erwin E.; Bond, Judith S.; Jayakumar, Arumugam; Traupe, Heiko; Chalaris, Athena; Rose-John, Stefan; Pietrzik, Claus U.; Postina, Rolf; Overall, Christopher M.; Becker-Pauly, Christoph (2013) The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (2), 309–333.
- Jefferson, Tamara; Čaušević, Mirsada; auf dem Keller, Ulrich; Schilling, Oliver; Isbert, Simone; Geyer, Rebecca; Maier, Wladislaw; Tschickardt, Sabrina; Jumpertz, Thorsten; Weggen, Sascha; Bond, Judith S.; Overall, Christopher M.; Pietrzik, Claus U.; Becker-Pauly, Christoph (2011) Metalloprotease Meprin Generates Nontoxic N-terminal Amyloid Precursor Protein Fragments *in Vivo*. *The Journal of biological chemistry* 286 (31), 27741–27750.
- Jones, Allison L.; Hulett, Mark D.; Parish, Christopher R. (2005) Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems; Review. *Immunology and cell biology* 83 (2), 106–118.
- Juarez, Jose C.; Guan, Xiaojun; Shipulina, Natalya V.; Plunkett, Marian L.; Parry, Graham C.; Shaw, David E.; Zhang, Jing-Chuan; Rabbani, Shafaat A.; McCrae, Keith R.; Mazar, Andrew P.; Morgan, William T.; Doñate, Fernando (2002) Histidine-proline-rich glycoprotein has potent antiangiogenic activity mediated through the histidine-proline-rich domain. *Cancer research* 62 (18), 5344–5350.
- Kalujnaia, Svetlana; McWilliam, Iain S.; Zaguinaiko, Vitalii A.; Feilen, Anja L.; Nicholson, John; Hazon, Neil; Cutler, Christopher P.; Cramb, Gordon (2007) Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*. *Physiological genomics* 31 (3), 385–401.
- Kang, Donghoon; Gho, Yong S.; Suh, Myungkoo; Kang, Chulhun (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (11), 1511–1512.
- Kasserra, H. P.; Laidler, K. J. (1969) Mechanisms of Action of Trypsin and Chymotrypsin. *Canadian Journal of Chemistry* (47), 4031–4039.

- Katagiri, C.; Maeda, R.; Yamashika, C.; Mita, K.; Sargent, T. D.; Yasumasu, S. (1997) Molecular cloning of *Xenopus* hatching enzyme and its specific expression in hatching gland cells. *The International journal of developmental biology* 41 (1), 19–25.
- Kawaguchi, Mari; Nakagawa, Masahiro; Noda, Tsutomu; Yoshizaki, Norio; Hiroi, Junya; Nishida, Mutsumi; Iuchi, Ichiro; Yasumasu, Shigeki (2008) Hatching enzyme of the ovoviviparous black rockfish *Sebastes schlegelii*- environmental adaptation of the hatching enzyme and evolutionary aspects of formation of the pseudogene. *The FEBS journal* 275 (11), 2884–2898.
- Kawaguchi, Mari; Yasumasu, Shigeki; Hiroi, Junya; Naruse, Kiyoshi; Inoue, Masayuki; Iuchi, Ichiro (2006) Evolution of Teleostean Hatching Enzyme Genes and their Paralogous Genes. *Development genes and evolution* 216 (12), 769–784.
- Kellermann, J.; Haupt, H.; Auerswald, E. A.; Müller-Ester, W. (1989) The arrangement of disulfide loops in human alpha 2-HS glycoprotein. Similarity to the disulfide bridge structures of cystatins and kininogens. *The Journal of biological chemistry* 264 (24), 14121–14128.
- Khaznadji, Eric; Collins, Peter; Dalton, John P.; Bigot, Yves; Moiré, Nathalie (2005) A New Multi-Domain Member of the Cystatin Superfamily Expressed by *Fasciola hepatica*. *International journal for parasitology* 35 (10), 1115–1125.
- Kibbe, Warren A. (2007) OligoCalc: an Online Oligonucleotide Properties Calculator. *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue), W43–6.
(www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html, 27.7.2011.)
- Kijimoto, Teiya; Watanabe, Masakatsu; Fujimura, Koji; Nakazawa, Masumi; Murakami, Yasunori; Kuratani, Shigeru; Kohara, Yuji; Gojobori, Takashi; Okada, Norihiro (2005) *cimp1*, a novel astacin family metalloproteinase gene from East African cichlids, is differentially expressed between species during growth. *Molecular biology and evolution* 22 (8), 1649–1660.
- Killar, Loran; White, Judith; Black, Roy; Peschon, Jacques (1999) Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE); Review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 878, 442–452.
- Kirchner, S.; McDaniel, N. K.; Sugiura, S. H.; Soteropoulos, P.; Tian, B.; Fletcher, J. W.; Ferraris, R. P. (2007) Salmonid microarrays identify intestinal genes that reliably monitor P deficiency in rainbow trout aquaculture. *Animal genetics* 38 (4), 319–331.
- Klein, Theo; Bischoff, Rainer (2011) Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *Journal of proteome research* 10 (1), 17–33.
- Koehl, Catherine; Knight, C. G.; Bieth, Joseph G. (2003) Compared action of neutrophil proteinase 3 and elastase on model substrates. Favorable effect of S'-P' interactions on proteinase 3 catalysts. *The Journal of biological chemistry* 278 (15), 12609–12612.
- Koide, Takehiko; Foster, Donald; Yoshitake, Shinji; Davie, Earl W. (1986) Amino acid sequence of human histidine-rich glycoprotein derived from the nucleotide sequence of its cDNA. *Biochemistry* 25 (8), 2220–2225.

- Koide, Takehiko; Odani, Shoji (1987) Histidine-rich glycoprotein is evolutionarily related to the cystatin superfamily. Presence of two cystatin domains in the N-terminal region. *FEBS letters* 216 (1), 17–21.
- Kordiš, Dušan; Turk, Vito (2009) Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evolutionary Biology* (9), 266–288.
- Kotsyfakis, Michalis; Horka, Helena; Salat, Jiri; Andersen, John F. (2010) The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular microbiology* 77 (2), 456–470.
- Krauhs, Erika; Dörsam, Herbert; Little, Melvyn; Zwilling, Robert; Ponstingl, Herwig (1982) A Protease from *Astacus fluviatilis* as an Aid in Protein Sequencing. *Analytical biochemistry* 119 (1), 153–157.
- Kronenberg, Daniel (12.05.2010) New Roles for Meprins and Mechanism of Action of Procollagen C-Proteinase Enhancers Lyon, Mainz: Université Claude Bernard Lyon₁; Johannes Gutenberg Universität. Dissertation.
- Kronenberg, Daniel; Bruns, Bernd C.; Moali, Catherine; Vadon-Le Goff, Sandrine; Sterchi, Erwin E.; Traupe, Heiko; Böhm, Markus; Hulmes, David J S; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph (2010) Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly? *The Journal of investigative dermatology* 130 (12), 2727–2735.
- Kronenberg, Daniel; Vadon-Le Goff, Sandrine; Bourhis, Jean-Marie; Font, Bernard; Eichenberger, Denise; Hulmes, David J. S.; Moali, Catherine (2009) Strong Cooperativity and Loose Geometry between CUB Domains Are the Basis for Procollagen C-Proteinase Enhancer Activity. *Journal of Biological Chemistry* 284 (48), 33437–33446.
- Kruse, Markus-N.; Becker, Christoph; Lottaz, Daniel; Khler, Danny; Yiallourous, Irene; Krell, Hans-Willi; Sterchi, Erwin E.; Stöcker, Walter (2004) Human Meprin α and β Homo-Oligomers: Cleavage of Basement Membrane Proteins and Sensitivity to Metalloprotease Inhibitors. *The Biochemical Journal* 378 (Pt 2), 383–389.
- Kyhse-Andersen, Jan (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10 (3-4), 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. *Nature* (227 (5259)), 680–685.
- Laskowski, Roman A. (2009) PDBsum New Things. *Nucleic acids research* 37 (Database issue), D355-359.
- Laskowski, Roman A.; Hutchinson, E. G.; Michie, A. D.; Wallace, A. C.; Jones, M. L.; Thornton, J. M. (1997) PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in Biochemical Sciences* 22 (12), 488–490.
- Laskowski, Roman A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26 (2), 283–291.

- Lazar (2010) GelAnalyzer2010a, www.GelAnalyzer.com.
- Leatherbarrow (1989-2004) GraFit. 4.0.21. Erithacus Software Limited, www.erithacus.com/grafit.
- Lebreton, J. P.; Joisel, F.; Raoult, J. P.; Lannuzel, B.; Rogez, J. P.; Humbert, G. (1979) Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *The Journal of clinical investigation* 64 (4), 1118–1129.
- Lee, Chong-Chou; Bowman, Barbara H.; Yang, Funmei M. (1987) Human alpha 2-HS-Glycoprotein: the A and B Chains with a Connecting Sequence are Encoded by a Single mRNA Transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (13), 4403–4407.
- Lee, Chunsik; Bongcam-Rudloff, Erik; Sollner, Christian; Jahnen-Dechent, Willi; Claesson-Welsh, Lena (2009) Type 3 Cystatins; Fetuins, Kininogen and Histidine-rich Glycoprotein. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14 , 2911–2922.
- Lee, Hojoon X.; Ambrosio, Andrea L.; Reversade, Bruno; Robertis, E. M. de (2006) Embryonic Dorsal-Ventral Signaling: Secreted Frizzled-Related Proteins as Inhibitors of Tolloid Proteinases. *Cell* 124 (1), 147–159.
- Lepage, T.; Ghiglione, C.; Gache, C. (1992) Spatial and temporal expression pattern during sea urchin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid. *Development (Cambridge, England)* 114 (1), 147–163.
- Lijnen, Henri R.; Hoylaerts, Marc; Collen, Désiré (1983) Heparin binding properties of human histidine-rich glycoprotein. Mechanism and role in the neutralization of heparin in plasma. *The Journal of biological chemistry* 258 (6), 3803–3808.
- Lin, Yan (2007) Expression, Reinigung und Funktionsanalyse des Nephrosin-Inhibitors aus *Cyprinus carpio* Mainz: Johannes Gutenberg UniversitätHrsg.Fachbereich Biologie. Institut für Zoologie. Diplomarbeit.
- Lineweaver, Hans; Burk, Dean (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56 (3), 658–666.
- Liu, Jing-Xia; Zhai, Yan-Hua; Geng, Fan-Suo; Xia, Jian-Hong; Gui, Jian-Fang (2008) Molecular Characterization and Expression Pattern of Fetuin-B in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*). *Biochemical Genetics* 46 (9-10), 620–633.
- Lobb, R. R.; Auld, D. S. (1984) Direct observation of enzyme substrate complexes by stopped-flow fluorescence: mathematical analyses. *Experientia* 40 (11), 1197–1206.
- Lottaz, D.; Maurer, C. A.; Hahn, D.; Buchler, M. W.; Sterchi, E. E. (1999) Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer research* 59 (5), 1127–1133.

- Mac Sweeney, A.; Gil-Parrado, S.; Vinzenz, D.; Bernardi, A.; Hein, A.; Bodendorf, U.; Erbel, P.; Logel, C.; Gerhartz, B. (2008a) Structural Basis for the Substrate Specificity of Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-like Metalloproteases. *Journal of molecular biology* 384 (1), 228–239.
- Mac Sweeney, A.; Parrado, S. G.; Vinzenz, D.; Bernardi, A.; Hein, A.; Bodendorf, U.; Erbel, P.; Logel, C.; Gerhartz, B. (2008b) Crystal structure of bone morphogenetic protein 1 protease domain in complex with partially bound DMSO.
- Machleidt, W.; Thiele, U.; Laber, Bernd; Assfalg-Machleidt, I.; Esterl, A.; Wiegand, G.; Kos, J.; Turk, Vito; Bode, Wolfram (1989) Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS letters* 243 (2), 234–238.
- Marrero, Aniebrys; Duquerroy, Stephane; Trapani, Stefano; Goulas, Theodoros; Guevara, Tibisay; Andersen, Gregers R.; Navaza, Jorge; Sottrup-Jensen, Lars; Gomis-Rüth, F. Xavier (2012) The Crystal Structure of Human α 2-Macroglobulin Reveals a Unique Molecular Cage. *Angewandte Chemie (International ed* 51 (14), 3340–3344.
- Mbuyi, J. M.; Dequeker, J.; Bloemmen, F.; Stevens, E. (1982) Plasma proteins in human cortical bone: enrichment of alpha 2 HS-glycoprotein, alpha 1 acid-glycoprotein, and IgE. *Calcified tissue international* 34 (3), 229–231.
- McCaffrey, Timothy A.; Falcone, Domenick J.; Du, Baoheng (1992) Transforming growth factor- β 1 is a heparin-binding protein: Identification of putative heparin-binding regions and isolation of heparins with varying affinity for TGF- β 1. *Journal of cellular physiology* 152 (2), 430–440.
- Meier, U. C.; Boetzel, J.; Kellermann, J.; Mann, K.; Billich, A.; Stocker, W.; Schramm, H. J. (1994) The cleavage of the bait region of alpha 2-macroglobulin by human immunodeficiency virus proteinases and by astacin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 737, 431–433.
- Meyer, Katharina M. (2009) Heterologe Expression und funktionelle Analyse des Nephrosin-Inhibitors aus *Cyprinus carpio*. Mainz: Johannes Gutenberg UniversitätHrsg. Fachbereich Biologie. Institut für Zoologie. Diplomarbeit.
- Michaelis, Leonor; Menten, Maud L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift : Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie* (49), 333–369.
- Mombouli, J. V.; Vanhoutte, P. M. (1992) Kinins mediate kallikrein-induced endothelium-dependent relaxations in isolated canine coronary arteries. *Biochemical and biophysical research communications* 185 (2), 693–697.
- Murai, H.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Oda, K.; Murao, S. (1985) Amino acid sequence of Streptomyces metallo-proteinase inhibitor from Streptomyces nigrescens TK-23. *Journal of biochemistry* 97 (1), 173–180.
- Nagase, Hideaki; Visse, Robert; Murphy, Gillian (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69 (3), 562–573.

- Nagase, Hideaki; Woessner, J. F., Jr. (1999) Matrix Metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 274 (31), 21491–21494.
- Nawratil, P.; Lenzen, S.; Kellermann, J.; Haupt, H.; Schinke, Thorsten; Muller-Esterl, W.; Jahnen-Dechent, Willi (1996) Limited proteolysis of human alpha2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide. *The Journal of biological chemistry* 271 (49), 31735–31741.
- Ni, J.; Abrahamson, M.; Zhang, M.; Fernandez, M. A.; Grubb, A.; Su, J.; Yu, G. L.; Li, Y.; Parmelee, D.; Xing, L.; Coleman, T. A.; Gentz, S.; Thotakura, R.; Nguyen, N.; Hesselberg, M.; Gentz, R. (1997) Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *The Journal of biological chemistry* 272 (16), 10853–10858.
- Nicholas (2006) GeneDoc - Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility. Version 2.7.000, www.psc.edu/biomed/genedoc.
- Nicholas, Karl B.; Nicholas, Hugh B., Jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. .
- Ohkubo, I.; Kurachi, K.; Takasawa, T.; Shiokawa, H.; Sasaki, Makoto (1984) Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. *Biochemistry* 23 (24), 5691–5697.
- Ohnishi, T.; Arakaki, N.; Nakamura, O.; Hirono, S.; Daikuhara, Y. (1991) Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid-containing protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody. Evidence that 59-kDa BSP may be the rat counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and is synthesized by both hepatocytes and osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 266 (22), 14636–14645.
- Ohno, A.; Tate, S.; Seeram, S. S.; Hiraga, K.; Swindells, M. B.; Oda, K.; Kainosho, M. (1998) NMR structure of the Streptomyces metalloproteinase inhibitor, SMPI, isolated from Streptomyces nigrescens TK-23: another example of an ancestral beta gamma-crystallin precursor structure. *Journal of Molecular Biology* 282 (2), 421–433.
- Okada, Akitoshi; Sano, Kaori; Nagata, Koji; Yasumasu, Shigeki; Ohtsuka, Jun; Yamamura, Akihiro; Kubota, Keiko; Iuchi, Ichiro; Tanokura, Masaru (2010) Crystal Structure of Zebrafish Hatching Enzyme 1 from the Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of molecular biology* 402 (5), 865–878.
- Olf, Mario (2012) Expression von Nephrosin aus *Danio rerio* Mainz: Johannes Gutenberg Universität. Institut für Zoologie. Diplomarbeit.
- Olivier, Emmanuel; Soury, Emmanuelle; Risler, Jean-Loup; Smih, Fatima; Schneider, Kurt; Lochner, Klaus; Jouzeau, Jean-Yves; Fey, Georg H.; Salier, Jean-Philippe (1999) A Novel Set of Hepatic mRNAs Preferentially Expressed During an Acute Inflammation in Rat Represents Mostly Intracellular Proteins. *Genomics* 57 (3), 352–364.
- Olivier, Emmanuel; Soury, Emmanuelle; Ruminy, P.; Husson, A.; Parmentier, F.; Daveau, Maryvonne; Salier, Jean-Philippe (2000) Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *The Biochemical Journal* 350 Pt 2, 589–597.

- Olsson, Anna-Karin; Larsson, Helena; Dixelius, Johan; Johansson, Irja; Lee, Chunsik; Oellig, Cornelia; Björk, Ingemar; Claesson-Welsh, Lena (2004) A fragment of histidine-rich glycoprotein is a potent inhibitor of tumor vascularization. *Cancer Research* 64 (2), 599–605.
- Otlewski, Jacek; Jelen, Filip; Zakrzewska, Malgorzata; Oleksy, Arkadiusz (2005) The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *The EMBO journal* 24 (7), 1303–1310.
- Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4 (11), 2411–2423.
- Pal, Durba; Dasgupta, Suman; Kundu, Rakesh; Maitra, Sudipta; Das, Gobardhan; Mukhopadhyay, Satinath; Ray, Sukanta; Majumdar, Subeer S.; Bhattacharya, Samir (2012) Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 18 (8), 1279–1285.
- Pallarés, Irantzu; Bonet, Roman; Castellanos, R.Garcia; Ventura, S.; Aviles, F. X.; Vendrell, J.; Gomis-Rüth, F. Xavier (2005a) Human carboxypeptidase A4 in complex with human latexin.
- Pallarés, Irantzu; Bonet, Roman; Garcia-Castellanos, Raquel; Ventura, Salvador; Aviles, Francesc X.; Vendrell, Josep; Gomis-Rüth, F. Xavier (2005b) Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (11), 3978–3983.
- Palomares, Laura A.; Estrada-Mondaca, Sandino; Ramírez, Octavio T. (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 267, 15–52.
- Pankow, Kristin; Wang, Yong; Gembardt, Florian; Krause, Eberhard; Sun, Xiaouu; Krause, Gerd; Schultheiss, Heinz-Peter; Siems, Wolf-Eberhard; Walther, Thomas (2007) Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circulation research* 101 (9), 875–882.
- Pedersen, Kai O. (1944) Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. *Nature* 154 (3914), 575.
- Pettersen, Eric F.; Goddard, Thomas D.; Huang, Conrad C.; Couch, Gregory S.; Greenblatt, Daniel M.; Meng, Elaine C.; Ferrin, Thomas E. (2004) UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of computational chemistry* 25 (13), 1605–1612.
- Ploper, Diego; Lee, Hojoon X.; De Robertis, Edward M (2011) Dorsal-ventral patterning: Crescent is a dorsally secreted Frizzled-related protein that competitively inhibits Toll-like proteases. *Developmental biology* 352 (2), 317–328.
- Poon, Ivan K.; Patel, Kruti K.; Davis, David S.; Parish, Christopher R.; Hulett, Mark D. (2011) Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma; Review. *Blood* 117 (7), 2093–2101.

- Preiß, Malin I. (2011) Mutagenese der DNA-Sequenz des Nephrosin-Inhibitors Fetuin-L
Mainz: Johannes Gutenberg UniversitätHrsg.Fachbereich Biologie. Institut für Zoologie;
Abteilung für Molekulare Zoologie. Bachelorarbeit.
- Qiagen (2003) The QIAexpressionist™ - A Handbook for High-Level Expression and
Purification of 6xHis-Tagged Proteins,
www.kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf.
- Quesada, Víctor; Sanchez, Luis M.; Alvarez, Jesus; Lopez-Otin, Carlos (2004) Identification
and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to
hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. *The Journal of biological
chemistry* 279 (25), 26627–26634.
- Radisky, Evette S.; Koshland, Daniel E. (2002) A clogged gutter mechanism for protease
inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
99 (16), 10316–10321.
- Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. (1963) Stereochemistry of
Polypeptide Chain Configurations. *Journal of molecular biology* 7, 95–99.
- Rawlings, Neil D.; Brix, Klaudia (Hrsg.) Stöcker, Walter (Hrsg.) Protease Families, Evolution
and Mechanism of Action. aus: Proteases: Structure and Function (2013), 1–36. Springer
Verlag. Wien. ISBN 978-3-7091-0884-0.
- Rawlings, Neil D.; Barrett, Alan J. (1990) Evolution of Proteins of the Cystatin Superfamily.
Journal of molecular evolution 30 (1), 60–71.
- Rawlings, Neil D.; Barrett, Alan J.; Bateman, Alex (2012) MEROPS: the database of
proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 40 (Database
issue), D343-50.
- Rawlings, Neil D.; Waller, Matthew; Barrett, Alan J.; Bateman, Alex (2014) MEROPS: the
Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors. *Nucleic acids research*
42 (Database issue), D503-9.
- Rehm, Hubert; Letzel, Thomas (2010) Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics.
Der Experimentator, 6. Aufl.Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 978-3-
8274-2312-2.
- Reiss, Karina; Saftig, Paul (2009) The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of
sheddasases: Physiological and cellular functions; Review. *Seminars in Cell & Developmental
Biology* 20 (2), 126–137.
- Reynolds, S. D.; Angerer, L. M.; Palis, J.; Nasir, A.; Angerer, R. C. (1992) Early mRNAs,
spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one
encoding a protein related to tolloid and BMP-1. *Development (Cambridge, England)* 114
(3), 769–786.
- Reznikoff, William S.; Winter, Robert B.; Hurley, Carolyn K. (1974) The location of the
repressor binding sites in the lac operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences
of the United States of America* 71 (6), 2314–2318.

- Rizzu, P.; Baldini, A. (1995) Three Members of the Human Cystatin Gene Superfamily, AHSB, HRG, and KNG, Map Within One Megabase of Genomic DNA at 3q27. *Cytogenetics and cell genetics* 70 (1-2), 26–28.
- Ronquist, Fredrik; Teslenko, Maxim; van der Mark, Paul; Ayres, Daniel L.; Darling, Aaron; Höhna, Sebastian; Larget, Bret; Liu, Liang; Suchard, Marc A.; Huelsenbeck, John P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61 (3), 539–542.
- Rydengård, Victoria; Olsson, Anna-Karin; Mörgelin, Matthias; Schmidtchen, Artur (2007) Histidine-rich glycoprotein exerts antibacterial activity. *The FEBS journal* 274 (2), 377–389.
- Saitoh, E.; Isemura, S. (1993) Molecular biology of human salivary cysteine proteinase inhibitors. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 4 (3-4), 487–493.
- Šali (2013) MODELLER - A Program for Protein Structure Modeling. Release 9.12, www.salilab.org/modeller/, 10.11.2013.
- Šali, Andrej; Webb, Ben; Madhusudhan, M. S.; Shen, Min-Yi; Martí-Renom, Marc A.; Eswar, Narayanan; Alber, Frank; Topf, Maya; Oliva, Baldomero; Fiser, András; Sánchez, Roberto; Yerkovich, Bozidar; Badretdinov, Azat; Melo, Francisco; Overington, John P.; Feyfant, Eric (2013) MODELLER 9.12 Manual - A Program for Protein Structure Modeling. Release 9.12, r9480, www.salilab.org/modeller/.
- Salvesen, Guy S.; Parkes, C.; Abrahamson, Magnus; Grubb, A.; Barrett, Alan J. (1986) Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *The Biochemical journal* 234 (2), 429–434.
- Sano, Kaori; Kawaguchi, Mari; Yoshikawa, Masayuki; Kaneko, Toyoji; Tanaka, Toshiomi; Iuchi, Ichiro; Yasumasu, Shigeki (2011) Hatching Enzyme of Japanese Eel *Anguilla japonica* and the Possible Evolution of the Egg Envelope Digestion Mechanism. *The FEBS journal* 278 (19), 3711–3723.
- Schäfer, Cora; Heiss, Alexander; Schwarz, Anke; Westenfeld, Ralf; Ketteler, Markus; Floege, Jürgen; Müller-Esterl, Werner; Schinke, Thorsten; Jahn-Dechent, Willi (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *The Journal of clinical investigation* 112 (3), 357–366.
- Schägger, Hermann; Aquila, Heinrich; Jagow, Gebhard v. (1988) Coomassie Blue-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Direct Visualization of Polypeptides during Electrophoresis. *Analytical biochemistry* 173 (1), 201–205.
- Schechter, Israel; Berger, Arieh (1967) On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* 27 (2), 157–162.
- Schinke, Thorsten; Amendt, C.; Trindl, A.; Pöschke, O.; Müller-Esterl, W.; Jahn-Dechent, Willi (1996) The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 271 (34), 20789–20796.

- Schinke, Thorsten; Koide, Takehiko; Jahnen-Dechent, Willi (1997) Human histidine-rich glycoprotein expressed in SF9 insect cells inhibits apatite formation. *FEBS letters* 412 (3), 559–562.
- Schure, R.; Costa, K. D.; Rezaei, R.; Lee, W.; Laschinger, C.; Tenenbaum, H. C.; McCulloch, C. A. (2013) Impact of matrix metalloproteinases on inhibition of mineralization by fetuin. *Journal of periodontal research* 48 (3), 357–366.
- Schütte, André; Hedrich, Jana; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph; Koch, Karl-Wilhelm (2010) Let It Flow: Morpholino Knockdown in Zebrafish Embryos Reveals a Pro-Angiogenic Effect of the Metalloprotease Meprin $\alpha 2$. *PloS one* 5 (1), e8835.
- Seeram, S. S.; Hiraga, K.; Oda, K. (1997) Resynthesis of reactive site peptide bond and temporary inhibition of Streptomyces metalloproteinase inhibitor. *Journal of biochemistry* 122 (4), 788–794.
- Shibata, Y.; Iwamatsu, T.; Oba, Y.; Kobayashi, D.; Tanaka, M.; Nagahama, Y.; Suzuki, N.; Yoshikuni, M. (2000) Identification and cDNA cloning of alveolin, an extracellular metalloproteinase, which induces chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. *The Journal of biological chemistry* 275 (12), 8349–8354.
- Shibata, Yasushi; Iwamatsu, Takashi; Suzuki, Norio; Young, Graham; Naruse, Kiyoshi; Nagahama, Yoshitaka; Yoshikuni, Michiyasu (2012) An oocyte-specific astacin family protease, alveolin, is released from cortical granules to trigger egg envelope hardening during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*). *Developmental biology* 372 (2), 239–248.
- Sidow, Arend (1996) Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (6), 715–722.
- Sieron, Aleksander L.; Tretiakova, Anna; Jameson, Bradford A.; Segall, Mark L.; Lund-Katz, Sissel; Khan, M. T.; Li, Shi-wu; Stöcker, Walter (2000) Structure and Function of Procollagen C-Proteinase (mTolloid) Domains Determined by Protease Digestion, Circular Dichroism, Binding to Procollagen Type I, and Computer Modeling. *Biochemistry* 39 (12), 3231–3239.
- Sigrist, Christian J.A.; Castro, Edouard de; Cerutti, Lorenzo; Cuche, Beatrice A.; Hulo, Nicolas; Bridge, Alan; Bougueleret, Lydie; Xenarios, Ioannis (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D344-7.
- Song, Huai-Dong; Sun, Xiao-Jian; Deng, Min; Zhang, Guo-Wei; Zhou, Yi; Wu, Xin-Yan; Sheng, Yan; Chen, Yi; Ruan, Zheng; Jiang, Chun-Lei; Fan, Hui-Yong; Zon, Leonard I.; Kanki, John P.; Liu, Ting X.; Look, A. T.; Chen, Zhu (2004) Hematopoietic Gene Expression Profile in Zebrafish Kidney Marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46), 16240–16245.
- Spiro, Robert G. (1960) Studies on Fetuin, a Glycoprotein of Fetal Serum - I. Isolation, Chemical Composition, and Physicochemical Properties. *The Journal of biological chemistry* 235 (10), 2860–2869.

- Srinivas, P. R.; Wagner, A. S.; Reddy, L. V.; Deutsch, D. D.; Leon, M. A.; Goustin, A. S.; Grunberger, G. (1993) Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (11), 1445–1455.
- Staniforth, Rosemary A.; Giannini, Silva; Higgins, Lee D.; Conroy, Matthew J.; Hounslow, Andrea M.; Jerala, Roman; Craven, C. J.; Waltho, Jonathan P. (2001) Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *The EMBO Journal* 20 (17), 4774–4781.
- Stenman, G.; Aström, A. K.; Røijer, E.; Sotiropoulou, G.; Zhang, M.; Sager, R. (1997) Assignment of a novel cysteine proteinase inhibitor (CST6) to 11q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 76 (1-2), 45–46.
- Sterchi, Erwin E.; Stöcker, Walter; Bond, Judith S. (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* 29 (5), 309–328.
- Stöcker, Walter; Bode, Wolfram (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins; Review. *Current opinion in structural biology* 5 (3), 383–390.
- Stöcker, Walter; Breit, Stephen; Sottrup-Jensen, Lars; Zwilling, Robert (1991a) alpha2-Macroglobulin from Hemolymph of the Freshwater Crayfish *Astacus astacus*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 98 (4), 501–509.
- Stöcker, Walter; Gomis-Rüth, F. Xavier; Bode, Wolfram; Zwilling, Robert (1993) Implications of the Three - Dimensional Structure of Astacin for the Structure and Function of the Astacin Family of Zinc-Endopeptidases. *European journal of biochemistry / FEBS* 214 (1), 215-231.
- Stöcker, Walter; Grams, Frank; Baumann, Ulrich; Reinemer, Peter; Gomis-Rüth, F. Xavier; McKay, David B.; Bode, Wolfram (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4 (5), 823–840.
- Stöcker, Walter; Ng, Michael; Auld, David S. (1990) Fluorescent Oligopeptide Substrates for Kinetic Characterization of the Specificity of *Astacus* Protease. *Biochemistry* 29 (45), 10418–10425.
- Stöcker, Walter; Sauer, Birgit; Zwilling, Robert (1991b) Kinetics of Nitroanilide Cleavage by Astacin. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 372 (6), 385–392.
- Stöcker, Walter; Wolz, Russel L.; Zwilling, Robert; Strydom, Daniel J.; Auld, David S. (1988) *Astacus* Protease, a Zinc Metalloenzyme. *Biochemistry* (27), 5026–5032.
- Stöcker, Walter; Yiallourous, Irene; Köhler, Danny; Gredel, Simone; Zwilling, Robert; Dive, Vincent; Bode, Wolfram; Gomis-Rüth, F. Xavier; Grams, Frank; Zwilling, R & Stöcker, W - Structural Basis for the Function of Astacin and Related Zinc Peptidases. aus: (Hrsg.) (1997) Symposium on "The Astacins--Structure and Function of a New Protein Family", 147–163 Schriftenreihe naturwissenschaftliche Forschungsergebnisse. Bd. 53. Verlag Dr. Kovač. Hamburg. 3-8606-4624-9.

- Stöcker, Walter; Zwilling, Robert (1995) Astacin. *Methods in enzymology* 248, 305–325.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry* 47, 819–846.
- Stubbs, Milton T.; Laber, Bernd; Bode, Wolfram (1994) The Refined 2.4 Å X-Ray Crystal Structure of Recombinant Human Stefin B in Complex with the Cysteine Proteinase Papain: a Novel Type of Proteinase Inhibitor Interaction.
- Stubbs, Milton T.; Laber, Bernd; Bode, Wolfram; Huber, Robert; Jerala, Roman; Lenarcic, Brigita; Turk, Vito (1990) The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *The EMBO journal* 9 (6), 1939–1947.
- Takahara, K.; Lyons, G. E.; Greenspan, D. S. (1994) Bone morphogenetic protein-1 and a mammalian tolloid homologue (mTld) are encoded by alternatively spliced transcripts which are differentially expressed in some tissues. *The Journal of biological chemistry* 269 (51), 32572–32578.
- Takeda, Soichi; Takeya, Hiroyuki; Iwanaga, Sadaaki (2012) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins; Review. *Biochimica et biophysica acta* 1824 (1), 164–176.
- Tanokura, Masaru; Okada, Akitoshi; Nagata, Koji; Yasumasu, Shigeki; Ohtsuka, Jun; Iuchi, Ichiro (2010) Crystal structure of the hatching enzyme ZHE1 from the zebrafish *Danio rerio*.
- Tate S, Ohon A, Seeram SS, Hiraga K, Oda K, Kainosho M. Elucidation of the mode of interaction of thermolysin with a proteinaceous metalloproteinase inhibitor, SMPI, based on a model complex structure and a structural dynamics analysis. *J Mol Biol.* 1998 Sep 18; 282(2):435-446
- Terkelsen, O. B.; Jahnen-Dechent, W.; Nielsen, H.; Moos, T.; Fink, E.; Nawratil, P.; Müller-Esterl, W.; Møllgård, K. (1998) Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anatomy and embryology* 197 (2), 125–133.
- The UniProt Consortium (2013) Update on Activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D43–47.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25 (24), 4876–4882.
- Titani, Koiti; Hermodson, Mark A.; Ericsson, Lowell H.; Walsh, Kenneth A.; Neurath, Hans; Zwilling, Robert (1987) Amino Acid Sequence of a Unique Protease from the Crayfish *Astacus fluviatilis*. *Biochemistry* 26 (1), 222–226.
- Troeberg, Linda; Nagase, Hideaki (2003) Unit 21.15: Zymography of Metalloproteinases. *Current Protocols in Protein Science.* 21.15.1–21.15.12
- Tsai, Pei-Ling; Chen, Chu-Hsuan; Huang, Chang-Jen; Chou, Chih-Ming; Chang, Geen-Dong (2004) Purification and Cloning of an Endogenous Protein Inhibitor of Carp Nephrosin, an Astacin Metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 279 (12), 11146–11155.

- Turk, Vito; Bode, Wolfram (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS letters* 285 (2), 213–219.
- Valente, R. H.; Dragulev, B.; Perales, Jonas; Fox, Jay W.; Domont, Gilberto B. (2001) BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *European journal of biochemistry / FEBS* 268 (10), 3042–3052.
- Van Wart, Harold E.; Birkedal-Hansen, Henning (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), 5578–5582.
- Vanwildemeersch, Maarten; Olsson, Anna-Karin; Gottfridsson, Eva; Claesson-Welsh, Lena; Lindahl, Ulf; Spillmann, Dorothe (2006) The anti-angiogenic His/Pro-rich fragment of histidine-rich glycoprotein binds to endothelial cell heparan sulfate in a Zn²⁺-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 281 (15), 10298–10304.
- Vogt, Günter; Stöcker, Walter; Storch, V.; Zwilling, Robert (1989) Biosynthesis of *Astacus* Protease, a Digestive Enzyme from Crayfish. *Histochemistry* 91 (5), 373–381.
- Wallis, C.; Ver, B.; Melnick, J. L. (1969) The Role of Serum and Fetuin in the Growth of Monkey Kidney Cells in Culture. *Experimental cell research* 58 (2), 271–282.
- Walter, J.; Steigemann, W.; Singh, T. P.; Bartunik, H.; Bode, Wolfram; Huber, R. (1982) on the Disordered Activation Domain in Trypsinogen. Chemical Labelling and Low-Temperature Crystallography.
- Wang, Wei-Man; Ge, Gaoxiang; Lim, N. H.; Nagase, Hideaki; Greenspan, Daniel S. (2006) TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *The Biochemical journal* 398 (3), 515–519.
- Wermter, Carsten; Höwel, Markus; Hintze, Vera; Bombosch, Bettina; Aufenvenne, Karin; Yiallourous, Irene; Stöcker, Walter (2007) The protease domain of procollagen C-proteinase (BMP1) lacks substrate selectivity, which is conferred by non-proteolytic domains. *Biological chemistry* 388 (5), 513–521.
- Wilkinson, Anthony J.; Fersht, Alan R.; Blow, David M.; Winter, Greg (1983) Site-Directed Mutagenesis as a Probe of Enzyme Structure and Catalysis: Tyrosyl-tRNA Synthetase Cysteine-35 to Glycine-35 Mutation. *Biochemistry* 22 (15), 3581–3586.
- Winter, Roland; Noll, Frank (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie Stuttgart. ISBN 3-519-03518-9.
- Wisniewska, Magdalena; Goettig, Peter; Maskos, Klaus; Belouski, Edward; Winters, Dwight; Hecht, Randy; Black, Roy; Bode, Wolfram (2008) Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex. *Journal of molecular biology* 381 (5), 1307–1319.
- Wong, Jason W.H.; Ho, Simon Y W; Hogg, Philip J. (2011) Disulfide bond acquisition through eukaryotic protein evolution. *Molecular biology and evolution* 28 (1), 327–334.

- Yamaguchi, T.; Fukase, M.; Kido, H.; Sugimoto, T.; Katunuma, N.; Chihara, K. (1994) Meprin is predominantly involved in parathyroid hormone degradation by the microvillar membranes of rat kidney. *Life sciences* 54 (5), 381–386.
- Yamakawa, Y.; Omori-Satoh, T. (1992) Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. *Journal of biochemistry* 112 (5), 583–589.
- Yamamoto, K.; Sinohara, H. (1993) Isolation and characterization of mouse countertrypsin, a new trypsin inhibitor belonging to the mammalian fetuin family. *The Journal of biological chemistry* 268 (24), 17750–17753.
- Yang, Feng (2009) Purification and Characterization of Trypsin and Chymotrypsins from Hepatopancreas of Crucian Carp (*Carassius auratus*) Xiamen, China: Jimei University. College of Biological Engineering. Masterarbeit.
- Yasumasu, S.; Yamada, K.; Akasaka, K.; Mitsunaga, K.; Iuchi, I.; Shimada, H.; Yamagami, K. (1992) Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. *Developmental biology* 153 (2), 250–258.
- Yasumasu, Shigeki; Mao, Kun M.; Sultana, Fowzia; Sakaguchi, Hiromi; Yoshizaki, Norio (2005) Cloning of a quail homologue of hatching enzyme: its conserved function and additional function in egg envelope digestion. *Development genes and evolution* 215 (10), 489–498.
- Yiallourous, Irene; Große Berkhoff, Eva; Stöcker, Walter (2000) The Roles of Glu₉₃ and Tyr₁₄₉ in Astacin-like Zinc Peptidases. *FEBS letters* 484 (3), 224–228.
- Yiallourous, Irene; Kappelhoff, Reinhild; Schilling, Oliver; Wegmann, Frank; Helms, Mike W.; Auge, Astrid; Brachtendorf, Gertrud; Berkhoff, Eva G.; Beermann, Bernd; Hinz, Hans-Jürgen; König, Simone; Peter-Katalinić, Jasna; Stöcker, Walter (2002) Activation Mechanism of Pro-Astacin: Role of the Pro-Peptide, Tryptic and Autoproteolytic Cleavage and Importance of Precise Amino-Terminal Processing amino-terminal processing. *Journal of molecular biology* 324 (2), 237–246.
- Yiallourous, Irene; Vassiliou, Stamatia; Yiotakis, Athanasios; Zwilling, Robert; Stöcker, Walter; Dive, Vincent (1998) Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors. *The Biochemical Journal* 331 (Pt 2), 375–379.
- Yoshida, K.; Suzuki, Y.; Yamamoto, K.; Sinohara, H. (1996) Cystatin-like domain of mouse countertrypsin, a member of mammalian fetuin family, is responsible for the inhibition of trypsin. Evidence from site-directed mutagenesis. *Biochemistry and molecular biology international* 39 (5), 1023–1028.
- Yoshida, K.; Suzuki, Y.; Yamamoto, K.; Sinohara, H. (1999) cDNA sequencing of guinea pig alpha 2-HS glycoprotein, its expression in various tissues and acute phase expression. *Biological chemistry* 380 (1), 95–99.
- Yu, C. L.; Tsai, M. H. (2001) Fetal fetuin selectively induces apoptosis in cancer cell lines and shows anti-cancer activity in tumor animal models. *Cancer letters* 166 (2), 173–184.

- Zeeuwen, P. L.; Van Vlijmen-Willems, I M; Jansen, B. J.; Sotiropoulou, G.; Curfs, J. H.; Meis, J. F.; Janssen, J. J.; van Ruissen, F.; Schalkwijk, J. (2001) Cystatin M/E expression is restricted to differentiated epidermal keratinocytes and sweat glands: a new skin-specific proteinase inhibitor that is a target for cross-linking by transglutaminase. *The Journal of investigative dermatology* 116 (5), 693–701.
- Zhang, J. C.; Claffey, K.; Sakthivel, R.; Darzynkiewicz, Z.; Shaw, D. E.; Leal, J.; Wang, Y. C.; Lu, F. M.; McCrae, K. R. (2000) Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (15), 2589–2600.
- Zhang, Jing-Chuan; Donate, Fernando; Qi, Xiaoping; Ziats, Nicholas P.; Juarez, Jose C.; Mazar, Andrew P.; Pang, Yuan-Ping; McCrae, Keith R. (2002) The antiangiogenic activity of cleaved high molecular weight kininogen is mediated through binding to endothelial cell tropomyosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), 12224–12229.
- Zhang, Yong; Bai, Xue-Tao; Zhu, Kang-Yong; Jin, Yi; Deng, Min; Le, Huang-Ying; Fu, Yan-Fang; Chen, Yi; Zhu, Jiang; Look, A. T.; Kanki, John; Chen, Zhu; Chen, Sai-Juan; Liu, Ting X. (2008) In vivo interstitial migration of primitive macrophages mediated by JNK-matrix metalloproteinase 13 signaling in response to acute injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* 181 (3), 2155–2164.
- Zhang, Yue; Ge, Gaoxiang; Greenspan, Daniel S. (2006) Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of alpha2-macroglobulin. *The Journal of biological chemistry* 281 (51), 39096–39104.

7 ANHANG

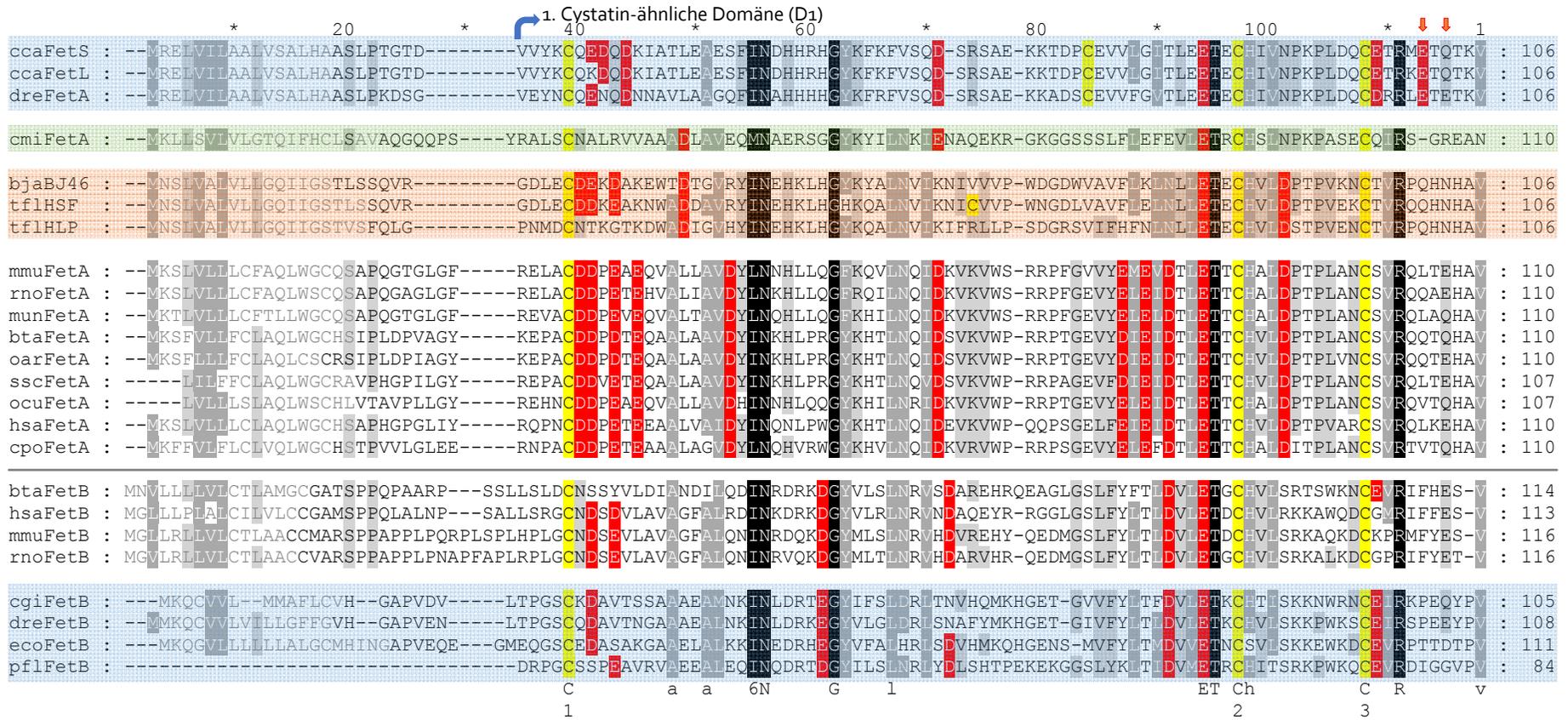
7.1 FETUIN-SEQUENZALIGNMENT

Das folgende Sequenzalignment vergleicht vollständige Fetuin Sequenzen von Säugetieren, Schlangen, echten Knochenfischen und einem Knorpelfisch. Die Daten der verwendeten Sequenzen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

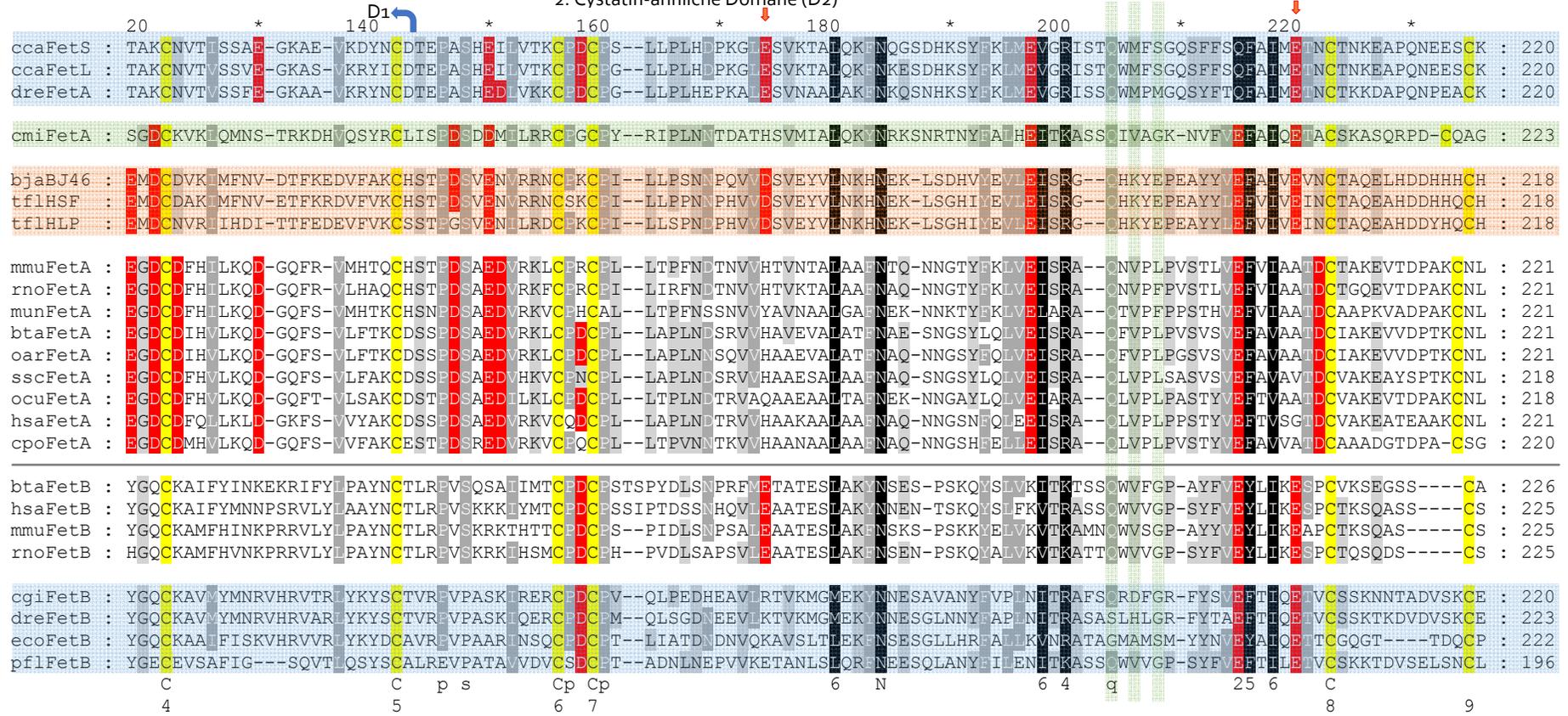
Tabelle 26: Legende der Fetuin-Sequenzen des folgenden Alignments (Abbildung 46).

Abk.	Fetuin	UniProt Nr.	Art	Klasse
ccaFetS	Fetuin-S	Q801Z6	<i>Cyprinus carpio</i> (Karpfen)	Actinopterygii
ccaFetL	Fetuin-L	Q801Z5	<i>Cyprinus carpio</i> (Karpfen)	Actinopterygii
dreFetA	Fetuin-A	Q800S8	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Actinopterygii
cmiFetA	Fetuin-A	K4FT29	<i>Callorhynchus milii</i> (Elefantenhai)	Chondrichthyes
bjaBJ46a	Fetuin-A	Q9DG10	<i>Bothropoides jararaca</i> (Jararaca-Lanzenotter)	Reptilia
tflHSF	Fetuin-A	P29695	<i>Protobothrops flavoviridis</i> * (Habu-Schlange)	Reptilia
tflHLP	Fetuin-A	Q5KQ55	<i>Protobothrops flavoviridis</i> * (Habu-Schlange)	Reptilia
mmuFetA	Fetuin-A	P29699	<i>Mus musculus</i> (Maus)	Mammalia
rnoFetA	Fetuin-A	P24090	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	Mammalia
munFetA	Fetuin-A	P97515	<i>Meriones unguiculatus</i> (Mongolische Rennmaus)	Mammalia
btaFetA	Fetuin-A	P12763	<i>Bos taurus</i> (Rind)	Mammalia
oarFetA	Fetuin-A	P29701	<i>Ovis aries</i> (Schaf)	Mammalia
sscFetA	Fetuin-A	P29700	<i>Sus scrofa</i> (Schwein)	Mammalia
ocuFetA	Fetuin-A	P80191	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Kaninchen)	Mammalia
hsaFetA	Fetuin-A	P02765	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Mammalia
cpoFetA	Fetuin-A	O70159	<i>Cavia procellus</i> (Meerschweinchen)	Mammalia
btaFetB	Fetuin-B	Q58D62	<i>Bos taurus</i> (Rind)	Mammalia
hsaFetB	Fetuin-B	Q9UGM5	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Mammalia
mmuFetB	Fetuin-B	Q9QXC1	<i>Mus musculus</i> (Maus)	Mammalia
rnoFetB	Fetuin-B	Q9QX79	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	Mammalia
cgiFetB	Fetuin-B	Q3LR74	<i>Carassius gibelio</i> (Gibel/Silberkarausche)	Actinopterygii
dreFetB	Fetuin-B	E7FE90	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Actinopterygii
ecoFetB	Fetuin-B	D6PVT4	<i>Epinephelus nebulosus</i> (Zackenbarsch)	Actinopterygii
pflFetB	Fetuin-B	C3UZW4	<i>Perca flavescens</i> (Amerikan. Flussbarsch)	Actinopterygii

* Synonym: *Trimeresurus flavoviridis*



2. Cystatin-ähnliche Domäne (D2)



240 ↓ * 260 * 280 D2 * 300 * 320 * 340 *

ccaFetS : AL**CGD**QARY**GFC**STK**VG**I-----EEPE**VECE**LY**FA**KNITHPMKRPAQ----- : 263
 ccaFetL : AL**CGE**KARY**GFC**STK**VG**I-----EEPE**VECE**LY**FA**KNITHPWKHPAQSRRD**C**K**FQ**GFPPGHRPGHGPPHRPGH-----GPPHRPGHGPPLRPGHEGHDHKD : 312
 dreFetA : AL**CGD**QATY**GFC**SS**KV**GS-----EEPE**VECE**LY**ED**QNFTHPMQHPAQSRRD**C**K**FH**DHRPGSVHPLGPDH-----GGHWKGGHGRGPPERGDKKHDH : 308

cmiFetA : **LG**ALKSTHT**GL**CTAS**VY**MP-----IFG**KE**KIE**VE**NC**EL**Y**EP**QVVANTRKSVNKGKIKRG-----RTKEKGRVSRSR : 288

bjaBJ46 : PNTAG**ED**HIG**FC**AV**FR**S-----HASLEKPKDE**QF**ESD**CV**LHVKEGHAHSHLIQ-----QHVEKDSIS : 278
 tflHSF : PYTAG**ED**HIA**FC**ST**VR**S-----HASLEKPKDE**KF**ESNC**VL**DVKDGHASHLIQ-----QHIEKNSIS : 278
 tflHLP : PYTAG**ED**HIA**FC**ST**VR**S-----HASLEKPKDE**KF**ESD**CV**L**DV**KEGHAHSHLIE-----HHVGKYSTS : 278

mmuFetA : LA---**E**K**Q**H**G**F**C**ANLMHN-----LGG-EEV**S**V**A**CK**L**F**Q**T**Q**P**Q**P-----ANANAVG----PVPTAN-----AALPADP----PASVVVGP : 284
 rnoFetA : LA---**E**K**Q**Y**G**F**C**ATLIHR-----LGG-EEV**S**V**A**CK**L**F**Q**T**Q**P**Q**P-----ANANPAG----PAP**TV**G**Q**AA-----PVAPPAGP----PESVVVGP : 288
 munFetA : LA---**E**K**Q**Y**S**F**C**ASLFQN-----LGG-EEV**T**V**T**CT**A**F**P**T**Q**AN-----G**VT**PAS----PAP**A**VE**K**GI-----PVALPDAP----PASLVVGP : 286
 btaFetA : LA---**E**K**Q**Y**G**F**C**GS**VI**QK-----ALGGED**V**R**V**T**CT**L**F**Q**T**Q**P**V**I**P**Q**P**Q**P-----DGAEAEA----PSAV**P**DAAG-----PT**PS**AAGP----PVASVVVGP : 295
 oarFetA : LA---**E**K**Q**Y**G**F**C**GS**VI**QK-----ALGGED**V**T**V**T**CT**L**F**Q**T**Q**P**V**I**P**Q**P**Q**P-----EGAEAGA----PSAV**P**DAAV**P**D-----AA**V**P**AP**SAAGL----PVGSVVAGP : 300
 sscFetA : LV---**E**K**Q**Y**G**F**C**RG**TV**TAK-----VNE-ED**V**AV**T**CT**V**F**Q**T**Q**P**V**V**L**Q**P**Q**P**-----AGADAGA----TP**V**V**D**AAAT-----AS**PL**AD**V**----PAASLVVGP : 290
 ocuFetA : LA---**D**K**Q**Y**G**F**C**AT**V**AEK-----VAR-EE**V**E**V**T**CT**L**F**PA**Q**P**V**V**P**Q**P**Q**P**GVAGAAAVE----PAP**A**V**D**PAS-----PV**S**P**P**D**Q**----SP**S**SLVVGP : 293
 hsaFetA : LA---**E**K**Q**Y**G**F**C**AT**L**SEK-----LGG-AE**V**AV**T**CT**V**F**Q**T**Q**P**V**T**S**Q**P**Q**P**-----EGANEAV----PT**P**V**V**D**P**AD-----P**S**P**PL**G**AP**L**P**PAG**S**P**P**DSH : 298
 cpoFetA : PP---**K**K**Q**Y**G**F**C**AT**V**AEK-----LGG-EEV**S**V**T**CT**V**F**P**T**Q**P**V**AP**L**P**Q**P-----DAASSAN----P**PP**AA**D**PA**V**-----S**PP**SS**SP**S--VP**V**D**S**VALGP : 293

btaFetB : LES**PG**S**V**P**VI**CH**S**L**GE**P-----Q**GN**Q**K**I**I**S**V**T**C**S**F**EN**S**Q**AP**T**PR**GENAT**V**N**Q**R**P**AN**PS**K**TE**EL-----Q**Q**Q**N**T**AP**T**NS**P**T**K**AV**P**K**GS**V**Q**YL** : 310
 hsaFetB : L**Q**SS**D**S**V**P**V**GL**C**GS**L**T-----R**TH**W**E**K**F**V**S**V**T**CT**D**F**F**ES**Q**APAT**G**SENS**AV**N**Q**K**P**T**N**L**P**K**VE**ES-----Q**Q**K**N**T**P**P**T**D**S**P**S**K**AG**P**RG**S**V**Q**YL** : 307
 mmuFetB : L**Q**HS**D**S**E**P**V**GL**C**Q**S**T**V**Q**SS**-----L**R**H**V**P**L**I**Q**P**VE**K**S**V**T**CT**E**F**F**ES**Q**A**Q**V**P**G**D**EN**PA**V**T**Q**G**F**Q**K**L**P-----Q**K**N**T**AP**T**SS**SP**S**V**T**AP**RG**S**I**Q**HL : 310
 rnoFetB : L**Q**AS**D**S**E**P**V**GL**C**Q**S**L**I**K**S**-----P**G**V**P**-P**Q**R**F**K**T**V**T**V**S**CT**E**F**F**ES**Q**D**V**P**G**GEN**PA**D**T**Q**D**A**K**K**L**P-----Q**K**N**T**AP**T**SS**SP**S**IT**AP**RG**S**I**Q**HL** : 307

cgiFetB : VM**AC**E**FA**H**K**G**F**C**V**SH**S**V-----TF**P**NE**E**H**L**S**V**Q**CE**I**F**E**PE**AA**E**E**K**K**H**L**I**G**G**E**L**D**H**S**S**T**T**G**S**A**T**E**Q**-----D**H**D**H**T**K**P**H**T**H**E**D**H**E**H**T**S--G**H**D : 306
 dreFetB : LM**AC**E**FA**H**K**G**L**C**A**SH**S**V-----T**V**T**K**E**E**H**L**N**I**Q**CE**I**F**E**PE**AA**E**E**K**K**H**L**L**G**G**E**V**D**H**S**H**T**T**G**S**S**T**A**H**D**H**T**K**T**H**T**H**E**H**S**H**E**H**T**H**E**D**H**T**K**P**H**S**H**D**H**D**H**D**H**T**K**P**H**T**H**N** : 325
 ecoFetB : LM**EC**E**FA**H**K**G**F**C**GS**L**F**Y-----T**P**T**G**E**A**N**PS**VE**CE**I**F**Y**P**X**A**A**X**R**E**K**T**Q**H**L**L**A**G**Q**T**D**H**S**H**T**D**X-----H**A**H**S**H**D**H----- : 287
 pflFetB : PM**DC**Q**F**A**HR**G**F**C**V**G**S**H**M**T**D**E**E**Q**F**E**V**R**L**P**V**G**K**K**A**S**S**F**Q**K**R**N**P**V**D**W**K**CE**LY**E**P**Q**A**A**T**V**E**EQ**V**H**A**K**A**D**S**G**H**T**G**H**Q**H**H**N-----H**T**H**L**H**P**H**E**H**M**S**V**T**PS** : 287

g C C
 10 11

```

          360          *          380          *          400          *          420          *          440          *          460          *
ccaFetS : ----- : -
ccaFetL : KTPDLRGHPEHAGRDPKDKTPDLRGHPEHA----GRDPKDKTPDLRGHPEHAARDPKDKTPDLRGHPEHAGRDPKDKTPDLRGHPEHAGHDHKGHPEHPQLCSRGPSPGVPEVPEG- : 424
dreFetA : GGRPEHGGRPEHAHGDKDIKPGHGGHPEHGGHLEHAHGDRDKKPGHGGGRPEHAHGD-KDKKHDHGGRPEHRHDDKDKKHDRFHPEHP-----CPKSPTGVPEPSPEGG : 412

cmiFetA : RQSPSHKQP HVVKQPRGRAATRRIESSE----- : -----EVQGSF : 324

bjaBJ46 : -----PEHNNTALNFVPHNDTSTSH----- : -----ESHEH : 304
tflHSF : -----PEHNITILNFVHPDDHTSTSH----- : -----ESHEH : 304
tflHLP : -----PGYN----- : -----STDEC : 287

mmuFetA : VVVPRG---LSDHRTYHDLRHAFSPVASVE----- : -----SASGE : 316
rnoFetA : VAVPLG---LPDHRTHHDLRHAFSPVASVE----- : -----SASGE : 320
munFetA : MVVPAE---HLPKTHHDLRHAFSPVASVE----- : -----SASGE : 318
btaFetA : SVVAVP---LPLHRAHYDLRHTFSGVASVE----- : -----SSSGE : 327
oarFetA : SVVAVP---LPLHRAHYDLRHTFSGVASVE----- : -----SASGE : 332
sscFetA : MVVAVPPGIPPVHRSHYDLRHSFSGVASVE----- : -----SASGE : 325
ocuFetA : VLVAQA---PAPPRAHYDLRQTFAGVPSME----- : -----SGSGE : 325
hsaFetA : VLLAAPPG-HQLHRAHYDLRHTFMGVVSLG----- : -----SPSGE : 332
cpoFetA : KRVLLP---PPVHREHYNLRYSPFDVD----- : -----SASGE : 322

btaFetB : PDW-DKKREGSQEKDPVETFPVQLDLTTN----- : -----PQGESL : 344
hsaFetB : PDL-DDK--NSQEKGPQEAFFVHDLTTN----- : -----PQGETL : 339
mmuFetB : PELDDEKPEESKGGSPPEAFFVQLDLTTN----- : -----PQGDTL : 345
rnoFetB : PEQ--EEPEDSKGKSPEEPFPVQLDLTTN----- : -----PQGDTL : 340

cgiFetB : HTHEHGKDLG--HSHEHDHAHAHANAEHGQDE----- : -----WEHHHHQYGHKKDETHEHDHEV : 360
dreFetB : HTHSHEHDHGHTHSHDHDHEHTHAKAHEHGQDE----- : -----WEHQHHQYGHKKDETHEHDHEI : 381
ecoFetB : ----- : ----- : -
pflFetB : SDLAVSKPRGSLGTVEDQ----- : ----- : 305

```

```

      480          *          500          *          520          *          540          *          560          *          580          *
ccaFetS : ---FPNG-----FAKIPPTIYPICLRPILFSRGPPNFVRPTGN----- : 300
ccaFetL : RHEFPCHG-----FVKIPPTIYPICLRPILLSRGPPNFVRPTGN----- : 464
dreFetA : RHEFPCHG-----YVKIPPSIYPICFPPPPRLCRCPDDLPRPTSSPKQ----- : 455

cmiFetA : GFVIGTGG-----TNGNSQSQTFFILPPPRTACFGRARYTRPGFQPI----- : 366

bjaBJ46 : LAEVPVAF-----VKKELPKDISDRHTTPVKGCPGKVHVFEL----- : 341
tflHSF : VAEVPVVF-----VKKELPTDISDHHTTPVKGCPGKVHVFELY----- : 342
tflHLP : VVECPVAF-----VNKEVPTDISDHNTTPVKGCPGRVLHFQL----- : 324

mmuFetA : TLHSP-----KVGQPG--AAG--PVSPMCPGRIRHFKI----- : 345
rnoFetA : VLHSP-----KVGQPGDAGAAG--PVAPLCPGRVRYFKI----- : 352
munFetA : AFQSPT-----QAGNAG--AAG--PAVPLCPGRVRHFKI----- : 348
btaFetA : AFHVGKTP-----IVGQPSIPGGP-----VRLCPGRIRYFKI----- : 359
oarFetA : AFHVGKTP-----IVGQPSVPGGP-----VHLCPGRIRYFKI----- : 364
sscFetA : AFHVGKTP-----KGAQPSIPAADGSPVVRPCPGRIRHFKI----- : 362
ocuFetA : AFHVGKVP-----VVVQPSVGAAPG--PVITPCPGKVRYFKI----- : 360
hsaFetA : VSHPRKTR-----TVVQPSVGAAPG--PVVPPCPGRIRHFKV----- : 367
cpoFetA : AFGPRQKP-----KVTHPGVASGVG-PVPPPCPGRIRHFKI----- : 358

btaFetB : DVSFLFQE-----PMEEKVVVLPFPSKEQRSACFQPAQKGYPFILPS----- : 387
hsaFetB : DISFLFLE-----PMEEKLVVLPFPKEKARTACFQPAQNASPLVLPP----- : 382
mmuFetB : DVSFLYLE-----PGDKKLVVLPFPGKEQRSACFQPEKENNPLVLPP----- : 388
rnoFetB : DVSFLYLE-----PEEKKLVVLPFPGKEQRSPECFQPEKQRTPE----- : 378

cgiFetB : ALDHEHKHRHLHEHEHHHHHH-DHENKTTVRRPDGMINVLPMDKPMTLPSFPDKPAAGPEQPSTLFFHPDQIPGQREPTIHPFDTMSPECFAMSNIHNGRLKEIISEDPLFKPTV : 477
dreFetB : VLDHDHKHRHIHEHEHHHHHHHDKSHQTKSRRPDGIFNVLPVDPKPMILPSFPDKPAAGPEQPSTLPLLPDPEIPGQKEPTIHTFPSKTSPECFAQSTIENGLLKQIVSEDPLFKPAA : 499
ecoFetB : ----- : -
pflFetB : -----PAPVRSAPAASSCFGPHRHNLGLDRLKL----- : 333

```

cpg
12

Abbildung 46: Vergleich vollständige Fetuin Sequenzen von Säugetieren (farblos), Schlangen (rot), echten Knochenfischen (blau) und einem Knorpelfisch (grün).

Die Cystatin-ähnlichen Domänen sind durch blaue, gebogene Pfeile und der Bezeichnung D1 oder D2 gekennzeichnet. Cysteinreste sind gelb hinterlegt. Konservierte Cysteine, für die die Ausbildung von Disulfidbrücken in den Fetuinsequenzen für humanes Fetuin-A (Kellermann et al., 1989) und HSF (Aoki et al., 2007) bereits nachgewiesen wurde, sind in der untersten Zeile nummeriert. Bereiche, die innerhalb der Fetuingruppen hauptsächlich negativ geladene Aufweisen sind rot hinterlegt. Rote Pfeile über den Sequenzen markieren Aminosäuren, auf die im Text näher eingegangen wird. Signalpeptide sind in grau gedruckt. Dieses Alignment wurde mit Clustal X2 erstellt und mit GeneDoc dargestellt.

7.2 DAS VERWENDETE INHIBITOR KONSTRUKT IM VERGLEICH ZU FULL LENGTH FETUIN DES KARPFENS

	*	20 ◊	*	40	*	60	
ccaFetS	:	MRELVILAAALV	SALHAASLPTGTDVVYK	QEDQDKIATLEAES	FINDHHRHGYKFKFVSQDS	:	62
ccaFetL	:	MRELVILAAALV	SALHAASLPTGTDVVYK	QKDQDKIATLEAES	FINDHHRHGYKFKFVSQDS	:	62
F-FetA	:	---	MASAWSHPQFEKISRAT	GTDDVVYKQKQDKIATLEAES	FINDHHRHGYKFKFVSQDS	:	58
	*	80	*	100	*	120	
ccaFetS	:	RSAEKKTDPC	EVVLGITLEETECHIVNPKPLDQCETRMETQTKVTAKCNVTISSAEGKAEVK	:	124		
ccaFetL	:	RSAEKKTDPC	EVVLGITLEETECHIVNPKPLDQCETRKETQTKVTAKCNVTVSSVEGKASVK	:	124		
F-FetA	:	RSAEKKTDPC	EVVLGITLEETECHIVNPKPLDQCETRKETQTKVTAKCNVTVSSVEGKAAVK	:	120		
	*	140	*	160	*	180	
ccaFetS	:	DYNCDTEPASHEILVTKCPDCPSLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNQGS	DHKS	YFKLM	EVGRIS	: 186
ccaFetL	:	RYICDTEPASHEILVTKCPDCPGLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNKES	DHKS	YFKLM	EVGRIS	: 186
F-FetA	:	RYICDTEPASHEILVTKCPDCPGLLPLHDPKGL	ESVKTALQKFNKES	DHKS	YFKLM	EVGRIS	: 182
	*	200	*	220	*	240	
ccaFetS	:	TQWMFSGQSFFSQFAIMETNCTNKEAPQNEESCKALCGDQARYGFCKSTKVGIEEPEVECEI	:	248			
ccaFetL	:	TQWMFSGQSFFSQFAIMETNCTNKEAPQNEESCKALCGEKARYGFCKSTKVGIEEPEVECEI	:	248			
F-FetA	:	TQWMFSGQSFFSQFAIMETNCTNKEAPQNEESCKALCGEKARYGFCKSTKVGIEEPEVECEI	:	244			
	*	260	*	280 ◊	*	300	*
ccaFetS	:	YEAKNITHPMKRPAQ	-----	:	263		
ccaFetL	:	YEAKNITHPWKHPAQ	SRRDCKFQGFPPGHRPGHGPPHRPGHGPPHRPGHGPPPLRPGHEGHDH	:	310		
F-FetA	:	YEAKNITHPWKHPAQ	SRRDCKFQGFPPGHRPGHG	TRASQPELAPEDPELE	HHHHHHHH	---	: 303
	320	*	340	*	360	*	
ccaFetS	:	-----	:	-			
ccaFetL	:	KDKTPDLRGHPEHAGRDPKDKTPDLRGHPEHAGRDPKDKTPDLRGHPEHAARDPKDKTPDLR	:	372			
F-FetA	:	-----	:	-			
	380	*	400	*	420	*	
ccaFetS	:	-----	-----	FPCNGFA	:	270	
ccaFetL	:	GHPEHAGRDPKDKTPDLRGHPEHAGHDHKGHPEHPQLCSRGPSPGVPESVPEGRHEFPCHGFV	:	434			
F-FetA	:	-----	:	-			
	440	*	460				
ccaFetS	:	KIPPTIYPICPLRPIL	SRGPPNFVRPTGN	:	300		
ccaFetL	:	KIPPTIYPICPLRPILL	SRGPPNFVRPTGN	:	464		
F-FetA	:	-----	:	-			

Abbildung 47: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Karpfen Fetuin S und L und dem reifen Fisch-Fetuin-A.

F-FetA entspricht dem Fusionsprotein, das durch die bakterielle Expression der reifen Inhibitorsequenz im pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektor gewonnen wurde und von einem Strep-tag (rot) und einem achtfachen His-tag (blau) flankiert wird. Durch die Klonierung zusätzlich inserierte Aminosäuren sind orange gedruckt. Die Signalpeptide von *ccaFetuin S* (Q801Z6) und *ccaFetuin L* (Q801Z5) sind grün markiert, unterschiedliche Aminosäuren zwischen den Sequenzen sind grau hinterlegt. *cca* = *Cyprinus carpio*; ◊ = vermutete Termini des reifen Inhibitors. Erstellt mit ClustalX 2.1 (Matrix: Gonnet PAM 250).

7.2.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Fisch-Fetuins-A

ggtacctcgcaatgcatctagattcaatgtgcagcatgagagagctggtgatattagcagcgttggtc
 G T S R M H L D S M C S M R E L V I L A A L V
 tcggctctacacgcagccagcctcctgacaggaactgatgtggtatataagtgccaaaaagatcaggac
 S A L H A A S L L T G T D V V Y K C Q K D Q D
 aagattgctacattagaagctgagagctttattaatgaccatcaccgccatggatacaaaattcaaattt
 K I A T L E A E S F I N D H H R H G Y K F K F
 gtctcacaggacagtcgcagtgagagaagaagactgatccttgtgaggtcgtcttggaataactcta
 V S Q D S R S A E K K T D P C E V V L G I T L
 gagaaactgaatgccacatcgtgaatcccaaaccttttagatcagtggtgagactagaaaggaaacacag
 E E T E C H I V N P K P L D Q C E T R K E T Q
 acgaaggtgacagcaaatgtaatgtgactgtctctagtgttgagggaaaagcagctgtgaagcgctac
 T K V T A K C N V T V S S V E G K A A V K R Y
 atctgtgacaccgaaccagcttcacatgaaataacttgtgacaaaatgccctgactgccccggtctgctg
 I C D T E P A S H E I L V T K C P D C P G L L
 cccttgcacgcccgaagggctctggagagtggtgaaaactgccctgcagaaattcaacaaagaatctgat
 P L H D P K G L E S V K T A L Q K F N K E S D
 cacaagtcttactttaactgatggaagtggggaggatcagcaccagtggtggttttcaggctcagagc
 H K S Y F K L M E V G R I S T Q W M F S G Q S
 ttcttttctcagtttgccattatggagacaaactgtacaaacaaggaggcaccacagaatgaagaatca
 F F S Q F A I M E T N C T N K E A P Q N E E S
 tgcaaggtttatgtggggagaaggctcggtatggcttctgtaagtccaccaaggttggaattgaggaa
 C K A L C G E K A R Y G F C K S T K V G I E E
 ccagaagtggaatgtgaaatttatgaagctaagaacataactcatccatggaacaccctgctcagtc
 P E V E C E I Y E A K N I T H P W K H P A Q S
 agaagagactgtaaattccagggttttccaccaggacatcgtccaggacatggtccccctcatcgcca
R R D C K F Q G F P P G H R P G H G P P H R P
 ggacatggtccccctcatcgcccaggacatggtcccccttgcgccaggacatgaaggccatgaccac
G H G P P H R P G H G P P L R P G H E G H D H
 aaggacaaaacaccagatctaagagggcatccagaacacgcaggccgtgaccccaaggacaaaacacca
K D K T P D L R G H P E H A G R D P K D K T P
 gatctaagagggcatccagaacatgcaggccgtgaccccaaggacaaaacaccagatctaagagggcat
D L R G H P E H A G R D P K D K T P D L R G H
 ccagaacacgcagcccgtgaccccaaggacaaaacaccagatctaagagggcatccagaacacgcaggc
P E H A A R D P K D K T P D L R G H P E H A G
 cgtgaccccaaggacaaaacaccagatctaagagggcatccagaacatgcaggccatgatcacaagggc
R D P K D K T P D L R G H P E H A G H D H K G
 catccagagcatccacagctctgttcaagagggccttcaggagttccagaatcagtgctgaaggccgc
H P E H P Q L C S R G P S G V P E S V P E G R
 catgagttccatgcccattggtttgtaaaaataccccctctatattatccaatctgccccttccctcca
H E F P C H G F V K I P P S I Y P I C P F P P
 ccacgtctctgcagagggcctccagacttgatacatcctccttcacctccttctcctcagtaa
 P R L C R G P P D L I H P P S P P S P Q -

Abbildung 48: Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Fisch-Fetuins-A (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Franz-Xavier Gomis-Rüth).

Das Signalpeptid ist in grau gedruckt. Glykosylierungsstellen sind unterstrichen. Die Insertsequenz ist grau hinterlegt.

7.2.2 pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektorkarte

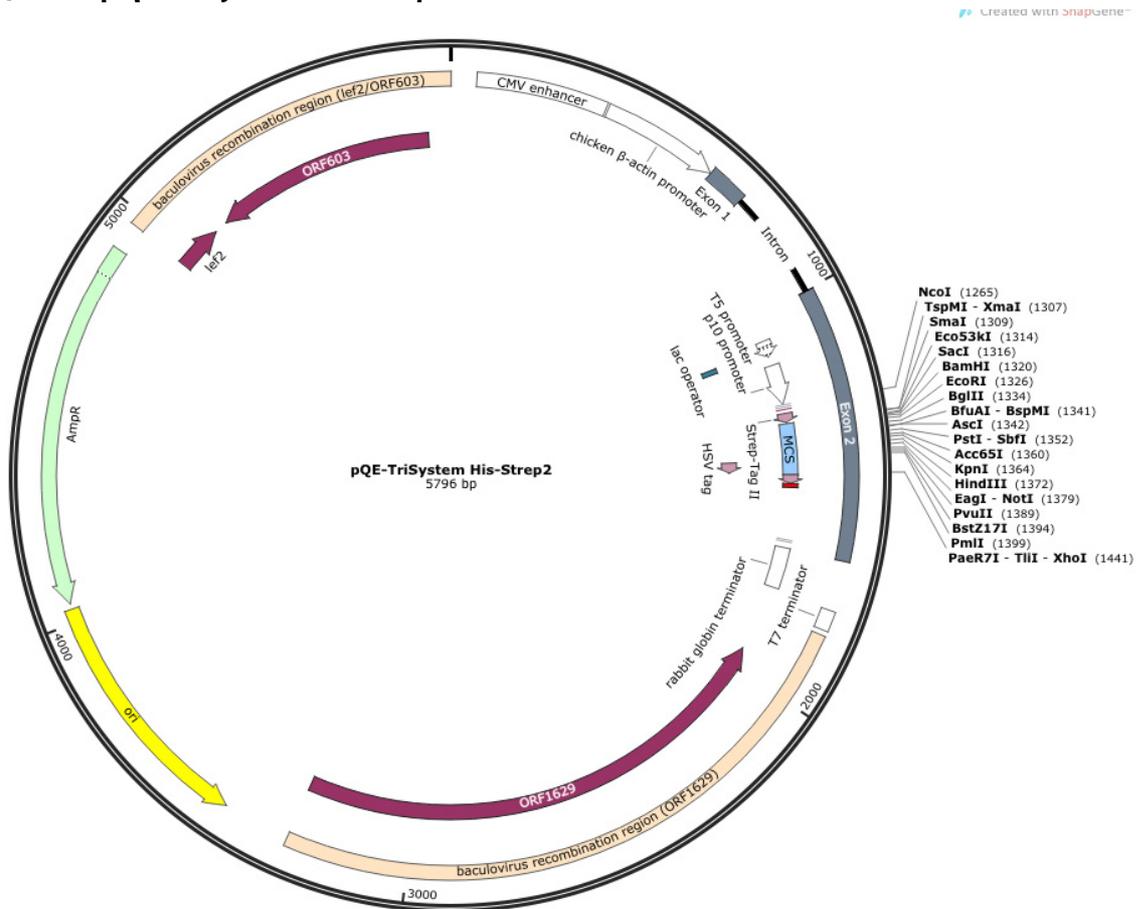


Abbildung 49: Vektorkarte mit Restriktionsschnittstellen des pQE-TriSystem His-Strep 2 (Qiagen, Hilden).

Das zu exprimierende Protein wird in die multiple cloning site (MCS) einkloniert. Durch die Transkription wird das gewünschte Protein, das Fisch-Fetuin-A, mit einem N-terminalen Strep-tag und einem C-terminalen 8x His-tag gewonnen. Mit diesem Vektor können Proteine in Bakterien-, Insekten- und Säugerzellen exprimiert werden. (Quelle: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/qiagen_vectors/pQE-TriSystem_His-Strep2/, 27.3.2014)

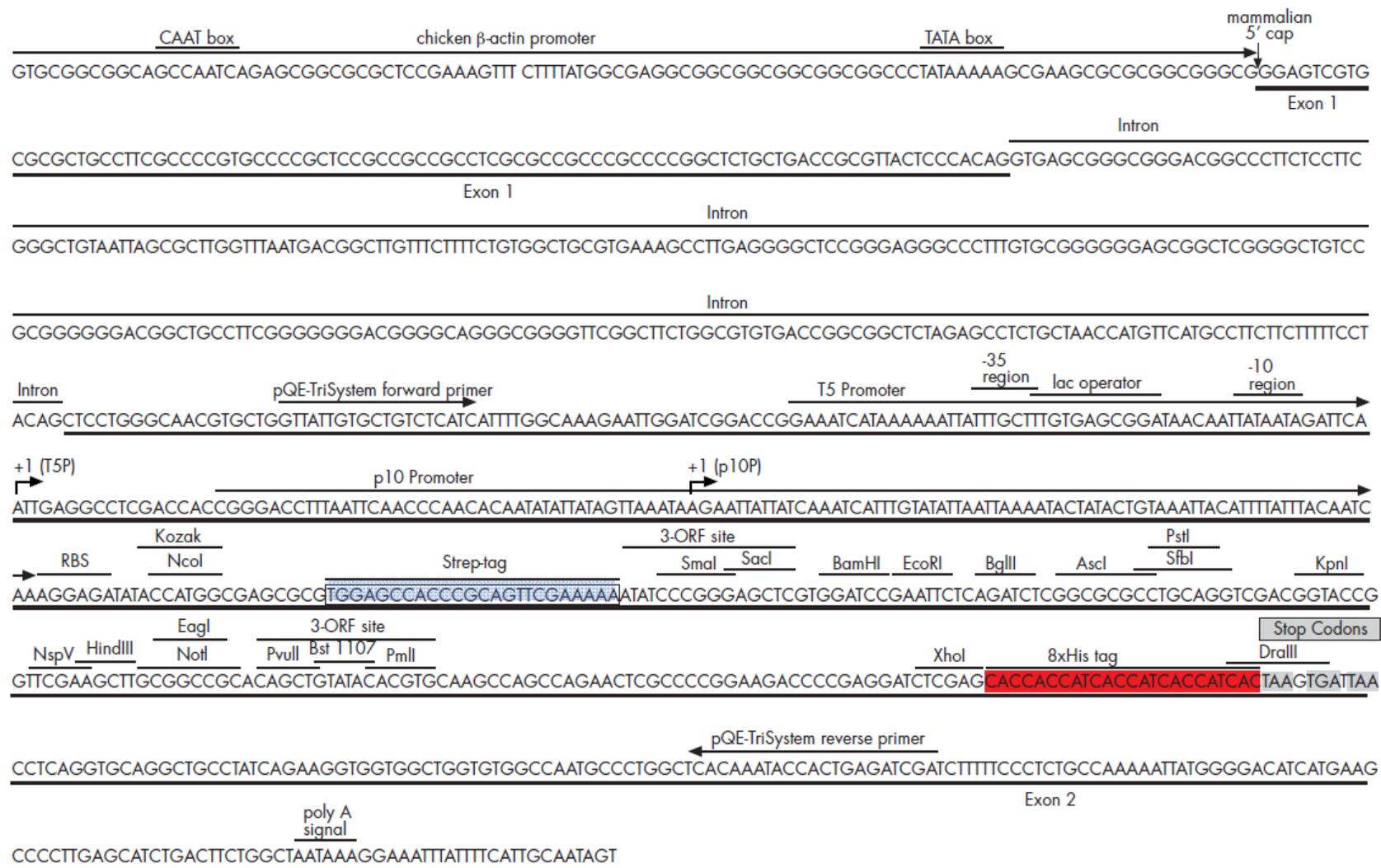


Abbildung 50: Sequenzbereich der MCS des pQE-TriSystem His-Strep 2 Vektors (Qiagen, Hilden, D).

7.2.3 pREP4-Plasmid

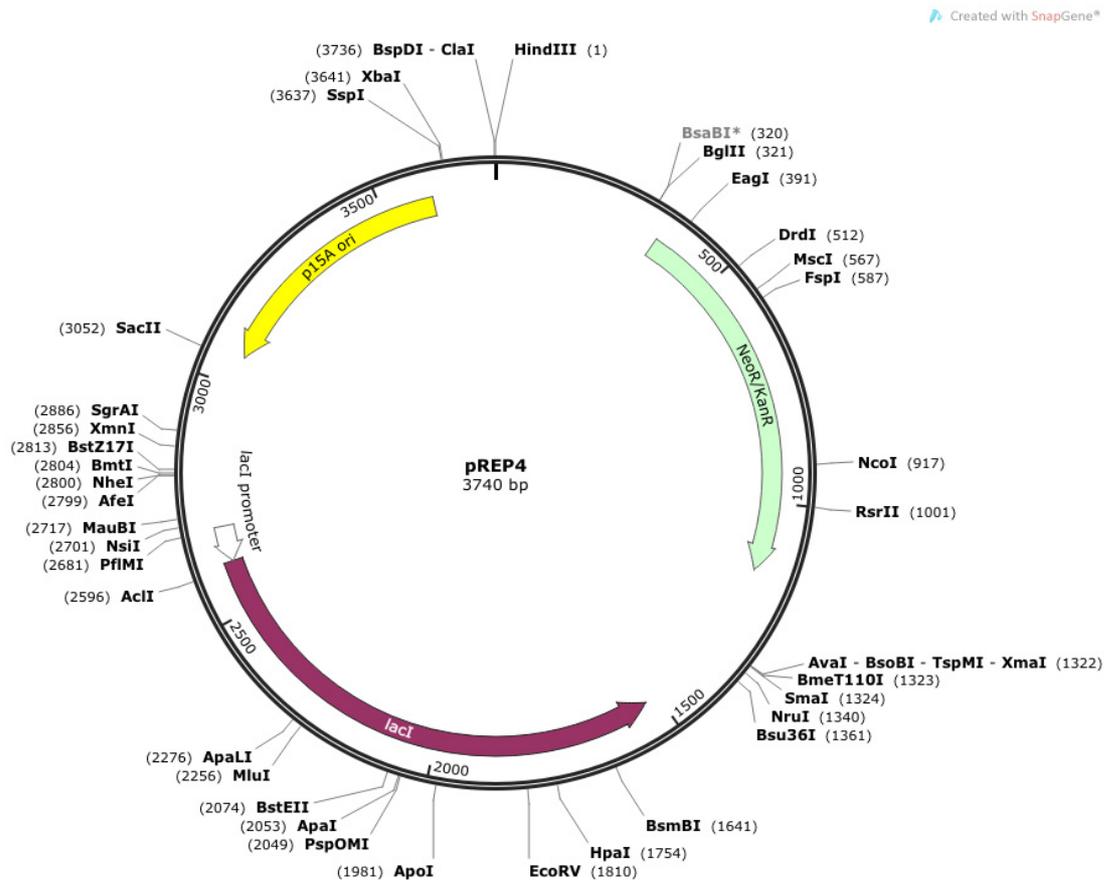


Abbildung 51: Vektorkarte mit Restriktionsschnittstellen des pREP4 Plasmids.

M15[pREP4] E. coli tragen dieses Plasmid. Es codiert unter anderem für das *lac I* Gen und gewährleistet so eine genauere Regulierung der Proteinexpression. Durch das *neo* Gen wird dem Bakterium eine Kanamycinresistenz verliehen. (Quelle: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/qiagen_vectors/pREP4/, 27.3.2014)

7.3 ZUGANGSNUMMERN DER VERWENDETEN PROTEINSEQUENZEN

Tabelle 27: Sequenzen von Astacinmetalloproteinasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Enzym Abkürzung	SwissProt Zugangsnr.	vollständige Bezeichnung	Organismus
ccaNpsn	O42326	Nephrosin	<i>Cyprinus carpio</i>
dreNpsn	Q8AYF4	Nephrosin	<i>Danio rerio</i>
dreZHE1	Q75NR9	High choriolytic enzyme	<i>Danio rerio</i>
olaHCE1	P31580	High choriolytic enzyme 1	<i>Oryzias latipes</i>
olaHCE2	P31581	High choriolytic enzyme 2	<i>Oryzias latipes</i>
olaLCE	P31579	Low choriolytic enzyme	<i>Oryzias latipes</i>
ggaALMP	PoDJJ2	Astacin-like metalloendopeptidase	<i>Gallus gallus</i>
hsaOvas	Q6HA08	Astacin-like metalloendopeptidase	<i>Homo sapiens</i>
spuSPAN	P98068	Protein SpAN	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
linLALPT	AoFKN6	Astacin-like metalloprotease toxin 1	<i>Loxosceles intermedia</i>
aasAEAs	O44072	<i>Astacus egg astacin</i>	<i>Astacus astacus</i>

hsaMep β	Q16820	<i>Meprin A subunit beta</i>	<i>Homo sapiens</i>
hsaMep α	Q16819	<i>Meprin A subunit alpha</i>	<i>Homo sapiens</i>
aasAsta	P07584	Astacin	<i>Astacus astacus</i>
hsaBMP1	P13497	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	<i>Homo sapiens</i>
dreTLL1	O57460	<i>Dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1</i>	<i>Danio rerio</i>
hsaTLL1	O43897	<i>Tolloid-like protein 1</i>	<i>Homo sapiens</i>
hsaTLL2	Q9Y6L7	<i>Tolloid-like protein 2</i>	<i>Homo sapiens</i>
pteTldl	Q75UQ6	<i>Tolloid like (Fragment)</i>	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>

Tabelle 28: Fetuin Sequenzen, die in dieser Arbeit für die Stammbaumanalyse und Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Sequenzen von denen nur Fragmente verfügbar waren, sind mit (F) gekennzeichnet.

Inhibitor Abkürzung	SwissProt Zugangsnr.	vollständige Bezeichnung	Organismus
hsaStfA	P01040	Cystatin-A	<i>Homo sapiens</i>
btaStfA	P80416	Cystatin-A	<i>Bos taurus</i>
rnoStfA	P01039	Cystatin-A	<i>Rattus norvegicus</i>
mmuStfA	P56567	Cystatin-A	<i>Mus musculus</i>
sscStfA	Q28988	Cystatin-A1	<i>Sus scrofa</i>
hsaStfB	P04080	Cystatin-B	<i>Homo sapiens</i>
btaStfB	P25417	Cystatin-B	<i>Bos taurus</i>
rnoStfB	P01041	Cystatin-B	<i>Rattus norvegicus</i>
mmuStfB	Q62426	Cystatin-B	<i>Mus musculus</i>
sscStfB	Q29290	Cystatin-B	<i>Sus scrofa</i>
oarStfB	Q10994	Cystatin-B	<i>Ovis aries</i>
hsaCytC	P01034	Cystatin-C	<i>Homo sapiens</i>
btaCytC	P01035	Cystatin-C	<i>Bos taurus</i>
rnoCytC	P14841	Cystatin-C	<i>Rattus norvegicus</i>
mmuCytC	P21460	Cystatin-C	<i>Mus musculus</i>
hsaCytD	P28325	Cystatin-D	<i>Homo sapiens</i>
ggaCyt	P01038	Cystatin	<i>Gallus gallus</i>
hsaCytSN	P01037	Cystatin-SN	<i>Homo sapiens</i>
hsaCytSA	P09228	Cystatin-SA	<i>Homo sapiens</i>
hsaCytS	P01036	Cystatin-S	<i>Homo sapiens</i>
mmuStf1	P35175	Stefin-1	<i>Mus musculus</i>
mmuStf2	P35174	Stefin-2	<i>Mus musculus</i>
mmuStf3	P35173	Stefin-3	<i>Mus musculus</i>
okeCyt	Q98967	Cystatin	<i>Oncorhynchus keta</i>
rnoCytS	P19313	Cystatin-S	<i>Rattus norvegicus</i>
hsaCyt8	O60676	Cystatin-8	<i>Homo sapiens</i>
mmuCyt8	P32766	Cystatin-8	<i>Mus musculus</i>
hsaKNG1	P01042	Kininogen-1	<i>Homo sapiens</i>
mmuKNG1	O08677	Kininogen-1	<i>Mus musculus</i>
rnoKNG1	P08934	Kininogen-1	<i>Rattus norvegicus</i>
btaKNG1	P01044	Kininogen-1	<i>Bos taurus</i>
rnoTKNG1	P01048	T-kininogen	<i>Rattus norvegicus</i>
rnoHRG	Q99PS8	Histidin-reiches Glykoprotein	<i>Rattus norvegicus</i>
hsaHRG	P04196	Histidin-reiches Glykoprotein	<i>Homo sapiens</i>
btaHRG	P33433	Histidin-reiches Glykoprotein (F)	<i>Bos taurus</i>

Inhibitor Abkürzung	SwissProt Zugangsnr.	vollständige Bezeichnung	Organismus
mmuHRG	Q9ESB3	Histidin-reiches Glykoprotein	<i>Mus musculus</i>
ocuHRG	Q28640	Histidin-reiches Glykoprotein (F)	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
hsaFetA	P02765	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Homo sapiens</i>
btaFetA	P12763	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Bos taurus</i>
mmuFetA	P29699	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Mus musculus</i>
rnoFetA	P24090	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Rattus norvegicus</i>
sscFetA	P29700	α -2-HS-Glykoprotein (F)	<i>Sus scrofa</i>
oarFetA	P29701	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Ovis aries</i>
cpoFetA	Q70159	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Cavia porcellus</i>
munFetA	P97515	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Meriones unguiculatus</i>
ocuFetA	P80191	α -2-HS-Glykoprotein (F)	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
dreFetA	Q800S8	Fetuin-A	<i>Danio rerio</i>
ccaFetL	Q801Z5	Fetuin lange Form	<i>Cyprinus carpio</i>
cmiFetA	K4FT29	α -2-HS-Glykoprotein	<i>Callorhynchus milii</i>
hsaFetB	Q9UGM5	Fetuin-B	<i>Homo sapiens</i>
btaFetB	Q58D62	Fetuin-B	<i>Bos taurus</i>
mmuFetB	Q9QXC1	Fetuin-B	<i>Mus musculus</i>
rnoFetB	Q9QX79	Fetuin-B	<i>Rattus norvegicus</i>
cgiFetB	Q3LR74	Fetuin-B	<i>Carassius gibelio</i>
pflFetB	C3UZW4	Fetuin-B (F)	<i>Perca flavescens</i>
ecoFetB	D6PVT4	Fetuin-B (F)	<i>Epinephelus coioides</i>
dreFetB	E7FE90	Uncharakterisiertes Protein	<i>Danio rerio</i>
tflHSF	P29695	<i>antihemorrhagic factor</i>	<i>Protothrops flavoviridis</i>
tflHLP	Q5KQS5	<i>HSF-like protein</i>	<i>Protothrops flavoviridis</i>
bjBJ46a	Q9DG10	<i>antihemorrhagic factor BJ46a</i>	<i>Bothropoides jararaca</i>
gbrcMSF	Q5KQS4	<i>Antihemorrhagic factor cMSF; chinese mamushi serum factor</i>	<i>Gloydius brevicaudus</i>
gbljMSF	Q5KQS1	<i>Antihemorrhagic factor jMSF; japanese mamushi serum factor</i>	<i>Gloydius blomhoffii</i>
zmaCys1	P31726	<i>Cystatin-1</i>	<i>Zea mays</i>

7.4 BINDUNGSSTELLEN FÜR DIE MUTAGENESE-PRIMER

	N-	H	E	I	L	V	T	K	C	P	D ¹⁴⁴	C	P	G	L	L	P	L-C	
_2as (rev)	3'	<<<	<<<	<<<	<<<	<<<	<GT	TTT	ACG	CCA	CGG	ACG	5'						
Fetuin-A	5'	CAT	GAA	ATA	CTT	GTG	ACA	AAA	TGC	CCT	GAC	TGC	CCC	GGT	CTG	CTG	CCC	TTG	3'
	3'	GTA	CTT	TAT	GAA	CAC	TGT	TTT	ACG	GGA	CTG	ACG	GGG	CCA	GAC	GAC	GGG	AAG	5'
NI2011_4s	5'				CTT	GTG	ACA	AAA	TGC	CCT	GCC	TGC	CCC	GGT	CTG	CTG	>>>	>>>	3'

Abbildung 52: Positionen der Primerbindungsstellen für die Einfügung einer Punktmutation innerhalb der für Fisch-Fetuin-A kodierenden Sequenz.

Die Pfeile (<<< und >>>) geben jeweils die Elongationsrichtungen, ausgehend von den Primern NI2011_2as und NI2011_4s an.

7.5 EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN UND QUELLEN FÜR DIE VERWENDETEN SUBSTRATE

Tabelle 29: Extinktionskoeffizienten und die entsprechenden Quellen für die verwendeten Substrate.

Die angegebenen Extinktionskoeffizienten wurden für die Konzentrationsbestimmung benötigt.

Gruppe	Wellenlänge	Extinktionskoeffizient	Quelle
pNitroanilin	405 nm	10200 M ⁻¹ cm ⁻¹	Stöcker <i>et al.</i> , 1991b
Dnp	410 nm	7500 M ⁻¹ cm ⁻¹	Koehl <i>et al.</i> , 2003
Edans	335/493	5900 M ⁻¹ cm ⁻¹	IDT, 2011
Dabcyl	453 nm	32000 M ⁻¹ cm ⁻¹	IDT, 2011
Dansyl	340 nm	4300 M ⁻¹ cm ⁻¹	Stöcker <i>et al.</i> , 1990
AMC/MCA	343 nm 370 nm	25500 M ⁻¹ cm ⁻¹ 7700 M ⁻¹ cm ⁻¹	www. bachem.com, 7.8.2013

7.6 DREI- UND EIN-BUCHSTABEN-CODE DER AMINOSÄUREN

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

7.7 ABKÜZUNGEN FÜR NUKLEOTIDE

Einbuchstabencode	Nukleinbase
a	Adenin
c	Cytosin
g	Guanin
t	Thymin

7.8 VERÖFFENTLICHUNG

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in *Biochemistry* veröffentlicht:

Hedrich, Jana; Lottaz, Daniel; Meyer, Katharina; Yiallourous, Irene; Jahnen-Dechent, Willi; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph (2010) *Fetuin-A and Cystatin C Are Endogenous Inhibitors of Human Mepirin Metalloproteases*. *Biochemistry* 49 (39), 8599–8607.

8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Frankfurt am Main, 18.07.2016

Katharina M. Meyer

9 CURRICULUM VITAE
