

Funktionelle und strukturelle Analyse der Metalloprotease Nephrosin aus dem
Zebrafisch (*Danio rerio*)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Mario Olf

Geboren am 23.11.1983 in Daun

Mainz, 06.03.2021

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2021

Zusammenfassung

Proteasen sind Enzyme, die in nahezu allen Prozessen von Lebewesen involviert sind. Aus diesem Grunde ist es von hohem Interesse die Lokalisation und die Regulationsmechanismen der verschiedenen Proteasen aufzuklären. In dieser Arbeit ist das zentrale Thema Nephrosin, eine Protease des Immunsystems von cyprinoiden Fischen.

Während einer Infektion mit *E. coli* Bakterien im Zebrafisch (*Danio rerio*) wird die Metalloprotease Nephrosin vermehrt exprimiert. Die physiologische Funktion des Nephrosin bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die Translation von Nephrosin konnte in den hämatopoetischen Geweben, wie der Niere, Kopfniere, Milz und Kiemen, cyprinoider Fische nachgewiesen werden. Auf zellulärer Ebene konnte eine Co-Translation mit myeloider Peroxidase gezeigt werden, was auf eine Genexpression in neutrophilen Granulozyten schließen lässt. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Nephrosin eine höhere Sterblichkeit in dem Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*) zur Folge hat. Somit scheint Nephrosin eine wichtige Rolle im Immunsystem von Fischen zu übernehmen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren in der Literatur Daten zur Lokalisation von Nephrosin vor allem auf RNA Ebene zu finden. Eine genaue Lokalisation des exprimierten Proteins auf zellulärer Ebene lag nicht vor. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nephrosin ab 24 Stunden nach der Befruchtung (hpf) als Protein in Zebrafischembryonen nachweisbar ist. Weiterhin ist es gelungen hochauflösende Aufnahmen des exprimierten Proteins in neutrophilen Granulozyten adulter Zebrafische anzufertigen. Diese zeigen, dass Nephrosin vorwiegend im peripheren Raum der Granulozyten lokalisiert ist und innerhalb der Zelle nicht mit der myeloiden Peroxidase kolokalisiert. Dies deutet auf eine Lokalisation in verschiedenen Granula innerhalb der neutrophilen Granulozyten hin. Neben der Lokalisation kommt der Regulation von Proteasen eine entscheidende Rolle zu, die bisher für Nephrosin im Detail nicht geklärt war. Mittels *in silico* Modellierungen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Nephrosin durch Fetuin-B bzw. Fisch Fetuin analog zur Inhibition von Astacin mit Maus Fetuin-B funktioniert. Diese Inhibition konnte ebenfalls durch eine inhibitorische Konstante (K_i) von $1,86 \cdot 10^{-11} \text{ M} \pm 3,36 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ (Maus Fetuin-B) bzw. $3,64 \cdot 10^{-9} \text{ M} \pm 5,87 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ (Fisch Fetuin) biochemisch quantifiziert werden. Nach einer Datenbankrecherche mit anschließenden Modellierungsversuchen konnten die Matrix Metalloproteasen MMP2 und MMP9 als mögliche Aktivatoren für Nephrosin identifiziert werden. Beide Proteasen spielen bei Entzündungsprozessen, wie sie auch bei Invasionen durch Pathogene hervorgerufen werden, eine Rolle, so dass eine physiologische Relevanz möglich ist. Somit konnte eine mögliche physiologische Regulation der Aktivierung und Inhibition des Nephrosin aufgezeigt werden.

Abstract

Proteases are enzymes, which play an important role in nearly every process of all living beings. Therefore, it is of high interest to identify the localisation and regulatory mechanisms of proteases. During infections in zebrafish (*Danio rerio*) the metalloproteinase nephrosin is highly expressed. Still, the physiological function of nephrosin is unclear. The expression of nephrosin in haematopoietic tissues like head kidney, kidney, spleen and gills of cyprinoid fish suggests an immunological function. A gene co-expression of nephrosin and myeloid peroxidase could be shown in neutrophil granulocytes of zebrafish. Another study revealed a higher death rate of the model organism zebrafish (*Danio rerio*) in absence of nephrosin when challenged with the bacterium *E. coli*. All these findings indicate an important role of nephrosin in immune response of fish.

A literature research for the localisation of nephrosin revealed that most data available were RNA investigations of nephrosin gene expression. A localisation of the nephrosin protein within cells was not shown in literature. In this study it could be shown that the nephrosin protein is expressed after 24 hours post fertilisation in zebrafish embryos. Furthermore, high resolution imaging of zebrafish kidney revealed a protein expression of nephrosin in neutrophil granulocytes of adult zebrafish. Here the nephrosin was found mostly in the peripheral space of the granulocytes, whereas myeloid peroxidase is not. It is known that granulocytes have different granules with different enzymes. Therefore, it seems that nephrosin and myeloid peroxidase are located in different granules.

Besides the localisation of a protein its regulation is a crucial key point for controlling its protein function. A study of Tsung and colleagues showed, that nephrosin could be regulated by a protein belonging to the fetuin family. But details of this regulation were not described until now. *In silico* modelling of nephrosin and fish fetuin showed a mechanism very closely related to mouse fetuin B and astacus astacin. FRET analyses of nephrosin revealed inhibitory constants (K_i) of this mechanism of $1,86 \cdot 10^{-11} \text{ M} \pm 3,36 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ (mouse fetuin B) or $3,64 \cdot 10^{-9} \text{ M} \pm 5,87 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ (fish Fetuin).

With the help of *in silico* analysis and modelling experiments, MMP2 (matrix metalloprotease 2) and MMP9 could be identified as potential activators of nephrosin. MMP9 is known to be present in neutrophilic granulocytes leading to a possible *in vivo* interaction during inflammatory processes or pathogen immune responses. MMP2 is also known to play a role in inflammatory processes. A possible *in vivo* regulation of nephrosin could be shown by characterisation of the activation and inhibition of nephrosin.

Inhalt

Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhalt	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus	1
1.1.1 Entwicklung der Niere des Zebrafisches	2
1.1.2 Immunsystem der Knochenfische	3
1.1.3 Neutrophile Granulozyten: Ein Teil der angeborenen Immunabwehr	4
1.2 Proteasen und ihre Bedeutung	6
1.2.1 Astacine	6
1.2.2 Die Astacin Protease Nephrosin	7
1.2.3 Die Astacin Protease Ovastacin	7
1.2.4 Schnittpräferenz von Astacinen	8
1.3 Inhibitoren und ihre Bedeutung	9
1.3.1 Fetuin-B: Ein endogener Inhibitor der Astacinproteasen	10
1.3.2 Fisch Fetuin	13
1.4 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Verwendete Antikörper	15
2.2 Der Zebraärling	15
2.2.1 Haltungsbedingungen	16
2.2.2 Tötung	16
2.3 Biochemische Methoden	16
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	16
2.3.2 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	17
2.3.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.3.4 Western-Blot mit anschließender Immundetektion	19
2.3.5 Coomassie-Brilliant-Blaufärbung zur Visualisierung von Proteinen	19
2.3.6 Affinitätschromatographie	19
2.4 Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1 Verwendetes Plasmid	22
2.5 Zellkultur	22
2.5.1 Verwendete Zelllinien	22

2.6	Expression und Reinigung der verwendeten Proteine	22
2.6.1	Expression mittels Baculovirus Expressionssystem	22
2.6.2	Proteinreinigung von Nephrosin	22
2.7	Zur Verfügung gestellte Proteine	23
2.8	Immunhistologie	24
2.8.1	Anfertigen von Paraffin Schnitten	24
2.8.2	Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten	25
2.8.3	Immunhistologische Färbung von Embryonen	27
2.8.4	Fluoreszenzmikroskopie	27
2.8.5	Dekonvolution	28
2.9	PICS Analyse	28
2.10	Enzymatischer Aktivitätstest	29
2.10.1	Verwendete Substrate	29
2.10.2	Fluorogener Aktivitätstest (FRET-Assay)	29
2.11	Bioinformatische Methoden	30
2.11.1	Homologie Modellierung	30
2.11.2	Docking Simulation zur Aktivierung von Nephrosin durch MMPs	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Reinigung der Antikörper aus dem Antiserum	32
3.2	Überprüfung der Kreuzreaktivität des anti-Nephrosin Antiserums	32
3.3	Lokalisation von Nephrosin im Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	34
3.3.1	Lokalisation von Nephrosin in Embryonen des Zebrafisches (<i>Danio rerio</i>)	34
3.3.2	Lokalisation von Nephrosin in adulten Zebrafischen	38
3.4	Expression von rekombinantem Nephrosin	40
3.5	Reinheit der Proteine	41
3.6	Glykosylierung der rekombinant exprimierten Proteine	41
3.7	Spaltspezifität von Nephrosin im Vergleich zu anderen Astacinen	42
3.8	Bestimmung des Anteils an katalytisch aktivem Nephrosin	43
3.9	Bestimmung der Michaelis-Konstante	44
3.10	Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Nephrosin mit Maus Fetuin-B	45
3.11	Bestimmung des Anteils an aktivem Ovastacin	46
3.12	Bestimmung der Inhibitionskonstante von Fisch Fetuin mit Astacinen	47
3.13	Vergleich der Inhibition von Nephrosin durch Fisch Fetuin WT und Fisch Fetuin D139A	48
3.14	Modellierung des Hemmmechanismus von Fisch Fetuin	49
3.15	Vergleich Astacin und Nephrosin mittels Homologiemodellierung	50
3.16	Aktivierung von Nephrosin durch Proteasen	52

3.16.1	Matrix Metalloprotease 2 (MMP2) als Aktivator	52
3.16.2	Matrix Metalloprotease 9 (MMP9) als Aktivator	55
4	Diskussion	57
4.1	Nephrosin im Embryo und in adulten Zebrafischen	57
4.2	Substratspezifität und Spaltspezifität des Nephrosins	59
4.3	Inhibition des Nephrosin durch Fetuin	60
4.4	Regulation von Nephrosin (hypothetisches Modell)	63
4.5	Ausblick	63
5	Literaturverzeichnis	66
6	Anhang	i
6.1	Weitere Daten	i
6.1.1	Zusätzliche Aufnahme mit Kontrolle 24 Stunden alter Embryo	i
6.2	Abkürzungsverzeichnis	ii
6.3	Parameter der Dekonvolution	iv
6.3.1	Allgemeine Parameter der Dekonvolution	iv
6.3.2	Signal to noise ratios der einzelnen immunhistologischen Aufnahmen	ix
6.3.3	Parameter der Bildbearbeitung zu Abbildung 16	xi
6.3.4	Parameter der Bildbearbeitung zu Abbildung 17	xii
6.4	Getestete fluorogene Substrate	xiii
6.5	Ramachandran Plots der erstellten Modelle	xiv
6.5.1	Qualität Modell Pronephrosin an Proastacin (3lq0)	xiv
6.5.2	Qualität Modell Nephrosin an Astacin (6HT9)	xv
6.5.3	Qualität Modell Nephrosin an HCE (3VTG)	xvi
6.5.4	Qualität Modell Fisch-Fetuin an Maus Fetuin-B (6HT9))	xvii
6.6	Verwendete Marker in der SDS-PAGE und dem Western Blot	xviii
6.7	Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine	xix
6.7.1	Nephrosin	xix
6.7.2	Ovastacin	xix
6.7.3	Maus-Fetuin-B	xx
6.7.4	Fisch-Fetuin	xx
6.8	Sequenzvergleiche der Nephrosinaktivatoren	xxi
6.8.1	MMP2	xxi
6.8.2	MMP9	xxii
6.9	Buchstabencode der Aminosäuren	xxiii

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	1
Abbildung 2: Vergleich eines Nephrons der Vertebraten mit dem Pronephros des Zebrafisches	2
Abbildung 3: Schematische Übersicht der adulten Niere des Zebrafisches.....	3
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entwicklung der neutrophilen Granulozyten.....	5
Abbildung 5: Einteilung der Proteasen.....	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Substratbindung	9
Abbildung 7: Bändermodell des Maus Fetuin-B	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Interaktion von Astacin und Maus Fetuin-B	11
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes einer PICS Analyse	28
Abbildung 10: Immunchemischer Nachweis der Kreuzreaktivität des anti-Nephrosin Antikörpers	32
Abbildung 11: Überprüfung der Kreuzreaktivität des anti-Nephrosin Antikörpers in Organlysaten des Zebrafisches	33
Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in frisch befruchteten Eiern (ca. 2h) durch anti-Nephrosin Antikörper	34
Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in 24 h alten Embryos	35
Abbildung 14: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in 48h alten Embryos	36
Abbildung 15: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in 72h alten Embryos	37
Abbildung 16: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in der Niere des Zebrafisches	38
Abbildung 17: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in adulten Zebrafischen durch Konfokalmikroskopie)	39
Abbildung 18: Reinigung rekombinanten Nephrosins aus Hi5 Insektenzellen.....	40
Abbildung 19: Polyacrylamid-Gel der verwendeten Proteine.....	41
Abbildung 20: Lektin Blot von Nephrosin und Maus Fetuin-B.....	41
Abbildung 21: Spezifität von Nephrosin gegenüber Protein Substraten	42
Abbildung 22: IC ₅₀ -Bestimmung der Inhibition von Nephrosin durch Maus Fetuin-B	43
Abbildung 23: K _m Bestimmung des Substrates MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH ₂ mit Nephrosin.....	44
Abbildung 24: K _i Bestimmung von Nephrosin und Maus Fetuin-B.....	45
Abbildung 25: IC ₅₀ -Bestimmung von Ovastacin durch Maus Fetuin-B.....	46
Abbildung 26: K _i Bestimmung von Ovastacin und Nephrosin mit Fisch Fetuin.....	47
Abbildung 27: Vergleich des inhibitorischen Potentials von Fisch Fetuin und Fisch Fetuin D139A gegenüber Nephrosin	48
Abbildung 28: Bändermodell des Fisch Fetuins im Komplex mit Astacin	49
Abbildung 29: Vergleich von Nephrosin und Astacin in Bezug auf die Hemmung durch Fetuin	50
Abbildung 30: Vergleich der Substratbindungsregion von Nephrosin und Astacin	51
Abbildung 31: Sequenzalignment verschiedener Nephrosine um den reifen N-Terminus	52
Abbildung 32: Interaktion von MMP2 mit Pronephrosin	54
Abbildung 33: Interaktion von MMP9 mit Pronephrosin	56
Abbildung 34: Hypothetischer Regulationsmechanismus von Nephrosin	63
Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in 24 Stunden in alten Embryos	i
Abbildung 36: Qualitätskontrolle des Modells von Pronephrosin an Proastacin (3lq0)	xiv
Abbildung 37: Qualitätskontrolle des Modells von Nephrosin an Astacin (6HT9)	xv
Abbildung 38: Qualitätskontrolle des Modells von Nephrosin an HCE (3VTG)	xvi
Abbildung 39: Qualitätskontrolle des Modells von Fisch Fetuin an Maus Fetuin-B (6HT9)	xvii
Abbildung 40: Verwendete Proteinmarker.....	xviii
Abbildung 41: Aminosäuresequenz des verwendeten Nephrosin	xix
Abbildung 42: Aminosäuresequenz des verwendeten Ovastacin	xix
Abbildung 43: Aminosäuresequenz des verwendeten Maus Fetuin-B.....	xx

Abbildung 44: Aminosäuresequenz des verwendeten Fisch Fetuin.....	xx
Abbildung 45: Sequenzvergleich von MMP2 von Mensch und Zebrafisch.....	xxi
Abbildung 46: Sequenzvergleich von MMP9 von Mensch und Zebrafisch.....	xxii

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	15
Tabelle 2: Zusammensetzung der Bradfordlösung.....	17
Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele	18
Tabelle 4: Lösungen der SDS-PAGE	18
Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot	19
Tabelle 6: Zusammensetzung der Coomassie Lösung nach Kang	19
Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von Fetuin-B	21
Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von Nephrosin.....	22
Tabelle 9: verwendete Puffer der Immunhistologie	24
Tabelle 10: Ethanolreihe und Paraffineinbettung zur Herstellung histologischer Schnitte.....	25
Tabelle 11: Ethanolreihe und Entparaffinieren zur Behandlung mit Antikörper	26
Tabelle 12: Behandlung Zebrafischembryonen zur Immunhistologischen Untersuchung.....	27
Tabelle 13: Verwendete Filter zur Immundetektion	27
Tabelle 14: Behandlung Zebrafischembryonen zur immunhistologischen Untersuchung	29
Tabelle 15: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 5-fache Vergrößerung	iv
Tabelle 16: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 20-fache Vergrößerung	v
Tabelle 17: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 40-fache Vergrößerung	vi
Tabelle 18: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 63-fache Vergrößerung	vii
Tabelle 19: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 100-fache Vergrößerung	viii
Tabelle 20: Verwendete Signal/Noise ratio 2 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung	ix
Tabelle 21: Verwendete Signal/Noise ratio 2 h alter Embryos 40-fache Vergrößerung	ix
Tabelle 22: Verwendete Signal/Noise ratio 24 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung	ix
Tabelle 23: Verwendete Signal/Noise ratio 24 h alter Embryos 40-fache Vergrößerung.....	ix
Tabelle 24: Verwendete Signal/Noise ratio 48 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung	x
Tabelle 25: Verwendete Signal/Noise ratio 48 h alter Embryos 63-fache Vergrößerung.....	x
Tabelle 26: Verwendete Signal/Noise ratio 72 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung	x
Tabelle 27: Verwendete Signal/Noise ratio 72 h alter Embryos 63-fache Vergrößerung	x
Tabelle 28: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 20-fache Vergrößerung.....	xi
Tabelle 29: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 63-fache Vergrößerung.....	xi
Tabelle 30: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 100-fache Vergrößerung.....	xi
Tabelle 31: Zusammenfassung der Parameter zur Restauration der Abbildung 17	xii
Tabelle 32: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution der Abbildung 17.....	xii
Tabelle 33: Mit Nephrosin getestete fluorogene Substrate	xiii
Tabelle 34: Übersicht der Aminosäuren und deren Vorkommen in <i>E. coli</i>	xxiii

1 Einleitung

1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Der Modellorganismus Zebrafisch weist viele molekulare, physiologische und entwicklungs-genetische Parallelen mit den Säugetieren auf. Für 70% der humanen Gene findet sich bei *Danio rerio* ein Ortholog (Howe et al., 2013). Auf Grund seiner geringen Unterhaltskosten sowie einer hohen Reproduktionszahl, ist der Zebrafisch ein sehr erfolgreicher Modellorganismus geworden. Ein weiterer großer Vorteil ist die leicht durchzuführende genetische Manipulation. So kann mit Hilfe des CRISPR/CAS Systems im Einzellstadium nahezu jedes Gen ausgeschaltet werden oder auch ein neues Gen eingefügt werden (Zhang et al., 2014). In frühen Stadien können diese Veränderungen mit einem entsprechenden Reporter sehr gut beobachtet werden, da die embryonalen und frühen juvenilen Stadien transparent sind. So können diverse Betrachtungen, wie z.B. Fluoreszenzuntersuchungen, leichter erfolgen.

Auf Grund der hohen genetischen und physiologischen Übereinstimmung mit dem Menschen, wird der Zebrafisch für die Erforschung verschiedener Krankheitsbilder, den Einfluss von Gefahrstoffen (Tavares und Santos Lopes, 2013) oder auch immunologischen Untersuchungen (Singh et al., 2013; Uribe et al., 2011) genutzt.



Abbildung 1: Der Zebrafisch (*Danio rerio*)

Quelle: Herbert Nigl, Dietzenbach

Zebraabürblinge legen wie die meisten Fische Eier. Sie betreiben jedoch keine Brutpflege und es kann auch vorkommen, dass sie ihre eigenen Eier fressen. Ein einzelnes Weibchen kann bis zu 400 Eier bei einer einzelnen Paarung laichen (Sessa et al., 2008). Die Laichablage findet bevorzugt im flachen Uferbereich über schlammigen oder auch kieselartigen Untergrund während der Morgendämmerung statt (Spence et al., 2007). Die weitere Entwicklung der Zygote über den Embryo hin zum adulten Tier wird wesentlich von der Umgebungstemperatur beeinflusst. Die erste Zellteilung findet bei 28 °C bereits ca. 40 Minuten nach der Befruchtung statt (Kimmel et

al., 1995). Es folgen weitere mitotische Teilungen bis nach ca. 2 Stunden das 64-Zell-Stadium erreicht ist. Mit dem 64-Zell-Stadium ist die Furchungsphase abgeschlossen und geht in die Blastula-Phase über. Ab dieser Phase wird die Entwicklung von der Zygote und nicht mehr maternal kontrolliert. Weitere Zellteilungen folgen bis zu einem 2000-Zell-Stadium, so dass das Blastoderm auf dem Dotter aufliegt. Zum Ende dieses Zyklus (bis ca. 4,5 Stunden nach Befruchtung) teilt sich das Blastoderm in drei Bereiche auf (Kimmel und Law, 1985). Zellen an der Dotter-Blastodermgrenze sinken in die Dotterzelle. Zellkerne und Zytoplasma der absinkenden Zellen bilden die Dotter-Syncytialschicht. Die Epithelschicht wird von den äußeren Zellen des Blastoderm gebildet, während die Zellen im Inneren des Blastoderms die embryonalen Anlagen bilden (Warga und Kimmel, 1990). Im Anschluss bilden sich in der Gastrula-Phase die Keimschichten aus. Diese Phase dauert bis ca. 10 Stunden nach der Befruchtung (hpf). Nach dieser Zeit sind die Anlagen des Kopfes zu erkennen. Die bis zum Ende des ersten Tages dauernde Phase wird als Segmentierungsphase bezeichnet, in der der Embryo mit der Differenzierung des Körpers beginnt. Im Schwanzbereich können nach ca. 10 Stunden die ersten Somiten beobachtet werden. Bis ca. 18 Stunden nach Fertilisation bilden sich die verschiedenen Bereiche des Gehirns aus

und sind ab diesem Zeitpunkt erkennbar. Der Schwanz des Embryos beginnt sich vom Dottersack zu lösen bis er ca. 24 Stunden nach der Befruchtung gerade ausgerichtet ist. Nach dem ersten Tag sind bereits Augen, das Herz, Ohren sowie weite Teile des neuronalen Netzwerkes zu erkennen. Außerdem beginnt sich der Pronephros, also ein Vorläufer der Niere zu bilden (Drummond und Davidson, 2016). Die Differenzierung des Pronephros ist nach 48 Stunden abgeschlossen. Dieser übernimmt dann bereits eine immunologische Funktion (Gerlach und Wingert, 2013). 48 Stunden bis 72 Stunden nach der Befruchtung schlüpfen die Embryonen. Ihre Nahrung beziehen sie weiterhin aus dem Dottersack. Erst fünf Tage nach Befruchtung können sich Zebrafische selbstständig ernähren. 30 Tage nach der Befruchtung (dpf) ist die Entwicklung zum juvenilen Fisch mit allen Flossen und dem typischen Muster erkennbar (Parichy, 2003). Während dem juvenilen Stadium bilden sich die Gonaden zu den Geschlechtsorganen aus (Orban et al., 2009). Labortiere erreichen ihre Geschlechtsreife bereits nach drei Monaten, während es bei Wildtieren bis zu sechs Monaten dauern kann (Engeszer et al., 2007). Unter Laborbedingungen kann die Lebensdauer der adulten Tiere bis zu sechs Jahren betragen. (Gerhard et al., 2002).

Für diese Arbeit ist die Entwicklung der Niere als ein Organ des angeborenen Immunsystems und Expressionsort des hier betrachteten Nephrosin (Song et al., 2004) von Bedeutung und wird im folgenden Abschnitt (1.1.1) genauer erläutert.

1.1.1 Entwicklung der Niere des Zebrafisches

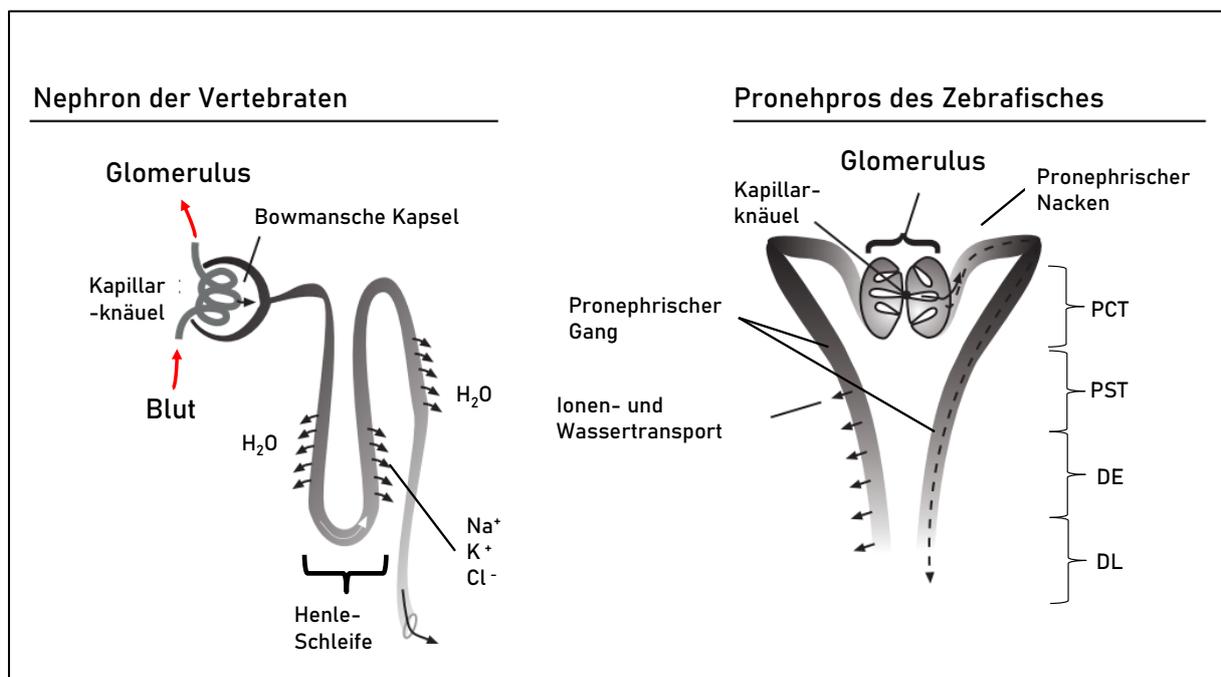


Abbildung 2: Vergleich eines Nephrons der Vertebraten mit dem Pronephros des Zebrafisches

Das Schaubild zeigt links die funktionelle Einheit der Niere (Nephron). Blut durchströmt die Kapillaren des Glomerulus, in dem es ultrafiltriert wird. Das Filtrat wandert dann durch die Henle-Schleife zum Sammelrohr. Die verschiedenen Bereiche erfüllen dabei spezifische Aufgaben. Rechts ist der Pronephros des Zebrafisches dargestellt. Dieser besteht aus einem verschmolzenen Glomerulus von dem aus zwei segmentierte pronephrische Gänge abgehen. Diese vollziehen ebenfalls spezifische Funktionen in der Resorption und Osmoregulation des Filtrats. PCT= *proximal convoluted tubulus*; PST= *proximal straight tubulus*; DE= *distal early* (früher distaler Tubulus); DL *distal late* (später distaler Tubulus).

Die Abbildung ist aus Drummond und Davidson, 2016 entnommen, ins Deutsche übersetzt und die Einteilung des pronephrischen Ganges hinzugefügt. Lizenznummer: 4834270796426

Die Niere der Knochenfische dient wie bei den höheren Vertebraten der Osmoregulation. Da der Fisch im Süßwasser lebt, wird ständig Wasser über die Haut aufgenommen und muss über die Niere wieder

ausgeschieden werden. Auch werden Stoffwechselprodukte und Ionen nach der Filtration des Blutplasmas resorbiert oder auch ausgeschieden (Drummond und Davidson, 2016). Neben der osmoregulatorischen Aufgabe werden in der Niere auch Zellen der angeborenen Immunantwort hergestellt (Zapata et al., 2006). Man unterscheidet Pronephros, Mesonephros und Metanephros (Seely, 2017). Die ersten Nierenanlagen können beim Zebrafisch 12 Stunden nach der Fertilisation beobachtet werden.

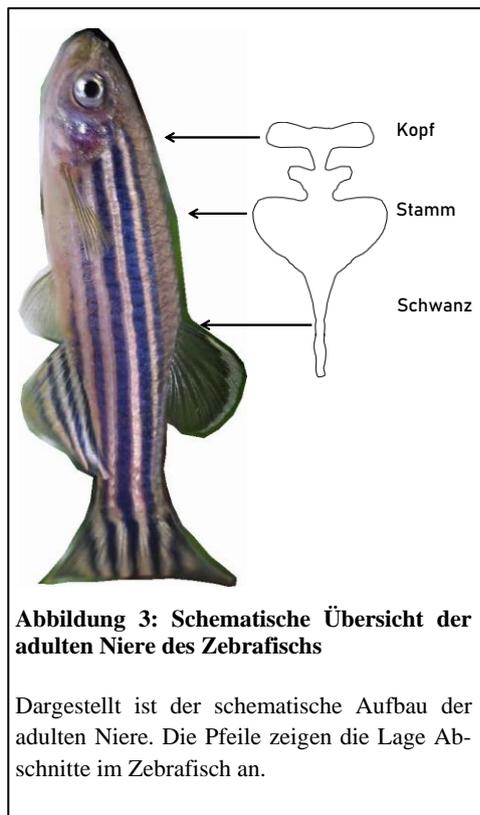


Abbildung 3: Schematische Übersicht der adulten Niere des Zebrafischs

Dargestellt ist der schematische Aufbau der adulten Niere. Die Pfeile zeigen die Lage Abschnitte im Zebrafisch an.

Während der Pronephros bei Säugetieren nicht funktionell ist (Seely, 2017), kann der Pronephros bei Knochenfischen seine Funktion bei der Osmoregulation übernehmen und 48 Stunden nach der Befruchtung nachgewiesen werden (Drummond et al., 1998; Drummond und Davidson, 2016). Der Pronephros besteht aus zwei Nephronen (Abbildung 2), deren Glomeruli miteinander verschmolzen sind. Die auf den Glomerulus folgenden Bereiche werden auf Grund von Genexpressionsdaten (Elmonem et al., 2018; Wingert und Davidson, 2008) in folgende Bereiche unterschieden: Nocken, proximaler gewundener Tubulus (PCT=*proximal convoluted tubulus*), proximaler gerader Tubulus (PST=*proximal straight tubulus*), früher distaler Tubulus (DE), später distaler Tubulus (DL) und das Sammelrohr. Der proximale gewundene Tubulus ist ähnlich aufgebaut wie der proximale Tubulus der Säugerniere und übernimmt auch ähnliche Funktionen. Im PCT wird das Säure-Base-Gleichgewicht

gesteuert und Ionen werden zurückgewonnen. Die Funktion des folgenden Abschnitts (PST) ist noch nicht ganz geklärt. Der PST scheint ebenfalls Ionen zu resorbieren (Drummond und Davidson, 2016). Auf den proximalen geraden Tubulus folgt der frühe distale Tubulus, welcher die Funktion des aufsteigenden Astes des Nephrons, die Reduzierung der Osmolarität des Nierenfiltrates (Guggino et al., 1988), übernimmt. Die Funktion des späten distalen Tubulus ist nicht abschließend geklärt. Da die Genexpression eines Natriumchlorid Kotransporters nachgewiesen werden konnte, wird von einer Natrium- und Chloridresorption ausgegangen. Diese Funktion wird vom distalen gewundenen Tubulus Segment des Säugernephros übernommen. Alle diese Übereinstimmungen zeigen die Ähnlichkeit zwischen dem Metanephros der Säugetiere und dem Pronephros der Knochenfische. Dies macht den Pronephros zu einem interessanten Instrument zur Erforschung der Nierenentwicklung oder Nierenerkrankungen.

Die Bildung der ersten Nephronen des Mesonephros beginnt ca. 14 Tage nach der Fertilisation caudal des Pronephros und der dorsal gelegenen Schwimmblase (Diep et al., 2015, 2011). Mit der Bildung des Mesonephros ist die Entwicklung der Niere beim Zebrafisch abgeschlossen. Diese kann aus mehreren hundert Nephronen bestehen (Diep et al., 2015). Die voll entwickelte Niere der Knochenfische wird in drei Bereiche eingeteilt (Abbildung 3). Beginnend mit dem Kopf bzw. der Kopfniere folgen Stamm und Schwanz der Niere (Diep et al., 2015). Der Kopfteil der Niere übernimmt nicht nur eine Funktion in der Osmoregulation sondern ist auch ein lympho-haematopoetisches Gewebe (Rauta et al., 2012) und somit an der Immunabwehr beteiligt.

1.1.2 Immunsystem der Knochenfische

Die Abwehr von Pathogenen ist für alle Lebewesen von essentieller Bedeutung. Deshalb hat sich über mehrere Millionen Jahre das Immunsystem entwickelt, welches Pathogene abwehren soll. Die immunologischen Gewebe der Knochenfische sind Thymus, Milz und Niere (Uribe et al., 2011), in denen Nephrosin exprimiert wird (Hung et al., 1997). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen angeborenem

und adaptivem Immunsystem. Da sich bei Fischen die Eier und Embryonen außerhalb der Körperhöhle entwickeln, kommen diese bereits früh mit der Umwelt und möglichen Pathogenen in Kontakt. Aus diesem Grund ist für Fische das angeborene Immunsystem besonders wichtig (Uribe et al., 2011).

Auch das angeborene Immunsystem ist ein in großen Teilen hochspezifischer Abwehrmechanismus. Es wird von mechanischen Barrieren, wie Epithelien oder Schleimschichten, Phagozyten, cytotoxischen Zellen, Rezeptoren und Peptiden gebildet (Uribe et al., 2011). Die eindringenden Pathogene können durch *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt werden und im Anschluss eine schnelle Immunantwort auslösen. So können infizierte Zellen oder Pathogene phagozytiert oder auch die Apoptose eingeleitet werden. An der angeborenen Immunantwort sind verschiedene Zelltypen beteiligt (Gasteiger et al., 2017). Es wird u.a. zwischen Makrophagen, dendritischen Zellen, myeloiden Suppressorzellen und Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen unterschieden.

Zunächst müssen die dendritische Zellen, Neutrophile und Makrophagen durch Chemokine und Cytokine aktiviert werden, ehe sie in der Lage sind Mikroorganismen und andere Zellen zu bekämpfen und die adaptive T- und B-Zell-basierte Immunantwort einzuleiten, die letztlich zur Wiederherstellung der Homöostase führt (Anwar et al., 2013; Rothlin et al., 2015). Regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen können die adaptive Immunantwort durch T-Zellen unterdrücken (Gasteiger et al., 2017). Neutrophile werden im folgenden Abschnitt (1.1.3) näher erläutert.

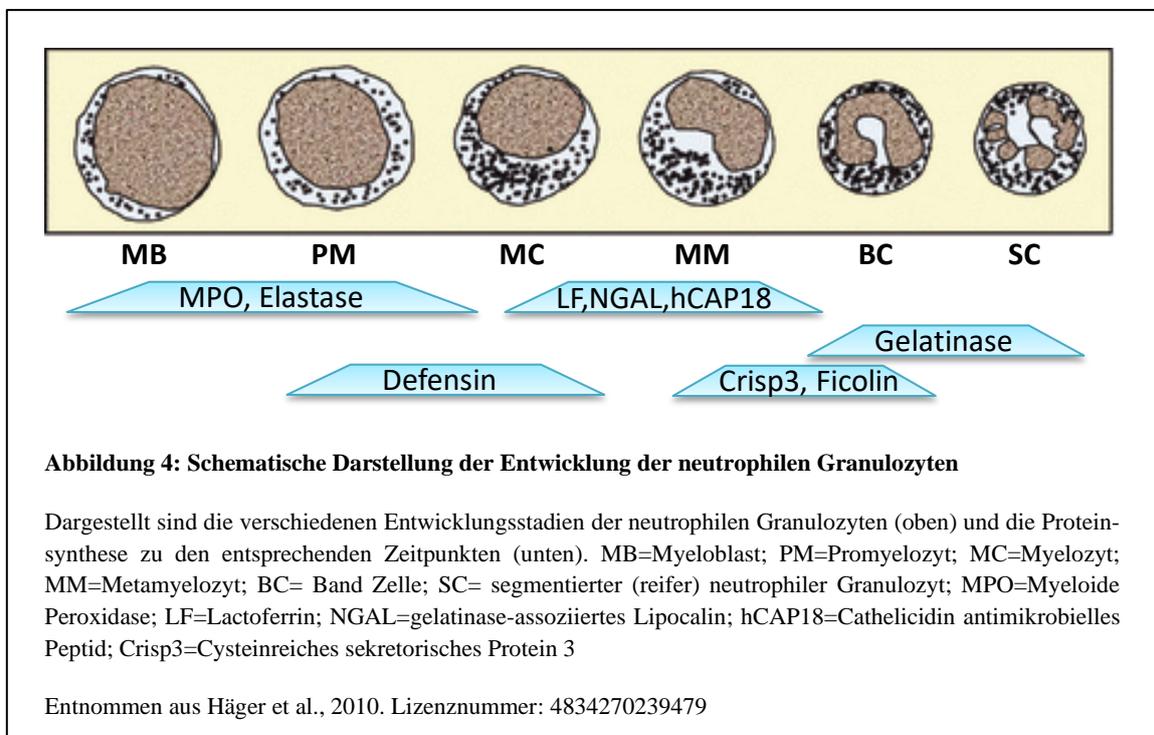
Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine extrem hohe Spezifität gegenüber Pathogenen aus. Es erlangt seine volle Funktionalität allerdings erst 4-6 Wochen nach Fertilisation (Lam et al., 2004). Bei einer Infektion mit Pathogenen versucht der Organismus diese zu identifizieren und Moleküle in Form von Antikörpern zu bilden. Sollte eine erneute Infektion stattfinden, können noch im Lymphsystem vorhandene B- und T- Gedächtniszellen die Pathogene schnell unschädlich machen.

1.1.3 Neutrophile Granulozyten: Ein Teil der angeborenen Immunabwehr

Wie bereits beschrieben ist das angeborene Immunsystem gerade für die frühen Entwicklungsstadien der Fische von besonderer Bedeutung. Neutrophile Granulozyten, oder kurz nur Neutrophile genannt, spielen in der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle, da sie eine der ersten Zellen am Ort der Infektion sind (Harvie und Huttenlocher, 2015).

Neutrophile Granulozyten werden aus myeloiden Vorläuferzellen in rostralen Blutinseln (anteriores Mesoderm) gebildet. Diese Vorläuferzellen wandern zum Dottersack und differenzieren sich ab ca. 22 Stunden nach Fertilisation zu einfachen Makrophagen, von denen sich ein Teil wiederum in Neutrophile differenziert. Dieser Vorgang beginnt etwa 33 Stunden nach der Befruchtung (Le Guyader et al., 2008). Während der larvalen Entwicklung werden die Neutrophilen also in den Blutinseln gebildet, die später zum caudalen hämatopoetischen Gewebe (Murayama et al., 2006) differenzieren. In diesem Stadium lassen sich Neutrophile sowohl in diesem Gewebe als auch als frei zirkulierende Neutrophile im Kopfbereich finden (Harvie und Huttenlocher, 2015). Bei adulten Zebrafischen wurden Neutrophile in der Niere sowie der Milz nachgewiesen (Lieschke et al., 2001), können aber auch bis zu 5 Tagen im Blut zirkulieren (Pillay et al., 2010).

Bei einer Infektion werden die Neutrophile über chemotaktische Gradienten zum Ort der Infektion geführt (Mócsai et al., 2015). Am Ort der Infektion können Neutrophile mehrere Funktionen erfüllen. Zum einen können sie sogenannte NETs (*neutrophil extracellular traps*) bilden, um Pathogene einzufangen und abzutöten (Harvie und Huttenlocher, 2015; Palić et al., 2007). Zum anderen können Neutrophile in die infizierte Gewebe migrieren und verschiedene antimikrobielle Proteine freisetzen (Häger et al., 2010). Diese Proteine befinden sich in verschiedenen Granula, die in spezifischer Reihenfolge freigesetzt werden (Häger et al., 2010). Häger und Kollegen haben zwischen diversen Granula unterschieden. Zum einen nennen sie die „Peroxidase positive Granula“, welche die myeloide Peroxidase beinhalten, die reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, um Pathogene zu töten (Harvie und Huttenlocher, 2015). Die weiteren Granula sind alle Peroxidase negativ. Die Granula können Defensin-, Gelatinase-, Lactoferrin-, Ficolin1-reich sein oder eine hohe Konzentration von cystein-reichem sekretorischem Protein 3 aufweisen. Diese Granula werden in einer spezifischen Reihenfolge gebildet (siehe Abbildung 4) (Häger et al., 2010). Die ersten Granula, die gebildet werden, sind die Peroxidase positiven und defensinreichen Granula zur Permeabilisierung von Membranen und Abwehr der Pathogene. Die folgenden sekretorischen Vesikel beinhalten Proteine zur Adhäsion und der Migration



in Gewebe. Als ein weiteres Enzym konnte Nephrosin in den Neutrophilen durch eine Kolo-kalisation mit der myeloiden Peroxidase nachgewiesen werden (Song et al., 2004). Eine Zuordnung zu einem Granulatyp wurde jedoch nicht vollzogen. Da Proteasen einen essentiellen Stellenwert im Immunsystem besitzen, wird im folgenden Abschnitt nochmal näher auf ihre Bedeutung eingegangen.

1.2 Proteasen und ihre Bedeutung

Proteasen sind als Enzyme ein essentieller Teil des Lebens und kommen in allen Organismen und deren Geweben vor. Proteasen hydrolysieren – spalten eine Peptidbindung mit Hilfe von Wasser – Peptidbindungen innerhalb (Endopeptidasen) oder vom Ende (Exopeptidasen) von Polypeptiden. Diese Spaltung kann durch verschiedene Mechanismen durchgeführt werden, weshalb Proteasen in aktuell sechs Klassen unterteilt werden, die sich vielfach untergliedern lassen (Abbildung 5). Aktuell sind 641 Gene für Proteasen im Menschen nachgewiesen (Bond, 2019), was ca. 3% des Genoms entspricht. Für alle Lebewesen sind, Stand September 2017, laut der Datenbank MEROPS (Rawlings et al., 2018) 3181 Proteasen auf Proteinebene experimentell nachgewiesen. Aktuell sind es laut dieser Datenbank sogar 4341 Proteasen. Die größte Gruppe der Proteasen sind die Serinproteasen (1710 Proteasen) gefolgt von den Metalloproteasen (1089 Proteasen).

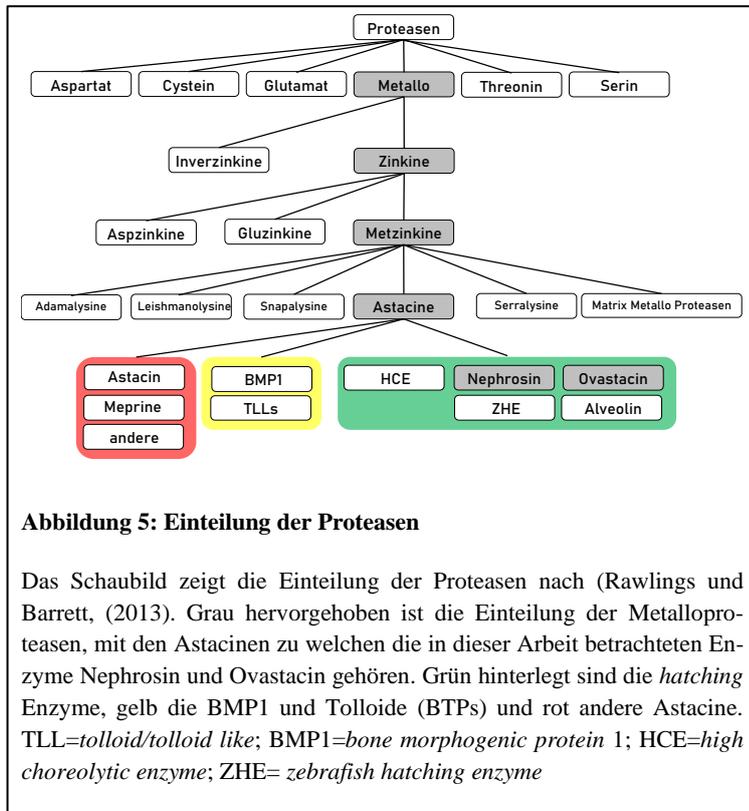


Abbildung 5: Einteilung der Proteasen

Das Schaubild zeigt die Einteilung der Proteasen nach (Rawlings und Barrett, (2013). Grau hervorgehoben ist die Einteilung der Metalloproteasen, mit den Astacinen zu welchen die in dieser Arbeit betrachteten Enzyme Nephrosin und Ovastacin gehören. Grün hinterlegt sind die *hatching* Enzyme, gelb die BMP1 und Tolloide (BTPs) und rot andere Astacine. TLL=*tolloid/tollid like*; BMP1=*bone morphogenic protein 1*; HCE=*high choreolytic enzyme*; ZHE=*zebrafish hatching enzyme*

Die große Anzahl der Proteasen spiegelt sich auch in den diversen Funktionen wider, die sie ausüben. Sie sind in nahezu allen physiologischen Bereichen involviert, wie z.B. in morphologischen Prozessen, dem Nahrungsverdau oder auch in der Fortpflanzung (López-Otín und Bond, 2008; Stöcker et al., 2014; Vadon-Le Goff et al., 2015).

1.2.1 Astacine

Von den bereits erwähnten 4341 experimentell nachgewiesenen Proteasen werden in der Datenbank MEROPS 235 Proteasen den Astacinen zugeordnet. Damit sind Astacine die zweitgrößte Familie aller Proteasefamilien. Namensgebend für die Familie ist das Astacin des Edelkrebses *Astacus astacus* L. (Stöcker et al., 1988). Die Struktur des Astacins wurde wenige Jahre später aufgeklärt (Bode et al., 1992). Alle Astacine weisen eine charakteristische Konsensussequenz ($\mathbf{HExxHxxGxxH}^1$) auf, mit der sie ein Zinkion binden können. Auf Grund dieser Sequenz in Verbindung des ebenfalls charakteristischen *Met-turns* (SxMHY) werden sie den Metzinkinen zugeordnet. Dabei wird das Zinkion durch die drei Histidine der Konsensussequenz, sowie durch das Tyrosin im *Met-turn* koordiniert (fett hervorgehoben) (Stöcker und Bode, 1995).

Astacine weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. So werden alle Astacine als Zymogene bestehend aus Propeptid, katalytischer Domäne und optionalen C-terminalen Domänen exprimiert. Das Propeptid muss zunächst proteolytisch entfernt werden, wodurch die Protease aktiviert wird (Guevara et al., 2010; Möhrlen et al., 2001; Yiallourous et al., 2002). Neben der katalytischen Domäne besitzen die meisten

¹ Einbuchstabencode der Aminosäuren der auch im Folgenden für Proteinsequenzen verwendet wird. X steht für eine beliebige Aminosäure

Astacine weitere C-terminale Domänen (Bond und Beynon, 1995). Charakteristisch für Bmp1 und die Tolloide (BTPs) sind CUB (*Complement, sea Urchin EGF, BMP1*) und EGF-ähnliche (*Epidermal Growth Factor*) Domänen, welche unter anderem für die Dimerisation von Tolloid wichtig ist (Berry et al., 2009). Meprine enthalten MAM-Domänen (*meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu*), welche für die Bildung von Multimeren notwendig sind (Arolas et al., 2012). Außerdem können sie Transmembrandomänen, EGF-ähnliche und TRAF-Domänen (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) enthalten. Meprine haben verschiedene Funktionen als Sheddase oder auch Kollagenasen. Sowohl Meprin α als auch Meprin β werden mit einer Transmembrandomäne translatiert, welche bei Meprin α durch Furin entfernt wird (Tang und Bond, 1998). Durch die Prozessierung von Prokollagen Typ I und Typ III wird die Struktur der extrazellulären Matrix – vor allem der Epithelien, wie der Haut - durch Meprine reguliert (Biasin et al., 2017; Broder und Becker-Pauly, 2013). Auch im Immunsystem übernehmen Meprine eine Funktion, indem sie verschiedene Interleukine prozessieren (Banerjee et al., 2011; Keiffer und Bond, 2014). Generell sind Astacine in fast allen physiologischen Bereichen zu finden, sei es in der Fortpflanzung durch Ovastacin bei Säugern (Stöcker et al., 2014) oder Alveolin bei Fischen und Vögeln (Shibata et al., 2012), als auch bei der embryonalen Musterbildung durch Tolloide (Connors et al., 1999).

1.2.2 Die Astacin Protease Nephrosin

Nephrosin wurde als erstes Astacin in lymphohämatopoetischen Geweben des Karpfen (*Cyprinus carpio*) entdeckt (Hung et al., 1997). Da dieses Astacin ursprünglich in der Kopfniere und Niere gefunden wurde, erhielt es den Namen Nephrosin. Eine Suche in der Datenbank UniProt (Bateman, 2019) mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul et al., 1990) ergab nur Übereinstimmungen in den Knochenfischen. Es besitzt eine einfache Domänenstruktur aus Prodomäne und katalytischer Domäne (Hung et al., 1997).

Obwohl Nephrosin die größte Sequenzidentität zu den *hatching* Enzymen aufweist, konnte eine Funktion beim Schlüpfprozess bislang nicht nachgewiesen werden (Hung et al., 1997). Die Funktion blieb daher unklar.

Es konnte gezeigt werden, dass das Nephrosin (*npsn*) von Zebrafischen in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Song et al., 2004). Weiterhin konnte die Genexpression von Nephrosin in einer primären Nierenzellkultur der Gelbschwanzmakrele (*Seriola quinqueradiata*) gesteigert werden, wenn diese mit immunstimulierenden Lipopolysacchariden behandelt wurde, nicht jedoch mit immunstimulierendem Concanavalin A (ConA) (Darawiroj et al., 2008). Die jüngste veröffentlichte Studie zu Nephrosin aus dem Jahre 2017 zeigt eine erhöhte Mortalität von Nephrosin *knockout*-Zebrafischen, nachdem die Tiere mit *Escherichia coli* behandelt worden sind, während Nephrosin überexprimierende Zebrafische eine verbesserte Immunantwort zeigten (Di et al., 2017). Ein *knockout* von Nephrosin hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten am Infektionsort (Di et al., 2017). Diese drei Studien machen eine Funktion im Immunsystem wahrscheinlich, ohne jedoch die genaue Funktion aufklären zu können.

Zwei weitere Veröffentlichungen von Boutet et al. (2006) und Zhang et al. (2015) konnten in verschiedenen Knochenfischen eine gesteigerte Expression von Nephrosin bei erhöhten Salzkonzentrationen nachweisen. Die Antwort, warum Nephrosin in dieser Umgebung hochreguliert ist, blieb jedoch offen.

1.2.3 Die Astacin Protease Ovastacin

Ovastacin wurde erstmals von Lopez-Otin und Kollegen 2004 als Mitglied der Astacinfamilie beschrieben (Quesada et al., 2004). Es besteht aus einer Prodomäne, der katalytischen Astacindomäne und einer C-terminalen Domäne, deren Funktion bisher unbekannt ist und keine Ähnlichkeit zu bekannten Domänen aufweist (Gomis-Rüth et al., 2012b; Quesada et al., 2004).

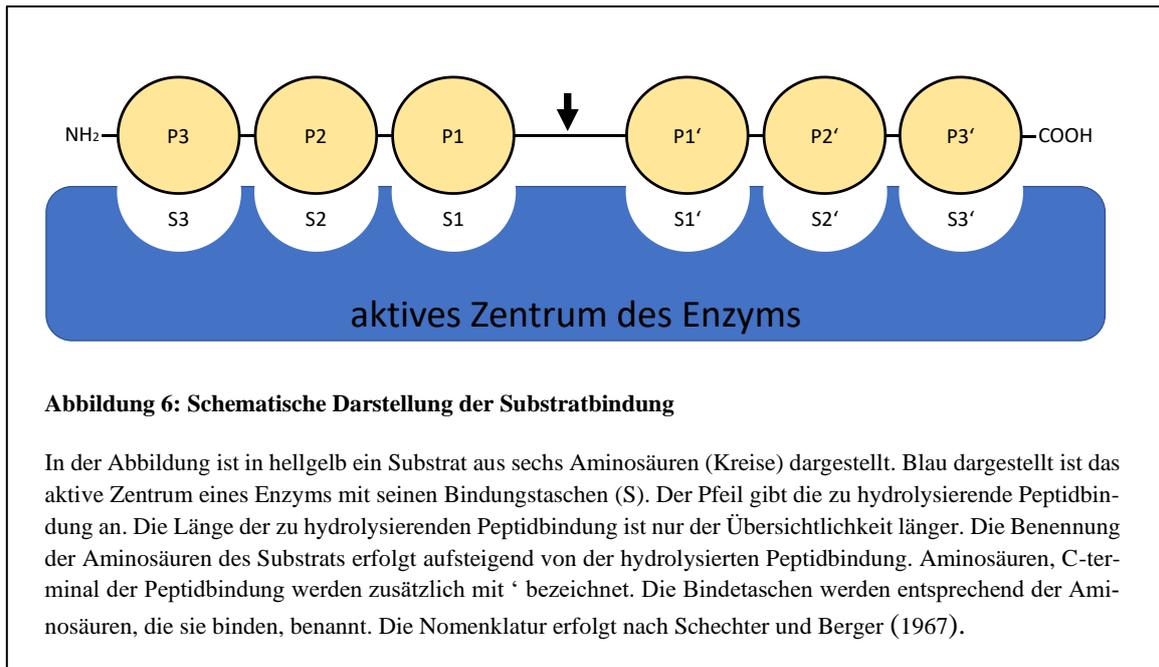
Ovastacin konnte im Ovar bzw. der Oocyte bei Säugetieren nachgewiesen werden, wo es in den kortikalen Granula vorliegt (Burkart et al., 2012). Weiterhin wurde in dieser Untersuchung gezeigt, dass Ovastacin das *zona Pellucida* Protein 2 prozessiert (ZP2). Nachdem das erste Spermium mit der Eizelle verschmolzen ist, wird die Corticalreaktion ausgelöst. Dabei werden corticale Granula ausgeschüttet, die auch Ovastacin beinhalten, wodurch ZP2 prozessiert wird. Dies führt zum Aushärten der *zona pellucida* und ein Eindringen weiterer Spermien in die Oocyte wird verhindert. Bei Ovastacin *knockout*-Mäusen ist diese Aushärtung nicht beobachtet worden (Dietzel et al., 2013). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Prozessierung der *zona pellucida* durch Ovastacin bereits vor der Befruchtung stattfinden kann (Körschgen et al., 2017). Diese Proteolyse verhindert die Befruchtung der Eizelle durch Spermien nicht, da sie einer strengen Kontrolle unterliegt. Diese Regulation von Ovastacin wird durch das Plasmaprotein Fetuin-B verursacht (Dietzel et al., 2013). Bei Fetuin-B defizienten weiblichen Mäusen kommt es zu einer verfrühten Aushärtung der *zona pellucida*, so dass kein Spermium mit der Eizelle verschmelzen kann und die Weibchen infertil sind (Dietzel et al., 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fetuin-B Ovastacin potent hemmen kann. Dies konnte durch Karmilin et al. (2019) bestätigt werden. Der Regulationsmechanismus der Astacine und somit auch des Ovastacins durch Fetuin-B ist in Abschnitt 1.3.1 erläutert.

1.2.4 Schnittpräferenz von Astacinen

Peptidbindungen werden zwischen Aminosäuren mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften gebildet. Damit Proteasen diese Bindung spalten können müssen die Proteasen auf diese Aminosäuren angepasst sein. Der Ort der Spaltung wird als aktives Zentrum bezeichnet. Zunächst ging man von einem starren Schlüssel-Schloss Prinzip aus, nach dem ein Enzym räumlich komplementär zu seinem Substrat strukturiert ist (Fischer, 1894). Da in den meisten Fällen nicht nur Dipeptide, sondern wesentlich längere Peptidketten oder auch gefaltete Proteine prozessiert werden, die jedoch nicht starr sind, erscheint das von Koshland (1958) entwickelte Modell des *induced fit* Mechanismus plausibler. Demnach passt sich das aktive Zentrum an das Substrat an, um so eine Bindung zu ermöglichen und das Enzym stabilisiert insbesondere den energetisch ungünstigen Übergangszustand bei der Substratumsetzung (Jencks, 1985; Knowles, 1987). Im Fall der Proteasen werden verschiedene Aminosäuren des Substrates in sogenannten Bindungstaschen gebunden, um die zu hydrolysierende Peptidbindung auszurichten (Schechter und Berger, 1967). Die Aminosäuren des Substrats werden nach der Lage zur hydrolysierten Bindung mit P (N-terminal der Spaltstelle) und P' (C-terminal der Spaltstelle) benannt (siehe Abbildung 6). Die Bindetaschen des Enzyms werden analog zu den gebundenen Aminosäuren mit S und S' benannt. Dennoch ist auch diese Anpassung nur in einem gewissen Maße möglich, da die Aminosäuren im aktiven Zentrum nicht frei beweglich sind. Da die sogenannten Bindungstaschen für bestimmte Seitenkettenstrukturen der Aminosäuren spezialisiert sind und sich in der Regel hinsichtlich ihrer Hydrophilie und Hydrophobie

unterscheiden, kann man für Proteasen typische Spaltmuster feststellen. Mit Hilfe dieser Spaltspezifität können Proteasen charakterisiert und typisiert werden.

Für die meisten Astacine konnte eine Spaltpräferenz für eine Peptidbindungen aminoterminal von ein oder zwei negativ geladenen Aminosäureresten gezeigt werden (Becker-Pauly et al., 2011). Ausnahmen dieser Präferenz sind die Proteasen LAST und Astacin (Becker-Pauly et al., 2011). Astacin bevorzugt ungeladene, kleine Aminosäuren in P1'. Ebenfalls zu sehen ist, dass Astacine direkt C-terminal des Schnitts (P2') die Aminosäure Prolin bevorzugen. Eine Spaltspezifität für Nephrosin und Ovastacin ist bisher nicht publiziert.



1.3 Inhibitoren und ihre Bedeutung

Proteasen sind in allen physiologischen und vielen pathophysiologischen Bereichen des Lebens involviert. Aus diesem Grund ist es auch von essentieller Bedeutung, dass Proteasen generell strenger Regulation unterliegen. Zum einen ist dies durch eine inaktiv exprimierte Vorstufe der Protease als Zymogen möglich. Jedoch darf die Protease auch nach ihrer Aktivierung nicht unkontrolliert weiterarbeiten. Dies könnte zu schweren Gewebsschäden und Krankheiten führen.

Aus diesem Grund gibt es eine Vielzahl an endogenen Inhibitoren, die die proteolytische Aktivität der Proteasen unterbinden. Einige Inhibitoren können ein breites Hemmspektrum besitzen und so verschiedene Proteasen hemmen. Ein Beispiel hierfür ist das α_2 -Makroglobulin, welches Endopeptidasen unabhängig der Proteasefamilie hemmen kann (Garcia-Ferrer et al., 2017; Starkey und Barrett, 1982). Oft sind es jedoch spezifischere Inhibitoren, die dann für eine Familie oder sogar nur für einen Teil der Familie wirksam sind. Matrix Metalloproteasen (MMPs) sind in der Lage die extrazelluläre Matrix abzubauen (Nagase und Woessner, 1999). Damit dieser Abbau kontrolliert ablaufen kann, werden MMPs durch TIMPS (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) gehemmt (Brew et al., 2000). Diese TIMPs hemmen ausschließlich MMPs. Ein weiteres Beispiel für einen spezifischen endogenen Inhibitor ist das Fetuin-B. Dieses ist in der Lage einen großen Teil der Astacine zu hemmen (Karmilin et al., 2019). Fetuin-B ist in dieser Arbeit verwendet und ist im folgenden Abschnitt (1.3.1) genauer erläutert.

Der Vollständigkeit halber soll nicht unerwähnt bleiben, dass es nicht nur endogene Inhibitoren für Proteasen gibt, sondern auch synthetische und exogene. So ist z.B. der Wirkstoff des AIDS-Medikaments

Invirase® ein Substratanalogon der HIV-Protease und hemmt deren Aktivität (HIV, Humanes Immundefizienz Virus) (Porche, 1996). Exogene Inhibitoren findet man unter anderem in Bakterien, die sich so gegen das Immunsystem des Wirtes zu Wehr setzen (de Jong et al., 2019).

1.3.1 Fetuin-B: Ein endogener Inhibitor der Astacinproteasen

Fetueine sind Mitglieder der Superfamilie der Cystatine. Die meisten Cystatine sind in der Lage Cysteinproteasen zu hemmen (Barrett, 1981), wodurch sich auch der Name ableitet. Die Cystatin Superfamilie besteht aus drei Typen.

Der erste Typ setzt sich ausschließlich aus Cystatinen mit nur einer Domäne zusammen und beinhaltet Cystatin A (Stefin), Cystatin C, Sarcocystatin und Cystatin RHcyst-1 (Rawlings et al., 2018). Sie sind intrazelluläre Proteine, die keine Glykolysierungen aufweisen (Abrahamson et al., 2003). Typ I Cystatine sind in der Lage Cysteinproteasen zu hemmen.

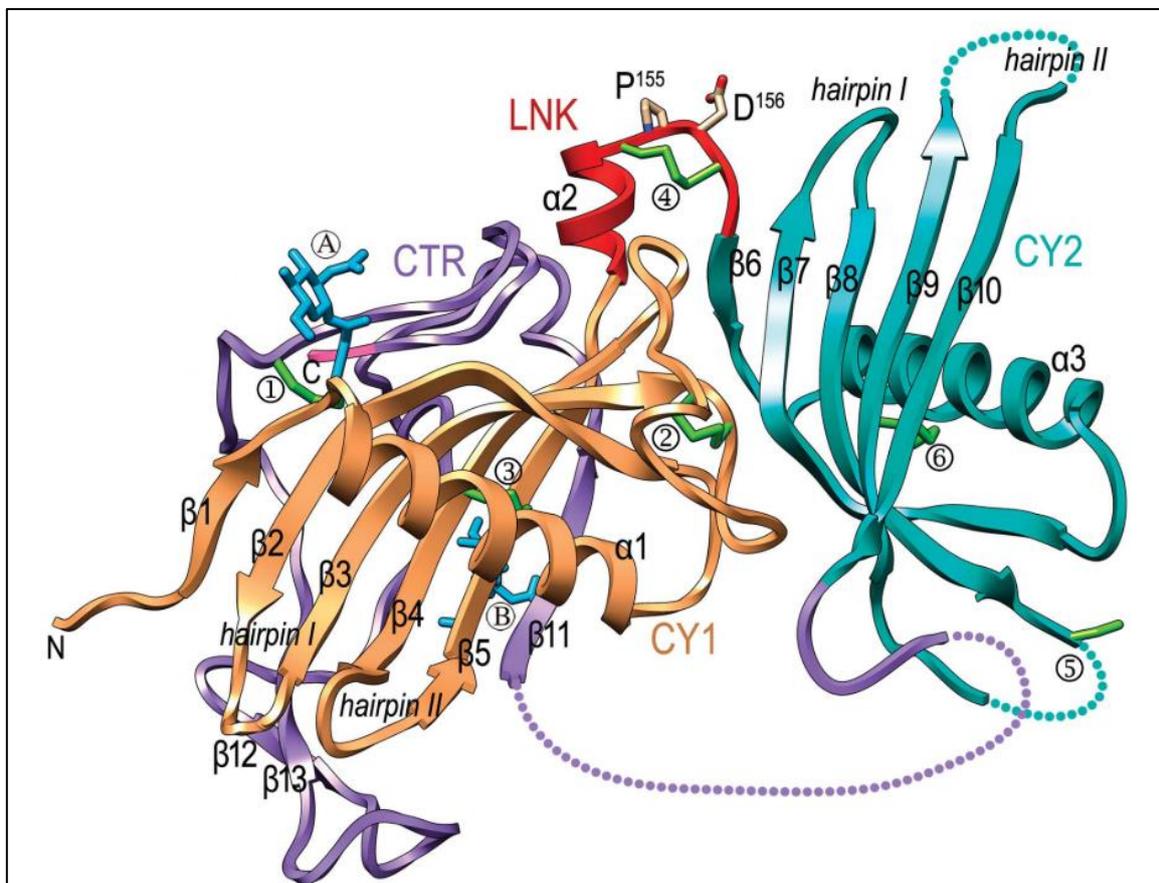


Abbildung 7: Bändermodell des Maus Fetuin-B

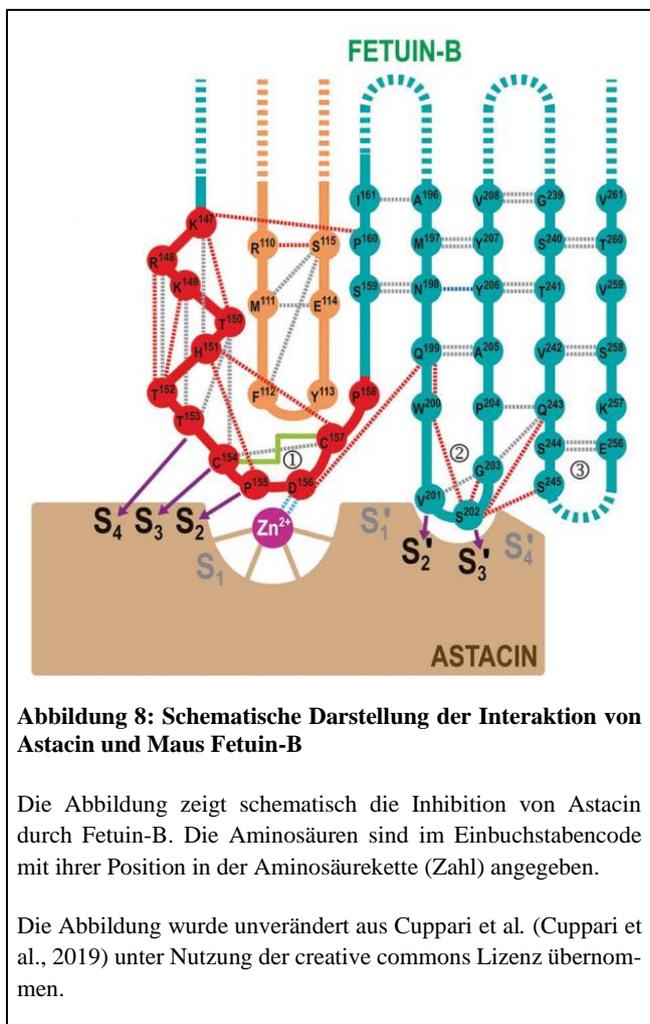
Die Abbildung zeigt die Anordnung der Sekundärstrukturen von Maus Fetuin-B. In Orange ist die erste cystatinähnliche Domäne (CY1) in türkis die zweite cystatinähnliche Domäne (CY2) gezeigt. Der C-terminale Abschnitt (CTR) ist in lila dargestellt. β -Faltblätter sind mit β bezeichnet, während α -Helices mit α bezeichnet sind. In grün sind Disulfidbrücken zwischen Cysteinen eingezeichnet. Hellblau (A und B) sind Glykosylierungsstellen.

Die Abbildung wurde unverändert aus Cuppari et al. (Cuppari et al., 2019) unter Nutzung der creative commons Lizenz übernommen.

Die Typ II Cystatine sind extrazelluläre, sezernierte Proteine und bestehen ebenfalls aus nur einer Domäne. Diese Domäne umfasst ca. 120 Aminosäuren und besitzt zwei charakteristische Disulfidbrücken

in der C-terminalen Region. Die Merops Datenbank enthält aktuell (18.02.2021) 52 Typ II Cystatine (Rawlings et al., 2018).

Der dritte Typ der Cystatine sind Plasmaproteine, welche in der Leber synthetisiert werden. Typ III Cystatine besitzen eine Multidomänenstruktur aus zwei oder drei Cystatin Domänen, die den TYP II Cystatinen ähneln. Neben diesen cystatin-ähnlichen Domänen besitzen alle auch noch einen C-terminalen Bereich (Lee, 2009), der sich jedoch variabel gestaltet. Drei cystatinähnliche Domänen findet man nur im Kininogen, von denen aber nur die zweite und dritte Domäne inhibitorische Funktion besitzen (Salvesen et al., 1986) in dem sie Papain, Cathepsin L oder auch Calpain (nur Domäne 2) hemmen können. Weiterhin spielt Kininogen eine Rolle in der Blutgerinnungskaskade, der Angiogenese und es hat antimikrobielle Eigenschaften (Lee, 2009). Auch das histidinreiche Glykoprotein (HRG) spielt in diesen Bereichen eine Rolle. Es besitzt wie die anderen Typ III Cystatine zwei cystatinähnliche Domänen (Abbildung 7, CY), von denen aber keine eine inhibitorische Fähigkeit gegenüber Cystein-Proteasen besitzt. Namensgebend für das HRG ist die prolinreiche und histidinreiche C-terminale Domäne. Auf diese Domäne ist die antimikrobielle Wirkung des HRG zurückzuführen (Lee, 2009).



Ein Typ III Cystatin vom Fetuintyp wurde erstmals 1944 von Pedersen als globuläres Protein in fötalem Kälberserum beschrieben (Pedersen, 1944). Darauf geht die Bezeichnung Fetuin zurück. Erst circa 60 Jahre später wurde klar, dass es sich bei Fetuin in Wirklichkeit um zwei Paraloge handelt (Olivier et al., 2000). Heute unterscheidet man zwischen Fetuin A (auch α_2 -Heremans-Schmid Glykoprotein) und dem Fetuin-B (Denecke et al., 2003; Olivier et al., 2000). Beide Proteine kommen in hohen Konzentrationen – 5,4 $\mu\text{mol/l}$ Fetuin-A (Jahnen-Dechent et al., 1997) und 2,3 $\mu\text{mol/l}$ Fetuin-B (Floehr et al., 2017) - im Blut von Mäusen vor. Fetuin A ist in der Lage Calciumphosphat (Hydroxyapatit) zu binden und spielt eine wichtige Rolle in der Mineralisierung der Knochen (Jahnen-Dechent et al., 2011). Zunächst wurde ein Ortholog des Maus Fetuin-B 2004 mit der Astacinprotease Nephrosin zusammen aus dem Karpfen gereinigt (Tsai et al., 2004), ehe das Säuger Fetuin-B von Karmilin *et al.* als potenter und spezifischer Inhibitor für Astacinproteasen mit Ausnahme der BTPs nachgewiesen werden konnte (Karmilin et al., 2019). Bereits 2013 konnte eine Funktion des Fetuin-B in der Regulation der Befruchtung bei Mäusen gezeigt werden.

Ovastacin prozessiert das *zona Pellucida* Protein 2, wodurch die *zona pellucida* verhärtet, so dass keine weiteren Spermien eindringen können. Um eine Aushärtung vor der Befruchtung zu verhindern, wird zu früh freigesetztes Ovastacin durch Fetuin-B gehemmt, das in der Follikelflüssigkeit und im Eileiter vorhanden ist (Dietzel et al., 2013). Der Hemmmechanismus von Astacinen durch

Fetuin-B konnte vor kurzem durch Röntgenkristallstrukturanalyse der dreidimensionalen Struktur von Fetuin-B im Komplex mit der Protease Astacin (Abbildung 8) aufgeklärt werden (Cuppari et al., 2019).

Fetuin-B besteht aus zwei cystatinähnlichen Domänen und einem C-terminalen Abschnitt. Die erste cystatinähnliche Domäne wird von fünf antiparallelen β -Faltblättern ($\beta 1$ - $\beta 5$) und einer α -Helix ($\alpha 2$) zwischen dem ersten und zweiten β -Faltblatt gebildet. $\beta 2$ und $\beta 3$ sowie $\beta 4$ und $\beta 5$ werden durch kurze Peptidsequenzen (*loops*) verbunden. Zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ ist ein größerer *loop*, welcher durch eine interne Disulfidbrücke (C^{96} - C^{107}) stabilisiert wird. Dieser größere *loop* ist bei humanem Cystatin E an der Inhibition von Legumain beteiligt (Dall et al., 2015). Maus Fetuin-B ist jedoch nicht in der Lage Legumain zu hemmen (Karmilin et al., 2019). Weitere Disulfidbrücken verbinden den ersten Faltblattstrang $\beta 1$ mit dem C-terminalen Bereich (C^{39} - C^{374}) und die β -Stränge $\beta 4$ und $\beta 5$ über die Cysteine C^{120} und C^{140} . Das letzte Faltblatt der ersten Cystatindomäne ist mit einer kurzen (12 Aminosäuren) Linkerregion (LNK) verbunden. Diese Linkerregion besteht aus einer einzelnen α -Helix ($\alpha 2$). Innerhalb dieser Linkerregion liegt eine Region mit der Aminosäuresequenz C^{154} PDCP 158 , in der die Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden. Durch die Proline und Cysteine formt dieses Motiv eine ringförmige Struktur, die für die Inhibition eine entscheidende Rolle spielt. Die zweite cystatinähnliche Domäne, die auf den Linker folgt, ist der ersten von den Sekundärstrukturen sehr ähnlich, obwohl sie nur 17% Identität aufweisen (Cuppari et al., 2019). Im Folgenden wird nur auf die Unterschiede eingegangen. Während die erste cystatinähnliche Domäne zwei Glykosylierungsstellen besitzt (Hellblau, Abbildung 7), besitzt die zweite Domäne keine Glykosylierungsstelle. Welchen Einfluss diese Glykosylierung hat, ist nicht genau geklärt. Der Loop zwischen $\beta 8$ und $\beta 9$ der zweiten Domäne ist mit 18 Aminosäuren um drei Aminosäuren kürzer als der entsprechende Loop in der ersten Domäne. *Hairpin I* ist um zwei Aminosäuren kürzer als in der ersten Domäne. An die zweite cystatinähnliche Domäne schließt sich der C-terminale Bereich (CTR) an, welcher in einem großen Abschnitt nicht kristallisiert und somit die Struktur nicht geklärt ist. Insgesamt sind nur drei β -Stränge im C-terminalen Bereich zu finden und keine α -Helix. Stabilisierender Faktor ist der β -Strang 11 ($\beta 11$), welcher parallel zum β -Faltblatt 5 der ersten Domäne verläuft und somit Fetuin-B stabilisiert. Ein weiteres wichtiges Strukturelement zur Stabilisierung ist eine Disulfidbrücke zwischen Cystatin 374 der CTR und dem Cystatin 39 der ersten Domäne. Der Rest der CTR ist sehr flexibel. Bis auf die stabilisierende Wirkung für das Fetuin-B ist für die CTR kein Einfluss auf die Inhibition gezeigt.

Direkte Wechselwirkungen (Abbildung 8) zwischen Astacin und Fetuin-B bilden die Linkerregion und die cystatinähnliche Domäne 2 aus. Besonders wichtig ist die CPDCP Sequenz in der Linkerregion, die in den katalytischen Spalt hineinragt. Diese Region blockiert die *non prime sites*, also Substratbindungsstellen die N-terminal der zu hydrolysierenden Peptidbindungen liegen. Das Aspartat komplexiert das katalytische Zinkion und ist somit essentiell für die Inhibition der Astacinproteasen. Dies zeigt die bis zu zehntausendfach schwächere Inhibition der Mutante (K_i 0,046 nM zu 426 nM für Ovastacin), bei der das Aspartat gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Die Substratbindetaschen S_2 bis S_4 werden durch die Aminosäuren 153 bis 155 blockiert. Die Bindetaschen C-terminal der Schnittstelle werden durch den *hairpin I* der zweiten cystatinähnlichen Domäne blockiert. Die Aminosäuren (QWVXGP), die diese Taschen blockieren, sind in Fetuin-B und entsprechenden Orthologen der Vertebraten konserviert. Nicht betroffen von einer direkten Interaktion sind die Bindungstaschen S_1 und S_1' . Da die S_1' -Bindungstasche bei vielen Metalloproteasen für die primäre Spezifität verantwortlich ist (Gomis-Rüth et al., 2012a, 2012b), können so verschiedene Astacine unabhängig der Spaltspezifität gehemmt werden.

Da eine Disulfidbrücke zwischen zwei direkt benachbarten Cysteinresten im sogenannten *edge*-strand der BTPs über den katalytischen Spalt ragt (Mac Sweeney et al., 2008), wird die oben beschriebene Inhibition bei BTPs verhindert.

1.3.2 Fisch Fetuin

2004 wurde der erste endogene Inhibitor für Astacinproteasen aus den hämatopoetischen Geweben des Karpfens isoliert (Tsai et al., 2004). Dieser Inhibitor bildet einen Komplex mit Nephrosin, wodurch dieses keine katalytische Aktivität mehr besitzt. Mit einer Sequenzähnlichkeit von ca. 50% zu Fetuin A und ca. 45% zu Fetuin-B (Maus und Mensch) wird dieser Inhibitor in die Cystatin III Familie eingeordnet. Auf Grund der Ähnlichkeit zu beiden Säugerfetuin wird in dieser Arbeit nur von Fisch Fetuin gesprochen. Das Fisch Fetuin, wie alle Typ III Cystatine, besitzt zwei Cystatin-ähnliche Domänen gefolgt von einer C-terminalen Domäne (Tsai et al., 2004). Das Fisch Fetuin, wie alle Typ III Cystatine, besitzt zwei Cystatin-ähnliche Domänen gefolgt von einer C-terminalen Domäne. Synthetisiert wird das Fisch Fetuin in der Leber und gelangt von dort über das Blut zu diversen Geweben. Das stärkste Aufkommen des Fisch Fetuins konnte in Niere, Kopfnieren, Kieme und Milz festgestellt werden, also Geweben in dem Nephrosin ebenfalls stark vertreten ist (Tsai et al., 2004).

Weiterhin konnten zwei verschiedene Transkripte gefunden werden. Eine lange Form mit einem *open reading frame* von 1395 Basenpaaren (Fetuin-L) und eine Form mit einem *open reading frame* von 903 Basenpaaren (Fetuin-S). Durch das häufigere Auftreten der längeren cDNA wurde vermutet, dass der Inhibitor wahrscheinlich von dieser Sequenz stammte (Tsai et al., 2004). Die Aminosäuresequenzen des Fetuin-L und Fetuin-S zeigen jedoch eine hohe Übereinstimmung. Insgesamt findet man verteilt über die gesamte Sequenz nur 15 Aminosäuresubstitutionen und eine Deletion von 164 Aminosäuren in der kurzen Form. Im Blut konnte das Fetuin-L in seiner gesamten Größe (67 kDa) nachgewiesen werden. Nachdem es in die hämatopoetischen Gewebe eingewandert ist, wird es von einer oder mehreren unbekannt Proteasen auf 40 kDa prozessiert. Vom N-Terminus werden lediglich vier oder fünf Aminosäuren entfernt. Rechnerisch werden C-terminal 182 Aminosäuren entfernt, um den reifen Inhibitor zu erhalten (Tsai et al., 2004). Dies bedeutet, dass ein Großteil der C-terminalen Domäne fehlt.

1.4 Zielsetzung

Die in der Literatur beschriebene Lokalisierung und Charakterisierung von Nephrosin erfolgte hauptsächlich auf Transkriptebene (mRNA) (Boutet et al., 2006; Darawiroj et al., 2008; Singh et al., 2013; Song et al., 2004). Auf Proteinebene wurde Nephrosin mittels Western Blot in verschiedenen Geweben des Karpfens untersucht (Hung et al., 1997). In einer weiteren Studie von Di und Kollegen (Di et al., 2017) wurde Nephrosin ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen, jedoch stand die Lokalisation nicht im Fokus.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der Lokalisation des translatierten Proteins Nephrosin in verschiedenen Entwicklungsstadien des Modellorganismus Zebrafisch. Dazu muss zunächst ein spezifischer Antikörper zur spezifischen Detektion des Nephrosin erstellt und eine Zebrafischzucht etabliert werden. Die Lokalisation soll immunhistologisch aufgeklärt werden. Dazu werden die frühen Stadien als komplettes Individuum (*whole mount*) analysiert, während für die adulten Tiere Paraffinschnitte angefertigt werden sollen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit stehen kinetische und biochemische Parameter im Fokus. Bevor diese Untersuchungen durchgeführt werden können, muss Nephrosin rekombinant in Insektenzellen exprimiert und gereinigt werden. Der Hemmmechanismus des Nephrosins, also die Regulation nach Aktivierung des Pronephrosins, soll durch Ermittlung der kinetischen Parameter mit Substraten und natürlichen Inhibitoren ermittelt werden. Ovastacin wird als Vergleich herangezogen, weil es eines der nächstverwandten Enzyme aus der Astacinfamilie darstellt.

Ein weiteres Ziel ist die Aufklärung der Spaltungsspezifität mit Hilfe massenspektrometrischen Methode PICS (*proteomic identification of protease cleavage site specificity*). Stimmt die Schnittspezifität mit einer anderen Protease überein, kann so eventuell ein funktionelles Analogon gefunden werden.

Anschließend kann überprüft werden, ob die Funktion des Analogons auf Nephrosin übertragen werden kann.

Schließlich wird die Struktur des Nephrosin mit Astacin auf der Basis der bekannten 3D-Strukturen verwandter Astacine durch Homologiemodellierung untersucht. Dies soll einen Einblick in die Funktionsweise der Bindung von Substraten von Nephrosin geben und so die Schnittspezifität belegen. Ebenfalls wurde versucht über bioinformatische Methoden einen natürlichen Aktivator zu finden. Zunächst wird ein Alignment der Nephrosine verschiedener Spezies angefertigt. Mit Hilfe dieses Alignments sollen konservierte Sequenzen im Propeptid als potenzielle Aktivierungsschnittstellen durch andere Proteasen identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Antigene Region	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verwendung
StrepTag Antikörper	StrepTag (WSHPQFEK)	Maus	Qiagen	Western Blot
Anti-Nephrosin AK	Rekombinantes Nephrosin mit Strep Tag	Meerschweinchen	Pineda	Western Blot Immunhistologie
Anti-Myeloperoxidase AK	Zebrabärbling Myeloperoxidase AS 422-725	Kaninchen	Abcam (ab210563)	Western Blot Immunhistologie
Anti-Meerschweinchen-Peroxidase AK	Meerschweinchen Immunglobuline	Ziege	Dianova	Western Blot
Anti-Meerschweinchen - Alexa 488 AK	Meerschweinchen Immunglobuline	Ziege	Dianova	Immunhistologie
Anti-Kaninchen-Peroxidase AK	Kaninchen Immunglobuline	Ziege	Jackson	Western Blot
Anti-Kaninchen - Alexa 568 AK	Kaninchen Immunglobuline	Ziege	Invitrogen	Immunhistologie

2.2 Der Zebrabärbling

Für diese Arbeit wurde der Wildtypstamm Tübingen (Tü) verwendet. Eier dieses Stamms wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. René Ketting aus dem Institut für Molekulare Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

Die erhaltenen Eier wurden zunächst einer Behandlung mit Hypochloridlösung (0,0045% in Dulbeccos PBS Puffer) unterzogen, um mögliche Keime zu töten. Im Anschluss wurden die behandelten Eier mit Wasser aus dem Aquarium (Fischwasser) gewaschen. Diese Prozedur wurde zweimal durchgeführt. Zuletzt wurde die behandelten Eier für 5 Minuten mit Pronase (ein Proteasegemisch aus *Streptomyces griseus*, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) (0,04 mg/ml) inkubiert. Dieser Schritt wird durch die Behandlung mit Hypochlorid nötig, welche eine Härtung der Eihülle verursacht und so die Embryonen am Schlüpfen hindert. Durch Pronase wird die Eihülle angedaut und die Embryonen können wieder schlüpfen. Danach wurden die Eier in entsprechende Becken überführt.

2.2.1 **Haltungsbedingungen**

Die Zebrabärblinge wurden bei einer Temperatur zwischen 26°C und 27°C und einer Hell/Dunkelphase von 12/12 Stunden gehalten. Es wurde das Regalsystem V30 der Firma Schwarz mit Becken für 11, 31, 71 und 15l verwendet. Es wurden 4 adulte Fische pro Liter Wasser gehalten.

2.2.2 **Tötung**

Mit Hilfe von Tricain (MS-222, Roth) wurden alle Stadien des Zebrabärblings euthanisiert. Die verwendete Konzentration betrug 0,3 mg/ml in 3,6 mM Natriumbicarbonatpuffer ohne Einstellen eines spezifischen pH (Matthews und Varga, 2012). Der Vorteil von Tricain ist die schnell eintretende Wirkung der Anästhesie, sowie die anschließende Euthanasie. Die Fische wurden so lange in der Lösung inkubiert bis keine Kiementätigkeit mehr festgestellt wurde. Um die Euthanasie zu überprüfen, wurde die Wurzel der Schwanzflosse mittels einer Pinzette vorsichtig gequetscht. Zeigte der Fisch keine Reaktion mehr, wurde der Fisch als tot betrachtet. Wenn es möglich war (z.B. bei histologischen Schnitten) wurde der Fisch zusätzlich dekapitiert.

2.3 **Biochemische Methoden**

2.3.1 **Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

2.3.1.1 *Photometrische Bestimmung*

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan ($\epsilon_{280} = 5600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) und Tyrosin ($\epsilon_{280} = 1400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) absorbieren Licht im nahen UV-Bereich (Cantor, C. R., Schimmel, 1980). Die Absorption anderer Aminosäuren wie Phenylalanin, Cystein (bzw. Cystin) in diesem Bereich ist vernachlässigbar klein ($\epsilon_{280} < 10 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Dies macht man sich bei der photometrischen Bestimmung zu Nutze, in dem man die Absorption bei 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des für individuelle Proteine aufgrund der unterschiedlichen Zahl und Anordnung der Tryptophan und Tyrosinreste typischen Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Der Berechnung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zu Grunde.

$$c[M] = \frac{OD_{280nm}}{\epsilon_{280nm}} \quad (1)$$

Formel 1: Berechnung der Proteinkonzentration c = Konzentration; OD = optische Dichte; ϵ = Extinktionskoeffizient

Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Online Tools ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechnet. Der Extinktionskoeffizient bei 280 nm für Nephrosin beträgt $32235 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.3.1.2 Bestimmung mittels Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen in Lösung wurde der Bradford-Test verwendet (Bradford, 1976). Bindet Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm proportional zur Proteinmenge. Eine Eichgerade wurde mit Hilfe einer BSA-Lösung (bovines Serumalbumin) für jede Messung neu ermittelt. Die Eichgerade deckte einen Bereich von 0 bis 10 µg/µl ab. Zur besseren Genauigkeit wurden alle Messansätze und Eichpunkte in dreifachen Ansätzen gemessen und gemittelt. Ein Ansatz bestand aus 100 µl Proteinlösung und 100 µl Bradford-Lösung (Tabelle 2). Die Messung erfolgte nach 30-minütiger Inkubation in einer 96-well Mikrotiterplatte in einem Varioskan Flash Fluoreszenz Photometer (Thermo Scientific, D-Dreieich).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Bradfordlösung

Chemikalie	Menge (w/v)
Coomassie Brillant Blau G 250	0,01 %
Ethanol 95%	4,7 %
o-Phosphorsäure (85%)	8,5 %

2.3.2 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Zum Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen wurden Amicon® Ultra Filter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Die Filter wurden zunächst mit dH₂O zweimal bei 7500 x g in einer Zentrifuge gewaschen. Im Anschluss wurde dieser Schritt mit Pufferlösung, in der das Protein vorlag, wiederholt. Beim Konzentrieren der Lösung wurde darauf geachtet, dass der Filter nie trockenfiel. Vor und nach dem Konzentrieren wurde photometrisch die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.3.1.1).

Zum Pufferwechsel wurde die Proteinlösung auf das halbe Volumen eingeeengt. Anschließend wurde wieder mit neuem Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Alle Schritte wurden bei 6°C durchgeführt.

2.3.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele

Chemikalie	Trenngel 14 %	Sammelgel 3,5 %
Puffer	2 ml	2 ml
dH ₂ O	3,88 ml	2,44 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	2 ml	0,51 ml
TEMED (10%)	60 µl	30 µl
APS (10%)	60 µl	30µl

Proteine können mit Hilfe eines elektrischen Feldes voneinander getrennt werden. Ohne weitere Agenzien beruht die Auftrennung auf dem isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des umgebenden Mediums. Somit ist eine Bestimmung des Molekulargewichtes nur sehr beschränkt möglich. Bei der Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese wird durch Zugabe von SDS die Tertiärstruktur von Proteinen aufgebrochen, jedoch ohne Disulfidbrücken zu spalten. Das SDS lagert sich proportional zur Masse an Proteine an und umgibt diese mit einer negativen Ladung, so dass die Eigenladung der Proteine aufgehoben wird. Die Wanderungsstrecke im Polyacrylamidgel ist unter diesen Bedingungen proportional zur Masse der Proteine, deren vollständige Entfaltung durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) und Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 Minuten erreicht wird. Es wurde die Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemli (1970) verwendet.

Tabelle 4: Lösungen der SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,02 % (w/v) SDS
3x Probenpuffer (pH 6,8)	200 mM Tris/HCl 10 % (v/v) SDS 25 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 140 mM DTT

Es wurden zwei Arten von Acrylamidgelelen verwendet. Zum einen wurden diskontinuierliche Trennsysteme mit Sammelgel und Trenngel unterschiedlicher Acrylamidkonzentration verwendet und zum anderen Gradientengele mit zur Anode kontinuierlich steigender Acrylamidkonzentration. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3 angegeben, während die Puffer in Tabelle 4 zu finden sind.

2.3.4 Western-Blot mit anschließender Immundetektion

Im Anschluss an die Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde ein Western Blot in einem abgewandelten *semi dry* Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) verwendet. Dabei werden je drei Whatman Papiere

Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot

Puffer	Zusammensetzung	
Anodenpuffer pH 10,4	Tris	300 mM
	Ethanol	20% (v/v)
Kathodenpuffer pH 8,0	Tris	25 mM
	Glycerin	40 mM
	Ethanol	20% (v/v)

Typ 3 in Kathoden- bzw. Anodenpuffer (Tabelle 5) getränkt, um ein elektrisches Feld zwischen Anode und Kathode aufzubauen. Durch das negativ geladene SDS, welches die Proteine umgibt, wandern diese zur Anode. So ist es möglich Proteine aus dem Gel auf eine geeignete Membran zu übertragen. In dieser Arbeit wurde eine Polyvinylidenfluoridmembran

(PVDF; Immobilon-P, Merck Millipore, D-Darmstadt) verwendet. Im Anschluss an die Übertragung können die Proteine nach Absättigung der proteinfreien Membranareale durch eine 7,5%ige Magermilchpulverlösung durch spezifische Antikörper (siehe 2.1) detektiert werden. Für ein besseres Signal wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, bei der der sekundäre Antikörper mit einer Peroxidase (aus Meerrettich, SIGMA-ALDRICH, N-Katmandu) gekoppelt ist. Diese setzt das verwendete Clarity Western ECL Blotting Substrat von Bio-Rad (D-München) unter Lichtemission um. Diese Emission wurde mittels Fusion FX (VWR, D-Darmstadt) detektiert.

2.3.5 Coomassie-Brilliant-Blaufärbung zur Visualisierung von Proteinen

Tabelle 6: Zusammensetzung der Coomassie Lösung nach Kang

Chemikalie	Menge
Al₂(SO₄)₃ * 16-18 H₂O	5 % (w/v)
Coomassie-Brilliant-Blau G250	0,02 % (w/v)
Ethanol 99%	10 % (v/v)
o-Phosphorsäure	2 % (v/v)

Zur Visualisierung der Proteine in Polyacrylamidgelen wurde eine Coomassie-Brilliant Blau Lösung verwendet (Kang et al., 2002). Hierbei lagert sich der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau 250 an die positiv geladenen Seitenketten der Aminosäure Lysin innerhalb des Proteins an. Bei der Methode nach Kang et al. wird eine kolloidale Lösung verwendet, so dass außer Proteinen nichts gefärbt sein

sollte (hintergrundfreie Färbung, Tabelle 6). Weiterhin zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Sensitivität (10 ng/ Proteinbande) aus.

2.3.6 Affinitätschromatographie

Durch die Affinitätschromatographie können Moleküle oder Substanzen sehr spezifisch gereinigt werden. Dabei wird ein Ligand an eine Trägermatrix gekoppelt, welche als stationäre Phase dient. Da der Ligand mit der Zielsubstanz eine spezifische Wechselwirkung eingehen kann, wird er an der stationären Phase festgehalten und kann mit einer geeigneten Milieuveränderung, (z.B. pH, Salzkonzentration) eluiert werden.

2.3.6.1 Protein G Affinitätschromatographie

Protein G ist ein Protein aus *Streptococcus spec.*, welches zwei Bindungsstellen für Immunglobuline des Typs G (IgG) besitzt. So ist es möglich, aus einem Gemisch aus verschiedenen Antikörpertypen und/oder Stoffgemischen Antikörper des Typs IgG zu reinigen. Diese können nach der Elution für weitere Untersuchungen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden „HiTrap Protein G HP antibody purification columns“ (1 ml) der Firma GE Healthcare Lifescience (D-München) verwendet, um die IgG Fraktion aus dem Antiserum gegen rekombinantes Nephrosin zu reinigen. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.3.6.2 StrepTactin®-Affinitätschromatographie

Für die StrepTactin® Affinitätschromatographie wurde Streptavidin-Sepharose in eine Säule gefüllt. Das in dieser Arbeit verwendete rekombinante Nephrosin besitzt einen C-terminalen *Strep-tag* (i.e. die Peptidsequenz WSHPQFEK, Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren). Der *Strep-tag* kann an das Streptavidin Derivat StrepTactin® binden ($K_d = 1 \mu\text{M}$). Diese Säule wurde mit Equilibrierungspuffer (Tabelle 8) eingestellt, ehe die Proteinlösung auf die Säule aufgetragen wurde. Die Säule wurde im Anschluss mit dem Equilibrierungspuffer gewaschen bis die OD_{280} nahezu 0 betrug. Nephrosin bindet unter diesen Bedingungen an der stationären Phase und kann mit Elutionspuffer abgelöst werden (Tabelle 7).

2.3.6.3 Nickel-NTA Affinitätschromatographie

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von Fetuin-B

Puffer	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer pH 7,8	100mM Tris 200 mM NaCl 25 mM Imidazol eingestellt bei 6°C
Elutionspuffer A pH 7,8	100mM Tris 200 mM NaCl 50 mM Imidazol eingestellt bei 6°C
Elutionspuffer B pH 7,8	100mM Tris 200 mM NaCl 200 mM Imidazol eingestellt bei 6°C

Das rekombinant exprimierte Fetuin-B besitzt einen C-terminalen Histidin-tag, der zur Reinigung mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie ausgenutzt wurde. Die Säule wurde zunächst mit Equilibrierungspuffer (Tabelle 7) eingestellt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Auftragung der Proteinlösung mit Fetuin-B erfolgte auch mit im Equilibrierungspuffer. Anschließend wurde die Proteine mit den verschiedenen Elutionspuffern eluiert. Für die photometrische Bestimmung und funktionelle Analysen wurde die Proteinlösung in Puffer ohne Imidazol umgepuffert (2.3.2).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Verwendetes Plasmid

Als Ausgangspunkt der molekularbiologischen Arbeiten diente der cDNA Klon IRBOp991C1084D der Firma SourceBioscience LifeSciences (Berlin). Dieser Klon enthielt den Vektor pME18S-FL3 sowie die Sequenz für Nephrosin (MGC152831) des Zebraäbrblings (*Danio rerio*).

Die Nephrosinsequenz wurde über diverse Umklonierungen in den pFastBac1 überführt und zusätzlich C-terminal ein StrepTag angefügt. Dieses Konstrukt wurde zur Herstellung rekombinanter Viren genutzt.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Insektenzelllinien Hi5(BTI-Tn-5B1-4) und Sf9 verwendet. Mit Hilfe der Sf9 Zellen und des Bac-to-Bac Expressionssystems wurden Baculoviren erstellt. Diese Viren wurden nun genutzt, um Hi5 Zellen zu infizieren und so die Expression des Zielproteins zu bewirken (siehe 2.6).

2.6 Expression und Reinigung der verwendeten Proteine

2.6.1 Expression mittels Baculovirus Expressionssystem

Für die Expression wurde das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem verwendet. Hi5 Zellen wurden mit Viren der sechsten Passage infiziert. Die infizierten Zellen wurden auf einem Multitron Schüttelinkubator Typ AJ117 (Infors, Bottmingen) bei 60 Umdrehungen pro Minute und 26°C für ca. 72 h inkubiert. Im Anschluss begann die Reinigung des Proteins (siehe 2.6.2).

2.6.2 Proteinreinigung von Nephrosin

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von Nephrosin

Puffer	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer pH 8,0	150 mM Tris 50 mM NaCl eingestellt bei 6°C
Elutionspuffer pH8,0	20 mM Tris 150 mM NaCl eingestellt bei RT 2,5 mM D-Desthiobiotin (frisch zugesetzt)

Die Expression wurde durch Zentrifugieren der Zellen (500 x g, 20 min, 6°C) beendet. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und portionsweise, unter Rühren, mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40% versetzt. Die Proteine wurden über Nacht bei 6°C aus dieser Lösung gefällt. Am folgenden Tag wurden die Proteine bei 8627 x g für 120 Minuten bei 6°C zentrifugiert und das entstandene Proteinpellet in Auftragspuffer (siehe Tabelle 8) aufgenommen. Der Überstand nach der ersten Zentrifugation wurde ein weiteres Mal für 30 Minuten mit denselben Parametern zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde ebenfalls in Dialysepuffer aufgenommen. Das Gesamtvolumen des Dialysepuffers betrug 10% des

Medienüberstandes und wurde zur weiteren Verarbeitung vereinigt.

Im Anschluss wurde das Ammoniumsulfat durch Dialyse gegen Equilibrierungspuffer (Dialyseschlauch (Roth, Ausschlussgröße 10 kDA). Der Puffer wurde 4 mal in stündlichen Abständen gewechselt. Der letzte Dialyseschritt erfolgte über Nacht. Alle Schritte wurden bei 6°C und unter Rühren durchgeführt.

Das Dialysat wurde vor der Affinitätschromatographie (siehe 2.3.6.2) für 15 Minuten bei 6°C und 5000 x g zentrifugiert.

2.7 Zur Verfügung gestellte Proteine

In dieser Arbeit wurden neben den von mir exprimierten Proteinen Nephrosin und Maus Fetuin-B auch Ovastacin, Fisch Fetuin und eine Fisch Fetuin Mutante (D139A) verwendet. Ovastacin wurde von Hagen Körschgen in aktiver Form wie von Karmilin et al. (2019) beschrieben zur Verfügung gestellt. Beide Fisch Fetuin Varianten stammen von Katharina Meyer (Meyer, 2016).

2.8 Immunhistologie

Tabelle 9: verwendete Puffer der Immunhistologie

Lösung	Zusammensetzung	
Fixierlösung pH 6,8	Formaldehyd	3,7% (v/v)
	NaH ₂ PO ₄	0,4% (w/v)
	Na ₂ HPO ₄	0,65% (w/v)
	Methanol	1,5% (v/v)
	dH ₂ O	90% (v/v)
Dekalzifizierungslösung	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	0,35 M
HIER Puffer pH 6,0	Tri-Natriumcitrat(dihydrat)	2,94 g/l
	Tween 20	0,5 ml/l
Einbettmedium	Mowiol 4-88 (Carl Roth GmbH)	
	DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol;)	0,5 mg/ml
	Dabco (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	25 mg/ml
TBS Puffer pH 7,4	Tris	10 mM
	NaCl	500 mM
TBS-T Puffer pH 7,4	Tris	10 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,05% (v/v)
	Triton X-100	0,2% (v/v)

Mit Hilfe spezifischer Antikörper können gezielt Proteine nachgewiesen werden. Durch die Fixierung ist es möglich auch sezernierte Proteine in ihrer physiologischen Umgebung nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen Antikörpern verwendet (siehe Tabelle 1).

2.8.1 Anfertigen von Paraffin Schnitten

Die Versuche wurden von Susann Kahl im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Diese Arbeiten wurden unter meiner Aufsicht und Anleitung durchgeführt.

Zur Herstellung von Präparaten für die immunhistologischen Untersuchungen wurden Zebrafische wie unter 2.2.2 beschrieben getötet. Nachfolgend wurde versucht, eine horizontale Orientierung der Fische beizubehalten, um eine Stauchung zu verhindern.

Zur Proteinfixierung wurden die Fische zunächst kurz in Fixierlösung gewaschen und anschließend in dieser Lösung für 24h bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Tiere zweimal mit PBS gewaschen und sieben Tage bei RT in Dekalzifizierungslösung gelagert. Dies dient zur Erhaltung der Gewebeintegrität beim Anfertigen der Präparate bei. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Fische mit einem Skalpell zerteilt und in Einbettkassetten überführt. Ehe die Präparate in Paraffin eingebettet werden konnten, erfolgte eine Entwässerung der Präparate in Lösungen (Tabelle

Tabelle 10: Ethanolreihe und Paraffineinbettung zur Herstellung histologischer Schnitte

Lösung	Inkubationsdauer
Ethanol 25% (v/v)	1,5 h
Ethanol 50% (v/v)	1,5 h
Ethanol 70% (v/v)	1,5 h
Ethanol 80% (v/v)	1,5 h
Ethanol 90% (v/v)	1,5 h
Ethanol 99% (v/v)	über Nacht anschließend 2 x 2 h
Roti®-Histol	3 h anschließend über Nacht

10) mit sequenziell-ansteigender Ethanolkonzentration (Ethanolreihe). Mit dem Intermedium Roti®-Histol wurde anschließend die Einbettung in Paraffin vorgenommen. Die Behandlung mit Paraffin erfolgte bei 60 °C für zweimal drei Stunden im Brutschrank. Nach der Sättigung der Präparate mit Paraffin, wurden sie mit frischem Paraffin in Blöcke gegossen und bei RT zum Aushärten gelagert.

Die Schnitte wurden nach dem vollständigen Aushärten am Rotationsmikrotom Leica RM

2255 mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost® Ultra Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) übertragen und für 48 Stunden bei RT getrocknet, ehe die Färbung (2.8.2) erfolgen konnte.

2.8.2 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Die Versuche wurden von Susann Kahl im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Diese Arbeiten wurden unter meiner Aufsicht und Anleitung durchgeführt

Für die Antikörper-basierte Immunhistologie mussten die Schnitte zunächst von Paraffin und Ethanol befreit werden. Dazu wurden die Schnitte auf 60 °C erwärmt. Anschließend folgte eine fallende Ethanolreihe (Tabelle 11).

Die Fixierung mit Formaldehyd kann zu einer Blockierung der Antikörper epitope führen und dadurch die Immunhistologie negativ beeinflussen. Zur Reaktivierung dieser Epitope wurden die Schnitte in kochendem HIER-Puffer (Tabelle 9) für 20 Minuten inkubiert. Nachdem die Objektträger in H₂O_{dest} abgekühlt wurden, folgten zwei Waschschriffe für jeweils 5 Minuten mit TBS-T (Tabelle 9). Das TBS-T wurde wieder entfernt und durch Blockierlösung (2% Ziegen Serum in TBS) ersetzt und für 60 Minuten bei RT inkubiert. Alle verwendeten primären Antikörper wurden in einer Verdünnung 1:200 (in 2% Ziegen Serum in TBS) verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach der Behandlung mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten in TBS gewaschen ehe die Inkubation der sekundären Antikörper in einer Verdünnung 1:200 (in 2% Ziegen Serum in TBS) für 60 Minuten bei RT durchgeführt wurde. Durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit TBS wurde der zweite Antikörper entfernt. TBS wurde durch Waschen der Schnitte mit H₂O_{dest} entfernt.

Der finale Schritt zum Einbetten erfolgte mit Einbettmedium (Tabelle 9). Nachdem das Einbettmedium ausgehärtet war, konnten die immunhistologischen Aufnahmen am Mikroskop aufgenommen werden (siehe 2.8.4).

Tabelle 11: Ethanolreihe und Entparaffinieren zur Behandlung mit Antikörper

Lösung	Inkubationsdauer
Roti[®]-Histol	2x 3 min
Roti[®]-Histol mit Ethanol 99% (v/v) 1:1	1x 3 min
Ethanol 99% (v/v)	1x 3 min
Ethanol 95% (v/v)	1x 3 min
Ethanol 80% (v/v)	1x 3 min
Ethanol 70% (v/v)	1x 3 min
Ethanol 50% (v/v)	1x 3 min
Ethanol 25% (v/v)	1x 3 min
dH₂O	1x 10 min

2.8.3 Immunhistologische Färbung von Embryonen

Tabelle 12: Behandlung Zebrafischembryonen zur Immunhistologischen Untersuchung

Schritt	Lösung	Inkubationsdauer
Waschen	TBS-T	3x 5 min bei RT
Blockieren	10% Ziegen Serum in TBS-T	1 h bei RT auf dem Taumelschüttler 23h bei 6°C
Waschen	TBS-T	3x 5 min bei RT
Inkubation mit 1. Antikörper	Anti-Nephrin AK(Meerschweinchen; 1:100) Anti-Myeloperoxidase AK(Kaninchen; 1:100) In 1% Ziegen Serum in TBS-T	2 h bei RT auf dem Taumelschüttler 23 h bei 6°C
Waschen	TBS-T	3x 5 min
Inkubation mit 2. Antikörper	Anti- Meerschweinchen -Alexa 488 AK (1:200) Anti- Kaninchen -Alexa 568 AK(1:200) In 1% Ziegen Serum in TBS-T	2 h bei RT auf dem Taumelschüttler 23 h bei 6°C
Waschen	TBS-T	2x 5 min bei RT
Dapifärbung	Dapi (4',6-Diamidin-2-phenyl- nol) in TBS-T	1x 10 min
Waschen	TBS-T	1x 10 min

Am Tag nach der Verpaarung wurden die ersten Eier zwischen 10:00 Uhr und 11:00 Uhr morgens gesammelt. Im Anschluss wurden alle 24 Stunden Eier aus dem Fischbecken für den Versuch entnommen. Die letzte Entnahme fand 72 Stunden nach Befruchtung (hpf) statt.

Zunächst wurde das Chorion der Embryonen (24 hpf und älter) mechanisch mit zwei Dumontpinzetten entfernt. Unter dem Binocular Olympus SZX10 (Leica, Wetzlar) wurde die Unversehrtheit überprüft, indem die Blutzirkulation beobachtet wurde. Konnte dies gewährleistet werden, wurden die Eier/dechorionierten Embryos in Paraformaldehydlösung (4% in Dulbeccos PBS) für 24 Stunden inkubiert, so dass alle sekretierten Proteine, zu denen auch Nephrin zählt, fixiert sein sollten. Um mögliche blockierte Antikörper Epitope zu reaktivieren wurden die Embryos mit HIER-Puffer (Tabelle 9) für 20 Minuten inkubiert. Die weiteren Inkubationsschritte sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 13: Verwendete Filter zur Immundetektion

Kanal	Filter	Wellenlänge der Excitation (nm)	Wellenlänge der Emission (nm)
Alexa568	N3	546	565
Alexa488	L5	480	505
DAPI	A4	360	400
DIC	Ana	---	---

2.8.4 Fluoreszenzmikroskopie

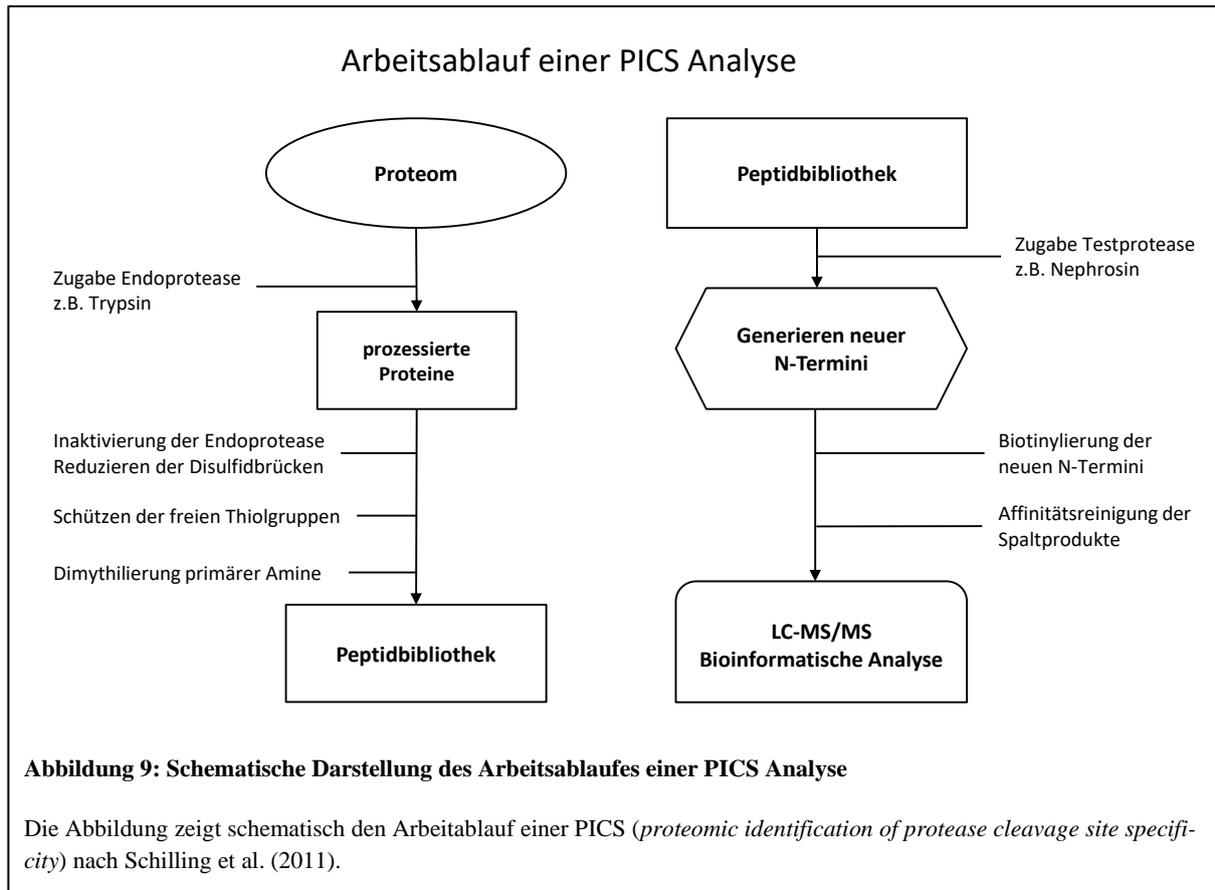
Die Fluoreszenzaufnahmen wurden am Mikroskop Leica DM6000B (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden die Aufnahmen innerhalb der verschiedenen Vergrößerungen mit der gleichen Belichtungszeit und -intensität aufgenommen. Die verwendeten

Filter sind in Tabelle 13 aufgeführt.

2.8.5 Dekonvolution

Die Dekonvolution ist ein mathematisches Verfahren zur Bereinigung von bildverfälschenden physikalischen Effekten. So ist es z.B. möglich, Streulicht aus dem aufgenommenen Bild zu entfernen. Für diese Berechnung wurde die Huygens Software in der Remote Version (<https://huygens.imb.uni-mainz.de/>) über das Institut für Molekulare Biologie (Mainz) genutzt.

2.9 PICS Analyse



PICS (*proteomic identification of protease cleavage site specificity*) ist eine Analysemethode zur Identifizierung der Spaltungsspezifität von Proteasen (Schilling et al., 2011). Für die Ermittlung der Spaltungsspezifität wurde autoaktiviertes Nephrosin aus Insektenzellen verwendet. Als Protein- und Peptidbibliothek diente ein *E. coli* Proteom bekannter Zusammensetzung. Alle Schritte wurden wie von Becker-Pauly et al. (2011) beschrieben durchgeführt und sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Zunächst wurde das Bakterium *E. coli* in einer Suspensionskultur vermehrt. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde über Waschschrte in einen hypotonischen Lysispuffer überführt. Nachdem die Zellen aufgeschlossen wurden, wurden die Proteine von den Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand, welcher die bakteriellen Proteine enthält, wurde auf 100 mM HEPES und einen pH Wert von 7,5 eingestellt. Im Anschluss wurden die Proteine mittels DTT denaturiert und die freien Cysteine mit Iodacetamid blockiert. Im Anschluss werden die Proteine mittels TCA (Trichloressigsäure) gefällt und die Reagenzien über Waschschrte entfernt. Die Proteine liegen final in 200 mM HEPES, pH 7,5 vor. Nachdem das Proteom gesammelt wurde, wurde es mit der Endoprotease Trypsin (1/100 Trypsin) für 16 Stunden bei 37 °C protzessiert. Mittels PMSF wurde Trypsin

inaktiviert. Im Anschluss wurden die Thiolgruppen mittels Iodacetamid geschützt, um ungewollte Reaktionen zu unterbinden. Mit Hilfe von Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid wurden die primären Amine methyliert. Im Anschluss wurde die gewonnene Peptidbibliothek in einen Assaypuffer (200 mM HEPES, pH 7,5) überführt. Diese Bibliothek wurde mit der Protease Nephrosin (1/100 Nephrosin) für 16 Stunden inkubiert. Nephrosin wurde im Anschluss an die Inkubation hitzeinaktiviert. Die neuen Spaltprodukte wurden mit Hilfe von Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher, D) biotinyliert. Über eine Streptavidin Affinitätschromatographie wurden diese biotinylierten Proteine aufgereinigt. Die Proteine wurden in 50 mM HEPES und 20 mM DTT überführt. Im Anschluss erfolgte die massenspektrometrische Analyse. Die massenspektrometrische Analyse wurde in der AG Schilling (Universität Freiburg) durchgeführt. Die Daten wurden mittels iceLogo visualisiert. IceLogo berücksichtigt das natürliche Vorkommen der Aminosäuren des untersuchten Ursprungsorganismus der erstellten Peptidbibliothek.

2.10 Enzymatischer Aktivitätstest

2.10.1 Verwendete Substrate

Tabelle 14: Behandlung Zebrafischembryonen zur immunhistologischen Untersuchung

Beide Substrate wurden über die Firma Biosyntan, Berlin bezogen.

Substratsequenz	Enzym	Excitation/Emission [nm]
MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂	Nephrosin	328/393
Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPYK(Dabcyl)-NH₂	Ovastacin	350/520

2.10.2 Fluorogener Aktivitätstest (FRET-Assay)

Der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) Assay ist eine Echtzeitmessung der Enzymaktivität basierend auf einer Fluoreszenzzunahme (Förster, 1948). Diese Zunahme wird durch die spezifische Spaltung eines Substrates zwischen zwei fluorogenen Halbstrukturen (Gruppen) hervorgerufen. Wichtig für diese Gruppen ist eine Überlappung von Emission und Excitation einer der Gruppen zur anderen. So wird die Energie nicht als Fluoreszenz frei, sondern von der anderen Gruppe (Quencher) aufgenommen, die wiederum diese Energie als Fluoreszenz abstrahlt. Für diesen Energietransfer dürfen die fluorogenen Gruppen maximal 10 nm weit auseinander sein. Wird der Abstand durch z.B. Hydrolyse der Peptidkette zwischen den Fluorophoren größer, kann der Quencher die Energie nicht mehr aufnehmen und das erste Fluorophor (Donor) emittiert nun Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches detektiert werden kann.

Die Messungen wurden für Nephrosin bei 27 °C und für Ovastacin bei 37 °C durchgeführt. Die Detektion erfolgte im Spektralfluorimeter Varioskan® Flash 3001 mit der Software SkanIt Software 2.4.3.RE. Dieses Gerät bietet die Option einen der Reaktionspartner automatisch zu injizieren. Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten wurde Nephrosin injiziert und die Reaktion damit gestartet, während für die Ermittlung der Inhibitionskonstanten die Substratlösung injiziert wurde. Dies ermöglichte Messansätze mit vielen Einzelmessungen ohne signifikanten Zeitverlust und Ungenauigkeit zu messen. Gemessen wurden alle Ansätze in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten der Firma Thermo Scientific (Dreieich) mit einem Endvolumen von 100 µl. Zum Ende der Messung wurden in jedes well 2 µl einer Proteinase K Lösung (2 mg/100 µl) gegeben, um das Substrat komplett zu spalten und so die maximale mögliche Fluoreszenz zu ermitteln.

Die Aktivitäten wurden zunächst mit Hilfe der Messpunkte in dem Programm Excel (Microsoft) ausgewertet. Für die Ermittlung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_m wurde die Software Grafit 4 (Erithacus Software) verwendet. Die verwendeten Substrate stammten von der Firma Biosyntan (Berlin).

2.10.2.1 Bestimmung der kinetischen Parameter IC_{50} und K_i

Da die verwendeten Enzyme nicht zu 100% aktiv waren, wurde die Menge an aktivem Enzym durch Titration mit dem natürlichen Hemmstoff Fetuin-B (Maus) ermittelt. Dazu muss die Inhibition sehr stark sein (*tight binding*), was für Ovastacin und andere Astacine mit einem K_i zwischen 0,046 nM und 0,1 nM (Karmilin et al., 2019) schon gezeigt wurde. Deshalb wurde diese Bestimmung ebenfalls mit Nephrosin durchgeführt.

Dazu wurde die Inhibition in einem Bereich von 0,001 nM bis 1000 nM Fetuin bei eingesetzten 50 nM Enzym gemessen. Die Substratkonzentration wurde konstant gehalten. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Software Grafit 4 (Erithacus Software) der IC_{50} bestimmt. Ebenso wurde für die Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i) verfahren. Zur Berechnung des K_i -Wertes wurde die Gleichung von Morrison (1969) für *tight binding* verwendet.

2.10.2.2 Bestimmung Michaelis-Konstante (K_m)

Die Michaelis-Konstante ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat. Je niedriger der K_m -Wert, desto affiner ist das Enzym zum Substrat. In dieser Arbeit wurde der K_m -Wert von Nephrosin zu dem Substrat MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂ (Biosynton, Berlin) bestimmt. Zunächst wurde das Substrat auf ca. 50 mM in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Im Anschluss erfolgte eine Verdünnung von 1:10. Mit dieser verdünnten Lösung wurde dann eine Substratkonzentration im Messansatz zwischen 20 – 180 μ M eingestellt. Um die Aktivitäten vergleichen zu können, wurde ein DMSO Ausgleich durchgeführt, so dass die DMSO Konzentration in allen Endansätzen 0,31% betrug.

2.11 Bioinformatische Methoden

2.11.1 Homologie Modellierung

Ist die dreidimensionale Struktur von Enzymen oder Inhibitoren bekannt, können anhand der Anordnung der Aminosäuren und der daraus resultierenden physikochemischen Eigenschaften Aussagen über ihre Funktion und Interaktionen ermöglicht werden. Solche Aussagen sind anhand von Homologie-Modellen möglich. Zur Erstellung von Homologiemodellen wurde das Onlinetool SWISS-MODEL von expasy (<https://swissmodel.expasy.org/>) mit den Standardeinstellungen verwendet (Bertoni et al., 2017; Bienert et al., 2017; Guex et al., 2009; Studer et al., 2020; Waterhouse et al., 2018). In dieser Arbeit wurde Fisch Fetuin an Maus Fetuin-B (PDB: 6HT9) modelliert. Fetuin-B ist das bisher einzige Fetuin, dessen dreidimensionale Struktur durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Cuppari et al., 2019). Die Fisch Fetuin Sequenz, die zum Modellieren verwendet wurde, entspricht der Sequenz des Inhibitors, der auch für die Inhibitionsassays verwendet wurde. Zusätzlich enthält diese Sequenz N-terminale und C-terminale Anhänge, die zur Modellierung jedoch nicht berücksichtigt wurden. Nephrosin wurde anhand von Astacin (PDB: 1AST/3LQ0) des Edelkrebses (*Astacus astacus*) und vom *high choriolytic enzyme* (PDB: 3VTG) des Reiskärpflings (*Oryzias latipes*) modelliert. Die Vorlage 3VTG wurde auf Grund der höchsten Sequenzübereinstimmung (52,28 % Identität, 71% Ähnlichkeit) mit Nephrosin gewählt. Für Astacin ist der Aktivierungsmechanismus (Guevara et al., 2010) aufgeklärt und die Bindungstaschen sind ebenfalls beschrieben (Grams et al., 1996). Die Qualitätsprüfungen der erstellten Modelle sind im Anhang zu finden.

Alignments zur Überlagerung und Visualisierung der Modelle wurden mit Chimera 1.14 erstellt (Pettersen et al., 2004).

2.11.2 Docking Simulation zur Aktivierung von Nephrosin durch MMPs

Nachdem die Nephrosinmodelle wie unter 2.11.1 beschrieben modelliert wurden, sollte an Hand des Pronephrosin (an 3LQ0 modelliert) die Aktivierung ermittelt werden. Für MMP2 wurde der PDB Eintrag 1CK7 verwendet. Mit Hilfe der Software Chimera wurden alle Aminosäuren bis auf das Propeptid ausgewählt und eine PDB ohne das Propeptid erzeugt. Im Anschluss wurden beide Modelle mit der Software ClusPro (Kozakov et al., 2017) mit der Option Dock verwendet. Dieses Tool erstellt verschiedene Modelle, in dem der Ligand (Nephrosin) 70.000 mal um die x-, y- und z-Achse gedreht wird. Die energetisch günstigsten Modelle werden ausgewählt. Für diese Betrachtung wurde das energetisch günstigste Modell verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung der Antikörper aus dem Antiserum

3.2 Überprüfung der Kreuzreaktivität des anti-Nephrosin Antiserums

Für histologische Untersuchungen war es wichtig zu wissen, wie spezifisch das polyklonale anti-Nephrosin Antiserum war (im Folgenden „der anti-Nephrosin Antikörper“ genannt). Hierzu wurden die zu

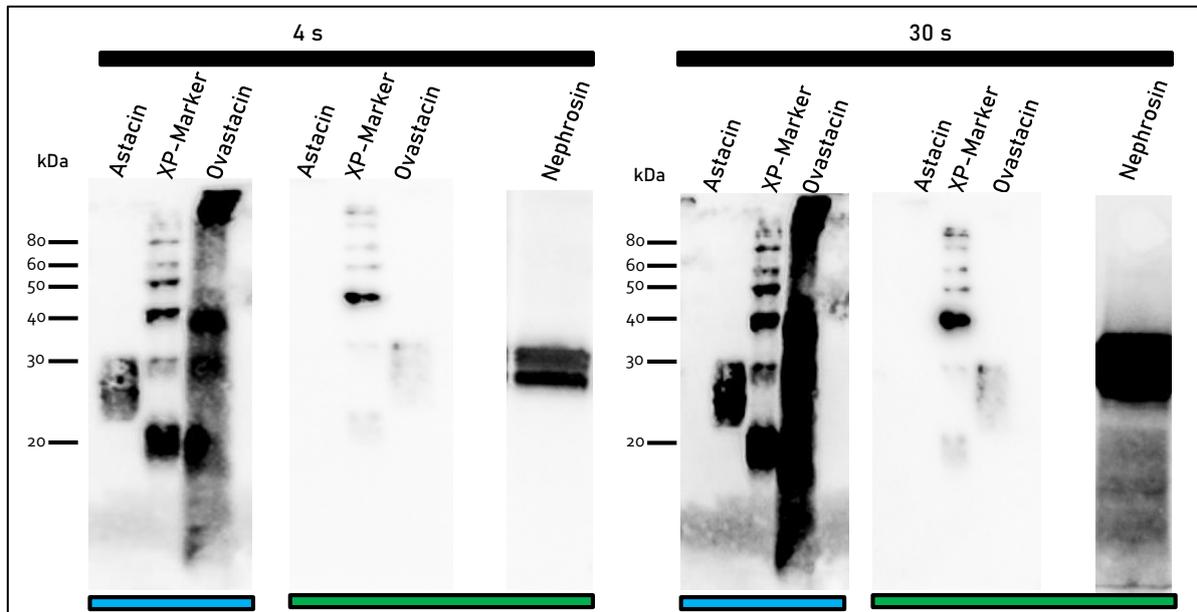
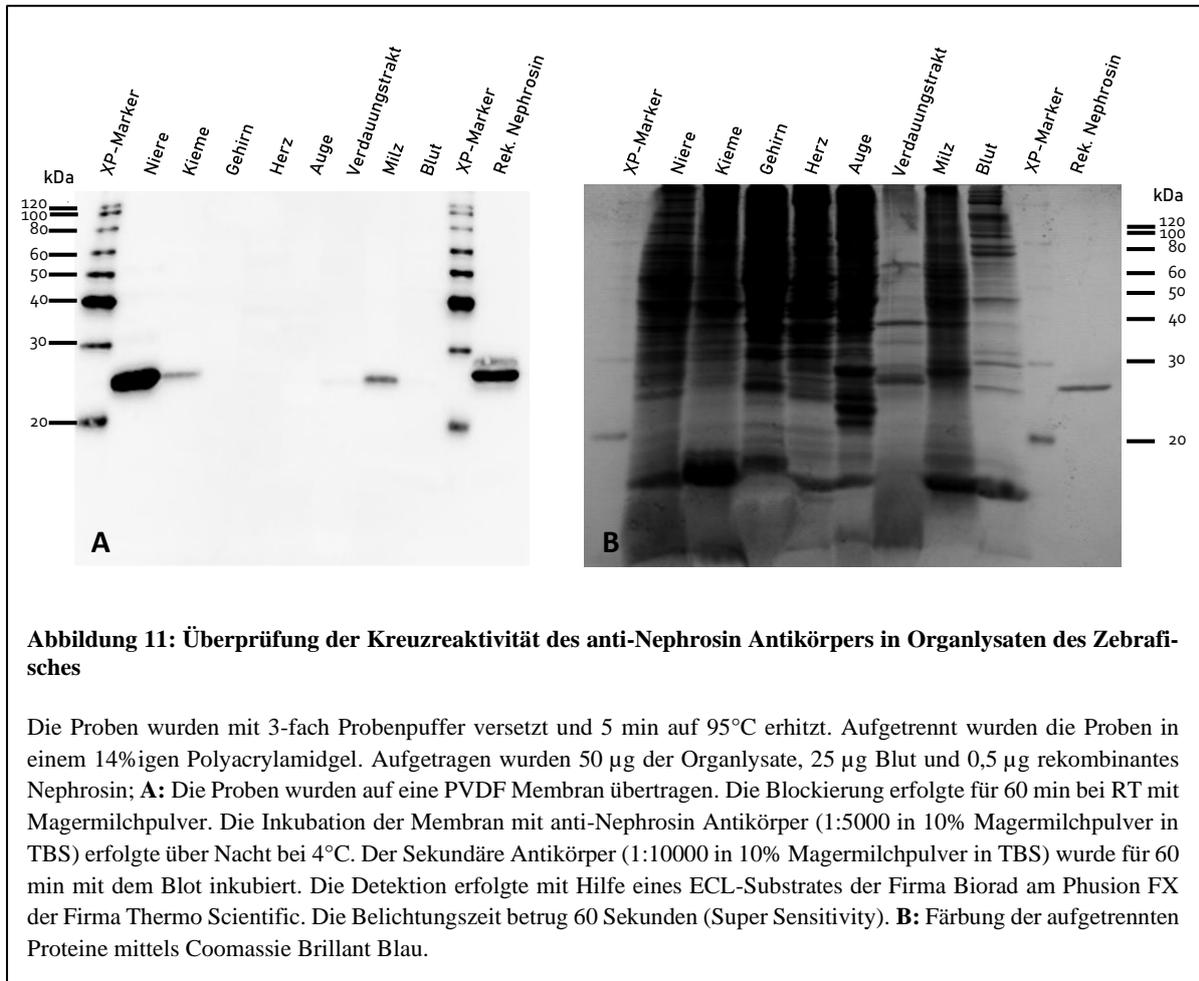


Abbildung 10: Immunchemischer Nachweis der Kreuzreaktivität des anti-Nephrosin Antikörpers

Die Proben wurden mit 3-fach Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Aufgetrennt wurden die Proben in einem 14%igen Polyacrylamidgel und auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde nach dem Übertragen der Proteine durchgeschnitten. Im Anschluss wurde ein Teil mit einem anti-StrepTag Antikörper (blau) und ein Teil mit dem spezifischen anti-Nephrosin Antikörper (grün) für 1h bei RT behandelt. Es wurden zwei Belichtungszeiten (4s und 30s) aufgenommen. Zum Vergleich ist ein separater Blot von Nephrosin mit denselben Parametern aufgenommen worden.

diesem Zeitpunkt verfügbaren Astacine mittels Western Blot getestet (Abbildung 10). Die Detektion von Ovastacin und Astacin mit dem StrepTag Antikörper zeigt bereits nach 4 Sekunden Belichtungszeit deutliche Signale. Mit dem spezifischen Nephrosin Antikörper kann bei einer Belichtungszeit von 4 Sekunden lediglich ein sehr schwaches Signal im Ovastacin beobachtet werden. Auch nach 30 Sekunden Belichtungszeit ist dieses Signal noch sehr schwach und Astacin konnte nicht nachgewiesen werden. Nephrosin weist zu Ovastacin und Astacin eine Sequenzidentität von jeweils 42% auf. Die Sequenzähnlichkeit zwischen Nephrosin und den beiden anderen Astacinen Ovastacin und Astacin beträgt 67%.

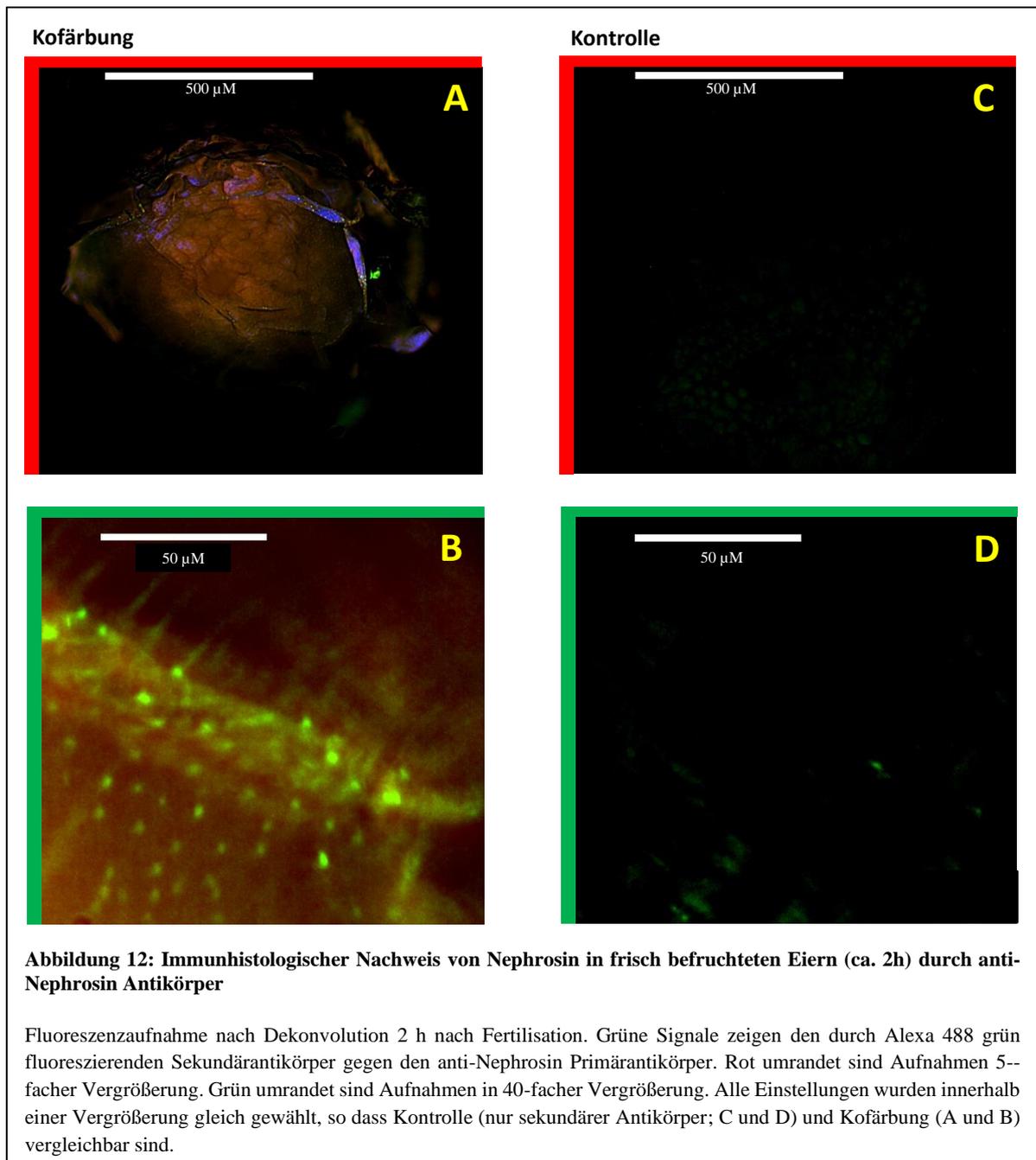
Auf der Basis von Organlysaten des Zebrafisches wurde nach möglichen Kreuzreaktivitäten von Proteinen des Zebrafisches gesucht werden (Abbildung 11). Das Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel zeigt, dass eine Vielzahl an Proteinen in den Lysaten vorhanden gewesen ist (Abbildung 11 B). In den Organlysaten konnten im Western Blot nur Signale in Höhe des rekombinanten Nephrosins detektiert werden (Abbildung 11 A). Im denaturierten Zustand erkennt der Antikörper mit hoher Wahrscheinlichkeit nur Nephrosin. Auf Grund dieser Ergebnisse ist der anti-Nephrosin Antikörper in der Histologie gut einsetzbar.



3.3 Lokalisation von Nephrosin im Zebrafisch (*Danio rerio*)

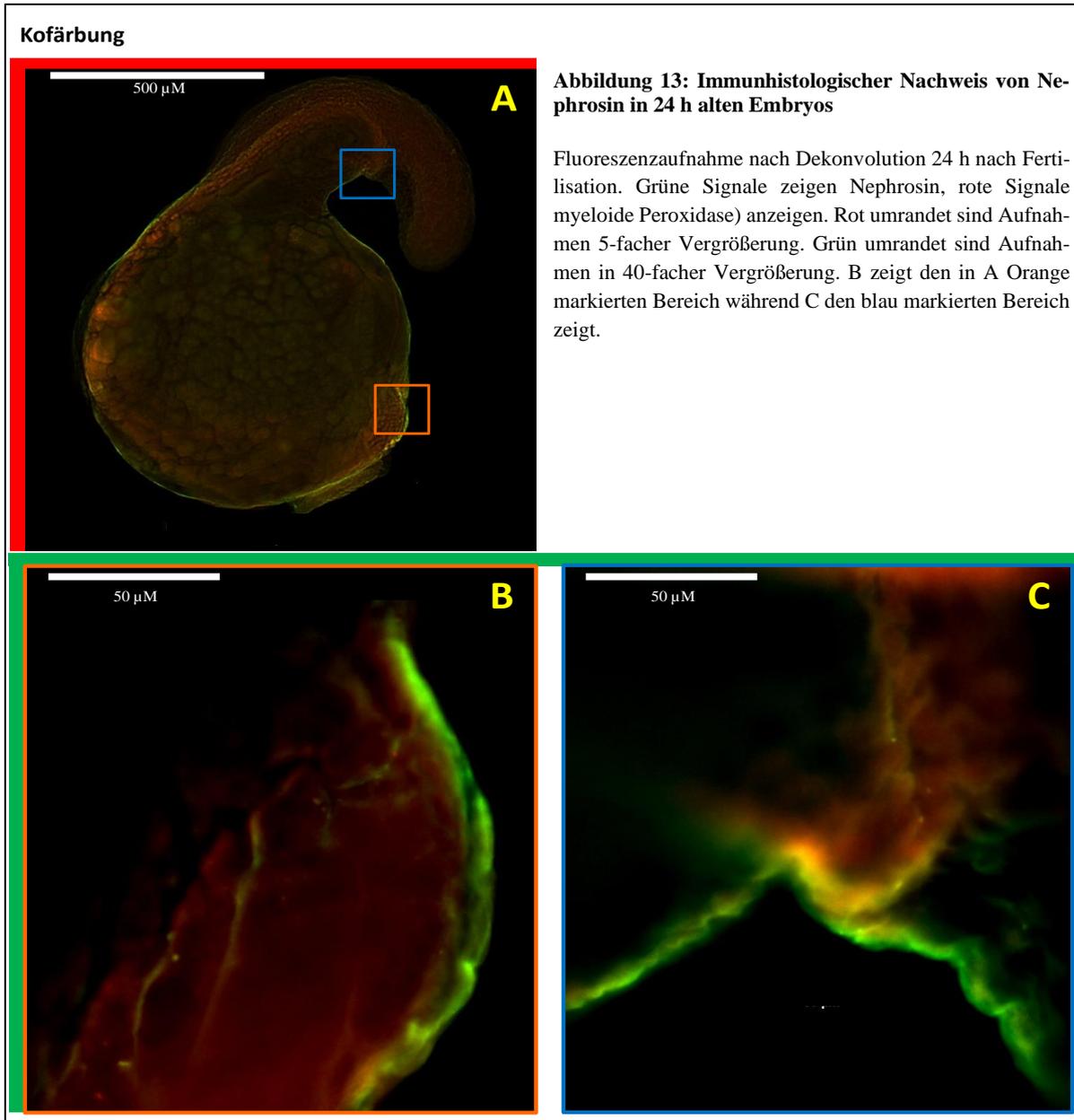
Da fast alle publizierten Daten zur Lokalisation von Nephrosin auf Genexpressionsdaten (Di et al., 2017; Song et al., 2004) oder Western-Blots (Hung et al., 1997) beruhen, stellte sich die Frage nach der genaueren Lokalisation des Proteins Nephrosin im Zebrafisch. Hinsichtlich der Proteinexpression und Lokalisation von Nephrosin in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und im adulten Tier wurde bisher kein immunhistologischer Nachweis des Proteins Nephrosin erbracht. Somit ist unklar ab wann Nephrosin als Protein nachgewiesen werden kann.

3.3.1 Lokalisation von Nephrosin in Embryonen des Zebrafischs (*Danio rerio*)



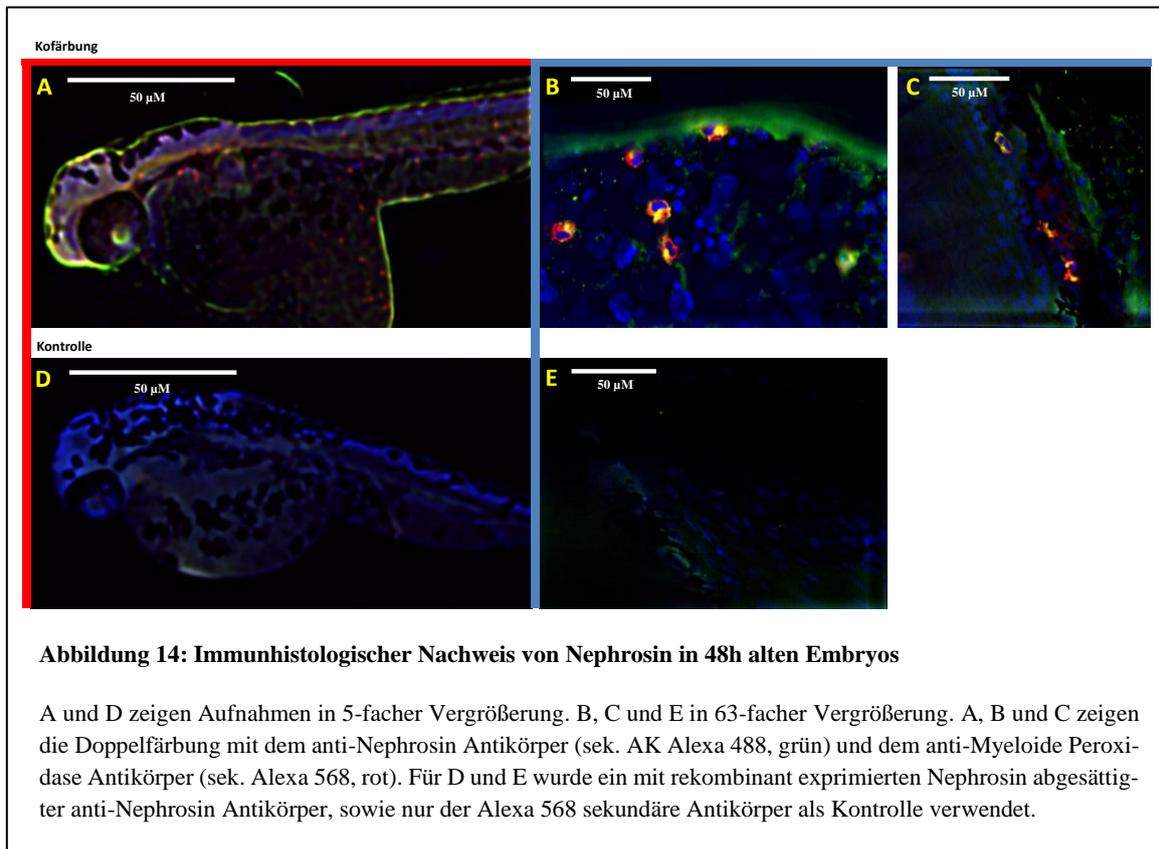
Da die Embryonen zu Beginn durchsichtig sind, wurden diese als ganzer Embryo (*whole mount*) bzw. als ganzes Ei behandelt. Da die befruchteten Eier nach zwei Stunden nur wenige Zellen auf dem Dottersack aufweisen, wurde auf das Entfernen des Chorions verzichtet. Es ist zu sehen, dass während der Antikörperfärbung die Eihülle stark beschädigt wurde (Abbildung 12 A). Während wenige bis keine

Signale in den Kontrollen (nur sekundärer Antikörper, C und D) zu sehen sind, zeigt die Kofärbung gegen Nephrosin (grün) und myeloide Peroxidase (rot) spezifische Signale für Nephrosin, jedoch nicht für die myeloide Peroxidase (Abbildung 12 A und B). Die myeloide Peroxidase wurde als spezifischer Marker für neutrophile Granulozyten, in denen Nephrosin beschrieben wurde (Lieschke et al., 2001), verwendet. Auffällig ist die Verteilung der spezifischen Signale lediglich in der Eihülle. Direkt auf dem Dottersack konnten keine Signale detektiert werden. 24 Stunden nach Befruchtung scheint die äußere



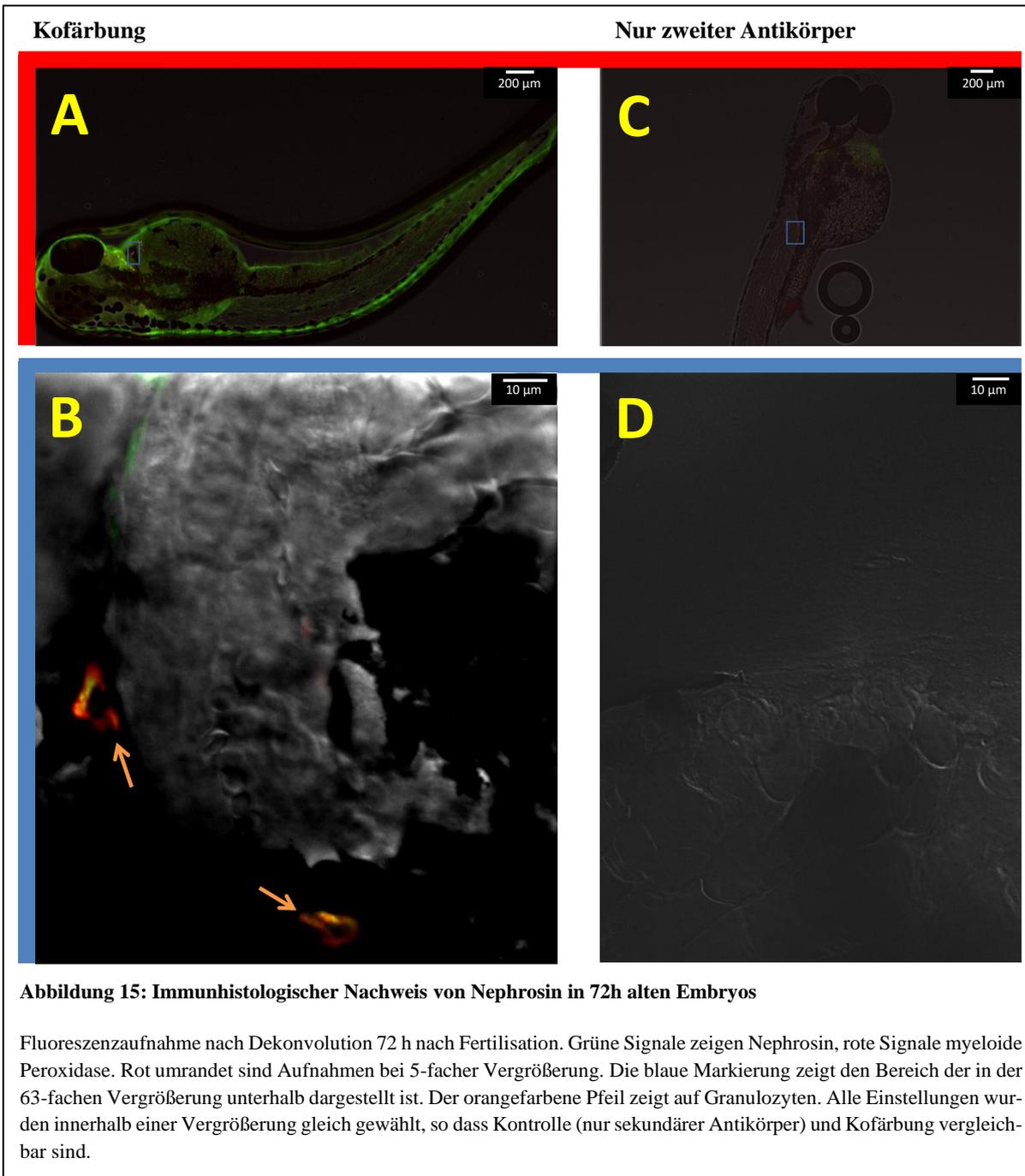
Zellschicht des Embryos Nephrosin in großen Mengen zu enthalten (Abbildung 13). Da das Chorion bei der Präparation entfernt wurde, sind die Signale dem Embryo zuzuordnen.

48 Stunden nach Fertilisation zeigte die immunhistologische Färbung der Embryonen eine Expression von Nephrosin und myeloider Peroxidase im Bereich des Dottersacks sowie vereinzelt im Schwanzbereich (Abbildung 14 B und C). Auch in 48 Stunden alten Embryonen sind Signale in der äußeren Zellschicht zu sehen. 72 Stunden nach Fertilisation zeigte sich ein ähnliches Bild (Abbildung 15). Über die genaue Lokalisation innerhalb der Zelle kann bei einer 63fachen Vergrößerung noch keine genauere Aussage getroffen werden. Allerdings ist der Bereich, in dem beide Proteasen exprimiert werden, durch



die Überlagerung (gelb) der Signale in der 63-fachen Vergrößerung gut zu erkennen. Der Großteil der Signale ist im Bereich des Pronephros zu finden (blaues Viereck, Abbildung 15). Vereinzelt sind auch Signale im Schwanzbereich zu sehen. Die Behandlung der Embryonen nur mit den zweiten Antikörpern zeigte keine Signale. Für die Zeitpunkte 48 Stunden und 72 Stunden nach Fertilisation wurden je 6 Embryonen für die Antikörperbehandlung betrachtet, die alle positive Signale zeigten.

Spezifische Antikörpersignale können zu allen betrachteten Zeitpunkten beobachtet werden, so dass ein Nachweis von Nephrosin bereits ab 2 Stunden nach Befruchtung möglich ist.



3.3.2 Lokalisation von Nephrosin in adulten Zebrafischen

Aufgrund ihrer typischen Färbung, war es nicht möglich den adulten Zebrafisch als *whole mount* also als komplettes Individuum immunhistologisch darzustellen. Deshalb wurden dorsoventrale Paraffinschnitte (Frontalschnitte) angefertigt. Mit Hilfe dieser Paraffinschnitte wurden verschiedene Gewebe

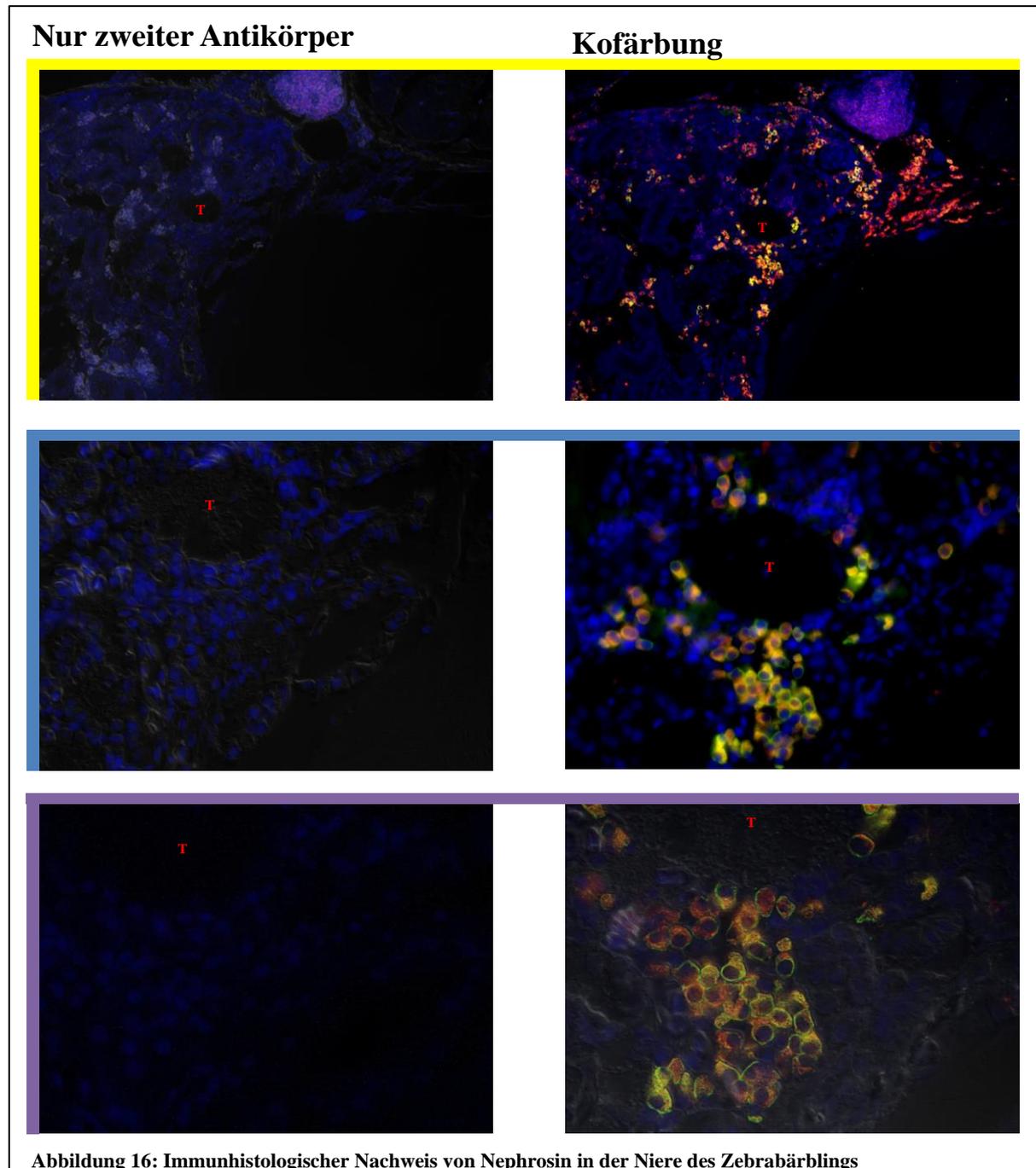


Abbildung 16: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in der Niere des Zebrafährblings

Fluoreszenzaufnahme von Nierengewebe nach Dekonvolution von adulten (2 Jahre alten) Zebrafährblingen. Grüne Signale zeigen Nephrosin, rote Signale myeloide Peroxidase. DNA im Zellkern ist durch den Fluoreszenzfarbstoff Dapi blau markiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Leica DM6000B aufgenommen. Dabei wurden die die Objektive mit 20facher Vergrößerung (gelbe Umrandung), 63-facher Vergrößerung (blaue Umrandung) und 100-facher Vergrößerung (lila Umrandung) verwendet. Weitere Einstellungen sind im Anhang aufgeführt. Das rote T markiert denselben Nierentubulus in den verschiedenen Vergrößerungen.

auf das Vorkommen von Nephrosin überprüft. Nephrosin kommt vor allem in der Niere vor (Abbildung 16). Es fällt auf, dass Nephrosin nicht direkt in den Zellen des Nierentubulus lokalisiert ist, sondern in

den umliegenden Zellen. In den Kiemen konnte Nephrosin nur vereinzelt und schwach nachgewiesen werden.

Auf Grund dieser Resultate wurde entschieden, die Niere genauer zu betrachten und mittels konfokaler Mikroskopie die Auflösung zu erhöhen. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wird Nephrosin (grün) und myeloide Peroxidase (rot) in denselben Zellen exprimiert. Es sieht jedoch so aus, dass Nephrosin eher im peripheren Raum nahe der Membran lokalisiert ist, während die myeloide Peroxidase im Cytoplasma verteilt auftritt. Diese absolut neue Erkenntnis deutet daraufhin, dass Nephrosin und myeloide Peroxidase nicht in denselben Granula vorliegen und unterschiedlich exprimiert werden.

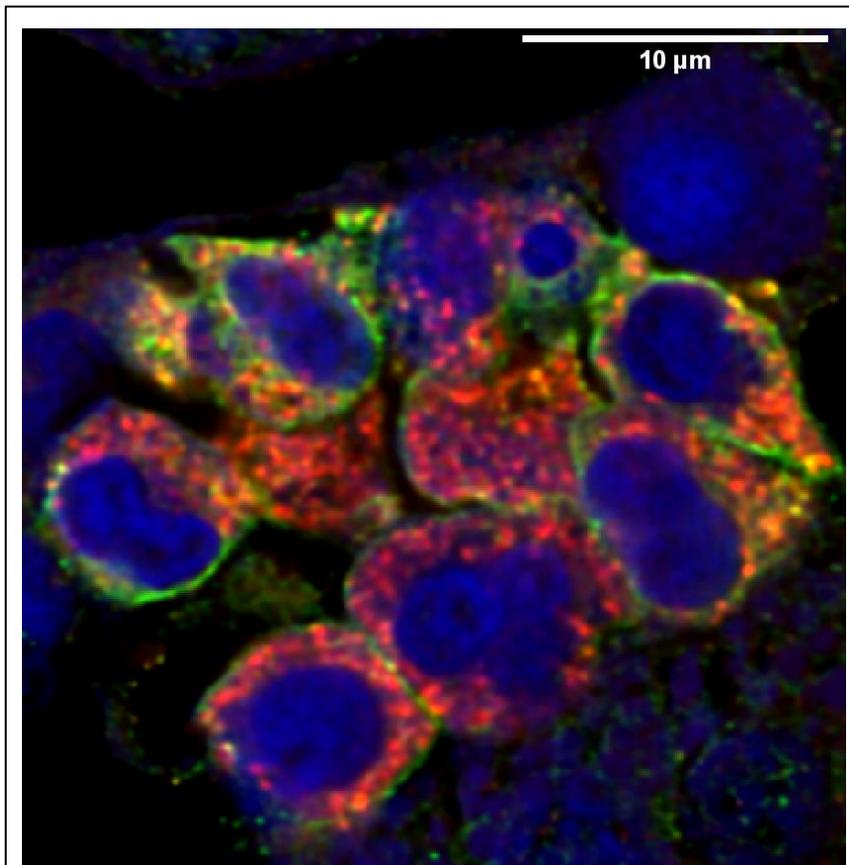
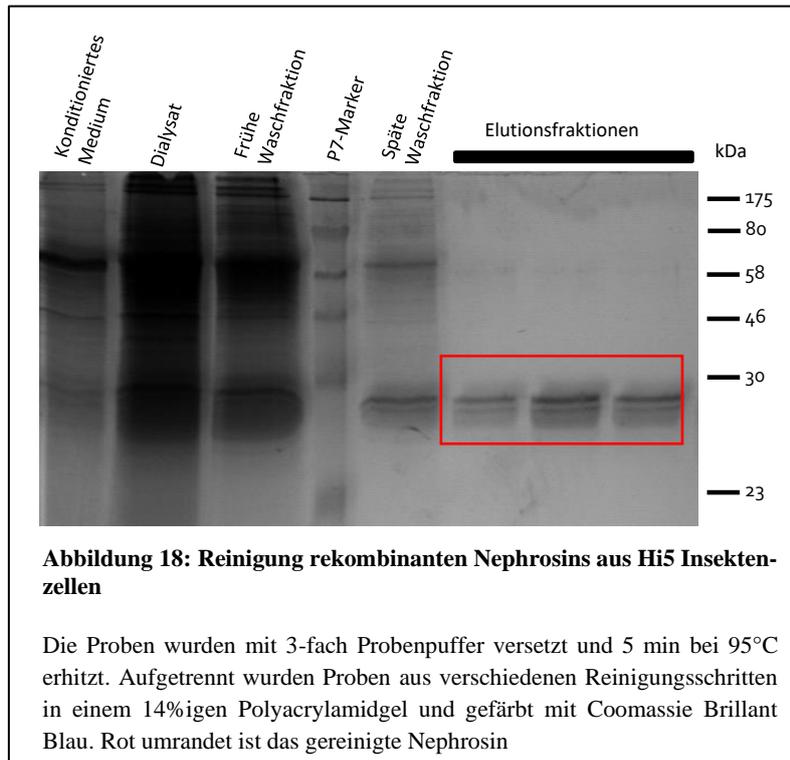


Abbildung 17: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in adulten Zebrafischen durch Konfokalmikroskopie)

Fluoreszenzaufnahme von Nierengewebe nach Dekonvolution von adulten (2 Jahre alten) Zebrafischen. Grüne Signale zeigen Nephrosin, rote Signale myeloide Peroxidase. Zellkerne sind durch den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Dapi blau markiert. Die Aufnahme wurde am konfokalen Mikroskop LEICA SP5 aufgenommen. Die numerische Apertur beträgt 1,4. Weitere Einstellungen sind im Anhang aufgeführt.

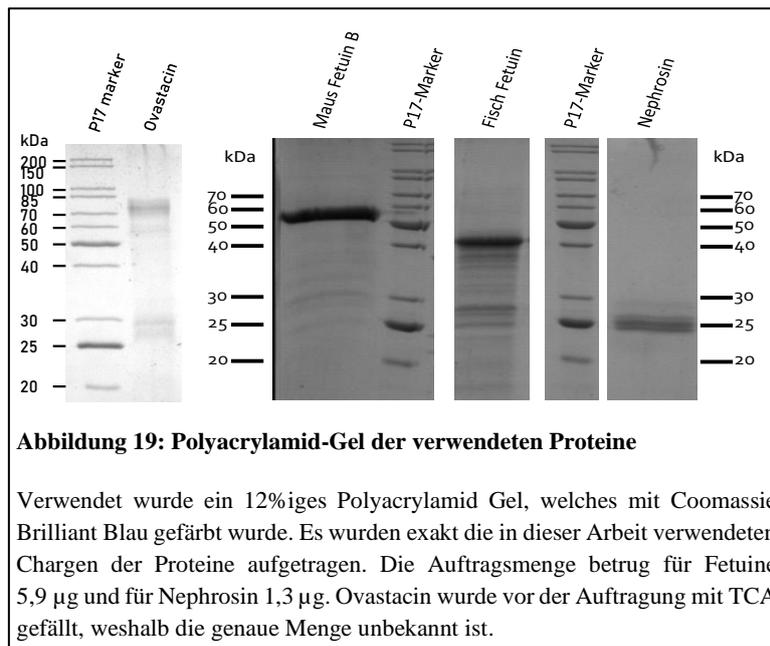
3.4 Expression von rekombinatem Nephrosin

Für die biochemische Charakterisierung von Nephrosin war es nötig, das Protein zu exprimieren und zu reinigen. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Bac-to-Bac Expressionssystems sowohl rekombinantes Nephrosin als auch rekombinantes Maus Fetuin-B in Insektenzellen hergestellt. Die Reinigung erfolgte beginnend mit einer Ammoniumsulfatfällung gefolgt von einer Dialyse und anschließender Affinitätschromatographie. Die Expressionsdauer in den Insektenzellen betrug 72 Stunden bei 27 °C unter ständigem Schwenken.



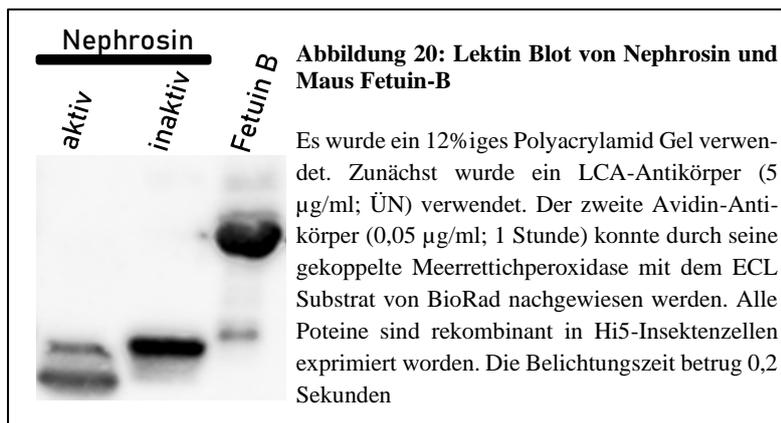
Exemplarisch ist die Reinigung von Nephrosin dargestellt. In den Elutionsfraktionen ist fast ausschließlich Nephrosin zu finden (Abbildung 18, roter Rahmen). Diverse andere Proteine werden durch die StrepTactin-Affinitätschromatographie abgetrennt. Offenbar wurde das Nephrosin während der Aufarbeitung proteolytisch prozessiert, was sich durch die zusätzlichen Banden ausdrückt.

3.5 Reinheit der Proteine



Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Proteine einer Polyacrylamid Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Brilliant Blau Färbung unterworfen. (Abbildung 19). Maus Fetuin-B zeigt eine dominante Bande bei ca. 50 kDa. In den Nephrosinproben sind insgesamt drei Banden zu sehen, von denen die Bande bei 25 kDa am stärksten ist. Eine schwache Bande ist bei ca. 30 kDa zu sehen. Die Proben der Fisch Fetuine zeigen deutlich mehr Banden. Allerdings ist auch in diesen Proben jeweils eine Bande deutlich stärker. In Western Blots konnten die meisten Banden ebenfalls detektiert werden (nicht gezeigt). Insgesamt ist festzuhalten, dass eine ausreichende Reinheit für die Ermittlung der kinetischen Parameter vorhanden ist.

3.6 Glykosylierung der rekombinant exprimierten Proteine



Nephrosin besitzt zwei potentielle Glykolysierungsstellen. An diese glykosylierten Stellen können Lektine binden. Mit Hilfe eines Lektin Blots (Abbildung 20) konnte die Glykosylierung des rekombinanten Nephrosin bestätigt werden. Als Lektin wurde LCA (*Lens Culinaris Agglutinin*) verwendet. Die Glykosylierung von rekombinant exprimierten Maus Fetuin-B konnte ebenfalls gezeigt werden und

diente als Positivkontrolle. Da Glykosylierungen wahrscheinlich nur erfolgen, wenn eine korrekte Proteinfaltung vorliegt, kann zumindest von einer *in vivo* nahen Faltung ausgegangen werden.

3.7 Spaltspezifität von Nephrosin im Vergleich zu anderen Astacinen

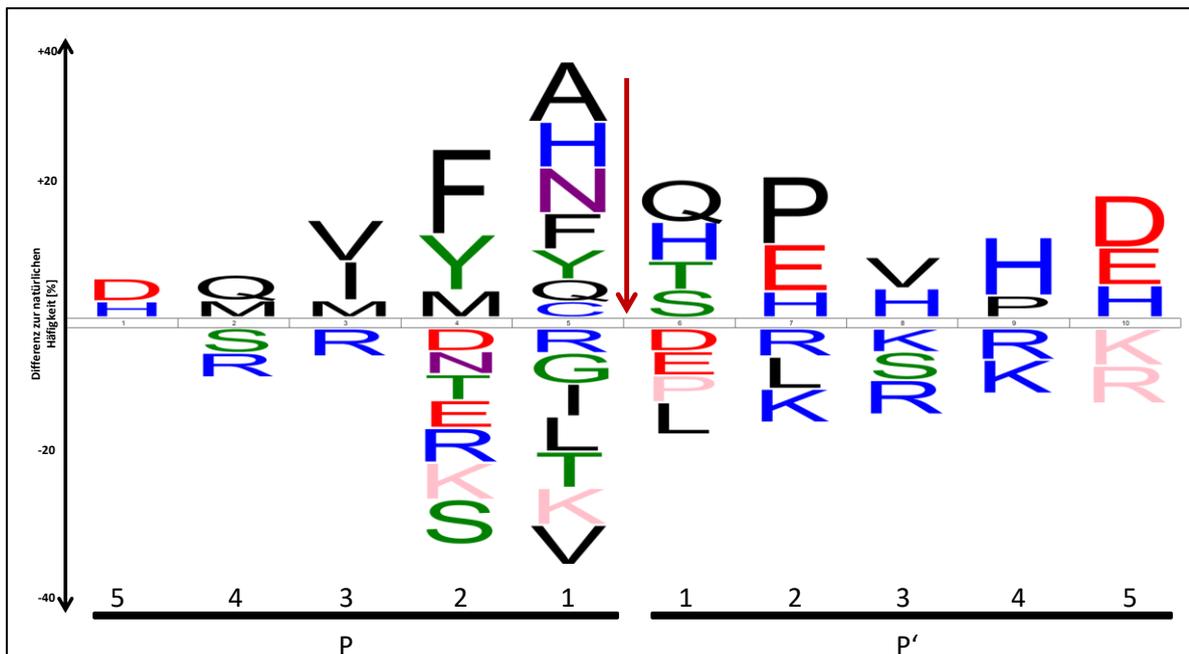


Abbildung 21: Schnittspezifität von Nephrosin gegenüber Protein Substraten

Dargestellt ist die Spaltpräferenz von Nephrosin in den Positionen P5 bis P5' Schechter und Berger (1967) als IceLogo (Colaert et al., 2009). Die Positionen P1 bis P5 sind N-terminal des Schnittes, während P1' bis P5' C-terminal des Schnittes liegen. Auf der Y-Achse ist die Differenz zur natürlichen Häufigkeit der Aminosäuren in *E. coli* aufgetragen. Zur Erstellung dieses Logos wurde einer *E. coli* Peptidbibliothek, welche über tryptischen Verdau erzeugt wurde, genutzt. Gefunden wurden 204 Schnittstellen für Nephrosin im *E.coli* Proteom. Der rote Pfeil zeigt die zu spaltende Peptidbindung an. Für die Farbgebung wurden die default Einstellungen verwendet. Blass rosa: kommt im Referenzsatz nicht vor; Blau: Basische Reste; Rot: saure Reste; Grün: polare R inklusive Tyrosin und Gylcin; Schwarz: hydrophope Reste inklusive Prolin und Alanin

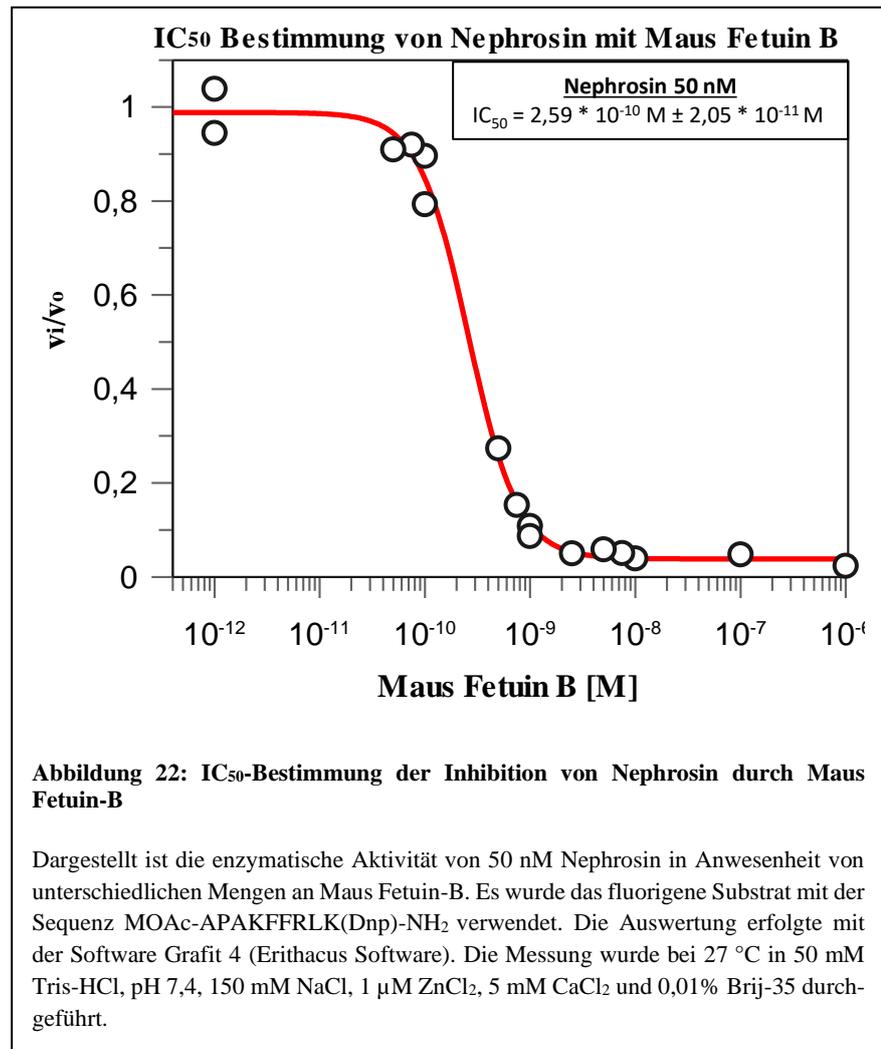
Peptidasen hydrolysieren Peptidbindungen in der Regel nicht willkürlich, sondern auf Grund spezifischer chemischer Eigenschaften der Aminosäurereste in der Umgebung der Schnittstelle. Dies spiegelt sich in bevorzugten Aminosäureresten in den sogenannten Bindungstaschen im aktiven Zentrum der Protease wider, auf Grund derer man eine Protease charakterisieren kann. Mit Hilfe der PICS-Analyse können Aminosäurepräferenzen in den verschiedenen Bindetaschen von Enzymen ermittelt werden. Für Nephrosin ist eine Untersuchung der Schnittspezifität bisher nicht publiziert worden. Zur Normierung werden die ermittelten Aminosäuren gegen das natürliche Vorkommen der Aminosäuren im verwendeten Organismus abgeglichen (Colaert et al., 2009). Sind Aminosäuren im Vergleich zum natürlichen Vorkommen seltener in den jeweiligen ermittelten Positionen zu finden, sind diese Aminosäuren eher unspezifische Bindungspartner in dieser Tasche. Je höher der Unterschied ist, desto unwahrscheinlicher ist ein Auftreten der Aminosäure in dieser Position. Umgekehrt verhält es sich mit selteneren Aminosäuren. Sind diese stark im ermittelten Logo repräsentiert, ist eine Bindung in der entsprechenden Position sehr wahrscheinlich. Die Größe der Buchstaben spiegelt dabei die relative Häufigkeit vor dem Hintergrund des natürlichen Vorkommen wider. Die Farben der Buchstaben zeigen die biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren an.

Abbildung 21 zeigt, dass Nephrosin keine eindeutige Präferenz für Aminosäuren in P1 und P1', also an der zu hydrolysierenden Peptidbindung, besitzt. Es können verschiedene Aminosäuren diese Positionen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit besetzen. Während in P2 eher große sperrige Aminosäuren (z.B. Phenylalanin (F), Methionin (M)) bevorzugt werden, scheinen kleine Aminosäuren (Valin (V), Isoleucin (I)) die P3 Bindungstasche zu besetzen. In P2' wird Prolin (P) präferiert, was ein typisches Merkmal

verschiedener Astacine ist (Becker-Pauly et al., 2011). Außerdem ist Glutamat in P2' stark repräsentiert. Die Bindetaschen P3' und P4' scheinen mittelgroße basische Aminosäuren wie Histidin (H) zu bevorzugen, während in P5' eher negativ geladene Aminosäuren wie Aspartat (D) und Glutamat (E) präferiert werden. Auffällig ist das häufige Auftreten von Histidinen (H) in P1 bis P5'. Somit weist Nephrosin nicht die typisch diazide Schnittpräferenz in P1' und P2' der Mehrheit der Astacine auf. Die relative Häufigkeit von Prolin in P2' teilt Nephrosin jedoch mit vielen anderen Astacinen.

3.8 Bestimmung des Anteils an katalytisch aktivem Nephrosin

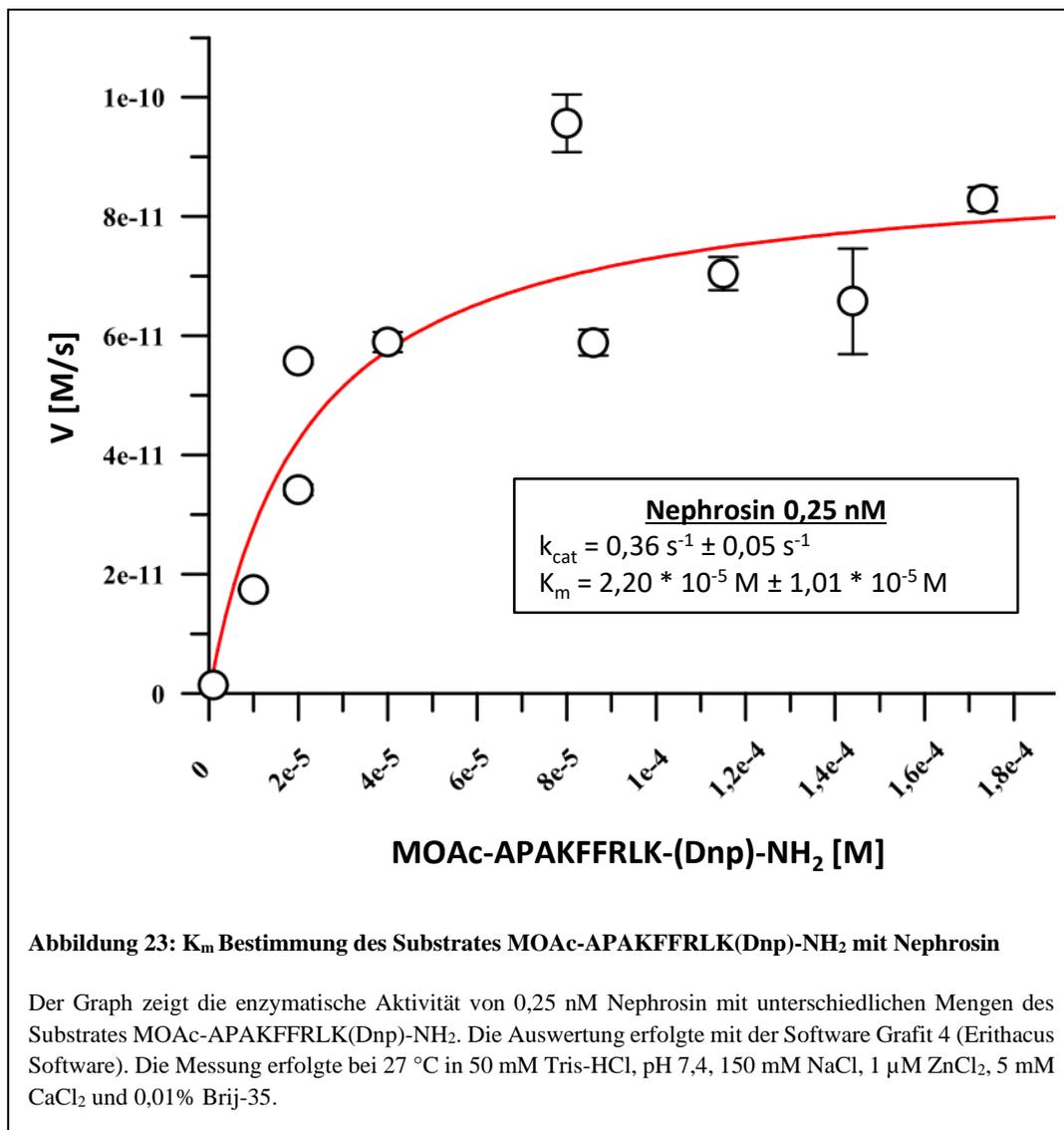
Für die korrekte Bestimmung von kinetischen Parametern der zu untersuchenden Enzyme ist es erforderlich, die Menge an aktivem Enzym möglichst genau zu bestimmen. Von Cuppari et al. (2019) und Karmilin et al. (2019) wurde gezeigt, dass Fetuin-B Astacinproteinasen mit hoher Selektivität und Affinität (*tight binding*) inhibiert. Diese Affinität ist so hoch, dass Fetuin-B genutzt werden kann, um die entsprechende Astacinproteinase zu titrieren und so die effektiv aktive Konzentration der Protease zu bestimmen. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch keine genauen Daten mit Nephrosin vorlagen, wurde davon ausgegangen, dass die Titration auch hier funktionieren sollte.



Bei eingesetzten 50 nM Nephrosin wurde ein IC₅₀-Wert von 0,259 nM ± 0,0205 nM ermittelt (Abbildung 22). Der IC₅₀-Wert zeigt die halbmaximal mögliche Hemmung an. Die Hälfte aller aktiven Enzyme sind bei dieser Konzentration gehemmt, so dass die Menge an aktivem Nephrosin 0,518 nM bei eingesetzten 50 nM Nephrosin beträgt. Mit Hilfe dieser Probe wurden die nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen durchgeführt. Die angegebenen Nephrosinkonzentrationen beziehen sich dabei auf das aktive Nephrosin.

3.9 Bestimmung der Michaelis-Konstante

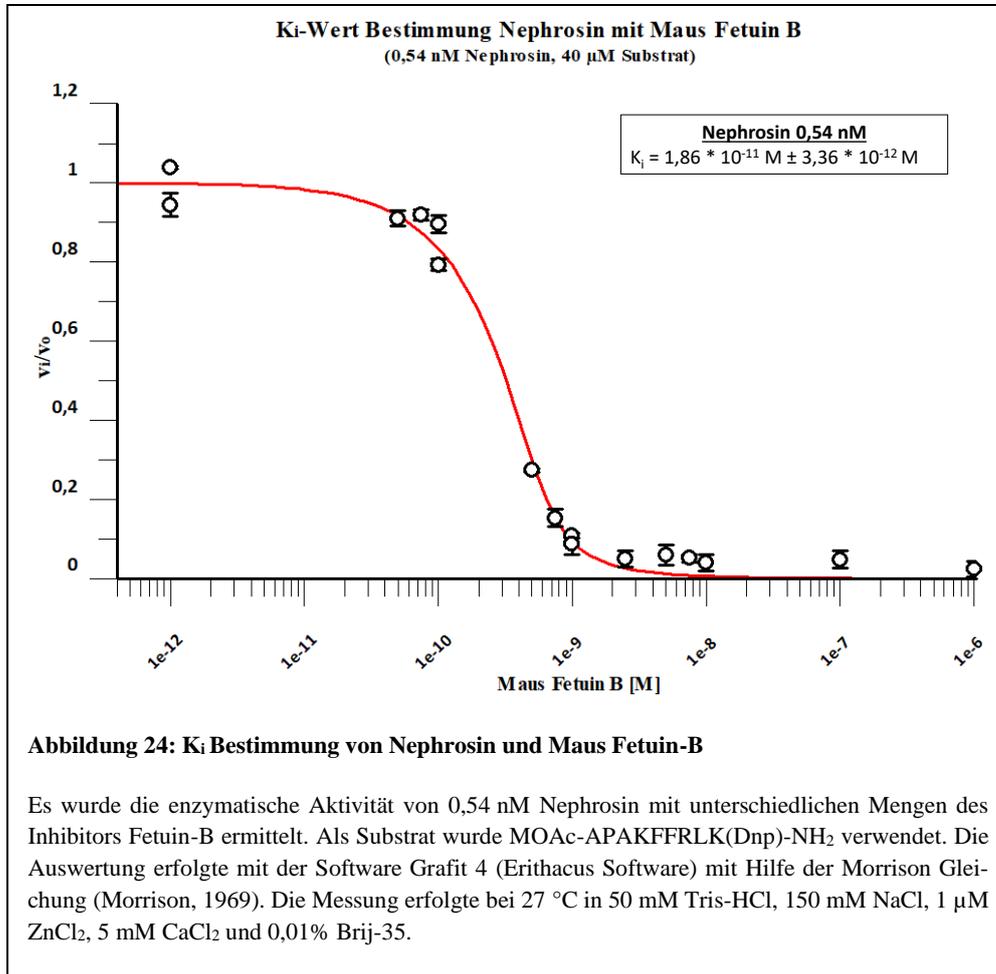
Bei der Bestimmung der Michaelis-Konstanten mit dem FRET-Substrat MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂ wurde bei Substratkonzentrationen oberhalb von 180 μM ein intermolekulares Quenching festgestellt. Hat Nephrosin sein Substrat prozessiert, kann das emittierte Licht der MOAc nicht mehr von der Dnp Gruppe gequenchet werden. Somit kann das emittierte Licht der Wellenlänge 393 nm gemessen werden. In dem vorliegenden Fall betrug der Abstand nach Totalhydrolyse durch Proteinase K von freien fluorogenen Gruppen ab einer Konzentration von 180 μM weniger als 10 nm. Somit konnte das emittierte Licht freier MOAc-Gruppen durch Dnp-Gruppen gequenchet werden. Dieses beeinflusste die



Messungen so stark, dass keine zuverlässige Auswertung erfolgen konnte. Unter den gegebenen Bedingungen und der Berücksichtigung von Werten unterhalb von 180 μM Substratkonzentration, ergab die Bestimmung der Michaelis-Konstante für Nephrosin mit dem fluorogenen Substrat MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂ 22 μM ± 10,1 μM (Abbildung 23) bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von 89 pM ± 11,3 pM. Dies ergibt eine Wechselzahl (k_{cat}) von 0,36 s⁻¹ mit einer Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_m) von 1,62*10⁴ M⁻¹s⁻¹.

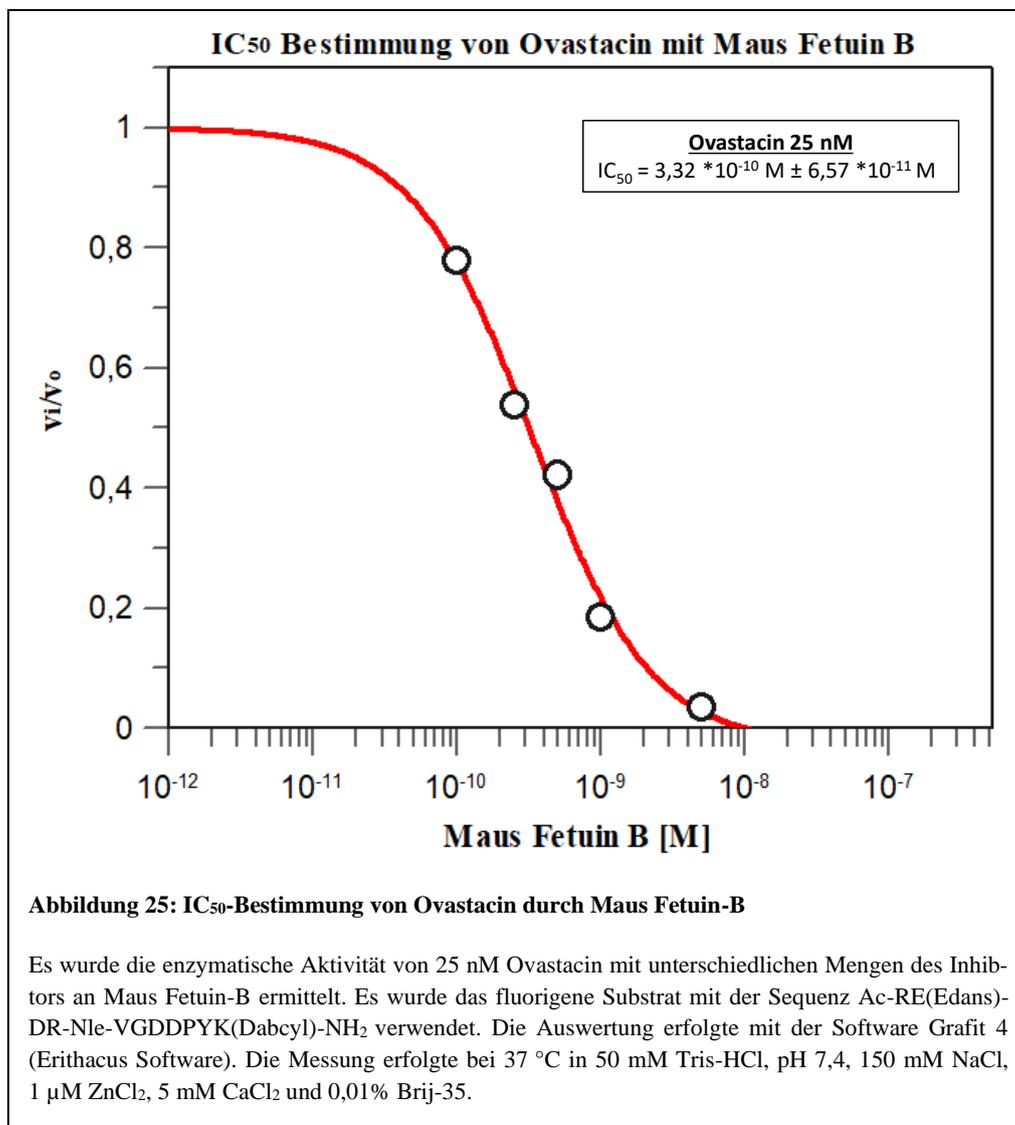
3.10 Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Nephrosin mit Maus Fetuin-B

Mit Hilfe der zuvor bestimmten Parameter war es möglich, die Interaktion zwischen Nephrosin und Fetuin zu bestimmen. So konnte eine sehr hohe Affinität zwischen Nephrosin und Maus Fetuin-B ($K_i = 0,0186 \text{ nM} \pm 0,00336 \text{ nM}$; Abbildung 24) nachgewiesen werden.



3.11 Bestimmung des Anteils an aktivem Ovastacin

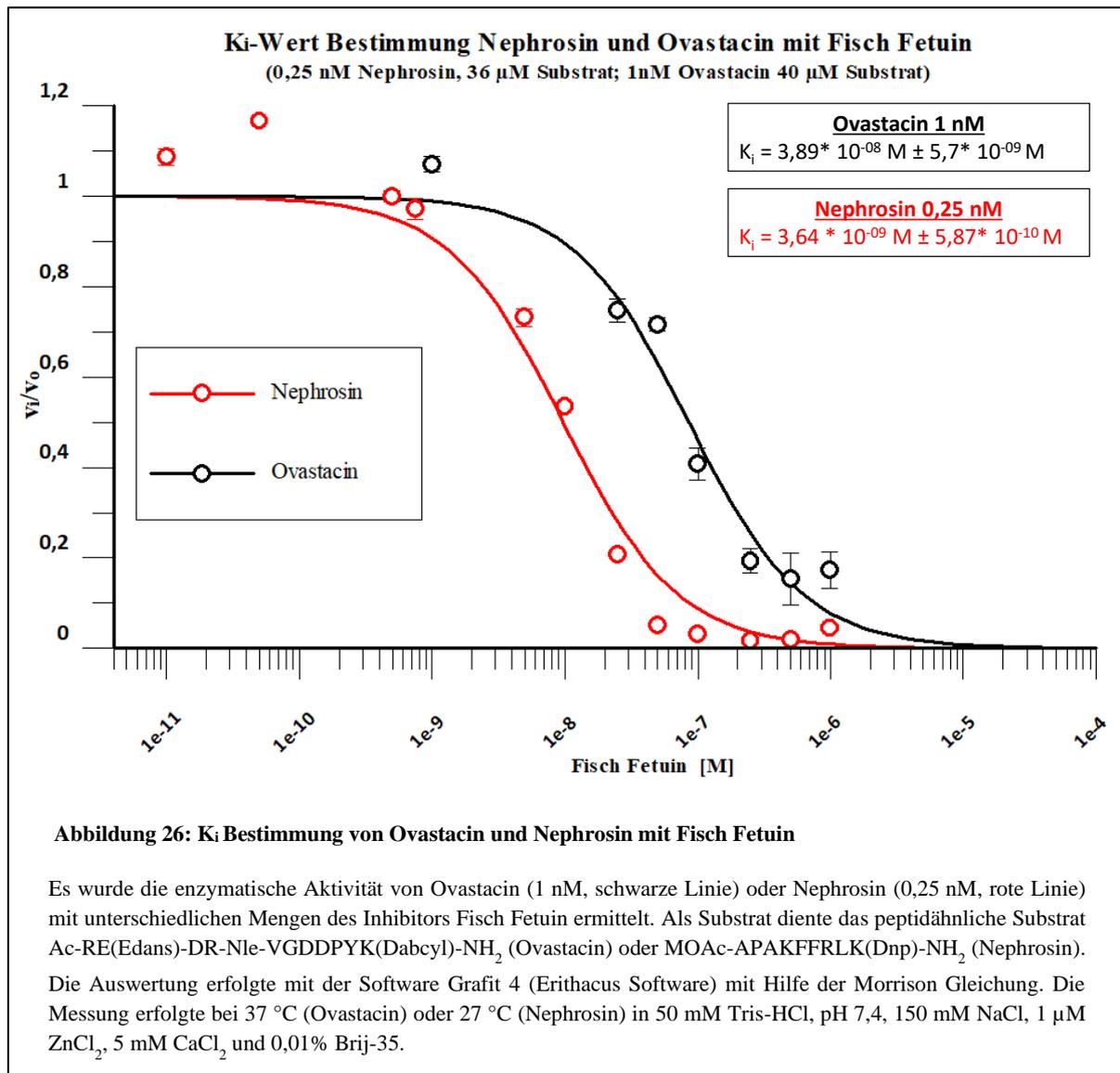
Zur genauen Bestimmung der Inhibitionskonstante ist es auch hier nötig die aktive Konzentration an Ovastacin zu kennen. Ovastacin wurde mittels Plasmin aktiviert (Karmilin et al., 2019). Die Expression,



Reinigung und Aktivierung wurde von Hagen Körschgen durchgeführt. Für die IC₅₀-Bestimmung wurde Maus Fetuin-B genutzt. Für diese Ovastacin-Charge konnte ein IC₅₀-Wert von 0,332 nM ± 0,066 nM bei eingesetzten 25 nM Enzym ermittelt werden (Abbildung 25). Es sind also von den eingesetzten 25 nM Ovastacin lediglich 0,664 nM aktiv.

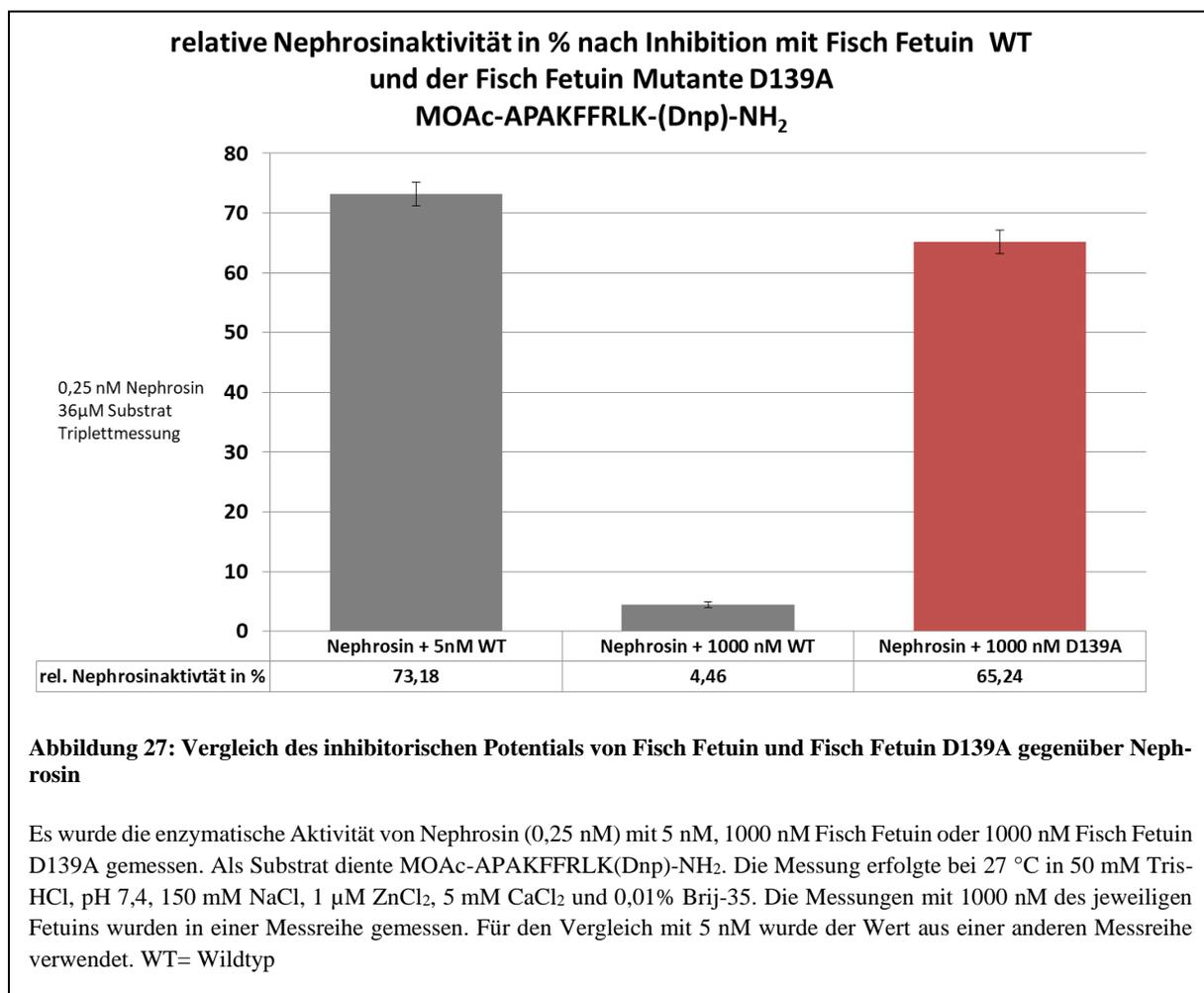
3.12 Bestimmung der Inhibitionskonstante von Fisch Fetuin mit Astacinen

Daten von Karmilin et al. (2019) und Cuppari et al. (2019) zeigten bereits, dass Maus Fetuin-B in der Lage ist, Astacine verschiedener Spezies sehr potent zu hemmen. Fraglich bis jetzt war, ob diese Fähigkeit erst ab den Säugetieren besteht oder schon zu einem deutlich früheren evolutionären Zeitpunkt auftritt. Zu diesem Zweck wurde die inhibitorische Konstante von Ovastacin und Nephrosin mit rekombinant exprimiertem Fisch Fetuin bestimmt. Die Bestimmung der inhibitorischen Fähigkeit von Fisch Fetuin zeigte eine deutlich schlechtere Hemmung als mit Maus Fetuin-B. So betrug der K_i -Wert von Fisch Fetuin mit Nephrosin $3,64 \text{ nM} \pm 0,59 \text{ nM}$ (Abbildung 26). Die Bestimmung von Ovastacin und Fisch Fetuin ergab einen K_i -Wert von $38,9 \text{ nM} \pm 5,70 \text{ nM}$.



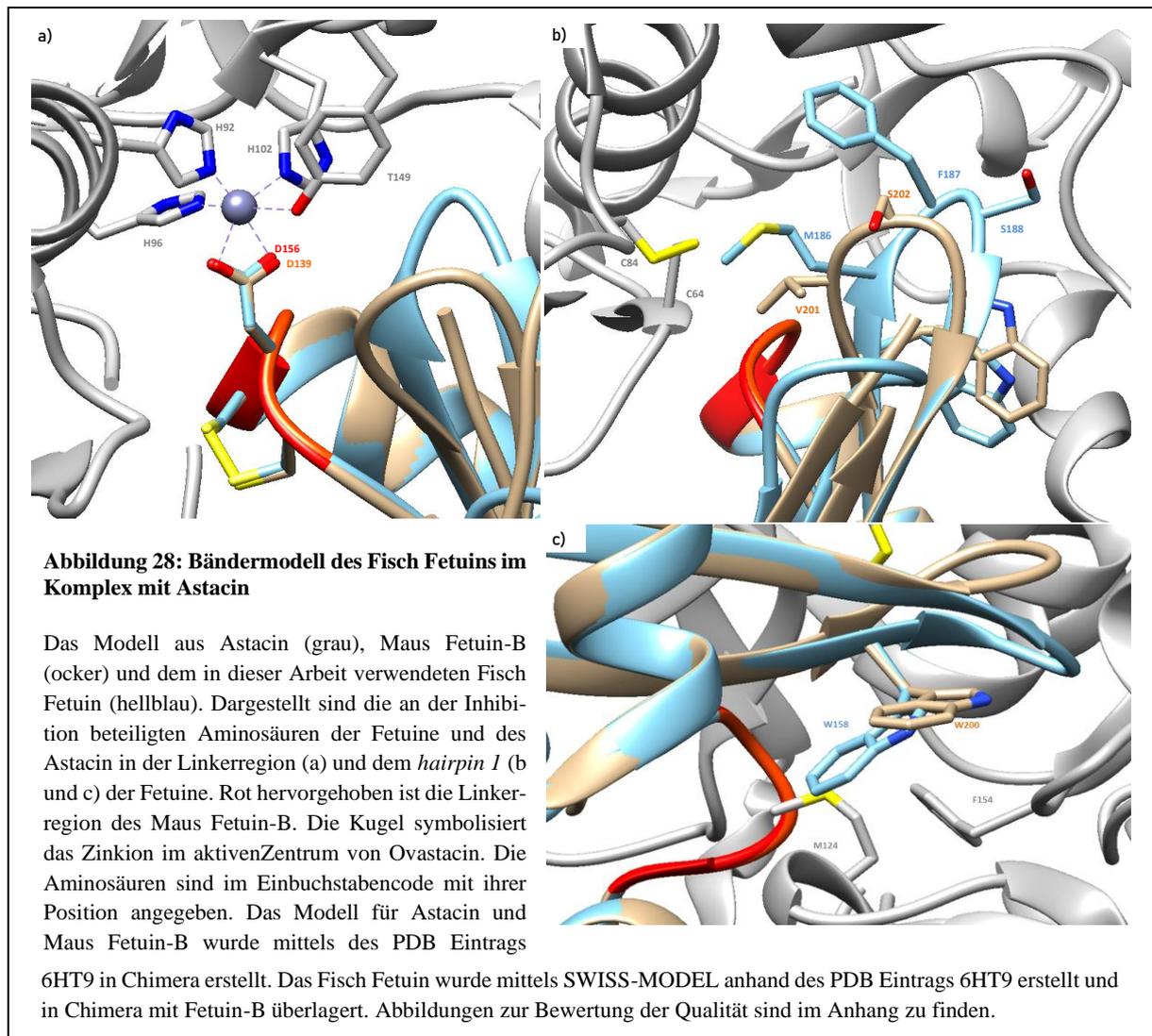
3.13 Vergleich der Inhibition von Nephrosin durch Fisch Fetuin WT und Fisch Fetuin D139A

Für die Inhibition von Nephrosin durch Fetuin ist ein Aspartat in der Linkerregion zwischen den zwei cystatinähnlichen Domänen im Maus Fetuin-B verantwortlich, das im Fisch Fetuin konserviert ist (Cuppari et al., 2019). Aus diesem Grunde wurde dieses Aspartat gegen ein Alanin ausgetauscht, um den Einfluss des Aspartats auf die Inhibition zu ermitteln. Es wurde eine Vergleichsmessung der beiden Fisch Fetuin Varianten bei eingesetzten 1000 nM Fisch Fetuin mit 0,25 nM Nephrosin durchgeführt (Abbildung 27). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation des Aspartats 139 zu Alanin eine signifikante Reduktion der inhibitorischen Fähigkeit zur Folge hat. So sind 1000 nM der Fisch Fetuin Mutante (65,24% Restaktivität) nötig um eine Inhibition von Nephrosin vergleichbar zu 5 nM Wildtyp Fisch Fetuin (73,17% Restaktivität) zu erreichen. Für eine genaue Bestimmung der inhibitorischen Konstante der Fisch Fetuin Mutante wären sehr hohe Konzentrationen des Proteins benötigt worden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung standen.



3.14 Modellierung des Hemmmechanismus von Fisch Fetuin

Auf Grund der Ergebnisse der Bestimmung der inhibitorischen Konstanten stellte sich die Frage nach den Unterschieden in der Inhibition der Fetuine. Da für das Fisch Fetuin keine Struktur bekannt war,



wurde diese Struktur mittels Homologie-Modellierung erstellt. Als Vorlage diente der Astacin/Maus Fetuin-B Komplex (PDB: 6HT9)(Cuppari et al., 2019). Die Linkerregion beider Fetuine ist fast identisch (Abbildung 28 a), so dass in beiden Fetuinen das Aspartat der Linkerregion mit dem katalytischen Zink interagieren kann. Ein deutlicher Unterschied liegt im *hairpin 1* der zweiten Cystatinähnlichen Domäne, der für die Interaktion mit der S2' und S3' Bindetasche des Astacin wichtig ist. Der *hairpin* im Maus Fetuin-B beginnt mit Val201, Abbildung 28 b), welches mit Cys64 und Cys68 des Astacins interagieren kann. Auf das Valin folgt ein Ser202. Im Fisch Fetuin findet sich statt des Valins Met186. Anders als im Maus Fetuin folgt auf das Methionin ein Phenylalanin und dann Ser188. Dies führt zu einer größeren Schleife, die sich auch anders im Raum anordnet (Abbildung 28 b). Betrachtet man nun noch das Tryptophan kurz vor dem *hairpin* fällt ebenfalls eine unterschiedliche räumliche Anordnung auf. Im Maus Fetuin-B ist Trp200 so angeordnet, dass es sowohl mit Met124 als auch mit Phe154 des Astacins interagieren kann. Trp158, hellblau, Abbildung 28 c) des Fisch Fetuins orientiert sich Richtung Met124 des Astacins, was zu sterischen Problemen führt. Auch eine Interaktion des Tryptophans mit dem Phenylalanin sollte nicht ohne weiteres möglich sein. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der Modellierungen Übereinstimmungen zwischen Fisch Fetuin und Maus Fetuin-B vor allem in der für

Maus Fetuin-B wichtigen Linkerregion nachgewiesen werden können. Der ebenfalls für die Inhibition wichtige *hairpin I* unterscheidet sich in den beiden Fetuinin sowohl in Größe als auch der Aminosäurezusammensetzung. Es scheint also so, dass die Mechanismen der Inhibition sich unter spezifischer Anpassung an die zu hemmende Protease ähneln.

3.15 Vergleich Astacin und Nephrosin mittels Homologiemodellierung

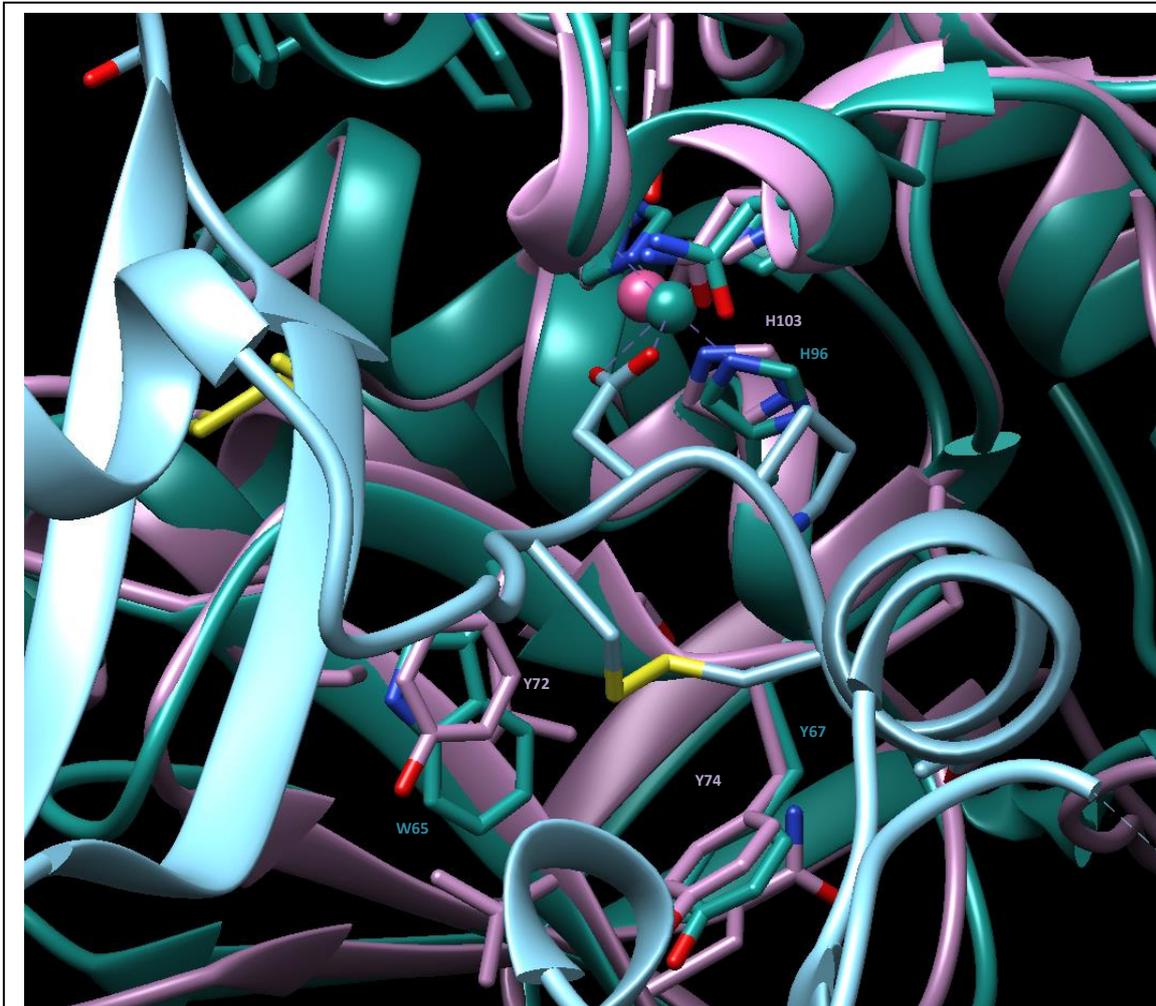


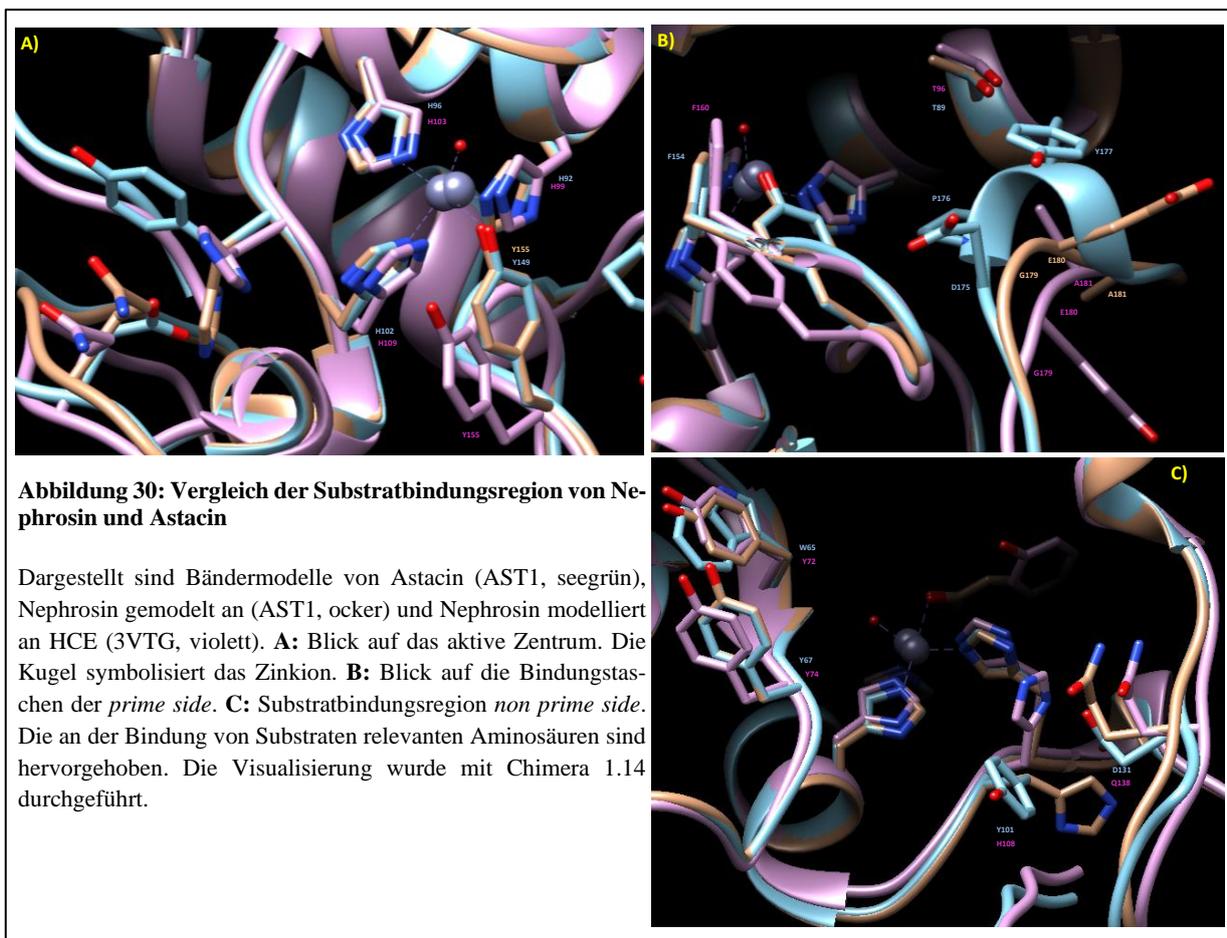
Abbildung 29: Vergleich von Nephrosin und Astacin in Bezug auf die Hemmung durch Fetuin

Dargestellt ist an HCE (3VTG) modelliertes Nephrosin (violett) und Astacin (6HT9, seegrün) überlagert. Ebenfalls zu sehen ist Maus Fetuin-B (6HT9, hellblau). Jeweils ein Histidin der beiden Proteasen, welches an der Zinkbindung beteiligt ist - His103 (Nephrosin) und His96 (Astacin) - ist zur besseren Orientierung markiert. Außerdem sind die Interaktionspartner mit dem Maus Fetuin und der Linker Region dargestellt. Das Matching und die Visualisierung der Enzyme erfolgte mit Chimera 1.4.

Auf Grund der sehr unterschiedlichen inhibitorischen Konstanten von Astacin und Nephrosin stellte sich die Frage auf welche Mechanismen dieser Unterschied zurückzuführen ist. Dazu wurden Modellierungen von Nephrosin an Astacin (6HT9) selbst und am *high choriolytic enzyme* (3VTG) durchgeführt. Das an Astacin erstellte Modell führte zu einer sterischen Behinderung mit Fetuin-B. So kam es unter anderem zu einer falschen Orientierung des Tyr72 (Abbildung 29; Y72) des Nephrosins, was zu einer sterischen Kollision mit dem Maus Fetuin-B geführt hätte. Aus diesem Grunde wurde dieses Modell für die Untersuchung der Inhibition verworfen. Anstelle von Trp65 im Astacin ist in Nephrosin Tyr72 zu finden. Die Orientierung des Ringes ist in beiden Proteinen ähnlich, so dass eine Interaktion von Tyrosin mit Cys157 des Maus Fetuin-B möglich ist. Es entsteht jedoch ein Raum, da der zweite Ring des

Tryptophans im Tyrosin fehlt. Tyr72, welches mit dem Phe112 des Fetuins-B interagiert ist auch in Nephrosin mit derselben Orientierung zu finden. Der Bereich um Tyr177 des Astacins bildet eine kurze Helix, die im Nephrosin in keinem der beiden Modelle zu finden ist (Abbildung 30 B).

Für den Vergleich des katalytischen Spaltes von Astacin und Nephrosin wurden die Homologiemodelle des Nephrosins anhand der PDB Einträge 1AST (Astacin) und 3VTG (HCE) verwendet. Im Folgenden wird das 1AST-basierte Modell, als Modell-1AST bezeichnet. Ebenso ist Modell-3VTG das an 3VTG erstellte Nephrosin Modell. Abbildung 30 A zeigt eine deutliche Übereinstimmung in der Orientierung der Zinkliganden. In Modell-3VTG weist der Zinkligand des Met-Turn Tyrosin 155 eine leicht andere Orientierung auf. Da für eine erfolgreiche Spaltung zunächst eine Bindung des Substrates erfolgen muss, sollte auch ein Vergleich der Bindungstaschen der Proteine erfolgen. C-terminal des Schnittes sind zwei Aminosäuren in Astacin und Nephrosin konserviert (Abbildung 30 B). Zum einen Thr89/Thr96 und zum anderen Phe154/Phe160. In Modell-3VTG ist das Phenylalanin leicht anders orientiert. Ein elementarer Unterschied ist in der kurzen Helix der Aminosäuren Aspartat 175, Prolin 176 und Tyrosin 177 zu beobachten Abbildung 30 B. In beiden Nephrosin Modellen wird keine Helix ausgebildet und es findet sich keine Sequenzübereinstimmung mit Astacin. In Nephrosin befinden sich an dieser Stelle Glycin 179, Glutamat 180 und Alanin 181. Die Orientierung dieser Aminosäuren ist in beiden Modellen unterschiedlich. Modell-AST1 zeigt eine Schleife, die in Richtung der Helix weist. Die Reste der Ami-

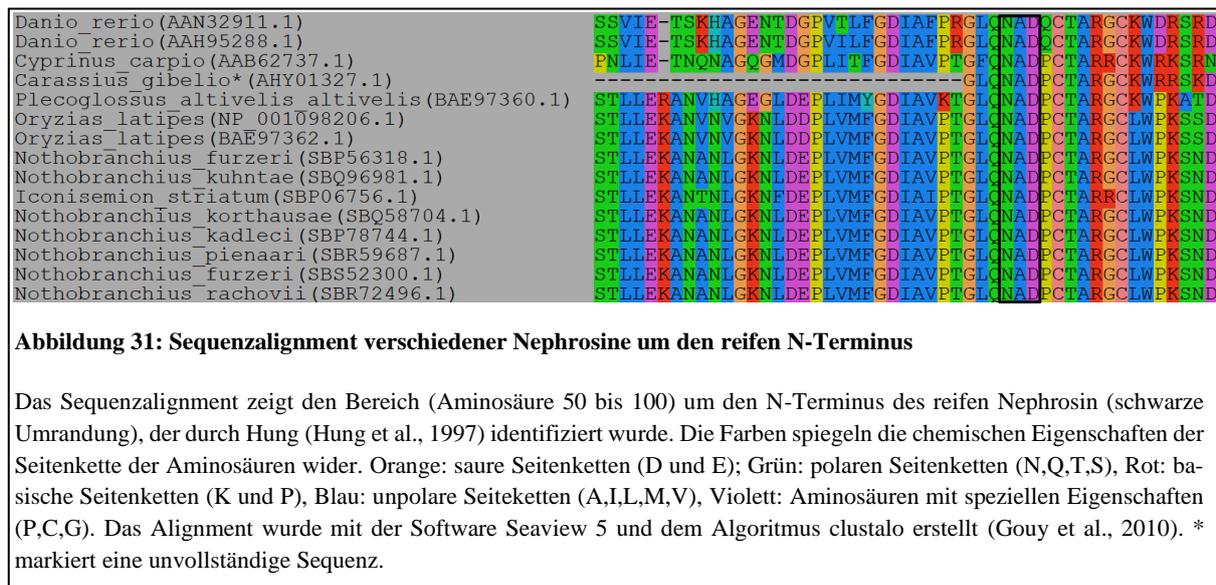


nosäuren weisen jedoch in die entgegengesetzte Richtung. Betrachtet man die Bindungstaschen N-terminal (*none prime side*) der zu spaltenden Peptidbindung, zeigen sich größere Abweichungen (Abbildung 30 c). Lediglich das Tyr74 ist auch in der Ausrichtung konserviert. Anstelle des Tryptophan 65 des Astacin ist in Nephrosin ein weiteres Tyrosin (Tyr72). Auch die an der Bildung der P2 Bindungstasche beteiligten Aminosäuren Tyr101 und Asp131 des Astacin sind ausgetauscht. Hier befindet sich

im Nephrosin ein Histidin (H108) statt Tyrosin und Glutamin (Q138) statt Aspartat. Die Modellierungen zeigen sehr deutlich, dass Nephrosin und Astacin sich im zinkbindenden Motiv sehr ähnlich sind. In der Substratbindungsregion sind jedoch essentielle Unterschiede festzustellen.

3.16 Aktivierung von Nephrosin durch Proteasen

Nephrosin wird als inaktives Zymogen exprimiert und muss durch proteolytische Abspaltung eines aminoterminalen Propeptids aktiviert werden. In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass rekombinant exprimiertes Zebrafisch Nephrosin mit Trypsin aktiviert werden kann (Olf, 2012). Weiterhin war eine Autoaktivierung von Nephrosin durch Inkubation bei einer Temperatur von 25°C zu beobachten. Beide Mechanismen spiegeln womöglich nicht den physiologisch relevanten Aktivierungsmechanismus wider, aber sie geben Hinweise auf die mögliche Position der Aktivierungsstelle. Aus diesem Grunde wurde versucht mit Hilfe eines Sequenzalignments von Nephrosinen verschiedener Organismen eine konser-



vierte Aktivierungsstelle auszuspielen. Das aktive Nephrosin des Karpfens beginnt mit der Aminosäuresequenz NAD (Hung et al., 1997), welche in allen hier analysierten Organismen konserviert ist (Abbildung 31, schwarze Umrandung). Wie im Sequenzalignment zu sehen ist, ist der Bereich fünf Aminosäuren vor dem reifen N-Terminus stark konserviert. Anschließend wurde die Datenbank MEROPS (Rawlings et al., 2018) auf Grund der dort hinterlegten Schnittspezifität nach potentiellen Aktivatoren durchsucht. Als Aktivator wurden die Matrix Metalloprotease 2 und Matrix Metalloprotease 9 identifiziert.

3.16.1 Matrix Metalloprotease 2 (MMP2) als Aktivator

MMP2 hydrolysiert Peptidbindungen bevorzugt zwischen Glycin (G) und Leucin (L) und zeigt eine Präferenz für Prolin (P) in P3 (Prudova et al., 2010; Schilling und Overall, 2008). Für das Docking wurde die Kristallstruktur 1CK7 von humanen MMP2 verwendet. Kristallstrukturen von MMP2 anderer Organismen standen nicht zur Verfügung. Aus diesem Grunde wurde ein Sequenzvergleich von humanen MMP2 mit MMP2 des Zebrafisches durchgeführt (Abbildung 45 im Anhang). Dieser Vergleich zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz beider Enzyme mit einer Identität von 70,74%. Der größte Unterschied ist im Signalpeptid zu finden, so dass für die Interaktionsstudien auf das Erstellen eines Modells von MMP2 des Zebrafisches verzichtet wurde.

Pronephrosin wurde am Proastacin (3LQO) modelliert und als PDB gespeichert. Beide PDBs wurde dann mit dem Online Tool ClusPro (Kozakov et al., 2017) mit der Option Dock verwendet. Dieses Tool erstellt verschiedene Modelle, in dem der Ligand (Nephrosin) 70.000 mal um die x-, y- und z-Achse

gedreht wird. Die energetisch günstigsten Modelle werden ausgewählt. Für diese Betrachtung wurde das energetisch günstigste Modell verwendet.

Wie zu sehen ist, sind die Aminosäuren Glycin (G) und Leucin (L) in einem gut zugänglichen *loop* lokalisiert. Dieser ragt in den katalytischen Spalt des MMP2 hinein. Auch die chemischen Oberflächen beider Enzyme passen sehr gut zusammen (Abbildung 32 E), so dass eine Interaktion und somit eine Aktivierung möglich ist.

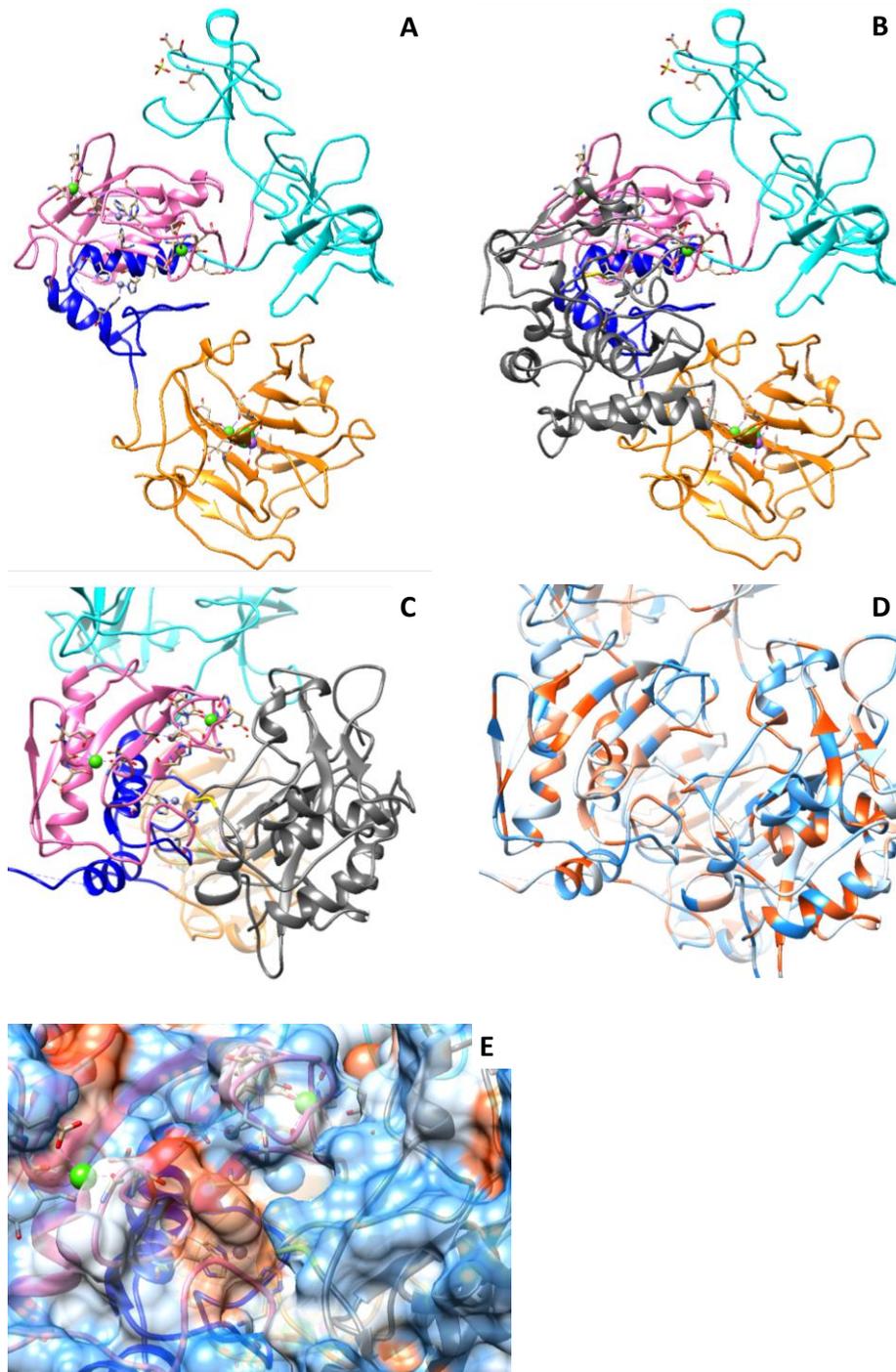


Abbildung 32: Interaktion von MMP2 mit Pronephrosin

In A, B, C und E sind die Enzyme manuell eingefärbt. Pink: Kollagenase ähnliche Domäne I; Dunkelblau: Kollagenase ähnliche Domäne II; Cyan: Kollagen bindende Domäne; Orange: Hämopoexinähnliche Domäne; Grau: Nephrosin; Gelb innerhalb des Nephrosin sind die Aminosäuren 57GL58 im Propeptid; grüne Kugel: Calciumion; hellblaue Kugel: Zinkion; Lila Kugel: Natriumion.

A: Bändermodell von MMP2 (1CK7) in Standardorientierung. B: Bändermodell MMP2 ins Standardorientierung mit Nephrosin nach Modellierung mit ClusPro. C: Bändermodell MMP2 mit Nephrosin. Das Modell ist zur Übersichtlichkeit der Aktivierungsstelle (gelb) gedreht. D: Bändermodell von MMP2 und Nephrosin in der Orientierung wie in C. Das Modell ist aufgrund der Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle (1982) gefärbt. Je roter ein Bereich ist, desto hydrophober ist er. Blaue Bereiche sind hydrophil. E: Bändermodell von MMP2 und Nephrosin mit ihrer Oberflächenstruktur nach Kyte & Doolittle (1982). Die Orientierung ist dieselbe wie in C und D. Es wurde auf die Aktivierungsstelle (gelb) hineingezoomt.

3.16.2 Matrix Metalloprotease 9 (MMP9) als Aktivator

Analog zu den Modellierungen von Nephrosin mit MMP2 (3.16.1) wurde eine Interaktion von MMP9 mit Nephrosin überprüft. Da in allen verfügbaren Kristallstrukturen die Hämopexindomäne fehlt, wurde die längste verfügbare Sequenz von MMP9 (1L6J) verwendet. Diese hatte eine Auflösung von 2,5 Å. Weiterhin muss erwähnt werden, dass die kürzere Variante von aktivem MMP9 verwendet wurde. Diese beginnt mit Aminosäure 107, während die andere Variante bei Aminosäure 94 beginnt. Der Abschnitt von Aminosäure 94 bis 107 schränkt den Zugang zum katalytischen Spalt ein. Alle verfügbaren Kristallstrukturen beginnen ebenfalls mit Aminosäure 107.

Die Modellierung und Berechnungen mit Hilfe des Online tools ClusPro zeigen eine mögliche Interaktion von MMP9 mit Pronephrosin. Dabei ist deutlich zu sehen, wie ein Teil des Propeptids von Nephrosin in den katalytischen Spalt des MMP9 ragt (Abbildung 33). Innerhalb der Sequenz, welche in das aktive Zentrum ragt, befinden sich auch die zwei Aminosäuren Glutamin und Leucin (Abbildung 33, gelb markiert). In Abbildung 33 C ist die räumliche Nähe zum katalytischen Zinkions von MMP9 sichtbar, so dass das polarisierte Wasser die Peptidbindung spalten könnte. Auch die Oberflächenstrukturen der beiden Enzyme passen sehr gut zusammen, so dass eine Fixierung des Nephrosin an MMP9 möglich scheint (Abbildung 33 E und F).

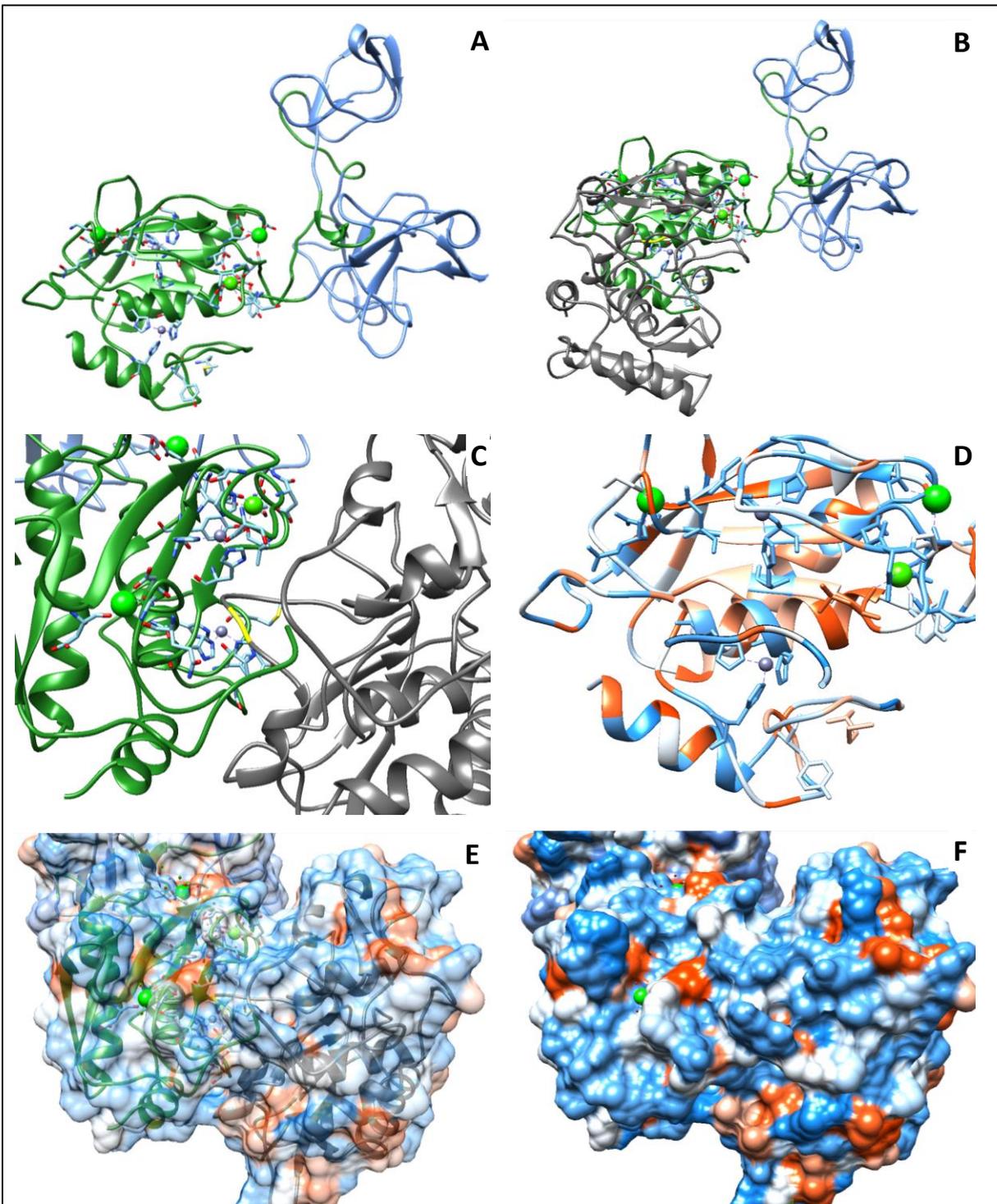


Abbildung 33: Interaktion von MMP9 mit Pronephrosin

In A, B, C und E sind die Enzyme manuell eingefärbt. Grün eingefärbt ist MMP9; Blau: Fibronectin Domänen; Grau: Nephrosin; Gelb innerhalb des Nephrosin sind die Aminosäuren 56GL57 im Propeptid; grüne Kugel: Calciumion; hellblaue Kugel: Zinkion. Abbildungen A, B und D sind auf die Standardorientierung von MMP9 ausgerichtet. Abbildungen C, E und F haben denselben Blickwinkel.

A: Bändermodell von MMP9 (1L6J). Das Propeptid wurde manuell bis AS 107 entfernt B: Bändermodell MMP9 mit Nephrosin nach Modellierung mit ClusPro. C: Bändermodell MMP9 mit Nephrosin. Das Modell ist zur Übersichtlichkeit der Aktivierungsstelle (gelb) gedreht. D: Bändermodell von MMP9 und der Aktivierungsstelle von Nephrosin (AS 54-59). Das Modell ist aufgrund der Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle (1982) gefärbt. Je roter ein Bereich ist, desto hydrophober ist er. Blaue Bereiche sind hydrophil. E, F: Bändermodell von MMP9 und Nephrosin mit ihrer Oberflächenstruktur nach Kyte & Doolittle (1982). In E besitzt die Oberfläche eine Transparenz von 60%.

4 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit ließen die verfügbaren Informationen zur Astacinprotease Nephrosin viele Fragen offen. So war nicht klar zu welchem Zeitpunkt der Ontogenese Nephrosin als Protein im Zebrafisch erstmals detektiert werden kann. Während Nephrosin auf RNA Ebene in nahezu allen Geweben in adulten Karpfen nachgewiesen werden konnte, wurde das Protein Nephrosin nur in den hämatopoetischen Geweben Niere, Kieme und Milz adulter Karpfen gefunden (Hung et al., 1997). Im cypriniden Modellorganismus Zebrafisch fanden Di et al. (2017) überexprimiertes Nephrosin auf Proteinebene infolge einer *E. coli* Infektion. In der vorliegenden Arbeit wurde Nephrosin auf Proteinebene in neutrophilen Granulozyten von Zebrafischembryonen verschiedenen Alters lokalisiert. Funktionelle, enzymkinetische Parameter zu Nephrosin wurden unter Federführung unserer Arbeitsgruppe und meinem Mitwirken, bezüglich der Hemmung des Enzyms durch Fetuin-B erarbeitet (Karmilin et al., 2019). Dies gilt auch für die Aufklärung der Hemmung von Astacinproteinasen durch Säuger Fetuin-B. Dieser Mechanismus konnte durch Analysen von Nephrosin mit Maus-Fetuin-B und Fisch Fetuin bestätigt und durch die Ermittlung der jeweiligen K_i -Werte quantifiziert werden (Cuppari et al., 2019). Nephrosin wurde biochemisch charakterisiert und die kinetischen Parameter der Substrathydrolyse k_{cat} und K_m wurden ermittelt. Die Spaltspezifität wurde erstmals durch eine PICS-Analyse massenspektrometrisch bestimmt. Homologiemodellierungen des Nephrosin/Fisch-Fetuin-Komplexes zeigten die prinzipielle Konservierung dieses Hemmmechanismus innerhalb der Wirbeltiere. Die experimentellen Daten zum Aktivierungsmechanismus des Pronephrosins wurden durch Sequenzalignments und *in silico docking* so weit ergänzt, dass ein möglicher *in vivo* Aktivator des Pronephrosins gefunden werden konnte.

4.1 Nephrosin im Embryo und in adulten Zebrafischen

Hung et al. (1997) entdeckten Nephrosin auf Proteinebene mittels Western Blot in Niere, Kopfniere, Kieme und Milz adulter Karpfen. Mittels Northern Blot konnte Nephrosin mRNA auch in Blutzellen, Gehirn, Herz und Leber detektiert werden. In 70 Stunden alten Embryos von Karpfen und in der Schlüpf-flüssigkeit war Nephrosin nicht nachweisbar. In der Flunder (*Paralichthys olivaceus*) war Expression von Nephrosin mit Hilfe einer reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion erst 35 Tage nach dem Schlüpfen der Larve zu beobachten (Kim et al., 2010). Das Nephrosin des Zebrafisches wird dagegen bereits 24 Stunden nach der Fertilisation in ca. 10% der Zebrafische detektiert (Song et al., 2004). Schon sechs Stunden später ist Nephrosin-RNA in allen Zebrafischen über einen *whole mount in situ hybridization assay* (WISH-assay) nachweisbar (Song et al., 2004). Di et al. (2017) zeigten auch die Expression von GFP (*green fluorescent protein*) unter Kontrolle des Nephrosin Promotors nach Infektion mit *E. coli* bei 48 Stunden alten Embryonen.

Offenbar sind die Unterschiede in der ontogenetischen Entwicklung in den verschiedenen Fischarten sehr ausgeprägt. Um dem Auftreten von Nephrosin bei verschiedenen Spezies bestimmten Funktionen zuordnen zu können, muss dies berücksichtigt werden ebenso die Abhängigkeit der Entwicklungsdauer von der Wassertemperatur. Die Entwicklung vom Ei bis zum Schlüpfen der Larve dauert bei den betrachteten Organismen in der Regel zwischen 48 und 72 Stunden (Cerqueira, 2005; Park et al., 2017). Nach dem Schlüpfen müssen sich die Larven gegen Infektionen verteidigen können, was mit Hilfe des angeborenen Immunsystems erfolgt. An der Bildung der Abwehrstoffe der Immunabwehr sind bei Knochenfischen der Thymus und die Niere, vor allem die Kopfniere beteiligt (Tort et al., 2003). In allen hier aufgeführten Knochenfischen ist die Niere zumindest in Form eines Pronephros zum Zeitpunkt des Schlüpfens ausgebildet (Botham und Manning, 1981; Drummond und Davidson, 2016; Liu et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass in adulten Zebrafischen Nephrosin in der Niere lokalisiert ist (Abbildung 16). Die Vorläuferzellen der Niere sind ab 12 hpf detektierbar (Drummond und Davidson, 2016). Primäre Antikörper gegen rekombinant exprimiertes Nephrosin konnten durch den sekundären Antikörper nach etwa 2 Stunden in der Eihülle frisch befruchteter

Oocyten (Abbildung 12) nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich hierbei jedoch um ein Artefakt bei der Zellpräparation. Abbildung 12 zeigt deutliche strukturelle Schäden an der Eihülle, auf Grund derer Antikörper vermutlich unspezifisch adhierten und trotz wiederholter Waschschriffe nicht eluiert werden konnten. Myeloide Peroxidase, die als Marker für neutrophilen Granulozyten dient (Nauseef et al., 1988) konnte in 2 Stunden alten Embryos nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dies stimmt mit Literaturdaten überein, wonach die Expression der neutrophilen Granulozyten spezifischen myeloiden Peroxidase erst ab 18 Stunden nach Befruchtung zu beobachten ist (Bennett et al., 2001; Harvie und Huttenlocher, 2015). Dies bestätigt die Vermutung des falsch positiven Nephrosinsignals im Chorion (Eihülle).

24 Stunden nach Befruchtung ist ausgehend von der mesodermalen Zellmasse, aus der die spätere Niere entsteht, eine starke Nephrosinexpression in der Kopfreion des Embryos festzustellen (Abbildung 13, blaue Umrandung). Wie bereits erwähnt detektierten sowohl Song et al. (2004) als auch Di et al. (2017) Nephrosin RNA etwa 18 Stunden nach Befruchtung und zwar im anterioren Bereich des Embryos, und in der Region des Notochords (Di et al., 2017; Song et al., 2004). Die von mir detektierten Signale auf Proteinebene liegen caudal des Notochords und im Bereich der anterioren Schlupfdrüse (*hatching gland*). In der Negativkontrolle finden sich Signale ausschließlich im Dottersack (Anhang, Abbildung 35), nicht jedoch im eigentlichen Embryo. Meine Beobachtung der Nephrosinexpression auf Proteinebene in 24 Stunden alten Embryonen steht somit in Einklang mit dem RNA-Nachweis nach 18 Stunden (Di et al., 2017; Song et al., 2004). Auch nach 48 Stunden ist der Nephrosinnachweis manifest (Abbildung 14 A und B), was ebenfalls mit den Genexpressionsdaten übereinstimmt (Di et al., 2017; Song et al., 2004). Demgegenüber bleibt festzuhalten, dass im Karpfen auch nach 70 Stunden noch kein Nephrosin gefunden werden konnte (Hung et al., 1997). Dagegen ist im Zebrafisch nach 72 Stunden das Enzym Nephrosin im Bereich des nun bereits morphologisch nachweisbaren Pronephros vorhanden (Abbildung 15). Hervorzuheben ist hierbei die Koloaliation von Nephrosin und myeloider Peroxidase innerhalb der gleichen Zellen, bei welchen es sich somit eindeutig um Granulozyten handelt. Die Auflösung der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt jedoch sehr deutlich, dass die intrazelluläre Überlagerung der Signale nicht perfekt ist (Abbildung 16). Hier brachte die konfokale Mikroskopie an Paraffinschnitten adulter Nieren Aufschluss (Abbildung 17). Demnach sind Nephrosin und myeloide Peroxidase zwar in der gleichen Zelle vorhanden, jedoch nicht in den gleichen Kompartimenten. Nephrosin ist eher im peripheren Raum nahe am Plasmalemma lokalisiert, während die myeloide Peroxidase in der Zelle verteilt vorkommt. Neutrophile Granulozyten enthalten verschiedene Granulatypen, die zeitlich gestaffelt erzeugt und abgegeben werden (Häger et al., 2010). Während die myeloide Peroxidase als eines der ersten Proteine in den neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (siehe Abbildung 4; Häger et al., 2010), erfolgt ihre Freisetzung erst auf einen Stimulus hin durch regulierte Sekretion (Bentwood und Henson, 1980). Auf Grund der Lokalisation ist es wahrscheinlich, dass beide Nephrosin und myeloide Peroxidase in unterschiedlichen Granula vorliegen. Da Nephrosin vornehmlich im peripheren Raum nahe der Membran lokalisiert ist, ist zu vermuten, dass es zu den früh sezernierten Proteinen gehört. Neutrophile Granulozyten werden chemotaktisch, also von einem chemischen Gradienten, an den Ort der Infektion geleitet (Havixbeck und Barreda, 2015). Um an den Ort der Infektion zu gelangen, müssen die neutrophilen Granulozyten die Blutbahn verlassen und die Basalmembran und das aus vielen verschiedenen Proteinen (Collagene, Proteoglycane, Fibronectin, usw.) bestehende Bindegewebe (extrazelluläre Matrix) durchqueren (Birk und Brückner, 2011; Xu und Mosher, 2011). Diese Proteine müssen proteolytisch gespalten werden. Die Proteolyse von Säuger Fibronectin und Säuger Gelatine (denaturiertes Kollagen) durch Nephrosin konnte bereits gezeigt werden (Hung et al., 1997). Dies würde für eine Funktion in der Remodellierung der extrazellulären Matrix sprechen, um den neutrophilen Granulozyten den Weg zum Pathogen zu ermöglichen. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung im Nephrosin *knockout* Zebrafisch von Di et al. (2017). Dort konnte eine erhöhte Zahl an Neutrophilen am Ort der Infektion beobachtet werden. Die Motilität der Neutrophilen ist durch die Abwesenheit von

Nephrosin also offenbar nicht beeinträchtigt. Der *knockout* hatte allerdings auch eine erhöhte Sterblichkeit der Fische nach Infektion mit *E. coli* zur Folge. Es scheint so, als sei die antibakterielle Immunantwort geschwächt. Di et al. (2017) vermuteten eine Rolle von Nephrosin in der Aktivierung immunmodulatorischer Faktoren vom Typ der BMPs (*bone morphogenetic proteins*). BMPs sind TGF β -ähnliche Wachstumsfaktoren, die im Zuge der Immunantwort unter anderem durch spezifische, limitierte Proteolyse direkt oder indirekt aktiviert oder deaktiviert werden. TGF- β 1 wird beispielsweise von regulatorischen T-Lymphozyten produziert und dämpft die Immunantwort, indem es u.a. die Proliferation der Leukozyten hemmen kann (Shull et al., 1992). Sollte TGF- β oder ein anderer immunsuppressiver Botenstoff durch Nephrosin prozessiert werden, würde ein Fehlen von Nephrosin eine verlängerte oder stärkere Immunantwort zur Folge haben, was sich auch in einer gesteigerten Zahl an neutrophilen Granulozyten widerspiegeln kann. Dies würde auch die Notwendigkeit einer strengen Regulation erklären, wie sie durch Fetuin verursacht wird. Nephrosin müsste einer engen Kontrolle unterworfen werden, um ein Überschießen der Immunantwort, z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies, welche von der myeloide Peroxidase in den neutrophilen Granulozyten erzeugt werden, zu verhindern (Scribano et al., 2014).

4.2 Substratspezifität und Spaltspezifität des Nephrosins

Ein natürliches Substrat der Proteinase Nephrosin ist bislang nicht bekannt. Somit fehlen auch Informationen über die primäre Spaltspezifität. Für die meisten Astacine konnte eine Präferenz für eine Hydrolyse der Peptidbindung vor zwei negativ geladenen Aminosäuren ermittelt werden. Dies entspricht den Positionen P1' und P2' in der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967); auch ein Prolinrest in der P2'-Position ist bei vielen Astacinen bevorzugt. (Becker-Pauly et al., 2011).

In dieser Situation hatten die Erstbeschreiber des Nephrosins verschiedene Peptide getestet und waren mit dieser willkürlichen Vorgehensweise auf Substanz P (*Hauptschnittstelle: RPKPQQF*FGLM) gestoßen, ein Neuropeptid aus Nervenzellen und weißen Blutzellen, sowie auf das vasoaktive Peptid Bradykinin (*Hauptschnittstelle: KRPPGF*SPFR) (Hung et al., 1997). Kürzere Peptide wurden nicht gespalten. Es wurde allerdings auch nur eine geringe Anzahl an Substraten getestet. Mit diesen Hintergrundinformationen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene fluorogene Substrate getestet, die für andere Astacine (vor allem Astacin) in den Fluoreszenzmessungen gut funktioniert haben. Jedoch konnte mit keinem dieser Substrate eine Hydrolyse durch Nephrosin beobachtet werden (Tabelle 33). Ein Peptid mit der Aminosäuresequenz APAKFFRLK erwies sich schließlich als brauchbar. Nephrosin spaltet dieses Peptid wahrscheinlich zwischen den beiden Phenylalaninresten. Dieser Schnitt war von Hung et al. bei der Hydrolyse von Substanz P durch Nephrosin ebenfalls beobachtet worden (Hung et al., 1997).

Diese Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit als Grundgerüst zur Herstellung eines FRET-Substrates benutzt. Mit diesem Substrat MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂ konnte die proteolytische Aktivität von Nephrosin enzymkinetisch quantifiziert werden. Die ermittelte Michaelis-Konstante von 22 μ M für Nephrosin und dem verwendeten synthetischen Substrat liegt in einem typischen Bereich für synthetische Astacin-Substrate (Stöcker et al., 1990). Die berechnete Wechselzahl $k_{cat} = 0,356 \text{ s}^{-1}$ und die Spezifitätskonstante $k_{cat}/K_m = 1,62 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zeigen, dass es sich bei dem fluorogenen Peptidderivat MOAc-APAKFFRLK(Dnp)-NH₂ um ein für Routinemessungen brauchbares Substrat handelt. Es muss allerdings erwähnt werden, dass ein Substratumsatz mit Substratkonzentrationen über 180 μ M, wegen der starken intermolekularen Fluoreszenzlöschung (Quenching) mit diesem Substrat nicht möglich ist. Das Michael-Menten Diagramm zeigt den typischen Hyperbelverlauf, ohne Hinweis auf Substrathemmung.

Aufschluss über die Spaltspezifität des Nephrosins brachte eine massenspektrometrische Analyse von Schnittstellen in einem *E. coli* Proteom mit der Methode PICS (*proteomic identification of protease cleavage site specificity*). Die von mir ermittelte Schnittspezifität von Nephrosin (Abbildung 21) zeigt eine Präferenz des Enzyms. Viele Astacine weisen eine diazide, also zwei aufeinanderfolgende saure

Aminosäuren, Schnittstelle in P1' und P2' auf (Becker-Pauly et al., 2011). Astacin bevorzugt in P1' kleine ungeladene Aminosäuren. Nephrosin passt in keines der beiden Muster. In P1' werden eher sperrige polare Aminosäuren bevorzugt. In den Bindungstaschen in P1, P2 und P3 werden unpolare sperrige Aminosäuren als Bindungspartner bevorzugt. Mit vielen Astacinen hat Nephrosin eine Präferenz für Prolin in P2' gemeinsam (Stöcker et al., 1990; Becker-Pauly et al., 2011).

Diese ermittelten Daten lassen anhand der erstellten Nephrosinmodelle gut interpretieren (siehe 3.15). Die Bindungstasche P1' von Astacin wird durch die Aminosäuren Cystein 64, Histidin 92, Threonin 89 und Prolin 176 gebildet (Grams et al., 1996). Bis auf das Prolin 176 sind die Aminosäurereste im Nephrosin konserviert. (Abbildung 30 B). Das Prolin 176 liegt in einer Helix und zeigt Richtung aktives Zentrum. Im Nephrosin ist diese kurze Helix nicht vorhanden. Der Prolinrest des Astacins, welcher an dieser Stelle den Zugang voluminöser Reste ausschließt, liefert den Grund für die P1'-Spezifität des Flusskrebs-Astacins für kleine aliphatische Reste. Im Nephrosin sind mit Glycin 179 und Alanin 181 eher kleine Aminosäuren in dieser S1'-Region und die Seitenkette des zwischen diesen Aminosäuren liegende Glutamat 180 weist weg vom aktiven Zentrum. Dies erlaubt es großen und sperrigen Aminosäuren in der S1'-Tasche zu binden. Auch der Unterschied in der S2' Bindetasche kann anhand des Modells und der PICS Analyse gut erklärt werden. Statt einem Tyrosin (Y101) und einem Aspartat (D131) findet man in Nephrosin ein Histidin (H108) und ein Glutamin (Q138) (Abbildung 30 C). So wird die Bindetasche des Nephrosins eher positiv geladen während sie in Astacin eher negativ geladen ist. Außerdem sind die Positionen der geladenen (H108) und der unpolaren (Q138) Aminosäure in Nephrosin getauscht. Dadurch entsteht eine größere Lücke, sodass sperrige Aminosäuren wie Phenylalanin gebunden werden können. Auch in der S3 Bindetasche wird durch den Austausch von Tryptophan (W65) zu Tyrosin (Y72) etwas Platz geschaffen. Der Wechsel von einer unpolaren Aminosäure zu einer polaren Aminosäure belegt die Bindespezifität für unpolare größere Aminosäuren und S3. Somit kann die Spaltspezifität über die Modellstruktur bestätigt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei einer PICS Analyse um eine Untersuchung an nicht nativen Proteinen handelt. Das ermittelte Schnittmuster für Nephrosin kann mittels der MEROPS-Datenbank (Rawlings et al., 2018) nur bedingt anderen Proteasen zugeordnet werden. Das Schnittmuster diverser Cathepsine (Schnittmuster Cathepsin K; 16.02.2021) stimmt am ehesten mit dem von Nephrosin überein. Jedoch zeigen Cathepsine laut der MEROPS (Rawlings et al., 2018) eine eher breite Spezifität, so dass ein Vergleich zwischen Nephrosin und Cathepsin K wenig zielführend ist. Eindeutig ist jedoch, dass die Schnittspezifität von Nephrosin nicht mit anderen Astacinen übereinstimmt und darauf hindeutet, dass das immer noch unbekannt natürliche Zielsubstrat möglicherweise hochselektiv von Nephrosin gespalten wird.

4.3 Inhibition des Nephrosin durch Fetuin

Nach der Entdeckung der Astacine (Pfleiderer et al., 1967; Stöcker et al., 1988) dauerte es fast 50 Jahre bis ein spezifischer endogener Inhibitor für eine Astacinprotease entdeckt werden konnte (Tsai et al., 2004). Wie sich zeigte, gehört dieser Inhibitor zu den Typ III Cystatinen. Diese finden sich ebenfalls bei vielen Säugetieren in hoher Konzentration im Blut und erregten somit die Aufmerksamkeit als Inhibitoren anderer Astacinproteasen. Zunächst konnte Fetuin-A als Inhibitor für menschliche Meprine identifiziert werden (Hedrich et al., 2010). Da Fetuin-A und Fetuin-B ähnliche physikochemische Eigenschaften haben und Fetuin-B noch nicht charakterisiert war, enthielt damals gekaufte Fetuin-A Probe auch Fetuin-B. Erst später wurde bekannt, dass Fetuin-B grundsätzlich andere Eigenschaften und physiologische Funktionen hat als Fetuin-A. Nicht Fetuin-A ist ein Inhibitor für verschiedene Astacine, sondern ausschließlich Fetuin-B (Karmilin et al., 2019). Die inhibitorische Konstante K_i von Maus Fetuin-B mit Ovastacin beträgt $0,046 \pm 0,016$ nM (Cuppari et al., 2019). Des Weiteren wurde die inhibitorischen Konstanten von Maus Fetuin-B mit *Astacus astacus* Astacin ($0,1 \pm 0,003$ nM), humanen Meprin α ($33 \pm 2,4$ nM) und humanen Meprin β ($0,081 \pm 0,015$ nM) bestimmt (Cuppari et al., 2019; Karmilin et al., 2019). In der Dissertation von Katharina Meyer (Meyer, 2016) wurden die

inhibitorischen Konstanten von humanen Meprin α ($115 \pm 8,3$ nM) und humanen Meprin β (556 ± 69 nM) mit Fisch-Fetuin bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal die inhibitorischen Konstanten sowohl von Maus-Fetuin-B als auch von Fisch-Fetuin mit Nephrosin bestimmt werden. Es konnte eine inhibitorische Konstante K_i von Maus Fetuin-B und Nephrosin von $0,0186 \pm 0,00336$ nM ermittelt werden (Abbildung 24). Berücksichtigt man den Fehler der Messung, stimmt der ermittelte Wert in etwa mit dem für Ovastacin ($0,046 \pm 0,016$ nM) überein (Cuppari et al., 2019). Das Maus Fetuin-B zeigt eine deutlich höhere Affinität zu Nephrosin und Ovastacin als zu den Meprinen, deren K_i mindestens 40-fach höher ist als für Nephrosin. Die geringere Affinität der Meprine und von Astacin zu Fetuin kann auch in den Ergebnissen der Messungen mit dem Fisch-Fetuin beobachtet werden. Mit einem K_i -Wert von $3,64 \pm 0,587$ nM des Fisch-Fetuiins mit Nephrosin (Abbildung 26) zeigt das Fisch-Fetuin gegenüber Meprin β (556 ± 69 nM) sogar eine um das 150-fach bessere Inhibition (Meyer, 2016). Die Ermittlung der inhibitorischen Konstante von Fisch-Fetuin mit Ovastacin ergab einen K_i -Wert von $38,9 \pm 0,57$ nM (Abbildung 26). Somit ist die Inhibition im Vergleich zu Nephrosin um ca. den Faktor 10 geringer, jedoch dreimal bzw. vierzehnmal stärker als gegenüber Meprin α und Meprin β . Das Ergebnis der Messung von Nephrosin mit der Fisch-Fetuin-Mutante D139A zeigt einen extremen Verlust der inhibitorischen Kapazität (Abbildung 27) So ist die 200-fache Menge der Fisch-Fetuin-Mutante D139A nötig, um Nephrosin in vergleichbarer Weise auf 70%-Restaktivität zu hemmen. Dies zeigt deutlich die essentielle Bedeutung des Asp139-enthaltenden *war-heads*, CPDC wie es für Maus Fetuin-B ebenfalls gezeigt wurde (Cuppari et al., 2019).

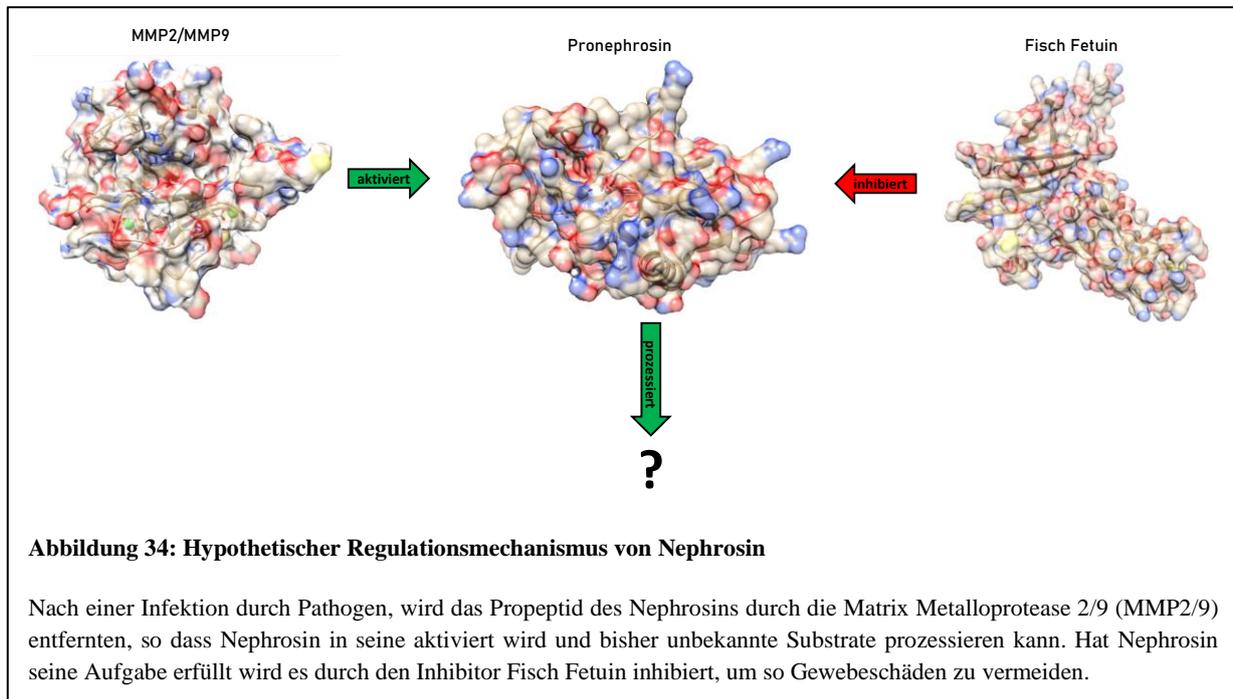
Auf Grund der ermittelten Daten kann darauf geschlossen werden, dass der für Fetuin-B und Astacin-proteinasen entschlüsselte Hemmmechanismus ebenfalls im Fisch-Fetuin-A wirksam ist. Damit gleicht Fisch-Fetuin zumindest funktionell dem Fetuin-B der Säugetiere. Allerdings ist die Hemmwirkung des auf die zwei Cystatindomänen und den *war-head* reduzierte Fisch-Fetuin deutlich schwächer.

Ein Homologiemodell des Fisch-Fetuiins auf der Basis der Fetuin-B Struktur zeigt mögliche Ursachen. Die essentielle Aminosäure des Fetuin-B für die Inhibition, Asp156, ist mit einer identischen Lage und Orientierung im Fisch-Fetuin vorhanden (Abbildung 28 a). Auch die restlichen Aminosäuren der Linkerregion sind stark konserviert. Eine weitere wichtige Region für die Inhibition ist die Haarnadelschleife I der zweiten cystatinähnlichen Domäne. Diese interagiert durch Trp200 und Val201 mit der S2' bzw. S3' Bindungstasche des Astacins (Abbildung 28 c). Das Fisch-Fetuin besitzt statt Val201 ein Methionin (M186). Während Valin mit seinen zwei Methylgruppen der Seitenkette über kurze Distanz hydrophobe Wechselwirkungen mit Gly63, Cys64, Gly83 und Cys84 im Astacin eingehen kann (Cuppari et al., 2019), fehlt dem Methionin des Fisch-Fetuiins dieser *short-range* Kontakt. Zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen ist eine minimale Distanz von $3,52 \text{ \AA}$ nötig. (Siódmiak et al., 2017) Dies könnte eine Erklärung für die schlechte Inhibition des Astacin durch Fisch Fetuin mit einem K_i -Wert von $3,49 \mu\text{M}$ sein (Meyer, 2016). Auch in den umliegenden Bereichen sind hydrophobe Wechselwirkungen im modellierten Fisch-Fetuin/Astacin-Komplex aufgrund größerer Distanzen vermutlich schwächer ausgeprägt als im Maus-Fetuin-B/Astacin-Komplex. Für die physiologische Regulation wird somit eine höhere Konzentration an Fetuin-B benötigt

Ein weiterer Umstand, der berücksichtigt werden muss, ist die komplett fehlende C-terminale Region des Fisch-Fetuiins. Nach Tsai et al. (2004) wird die lange Form des endogenen Fisch-Fetuiins (Fetuin-L) durch bislang unbekannt Proteasen in den Kiemen der Niere und der Kopfnieren des Karpfens prozessiert und erlangt erst dadurch seine inhibitorische Wirkung. Interessanterweise sind das diejenigen Organe, in welchen Nephrosin exprimiert wird (Tsai et al., 2004). Das in unserem Labor rekombinant hergestellte Maus-Fetuin-B ist auch als full-length Protein inhibitorisch wirksam (Karmilin et al., 2019; Cuppari et al., 2019). Allerdings werden auch Säuger Fetuine *in vivo* proteolytisch im Bereich der

intrinsisch ungeordneten C-terminalen Domäne prozessiert. Dies wurde für menschliches Fetuin-A von Jahnen-Dechent et al. (1994) gezeigt und dies gilt auch für Fetuin-B. Wird rekombinantes Maus Fetuin-B mit einem Überschuss an Astacin inkubiert, lässt sich ebenfalls ein Schnitt innerhalb des Maus Fetuin-B durch Astacin beobachten (Cuppari et al., 2019). Allerdings hat dies nur geringen Einfluss auf die Hemmwirkung. Im Fall des humanen Fetuins-B wird die C-terminale Domäne sogar fast vollständig abgebaut. Trotzdem bleibt das Protein zumindest was die Hemmwirkung gegen Astacinproteasen betrifft voll funktionsfähig (Guevara et al., 2020). Bei der in unserem Labor von Katharina Meyer vorgenommenen bakteriellen Expression des rekombinanten Karpfen-Fetuins wurden daher lediglich die beiden Cystatindomänen mit dem dazwischenliegenden CPDC-*war head* kloniert (Meyer, 2016). Zu Zeitpunkt dieser Klonierung waren die Struktur und der sich daraus ergebende Hemmmechanismus jedoch noch völlig unbekannt. Die geringere Aktivität der Fisch-Fetuins gegen Säuger-Astacine lassen sich unter Umständen durch ein strukturelles Detail erklären, das erst im Rahmen der Stukturaufklärung deutlich wurde. Denn auch im proteolytisch prozessierten Maus-Fetuin-B ist ein Teil der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 304 bis 310) für die Stabilisation der Domänen zueinander wichtig. Dieses Stützelement ist in dem verwendeten Fisch Fetuin Konstrukt durch eine klonierungsbedingte inserierte Sequenz sowie durch eine achtfachen His-*tag* ersetzt, was ebenfalls einen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften des Fisch-Fetuins haben könnte. Die nahe am C-Terminus aller Fetuine lokalisierte Disulfidbrücke, die die C-terminale Domäne mit der ersten cystatinähnlichen verknüpft (s. Abbildung 8), fehlt im rekombinanten Konstrukt des Fisch-Fetuins ebenfalls. Da Disulfidbrücken einen wesentlichen Bestandteil zur Stabilität und von Proteinen beitragen können, könnte ein Fehlen einer derartigen Klammer destabilisierend wirken. Allerdings spricht die starke Hemmung des Nephrosin durch das rekombinante Fisch-Fetuin für eine *in vivo* nahe Faltung.

4.4 Regulation von Nephrosin (hypothetisches Modell)



Astacine werden als Zymogene exprimiert (Guevara et al., 2010) und müssen proteolytisch durch Abspaltung eines aminoterminalen Propeptids aktiviert werden. Im Falle von Astacin übernimmt die initiale Aktivierung Trypsin, ehe Astacin dann die restlichen Aminosäuren bis zum reifen N-Terminus prozessiert (Guevara et al., 2010; Yiallourous et al., 2002). Auch wenn Trypsin in der Lage ist, Zebrafisch Nephrosin zu aktivieren, sollte dies bei den anderen Nephrosinen nicht möglich sein, da bei diesen eine positiv geladene Aminosäure im Bereich des reifen N-Terminus fehlt (s. Abbildung 31). Das Sequenzalignment zeigte eine konservierte Sequenz (PR/TGL/FQ) etwa fünf Aminosäurereste vor dem reifen N-Terminus. Mit Hilfe einer Datenbanksuche in MEROPS (Rawlings et al., 2018) wurden MMP2 und MMP9 als potentielle Aktivatoren identifiziert. Die Spaltspezifität beider Enzyme passt sehr gut zu der Aktivierungssequenz des Nephrosins. Auch das Homologiemodell der Oberflächenstrukturen der betreffenden Enzyme lässt diese MMPs als Aktivatoren möglich erscheinen. Die Seitenkette von Glycin 56 und Leucin 57 des Nephrosins begünstigen diese Interaktion indem sie in den katalytischen Spalt der MMPs (2&9) eintauchen. Beide MMPs sind im Rahmen der angeborenen inflammatorischen Immunantwort in vielfältigen Funktionen beteiligt (De Jager und Hoefler, 2017; Pedersen et al., 2015).

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und anderer Immunzellen zum Ort einer Infektion (Rauta et al., 2012; Tort et al., 2003) bedingt die Degranulierung und Freisetzung von Pronephrosin, welches *in situ* aktiviert wird. Die extrem stringente Hemmung des aktiven Nephrosins durch das ständig präsente Fetuin deutet darauf hin, dass die proteolytische Wirkung des Enzyms sehr spezifisch sein muss und dass es von großer Bedeutung ist, diese Wirkung zeitlich und räumlich sehr eng zu begrenzen.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass es sich bei Nephrosin um ein Protein handelt, welches im Zebrafisch bereits ab 24 Stunden nach Befruchtung in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden kann. Für diese Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Nephrosin verwendet, welcher potentiell alle Bereiche des Nephrosin erkennen kann. Eine Aktivierung mit Trypsin und eine autoprotoleolytische Aktivierung von Nephrosin konnte bereits gezeigt (Olf, 2012). Der logische Folgeschritt ist

die Überprüfung des Aktivierungsortes und Zeitpunktes. Um diese Frage zu lösen, kann ein mit GFP N-terminal markiertes Nephrosin verwendet werden. GFP kann ohne weitere Behandlung durch Licht der Wellenlänge 395 nm angeregt werden. Das so angeregte GFP emittiert Licht einer Wellenlänge von 509 nm, welches detektiert werden kann. So ist es auch möglich live *in vivo* Aufnahmen durchzuführen, so lange die Zebrafisch Embryonen noch durchsichtig sind. Allerdings muss im zweiten Schritt eine Detektion des Nephrosin durch immunhistologische Behandlung durchgeführt werden. Da GFP weiterhin am Propeptid angeregt werden kann und dieses wahrscheinlich nicht unmittelbar nach Abspaltung abgebaut wird, ist diese zweite Detektion notwendig. Durch eine Überlagerung der Signale kann dann ermittelt werden, wo sich aktives und inaktives Nephrosin befindet. Mit Hilfe dieser Ergebnisse können auch Rückschlüsse auf den Aktivierungszeitpunkt, also ob Nephrosin schon in den neutrophilen Granulozyten oder erst außerhalb aktiviert wird, gezogen werden. Alternativ könnte zusätzlich zum GFP ein weiterer fluoreszenter Tag, wie z.B. DsRed, C-terminal an das Nephrosin hinzugefügt werden. Werden nur noch rote Fluoreszenzen detektiert, ist das Nephrosin aktiviert worden. Allerdings muss beachtet werden, dass fluoreszente Proteine in etwa so groß sind wie Nephrosin selbst, was die Funktionalität von Nephrosin einschränken könnte. Auch das Anfügen kurzer Peptidsequenzen, wie der in dieser Arbeit verwendete Strep-Tag oder auch Histidin-Tag, sollte in Betracht gezogen werden. In diesem Fall ist eine Analyse des Aktivitätszustandes von Nephrosin nur durch immunhistologische Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit erfolgt sind, möglich. Alle Varianten könnten über das CRISPR/CAS System (Jinek et al., 2012) in den Zebrafisch eingeführt werden. Für die Aktivierung könnte es auch nötig sein, das Immunsystem der Zebrafische anzuregen, damit Nephrosin aus den Granulozyten ausgeschleust wird. Dies könnte durch ein Zufügen von leichten Wunden oder auch eine Infektion durch pathogene erfolgen.

Sollte die Aktivierung außerhalb der neutrophilen Granulozyten erfolgen könnte MMP2, wie in der Modellierung (Abbildung 32) dargestellt als Aktivator in Frage kommen. Diese Hypothese sollte durch eine Kolokalisation mittels immunhistologischer Untersuchungen und hochauflösender Mikroskopie überprüft werden. Besonders würde sich die *high resolution microscopy* eignen, mit der einzelne Antikörpermoleküle nachgewiesen werden können (Schneckenburger et al., 2020). Auch die FRET-Mikroskopie, bei der eine Fluoreszenz nur bei einer Interaktion von Molekülen detektiert werden kann. Da MMP9, welches in den neutrophilen Granula des Zebrafisches vorkommt, ein ähnliches Schnittmuster zu MMP2 aufweist, muss MMP9 ebenfalls als Aktivator überprüft werden. Weiterhin sollte das Granula, welches Nephrosin enthält, genauer charakterisiert werden. Durch die Zusammensetzung der Proteine kann auch so eine Aussage über den Zeitpunkt der Ausschleusung getroffen werden. Ein Vorgehen wie von Kjeldsen et al. (1994) beschrieben scheint dabei vielversprechend. Die neutrophilen Granulozyten von Menschen wurden aus dem Blut gereinigt, lysiert und die verschiedenen Granula über einen Precoll® Gradienten voneinander getrennt. Sind die Granula voneinander getrennt, kann über den Western Blot bestimmt werden in welcher Fraktion das Nephrosin zu finden ist. Mit dieser Information werden weitere Isolationen dieser Granula durchgeführt, so dass eine massenspektrometrische Analyse möglich ist. Eine Alternative zum Zebrafisch könnte der Karpfen darstellen, da dieser deutlich mehr Blut enthält als der Zebrafisch. Allerdings ist der Karpfen nicht komplett durch sequenziert, so dass eine Zurodnung von verschiedenen Peptiden nicht möglich sein könnte.

Um auch die physiologische Relevanz von Nephrosin zu ermitteln, sollten TAILS (*Terminal amine isotopic labeling of substrates*)-Analysen durchgeführt werden (Kleifeld et al., 2011). Mit Hilfe dieser Analysemethode ist es möglich in einem *in vivo* nahen Versuchsaufbau physiologisch relevante Substrate zu ermitteln. Dies kann sowohl mit Hilfe von Zellen aus einer Zellkultur erfolgen, aber auch mit Geweben, die entsprechend aufgearbeitet werden (Kleifeld et al., 2011). Anders als in der PICS-Analyse behalten Proteine ihre natürliche Konformation. So wäre es interessant zu sehen, ob TAILS-Analysen verschiedener Gewebe, Substrate für Nephrosin aufdecken können. Ein Nephrosin Knockout Zebrafisch

und eine dauerhaft inaktive Variante des Nephrosin wären dafür sehr hilfreich, um eine gute Kontrollprobe zu erhalten. Weiterhin könnte auch mit Hilfe einer TAILS Analyse überprüft werden, ob Nephrosin direkt mit Pathogenen wie z.B. *E. coli* interagieren kann. Dies würde bedeuten, dass ein Protein der Zellmembran als Substrat dient und proteolytisch gespalten wird. Dazu könnte man eine Nephrosinlösung in verschiedenen Konzentrationen mit einer *E. coli* Suspension inkubieren und das Wachstum kontrollieren. Eine direkte Interaktion müsste ein vermindertes Wachstum zur Folge haben. Auch hier könnte mit Hilfe von TAILS die Identifikation des Zielproteins geschehen, in dem man die massenspektrometrische Analyse vor und nach Inkubation mit Nephrosin vergleicht. Eine weitere Möglichkeit ist ein mechanisches/chemisches Aufbrechen der Bakterienzellen ohne eine Degradation der Proteine. Im Anschluss werden die Zellmembranen über eine Dichtezentrifugation von den übrigen Proteinen entfernt, so dass eine Inkubation der Zellmembranen mit Nephrosin möglich ist. Sollte Nephrosin jedoch eine Interaktion mit einem intrazellulären oder sekretierten Protein des Pathogen eingehen, so müssten auch diese Proteine auch mit Hilfe von TAILS analysiert werden.

Sind physiologische Substrate und die Aktivierung von Nephrosin geklärt, sollte auch der Inhibitionsmechanismus und die inhibitorischen Parameter mit einem vollständigen Fisch Fetuin, also mit vollständigem C-terminalem Bereich untersucht werden. Die kinetischen Parameter können wie in dieser Arbeit beschrieben ermittelt werden. Der Mechanismus sollte mit Hilfe der Kristallographie aufgeklärt werden, wie es mit dem Maus Fetuin-B auch erfolgt ist (Cuppari et al., 2019).

Sind die funktionellen Parameter aufgeklärt, muss sich mit der Frage beschäftigt werden, warum ein zu Nephrosin homologes Protein nicht vorhanden ist. Für diese Zwecke sollten umfangreiche phylogenetische Analysen mit bioinformatischen Methoden durchgeführt werden. Eine relative einfache Analyse über vorhandene Sequenzalignments der Proteinsequenzen mit anschließender Stammbaumberechnung führte hier nicht zum Ziel. Dies lieferte nur die schon beschriebene Verwandtschaft zu den *hatching* Enzymen. Aus diesem Grunde müssten die Untersuchungen auf DNA Vergleiche und Mutationen ausgeweitet werden. Diese Analysen könnte eine weitere Hilfe sein, wie sich das Immunsystem entwickelt hat. Vielleicht handelt es sich bei Nephrosin um ein speziell an die Lebensweise der cypriniden Fische angepasstes Enzym, welches bei der weiteren Evolution nicht benötigt wurde. Auch diese könnte mit Hilfe der bioinformatischen Tests aufgezeigt werden.

Mit Hilfe dieser weiteren Analysen könnte der Einfluss von Metalloproteasen auf die Regulation des Immunsystems noch einmal verdeutlicht werden. So könnte eine künstliche Hemmung von Astacinen bei Autoimmunerkrankungen helfen, sollte die Funktion von Nephrosin durch ein anderes Astacin übernommen werden. Dies ist bis jetzt jedoch noch nicht beschrieben worden. Auch die Relevanz der MMPs müsste bei positiven Ergebnissen der vorgeschlagenen Versuche sicherlich überdacht werden. Aktuell sind MMP2 und MMP9 als Kollagenasen beschrieben, welche bei der Remodulierung der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle übernehmen. Diese Funktion könnte um die Aktivierung von immunogenen Enzymen erweitert werden, so dass diese MMPs auch ein Ziel für Therapien von Krankheiten sein können.

5 Literaturverzeichnis

- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 99, 179–199. <https://doi.org/10.1042/bss0700179>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anwar, M.A., Basith, S., Choi, S., 2013. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp. Mol. Med.* 45, e11–14. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.28>
- Arolas, J.L., Broder, C., Jefferson, T., Guevara, T., Sterchi, E.E., Bode, W., Stöcker, W., Becker-Pauly, C., Gomis-Rüth, F.X., 2012. Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16131–16136. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211076109>
- Banerjee, S., Jin, G., Bradley, S.G., Matters, G.L., Gailey, R.D., Crisman, J.M., Bond, J.S., 2011. Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 300, 273–283. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00504.2009>
- Barrett, A.J., 1981. Cystatin, the Egg White Inhibitor of Cysteine Proteinases. *Methods Enzymol.* 80, 771–778. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)80059-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)80059-6)
- Bateman, A., 2019. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47, D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Becker-Pauly, C., Barré, O., Schilling, O., Auf Dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schütte, A., Kappelhoff, R., Stöcker, W., Overall, C.M., 2011. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol. Cell. Proteomics* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009233>
- Bennett, C.M., Kanki, J.P., Rhodes, J., Liu, T.X., Paw, B.H., Kieran, M.W., Langenau, D.M., Delahaye-Brown, A., Zon, L.I., Fleming, M.D., Thomas Look, A., 2001. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* 98, 643–651. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.643>
- Bentwood, B.J., Henson, P.M., 1980. The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J. Immunol.* 124, 855 LP – 862.
- Berry, R., Jowitt, T.A., Ferrand, J., Roessle, M., Grossmann, J.G., Canty-Laird, E.G., Kammerer, R.A., Kadler, K.E., Baldock, C., 2009. Role of dimerization and substrate exclusion in the regulation of bone morphogenetic protein-1 and mammalian tolloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8561–8566. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812178106>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Biasin, V., Wygrecka, M., Marsh, L.M., Becker-Pauly, C., Brcic, L., Ghanim, B., Klepetko, W., Olschewski, A., Kwapiszewska, G., 2017. Meprin β contributes to collagen deposition in lung fibrosis. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep39969>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>

- Birk, D.E., Brückner, P., 2011. Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly, in: *The Extracellular Matrix: An Overview*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 77–115. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16555-9_3
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Huber, R., Zwillig, R., Stöcker, W., 1992. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* 358, 164–167. <https://doi.org/10.1038/358164a0>
- Bond, J.S., 2019. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *J. Biol. Chem.* 294, 1643–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004156>
- Bond, J.S., Beynon, R.J., 1995. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 4, 1247–1261. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040701>
- Botham, J.W., Manning, M.J., 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* 19, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb05844.x>
- Boutet, I., Long Ky, C.L., Bonhomme, F., 2006. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.04.011>
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brew, K., Dinakarpanian, D., Nagase, H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477, 267–283. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00279-4)
- Broder, C., Becker-Pauly, C., 2013. The metalloproteases meprin α and meprin β : Unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem. J.* 450, 253–264. <https://doi.org/10.1042/BJ20121751>
- Burkart, A.D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., Dean, J., 2012. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J. Cell Biol.* 197, 37–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112094>
- Cantor, C. R., Schimmel, P.R., 1980. *Biophysical Chemistry: Part II ' Techniques for the study of Biological Structure and Function ' Plasticity of Muscle Biophysical Chemistry: Part III ' The Behaviour of Biological Macromolecules*. W. H. Free. Co. 9, 1981.
- Cerqueira, V.R., 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 459–465. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300016>
- Colaert, N., Helsen, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., 2009. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat. Methods* 6, 786–787. <https://doi.org/10.1038/nmeth1109-786>
- Connors, S.A., Trout, J., Ekker, M., Mullins, M.C., 1999. The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo. *Development* 126, 3119–3130.
- Cuppari, A., Körschgen, H., Fahrenkamp, D., Schmitz, C., Guevara, T., Karmilin, K., Kuske, M., Olf, M., Dietzel, E., Yiallouris, I., De Sanctis, D., Goulas, T., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., Stoecker, W., Jovine, L., Xavier Gomis-Rüth, F., 2019. Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition. *IUCrJ* 6. <https://doi.org/10.1107/S2052252519001568>

- Dall, E., Fegg, J.C., Briza, P., Brandstetter, H., 2015. Structure and mechanism of an aspartimide-dependent peptide ligase in human legumain. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 2917–2921. <https://doi.org/10.1002/anie.201409135>
- Darawiroj, D., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., 2008. Immune-related gene expression profiling of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) kidney cells stimulated with ConA and LPS using microarray analysis. *Fish Shellfish Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.07.011>
- De Jager, S.C.A., Hoefler, I.E., 2017. Beyond the matrix: MMP2 as critical regulator of inflammation-mediated vascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 113, 1705–1707. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx202>
- de Jong, N.W.M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., 2019. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *Gram-Positive Pathog.* 618–639. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch39>
- Denecke, B., Gräber, S., Schäfer, C., Heiss, A., Wöltje, M., Jahnen-Dechent, W., 2003. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem. J.* 376, 135–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20030676>
- Di, Q., Lin, Q., Huang, Z., Chi, Y., Chen, X., Zhang, W., Zhang, Y., 2017. Zebrafish nephrosin helps host defence against *Escherichia coli* infection. *Open Biol.* 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.170040>
- Diep, C.Q., Ma, D., Deo, R.C., Holm, T.M., Naylor, R.W., Arora, N., Wingert, R.A., Bollig, F., Djordjevic, G., Lichman, B., Zhu, H., Ikenaga, T., Ono, F., Englert, C., Cowan, C.A., Hukriede, N.A., Handin, R.I., Davidson, A.J., 2011. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature* 470, 95–100. <https://doi.org/10.1038/nature09669>
- Diep, C.Q., Peng, Z., Ukah, T.K., Kelly, P.M., Daigle, R. V., Davidson, A.J., 2015. Development of the zebrafish mesonephros. *genesis* 53, 257–269. <https://doi.org/10.1002/dvg.22846>
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schäfer, C., Ensslen, S., Denecke, B., Rösing, B., Neulen, J., Veitinger, T., Spehr, M., Tropartz, T., Tolba, R., Renné, T., Egert, A., Schorle, H., Gottenbusch, Y., Hildebrand, A., Yiallourous, I., Stöcker, W., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., 2013. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Dev. Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.001>
- Drummond, I.A., Davidson, A.J., 2016. Zebrafish kidney development, Third Edit. ed, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.041>
- Drummond, I.A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Stemple, D.L., Zwartkruis, F., Rangini, Z., Driever, W., Fishman, M.C., 1998. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 125, 4655–4667. <https://doi.org/10.5167/uzh-216>
- Elmonem, M., Berlingerio, S., van den Heuvel, L., de Witte, P., Lowe, M., Levtschenko, E., 2018. Genetic Renal Diseases: The Emerging Role of Zebrafish Models. *Cells* 7, 130. <https://doi.org/10.3390/cells7090130>
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Fischer, E., 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* 27, 2985–2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>
- Floehr, J., Dietzel, E., Schmitz, C., Chappell, A., Jahnen-Dechent, W., 2017. Down-regulation of the

- liver-derived plasma protein fetuin-B mediates reversible female infertility. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 34–44. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw068>
- Garcia-Ferrer, I., Marrero, A., Gomis-Rüth, F.X., Goulas, T., 2017. α 2-Macroglobulins: Structure and Function, in: Harris, J.R., Marles-Wright, J. (Eds.), *Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 149–183. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_6
- Gasteiger, G., D’osualdo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M., Hartl, D., 2017. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J. Innate Immun.* 9, 111–125. <https://doi.org/10.1159/000453397>
- Gerhard, G.S., Kauffman, E.J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J.L., Kasales, C.J., Demidenko, E., Cheng, K.C., 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 37, 1055–1068. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00088-8)
- Gerlach, G.F., Wingert, R.A., 2013. Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 559–585. <https://doi.org/10.1002/wdev.92>
- Gomis-Rüth, F.X., Botelho, T.O., Bode, W., 2012a. A standard orientation for metallopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.014>
- Gomis-Rüth, F.X., Trillo-Muyo, S., Stöcker, W., 2012b. Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biol. Chem.* 393, 1027–1041. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0149>
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., Stocker, W., 1996. Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* 3, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nsb0896-671>
- Guevara, T., Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Bissdorf, S., Stöcker, W., Gomis-Rüth, F.X., 2010. Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase. *J. Biol. Chem.* 285, 13958–13965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097436>
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Guggino, W.B., Oberleithner, H., Giebisch, G., 1988. The amphibian diluting segment. *Am. J. Physiol. Physiol.* 254, F615–F627. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1988.254.5.F615>
- Häger, M., Cowland, J.B., Borregaard, N., 2010. Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* 268, 25–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x>
- Harvie, E.A., Huttenlocher, A., 2015. Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* 98, 523–537. <https://doi.org/10.1189/jlb.4mr1114-524r>
- Havixbeck, J.J., Barreda, D.R., 2015. Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology (Basel)*. 4, 715–734. <https://doi.org/10.3390/biology4040715>
- Hedrich, J., Lottaz, D., Meyer, K., Yiallourous, I., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W., Becker-Pauly, C., 2010. Fetuin-a and cystatin C are endogenous inhibitors of human Meprip metalloproteases.

- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gildertorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Suce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., De Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hung, C.H., Huang, H.R., Huang, C.J., Huang, F.L., Chang, G.D., 1997. Purification and cloning of carp nephrosin, a secreted zinc endopeptidase of the astacin family. *J. Biol. Chem.* 272, 13772–13778. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13772>
- Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Ketteler, M., 2011. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 108, 1494–1509. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234260>
- Jahnen-Dechent, W., Schinke, T., Trindl, A., Müller-Esterl, W., Sablitzky, F., Kaiser, S., Blessing, M., 1997. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J. Biol. Chem.* 272, 31496–31503. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31496>
- Jencks, W.P., 1985. A Primer for the Bema Hapothle. An Empirical Approach to the Characterization of Changing Transition-State Structures. *Chem. Rev.* 85, 511–527. <https://doi.org/10.1021/cr00070a001>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-.). 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kang, D., Ghoo, Y.S., Suh, M., Kang, C., 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [5]. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23, 1511–1512. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.11.1511>
- Karmilin, K., Schmitz, C., Kuske, M., Körschgen, H., Olf, M., Meyer, K., Hildebrand, A., Felten, M., Fridrich, S., Yiallourous, I., Becker-Pauly, C., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., Stöcker, W., 2019. Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37024-5>

- Keiffer, T.R., Bond, J.S., 2014. Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J. Biol. Chem.* 289, 7580–7588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546309>
- Kim, Y.O., Park, E.M., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, W.J., Noh, J.K., Lee, S.J., Kim, K.K., 2010. Identification of differentially expressed genes in the developmental stages from olive flounder *paralichthys olivaceus* using an annealing control primer system. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. <https://doi.org/10.1080/19768351003770871>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kimmel, C.B., Law, R.D., 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Dev. Biol.* 108, 86–93. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90011-9)
- Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Lollike, K., Nielsen, M.H., Borregaard, N., 1994. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 83, 1640–1649. <https://doi.org/10.1182/blood.v83.6.1640.bloodjournal8361640>
- Kleifeld, O., Doucet, A., Prudova, A., auf dem Keller, U., Gioia, M., Kizhakkedathu, J.N., Overall, C.M., 2011. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat. Protoc.* 6, 1578–1611. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.382>
- Knowles, J.R., 1987. Tinkering with enzymes: What are we learning? *Science (80-)*. 236, 1252–1258. <https://doi.org/10.1126/science.3296192>
- Körschgen, H., Kuske, M., Karmilin, K., Yiallourous, I., Balbach, M., Floehr, J., Wachten, D., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W., 2017. Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilization hardening of the zona pellucida. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 607–616. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax040>
- Koshland, D.E., 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 98–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.2.98>
- Kozakov, D., Hall, D.R., Xia, B., Porter, K.A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., Vajda, S., 2017. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nat. Protoc.* 12, 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Kyhse-Andersen, J., 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203–209. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(84\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0165-022X(84)90040-X)
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 9–28. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4)
- Le Guyader, D., Redd, M.J., Colucci-Guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., rie Briolat, V., Mordelet, E., Zapata, A., Shinomiya, H., Herbomel, P., 2008. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. <https://doi.org/10.1182/2007>
- Lee, C., 2009. Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front. Biosci.* Volume, 2911. <https://doi.org/10.2741/3422>

- Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M.O., Ward, A.C., Layton, J.E., 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087–3096. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.10.3087>
- Liu, Y., Zhang, S., Jiang, G., Yang, D., Lian, J., Yang, Y., 2004. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.10.001>
- López-Otín, C., Bond, J.S., 2008. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283, 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- Mac Sweeney, A., Gil-Parrado, S., Vinzenz, D., Bernardi, A., Hein, A., Bodendorf, U., Erbel, P., Logel, C., Gerhartz, B., 2008. Structural Basis for the Substrate Specificity of Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-like Metalloproteases. *J. Mol. Biol.* 384, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.029>
- Matthews, M., Varga, Z.M., 2012. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J.* 53, 192–204. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192>
- Meyer, M., 2016. Interaktion von Astacin - Metalloproteasen mit dem Plasmaprotein Fetuin - A aus *Cyprinus carpio*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Mócsai, A., Walzog, B., Lowell, C.A., 2015. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc. Res.* 107, 373–385. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv159>
- Möhrlen, F., Baus, S., Gruber, A., Rackwitz, H.R., Schnölzer, M., Vogt, G., Zwillig, R., 2001. Activation of pro-astacin: Immunological and model peptide studies on the processing of immature astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus*. *Eur. J. Biochem.* 268, 2540–2546. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02136.x>
- Morrison, J.F., 1969. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *BBA - Enzymol.* 185, 269–286. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90420-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90420-3)
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.F., Handin, R.I., Herbomel, P., 2006. Tracing Hematopoietic Precursor Migration to Successive Hematopoietic Organs during Zebrafish Development. *Immunity* 25, 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.015>
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21491>
- Nauseef, W.M., Olsson, I., Arnljots, K., 1988. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase — A marker for myeloid cell differentiation. *Eur. J. Haematol.* 40, 97–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1988.tb00805.x>
- Olf, M., 2012. Expression von Nephrosin aus *Danio rerio*. Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M., Salier, J.P., 2000. Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochem. J.* 350, 589–597. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3500589>
- Orban, L., Sreenivasan, R., Olsson, P.E., 2009. Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>
- Palić, D., Andreasen, C.B., Ostojić, J., Tell, R.M., Roth, J.A., 2007. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary

- granules. *J. Immunol. Methods* 319, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.11.003>
- Parichy, D.M., 2003. Pigment patterns: fish in stripes and spots. *Curr. Biol.* 13, 947–950. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00880-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00880-7)
- Park, J.M., Mun, S.J., Yim, H.S., Han, K.H., 2017. Egg Development and Larvae and Juveniles Morphology of Carp, *Cyprinus carpio* in Korean. *Dev. Reprod.* 21, 287–295. <https://doi.org/10.12717/dr.2017.21.3.287>
- Pedersen, K.O., 1944. Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. *Nature* 154, 575–575. <https://doi.org/10.1038/154575a0>
- Pedersen, M.E., Vuong, T.T., Rønning, S.B., Kolset, S.O., 2015. Matrix metalloproteinases in fish biology and matrix turnover. *Matrix Biol.* 44–46, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.009>
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pillay, J., Den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., De Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., Koenderman, L., 2010. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
- Porche, D.J., 1996. Treatment review saquinavir. *J. Assoc. Nurses AIDS Care* 7, 61–64. [https://doi.org/10.1016/S1055-3290\(96\)80059-8](https://doi.org/10.1016/S1055-3290(96)80059-8)
- Prudova, A., Auf Dem Keller, U., Butler, G.S., Overall, C.M., 2010. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 894–911. <https://doi.org/10.1074/mcp.M000050-MCP201>
- Quesada, V., Sánchez, L.M., Álvarez, J., López-Otín, C., 2004. Identification and Characterization of Human and Mouse Ovastacin. *J. Biol. Chem.* 279, 26627–26634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401588200>
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 2013. Introduction: Metalloproteinases and Their Clans, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00077-6>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R.D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Rothlin, C. V., Carrera-Silva, E.A., Bosurgi, L., Ghosh, S., 2015. TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 355–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112103>
- Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., 1986. Human low-M(r) kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem. J.* 234, 429–434. <https://doi.org/10.1042/bj2340429>
- Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 27, 157–162. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X)

- Schilling, O., Huesgen, P.F., Barré, O., Auf Dem Keller, U., Overall, C.M., 2011. Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 6, 111–120. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.178>
- Schilling, O., Overall, C.M., 2008. Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat. Biotechnol.* 26, 685–694. <https://doi.org/10.1038/nbt1408>
- Schneckenburger, H., Richter, V., Gelleri, M., Ritz, S., Vaz Pandolfo, R., Schock, F., Hase, V.J., Birk, U., Cremer, C., 2020. High-resolution deep view microscopy of cells and tissues. *Quantum Electron.* 50, 2–8. <https://doi.org/10.1070/QEL17204>
- Scribano, M. de la P., Baez, M. del C., Florencia, B., Tarán, M.D., Franco, S., Balceda, A.G., Moya, M., 2014. Effects of Atorvastatin on Oxidative Stress Biomarkers and Mitochondrial Morphofunctionality in Hyperfibrinogenemia-Induced Atherogenesis. *Adv. Med.* 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/947258>
- Seely, J.C., 2017. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: Juvenile animal relevancy. *J. Toxicol. Pathol.* 30, 125–133. <https://doi.org/10.1293/tox.2017-0006>
- Sessa, A.K., White, R., Houvras, Y., Burke, C., Pugach, E., Baker, B., Gilbert, R., Thomas Look, A., Zon, L.I., 2008. The effect of a depth gradient on the mating behavior, oviposition site preference, and embryo production in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 5, 335–339. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0535>
- Shibata, Y., Iwamatsu, T., Suzuki, N., Young, G., Naruse, K., Nagahama, Y., Yoshikuni, M., 2012. An oocyte-specific astacin family protease, alveolin, is released from cortical granules to trigger egg envelope hardening during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*). *Dev. Biol.* 372, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.09.016>
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T., 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0>
- Singh, S.K., Sethi, S., Aravamudhan, S., Krüger, M., Grabher, C., 2013. Proteome Mapping of Adult Zebrafish Marrow Neutrophils Reveals Partial Cross Species Conservation to Human Peripheral Neutrophils. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073998>
- Siódmiak, J., Bełdowski, P., Augé, W.K., Ledziński, D., Śmigiel, S., Gadomski, A., 2017. Molecular dynamic analysis of hyaluronic acid and phospholipid interaction in tribological surgical adjuvant design for osteoarthritis. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22091436>
- Song, H.D., Sun, X.J., Deng, M., Zhang, G.W., Zhou, Y., Wu, X.Y., Sheng, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Jiang, C.L., Fan, H.Y., Zon, L.I., Kanki, J.P., Ting, X.L., Look, A.T., Chen, Z., 2004. Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16240–16245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407241101>
- Spence, R., Ashton, R., Smith, C., 2007. Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour* 144, 953–966. <https://doi.org/10.1163/156853907781492726>
- Starkey, P.M., Barrett, A.J., 1982. Evolution of alpha 2-macroglobulin. The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human alpha 2-macroglobulin. *Biochem. J.* 205, 91–

95. <https://doi.org/10.1042/bj2050091>
- Stöcker, W., Bode, W., 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 383–390. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80101-4](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80101-4)
- Stöcker, W., Karmilin, K., Hildebrand, A., Westphal, H., Yiallourous, I., Weiskirchen, R., Dietzel, E., Floehr, J., Jahnen-Dechent, W., 2014. Mammalian gamete fusion depends on the inhibition of ovastacin by fetuin-B. *Biol. Chem.* 395, 1195–1199. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0189>
- Stöcker, W., Wolz, R.L., Zwilling, R., Strydom, D.J., Auld, D.S., 1988. Astacus protease, a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 27, 5026–5032. <https://doi.org/10.1021/bi00414a012>
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, R., Haas, J., Schwede, T., 2020. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 36, 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Tang, J., Bond, J.S., 1998. Maturation of secreted meprin α during biosynthesis: Role of the furin site and identification of the COOH-terminal amino acids of the mouse kidney metalloprotease subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 192–200. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0453>
- Tavares, B., Santos Lopes, S., 2013. The importance of Zebrafish in biomedical research. *Acta Med. Port.* 26, 583–92. <https://doi.org/10.20344/amp.4628>
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunologia* 22, 277–286.
- Tsai, P.-L., Chen, C.-H., Huang, C.-J., Chou, C.-M., Chang, G.-D., 2004. Purification and Cloning of an Endogenous Protein Inhibitor of Carp Nephrosin, an Astacin Metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 279, 11146–11155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310423200>
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 56, 486–503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Vadon-Le Goff, S., Hulmes, D.J.S., Moali, C., 2015. BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol.* 44–46, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.006>
- Warga, R.M., Kimmel, C.B., 1990. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108, 569–580.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., De Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wingert, R.A., Davidson, A.J., 2008. The zebrafish pronephros: A model to study nephron segmentation. *Kidney Int.* 73, 1120–1127. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.37>
- Xu, J., Mosher, D., 2011. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins, in: *The Extracellular Matrix: An Overview*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 41–75. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16555-9_2
- Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Schilling, O., Wegmann, F., Helms, M.W., Auge, A., Brachtendorf, G., Berkhoff, E.G., Beermann, B., Hinz, H.J., König, S., Peter-Katalinic, J., Stöcker, W., 2002. Activation mechanism of pro-astacin: Role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. *J. Mol. Biol.* 324, 237–246.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01102-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01102-6)

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>

Zhang, F., Wen, Y., Guo, X., 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1–7. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>

Zhang, R., Ludwig, A., Zhang, C., Tong, C., Li, G., Tang, Y., Peng, Z., Zhao, K., 2015. Local adaptation of *Gymnocypris przewalskii* (Cyprinidae) on the Tibetan Plateau. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/srep09780>

6 Anhang

6.1 Weitere Daten

6.1.1 Zusätzliche Aufnahme mit Kontrolle 24 Stunden alter Embryo

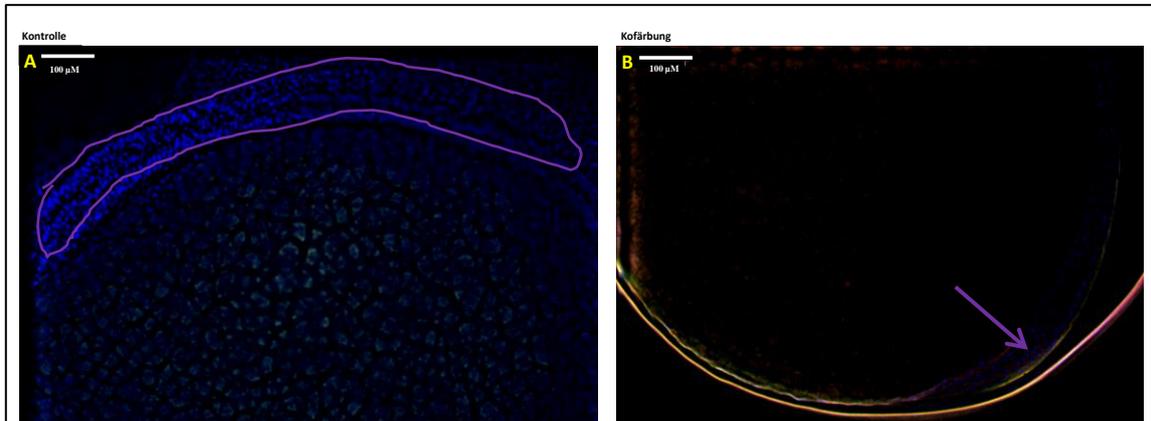


Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis von Nephrosin in 24 Stunden in alten Embryos

Fluoreszenzaufnahme nach Dekonvolution 24 h nach Fertilisation. Grüne Signale zeigen Alexa 488 Antikörper (Nephrosin), während die roten Signale den Alexa 568 Antikörper (myeloide Peroxidase) anzeigen. A zeigt die Negativkontrolle mit abgesättigtem Nephrosin Antikörper. B zeigt die Kofärbung mit Antikörper gegen Nephrosin (grün) und myeloide Peroxidase (rot). violett markiert ist der Bereich des Embryos.

In Abbildung 35 A sind schwache Signale des abgesättigten Antikörpers im Bereich des Dottersacks zu sehen, nicht jedoch im Bereich des Embryos (violette Markierung). Bei der Kofärbung gegen Nephrosin und myeloide Peroxidase können keine Signale in Bereich des Dottersacks detektiert werden, jedoch schwach im Bereich des Embryos (violetter Pfeil). Es kann also auch hier Nephrosin nachgewiesen werden.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Å	Ångström
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BC	Band Zelle
BMP1	<i>bone morphogenic protein 1</i>
BSA	<i>bovines serum albumin</i>
BTP	<i>Bmp1/tolloid-like</i>
c	Konzentration
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
ConA	Concanavalin A
Crisp3	Cysteinreiches sekretorisches Protein 3
CRISPR/CAS	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated</i>
C-terminal	Carboxyterminal
CTR	C-terminaler Bereich
CUB	<i>Complement, sea Urchin EGF, BMP1</i>
CY	Cystatinähnliche Domäne
Da	<i>Dalton</i>
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylinol
DE	<i>distal early</i>
dest	Destilliert
DL	<i>distal late</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dpf	<i>days past fertilization</i>
min	Minute

Abkürzung	Bedeutung
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
H2Odest	Destilliertes Wasser
hCAP18	Cathelicidin antimikrobielles Peptid
HCE	<i>high choreolytic enzyme</i>
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hpf	<i>Hours past fertilization</i>
HRG	Histidinreiches Glykoprotein
IgG	Immunglobulin G
k	<i>Kilo</i>
kcat	Wechselzahl
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Ki	inhibitorische Konstante
km	Michaelis-Menten-Konstante
Km/kcat	Spezifitätskonstante
l	Liter
LAST	<i>Limulus Astacin</i>
LCA	<i>Lens Culinaris Agglutinin</i>
LF	Lactoferrin
LNK	Linker
M	Molar (mol/l)
MAM	<i>mepirin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu</i>
MC	Myelozyt
WT	Wildtyp

Abkürzung	Bedeutung
ml	Milliliter
MM	Metamyelozyt
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloprotease
MPO	Myeloide Peroxidase
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NGAL	gelatinase-assoziiertes Lipocalin
nm	Nanometer
npsn	Nephrosin (Gen)
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAGE	<i>Poly acrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit Tween
PCT	<i>proximal convoluted tubulus</i>
pH	Wasserstoffionenkonzentration (logarithmisch)
PICS	<i>proteomic identification of protease cleavage site specificity</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PST	<i>proximal straight tubulus</i>
RT	Raumtemperatur
SC	segmentierter (reifer) neutrophiler Granulozyt
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	TBS mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMPS	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TII	<i>Tolloid/tolloid like</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

Abkürzung	Bedeutung
x g	Erdbeschleunigung
ZHE	<i>zebrafish hatching enzyme</i>
ZP2	<i>zona Pellucida Protein 2</i>
ε	Extinktionskoeffizient
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TAILS	<i>Terminal amine isotopic labeling of substrates</i>

6.3 Parameter der Dekonvolution

6.3.1 Allgemeine Parameter der Dekonvolution

Tabelle 15: Zusammenfassung der Parameter der Dekonvolution 5-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
X pixel size (μm)	All	0.815000
Y pixel size (μm)	All	0.815000
Z step size (μm)	All	0.988000
Time interval (s)	All	1.000000
Microscope type	All	widefield
Numerical aperture	All	0.150
Sample refractive index	All	1.490
Lens refractive index	All	1.000
Excitation wavelength (nm)	0	546.000
Emission wavelength (nm)	0	565.000
Excitation wavelength (nm)	1	480.000
Emission wavelength (nm)	1	505.000
Excitation wavelength (nm)	2	360.000
Emission wavelength (nm)	2	400.000
Excitation wavelength (nm)	3	600.000
Emission wavelength (nm)	3	600.000
Point Spread Function	All	Theoretical
Number of iterations	All	50
Quality stop criterion	All	10
Background estimation	All	Auto
Autocrop	All	No
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood

Tabelle 16: Zusammenfassung der Parameter der Deconvolution 20-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Value
X pixel size (µm)	All	0.509000
Y pixel size (µm)	All	0.509000
Z step size (µm)	All	1.087000
Time interval (s)	All	1.000000
Microscope type	All	widefield
Numerical aperture	All	0.700
Sample refractive index	All	1.490
Lens refractive index	All	1.000
Excitation wavelength (nm)	0	546.000
Emission wavelength (nm)	0	565.000
Excitation wavelength (nm)	1	480.000
Emission wavelength (nm)	1	505.000
Excitation wavelength (nm)	2	360.000
Emission wavelength (nm)	2	400.000
Excitation wavelength (nm)	3	600.000
Emission wavelength (nm)	3	600.000
Point Spread Function	All	Theoretical
Number of iterations	All	100
Quality stop criterion	All	0.01
Background estimation	All	auto
Autocrop	All	no
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood

Tabelle 17: Zusammenfassung der Parameter der Deconvolution 40-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
X pixel size (µm)	All	0.162000
Y pixel size (µm)	All	0.162000
Z step size (µm)	All	0.543000
Time interval (s)	All	1.000000
Microscope type	0	widefield
Numerical aperture	0	0.750
Sample refractive index	0	1.490
Lens refractive index	0	1.000
Excitation wavelength (nm)	0	546.000
Emission wavelength (nm)	0	565.000
Excitation wavelength (nm)	1	480.000
Emission wavelength (nm)	1	505.000
Excitation wavelength (nm)	2	360.000
Emission wavelength (nm)	2	400.000
Excitation wavelength (nm)	3	600.000
Emission wavelength (nm)	3	600.000
Point Spread Function	All	theoretical
Number of iterations	All	50
Quality stop criterion	All	10
Background estimation	All	auto
Autocrop	All	no
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood

Tabelle 18: Zusammenfassung der Parameter der Deconvolution 63-fache Vergrößerung

Parameter	Ka- nal	Wert
X pixel size (µm)	All	0.162000
Y pixel size (µm)	All	0.162000
Z step size (µm)	All	0.543000
Time interval (s)	All	1.000000
Microscope type	0	widefield
Numerical aperture	0	1.320
Sample refractive index	0	1.490
Lens refractive index	0	1.530
Excitation wavelength (nm)	0	546.000
Emission wavelength (nm)	0	565.000
Excitation wavelength (nm)	1	480.000
Emission wavelength (nm)	1	505.000
Excitation wavelength (nm)	2	360.000
Emission wavelength (nm)	2	400.000
Excitation wavelength (nm)	3	600.000
Emission wavelength (nm)	3	600.000
Point Spread Function	All	theoretical
Number of iterations	All	100
Quality stop criterion	All	0.01
Background estimation	All	auto
Autocrop	All	no
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood

Tabelle 19: Zusammenfassung der Parameter der Deconvolution 100-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
X pixel size (µm)	All	0.102000
Y pixel size (µm)	All	0.102000
Z step size (µm)	All	0.279207
Time interval (s)	All	0.000000
Microscope type	0	widefield
Numerical aperture	0	1.400
Sample refractive index	0	1.490
Lens refractive index	0	1.530
Excitation wavelength (nm)	0	480.000
Emission wavelength (nm)	0	505.000
Excitation wavelength (nm)	1	546.000
Emission wavelength (nm)	1	565.000
Excitation wavelength (nm)	2	360.000
Emission wavelength (nm)	2	400.000
Excitation wavelength (nm)	3	600.000
Emission wavelength (nm)	3	600.000
Point Spread Function	All	theoretical
Number of iterations	All	40
Quality stop criterion	All	0.05
Background estimation	All	auto
Autocrop	All	no
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood

6.3.2 Signal to noise ratios der einzelnen immunhistologischen Aufnahmen

6.3.2.1 2 Stunden alte Embryos

Tabelle 20: Verwendete Signal/Noise ratio 2 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	30
Signal/Noise ratio	1	30
Signal/Noise ratio	2	20
Signal/Noise ratio	3	42

Tabelle 21: Verwendete Signal/Noise ratio 2 h alter Embryos 40-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	60
Signal/Noise ratio	1	50
Signal/Noise ratio	2	40
Signal/Noise ratio	3	51

6.3.2.2 24 Stunden alte Embryos

Tabelle 22: Verwendete Signal/Noise ratio 24 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	15
Signal/Noise ratio	1	25
Signal/Noise ratio	2	30
Signal/Noise ratio	3	32

Tabelle 23: Verwendete Signal/Noise ratio 24 h alter Embryos 40-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	35
Signal/Noise ratio	1	30
Signal/Noise ratio	2	33
Signal/Noise ratio	3	0

6.3.2.3 48 Stunden alte Embryos

Tabelle 24: Verwendete Signal/Noise ratio 48 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	50
Signal/Noise ratio	1	40
Signal/Noise ratio	2	25
Signal/Noise ratio	3	30

Tabelle 25: Verwendete Signal/Noise ratio 48 h alter Embryos 63-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	70
Signal/Noise ratio	1	60
Signal/Noise ratio	2	90
Signal/Noise ratio	3	30

6.3.2.4 72 Stunden alte Embryos

Tabelle 26: Verwendete Signal/Noise ratio 72 h alter Embryos 5-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	45
Signal/Noise ratio	1	45
Signal/Noise ratio	2	10
Signal/Noise ratio	3	15

Tabelle 27: Verwendete Signal/Noise ratio 72 h alter Embryos 63-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	75
Signal/Noise ratio	1	75
Signal/Noise ratio	2	10
Signal/Noise ratio	3	15

6.3.3 Parameter der Bildbearbeitung zu Abbildung 16

Tabelle 28: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 20-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	60
Signal/Noise ratio	1	41
Signal/Noise ratio	2	30
Signal/Noise ratio	3	30

Tabelle 29: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 63-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	64
Signal/Noise ratio	1	88
Signal/Noise ratio	2	30
Signal/Noise ratio	3	30

Tabelle 30: Verwendete Signal/Noise ratio adulter Zebrafische 100-fache Vergrößerung

Parameter	Kanal	Wert
Signal/Noise ratio	0	71
Signal/Noise ratio	1	75
Signal/Noise ratio	2	30
Signal/Noise ratio	3	65

6.3.4 Parameter der Bildbearbeitung zu Abbildung 17

Tabelle 31: Zusammenfassung der Parameter zur Restauration der Abbildung 17

Parameter	Kanal	Wert
Deconvolution algorithm	All	Classic maximum likelihood
Number of iterations	All	50
Quality stop criterion	All	10
Background estimation	All	auto
Signal/Noise ratio	0	16
Signal/Noise ratio	1	12
Signal/Noise ratio	2	9
Autocrop	All	no

Tabelle 32: Zusammenfassung der Parameter der Deconvolution der Abbildung 17

Parameter	Kanal	Wert
X pixel size (μm)	All	0.059000
Y pixel size (μm)	All	0.059000
Z step size (μm)	All	0.126000
Time interval (s)	All	1.000000
Microscope type	All	confocal
Numerical aperture	All	1.400
Sample refractive index	All	1.458
Lens refractive index	All	1.518
Pinhole size (nm)	All	285.000
Excitation wavelength (nm)	0	561.000
Emission wavelength (nm)	0	638.000
Excitation wavelength (nm)	1	488.000
Emission wavelength (nm)	1	525.000
Pinhole size (nm)	2	285.000

Parameter	Kanal	Wert
Excitation wavelength (nm)	2	405.000
Emission wavelength (nm)	2	442.000
Point Spread Function	All	theoretical

6.4 Getestete fluorogene Substrate

Tabelle 33: Mit Nephrosin getestete fluorogene Substrate

Substrat	Sequenz
BMP1	MCA-YVADAPK(DuP)-OH
ASTA 0	DNS-PKRAPWV-OH
ASTA 1	DNS-PKRAPWER-OH
ASTA 2	DNS-PKFAPWR-OH
ASTA 3	DNS-PKFKPWR-OH
ASTA 4	DNS-PKFEPWR-OH
MMP 2	Mca-PLA-Nva-Dap(DnP)-AR-NH ₂
Substrat 4	MOCAc-GSPAFLAK(Dnp)-D-R-NH ₂
Substrat 2	Boc-FSR-MCA
Substrat 3	Dns-PKRAPWV-OH
Novartis	Ac-RE-Edans-DRLVGDDPYK-DabcyI

6.5 Ramachandran Plots der erstellten Modelle

6.5.1 Qualität Modell Pronephrosin an Proastacin (3lq0)

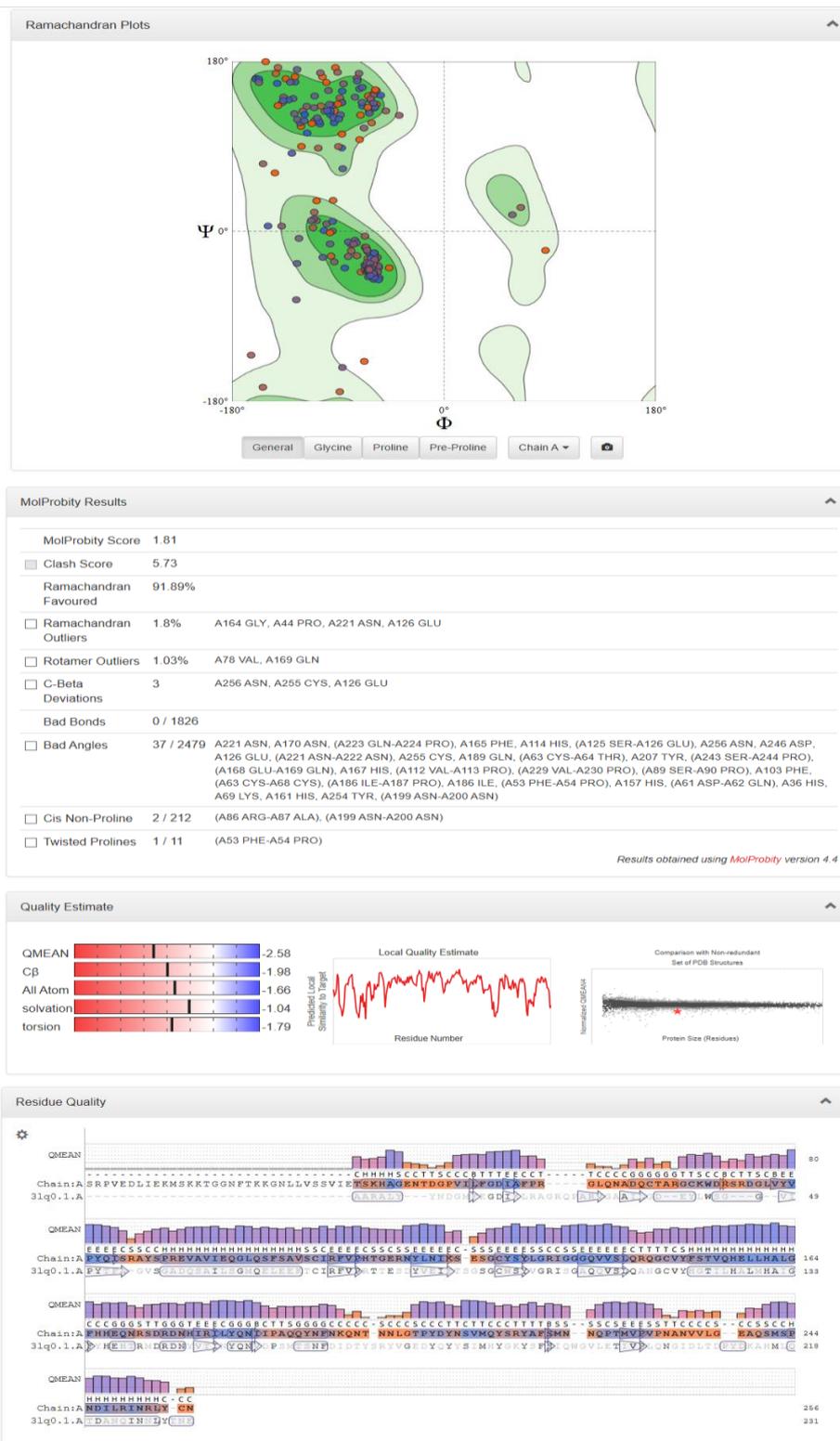


Abbildung 36: Qualitätskontrolle des Modells von Pronephrosin an Proastacin (3lq0)

Die Abbildung zeigt den Ramachandran-Plot der Aminosäuren, sowie andere Parameter des Nephrosin Modells zur Qualitätsprüfung einschließlich eines Alignments der Proteine

6.5.2 Qualität Modell Nephrosin an Astacin (6HT9)

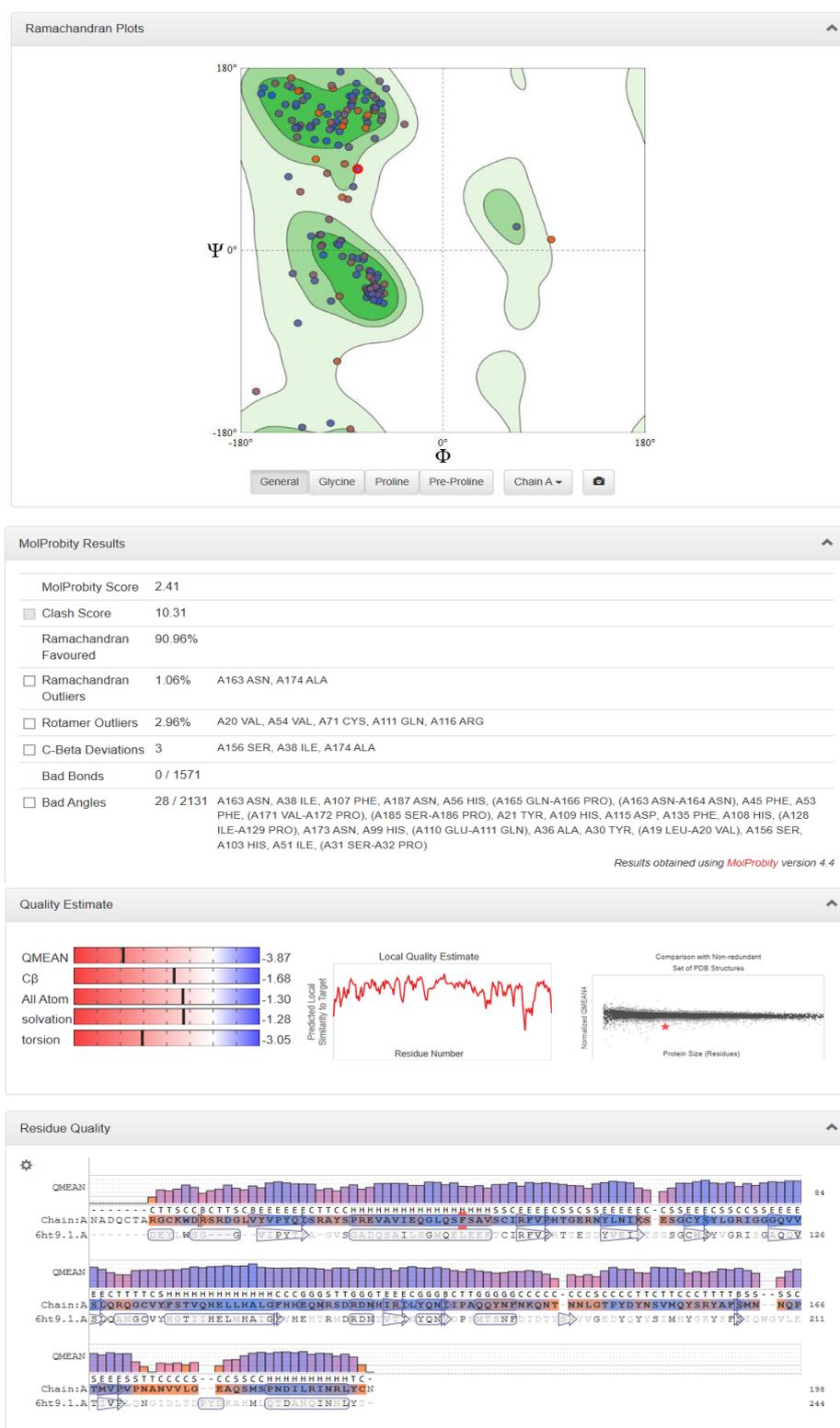


Abbildung 37: Qualitätskontrolle des Modells von Nephrosin an Astacin (6HT9)

Die Abbildung zeigt den Ramachandran-Plot der Aminosäuren, sowie andere Parameter des Nephrosin Modells zur Qualitätsprüfung einschließlich eines Alignments der Proteine

6.5.3 Qualität Modell Nephrosin an HCE (3VTG)

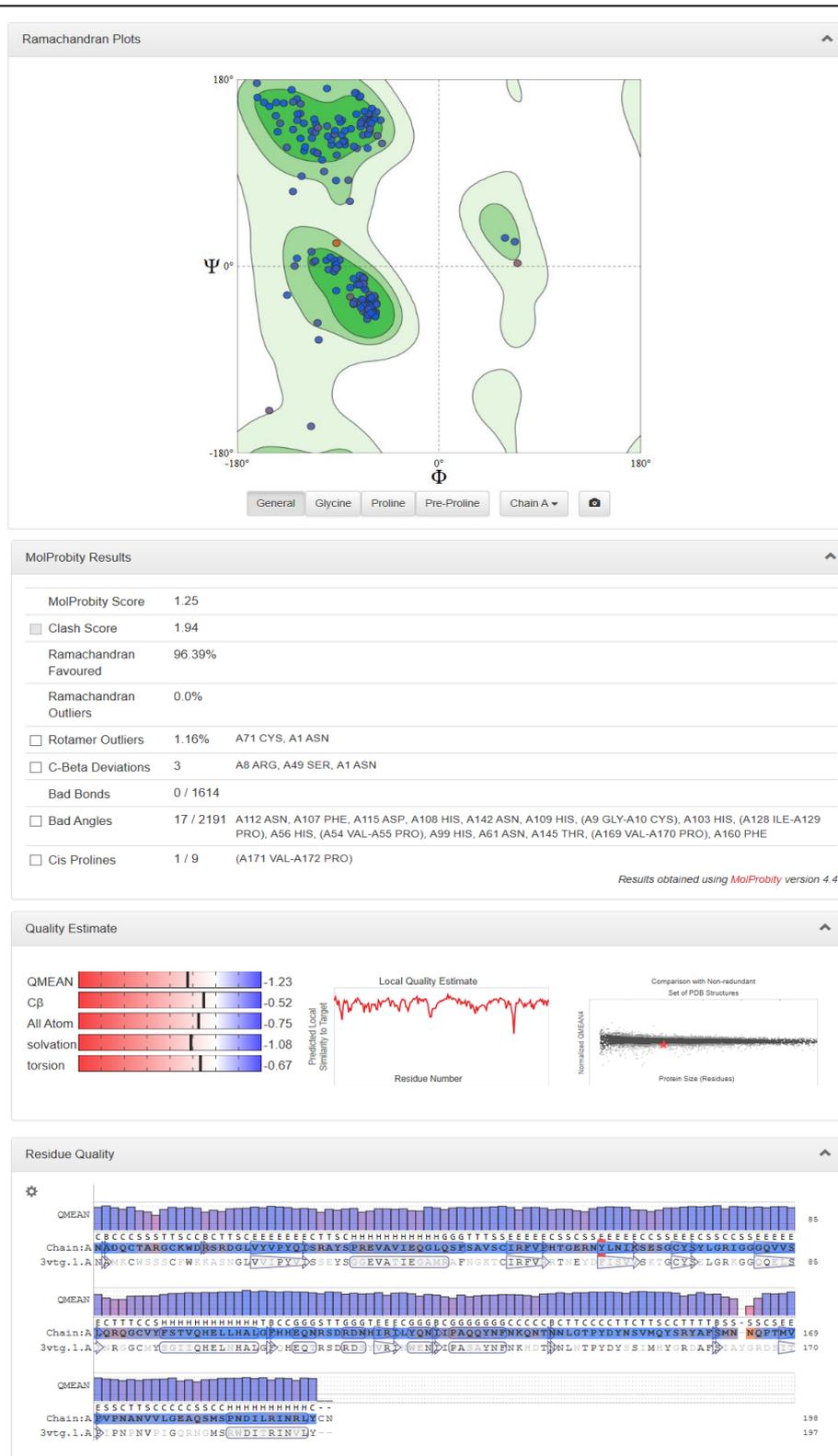


Abbildung 38: Qualitätskontrolle des Modells von Nephrosin an HCE (3VTG)

Die Abbildung zeigt den Ramachandran-Plot der Aminosäuren, sowie andere Parameter des Nephrosin Modells zur Qualitätsprüfung einschließlich eines Alignments der Proteine.

6.5.4 Qualität Modell Fisch-Fetuin an Maus Fetuin-B (6HT9)

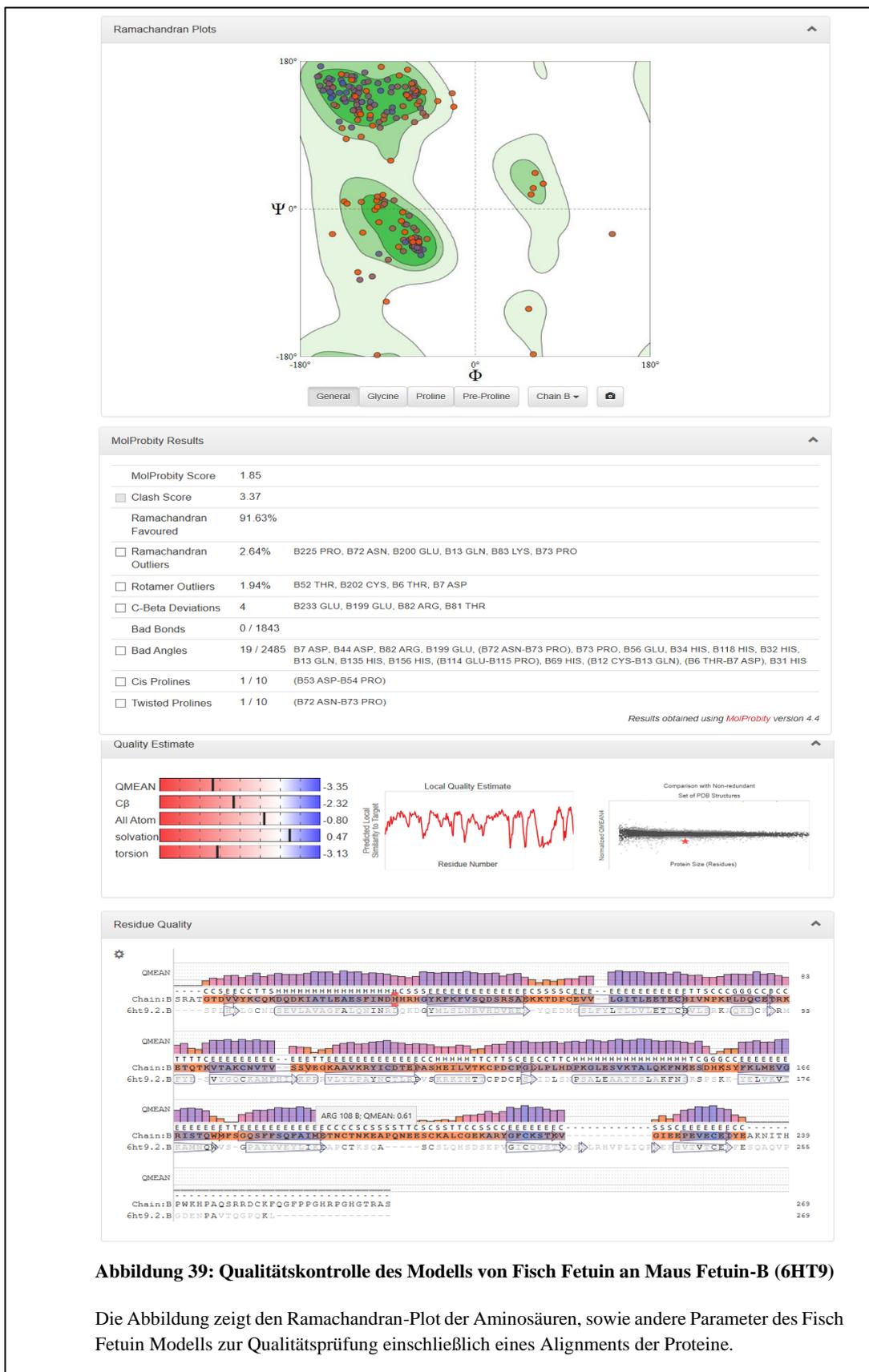
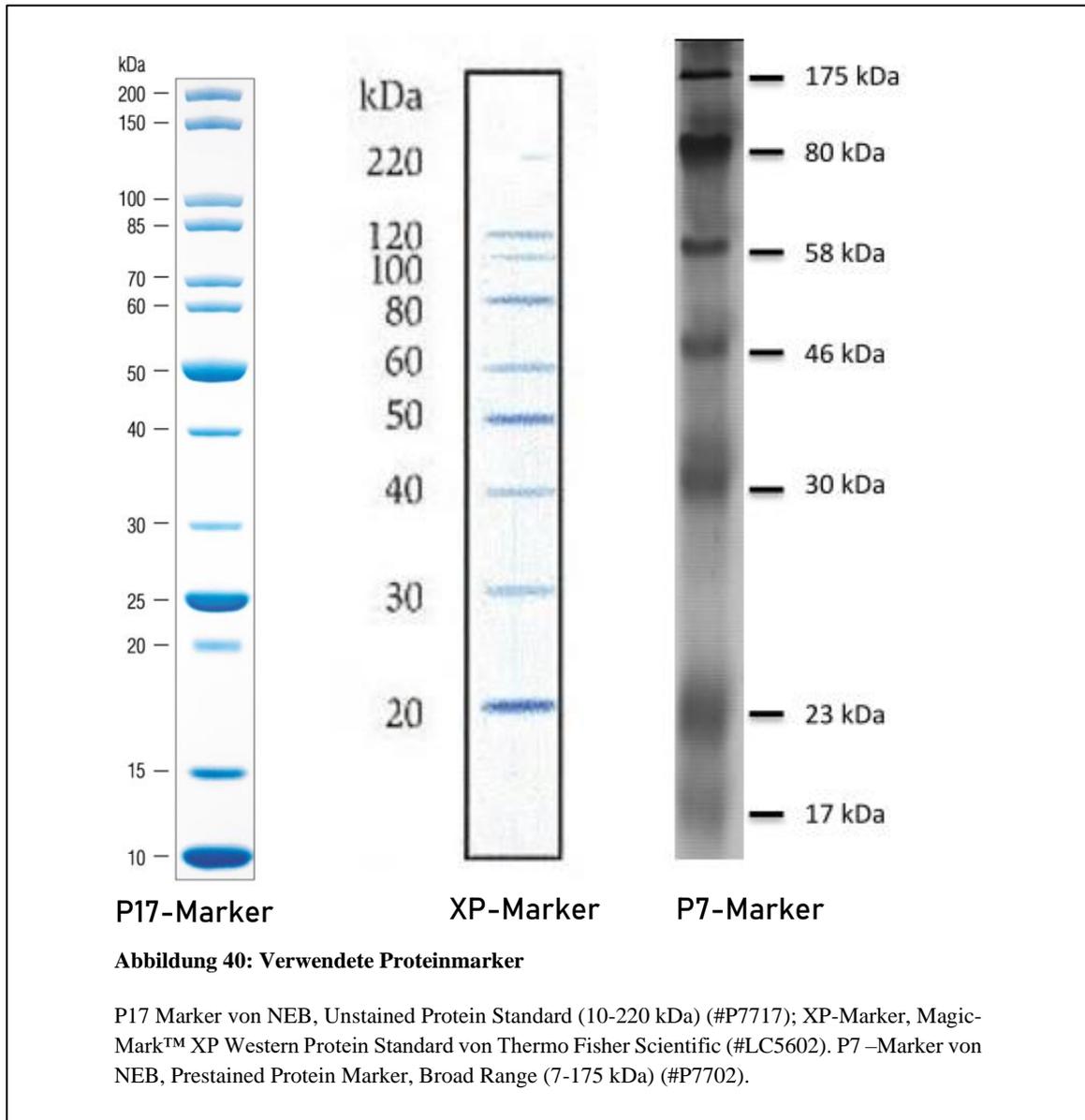


Abbildung 39: Qualitätskontrolle des Modells von Fisch Fetuin an Maus Fetuin-B (6HT9)

Die Abbildung zeigt den Ramachandran-Plot der Aminosäuren, sowie andere Parameter des Fisch Fetuin Modells zur Qualitätsprüfung einschließlich eines Alignments der Proteine.

6.6 Verwendete Marker in der SDS-PAGE und dem Western Blot



6.7 Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine

6.7.1 Nephrosin

```
      10      20      30      40      50      60
MYLLVWVISL LLSSGPVQSR PVEDLIEKMS KKTGGNFTKK GNLLVSSVIE TSKHAGENTD

      70      80      90      100     110     120
GPVILFGDIA FPRGLQNADQ CTARGCKWDR SRDGLVVVPY QISRAYSPRE VAVIEQGLQS

     130     140     150     160     170     180
FSAVSCIRFV PHTGERNYLN IKSESGCYSY LGRIGGGQVV SLQRQGCVYF STVQHELLHA

     190     200     210     220     230     240
LGFHHEQNRS DRDNHIRILY QNIIPAQQYN FNKQNTNNLG TPYDYNSVMQ YSRYAFSMNN

     250     260     270     280
QPTMVPVPNA NVVLGEAQSM SPNDILRINR LYCNWSHPQF EK
```

Abbildung 41: Aminosäuresequenz des verwendeten Nephrosin

Signalpeptid, Propeptid, katalytische Domäne, Strep-tag

6.7.2 Ovastacin

```
      10      20      30      40      50      60
MGIMGSLWPW ILTMLSLLGL SMGAPSASRC SGVCSTSVPE GFTPEGSPVF QDKDIPAINQ

      70      80      90      100     110     120
GLISEETPES SFLVEGDIIR PSPFRLLSVT NNKWPKGVGG FVEIPFLLSR KYDELSRRVI

     130     140     150     160     170     180
MDAFAEFERF TCIRFVAYHG QRDFVSILPM AGCFSGVGRS GGMQVWSLAP TCLRKGRGIV

     190     200     210     220     230     240
LHELMHVLGF WHEHSRADRD RYIQVNWNEI LPGFEINFIK SRSTNMLVPY DYSSVMHYGR

     250     260     270     280     290     300
FAFSWRGQPT IIPLWTSSVH IGQRWNLSTS DITRVCRLYN CSRSVPDSHG RGFEAQSDGS

     310     320     330     340     350     360
SLTPASISRL QRLLEALSEE SGSSAPSGSR TGGQSIAGLG NSQQGWEHPP QSTFSVGALA

     370     380     390     400     410     420
RPPQMLADAS KSGPGAGADS LSLEQFLAQ APTVPLALFP EARDKPAPIQ DAFERLAPLP

     430     440
GGCAPGSHIR EVPRDRSWSH PQFEK
```

Abbildung 42: Aminosäuresequenz des verwendeten Ovastacin

Signalpeptid, Propeptid, katalytische Domäne, C-terminale Domäne, Strep-tag

6.7.3 Maus-Fetuin-B

```
      10      20      30      40      50      60
MGLLRLLVLC TLAACCMARS PPAPPLPQRP LSPLHPLGCN DSEVLAVAGF ALQNINRDQK

      70      80      90     100     110     120
DGYMLSLNRV HDVREHYQED MGSFLYLTLD VLETDCHVLS RKAQKDCCKPR MFYESVYGQC

      130     140     150     160     170     180
KAMFHINKPR RVLYLPAYNC TLRPVSKRKT HTTCPDCPSP IDLSNPSALE AATESLAKFN

      190     200     210     220     230     240
SKSPSKKYEL VKVTKAMNQW VSGPAYVEY LIKEAPCTKS QASCSLQHS D SEPVGICQGS

      250     260     270     280     290     300
TVQSSLRHVP LIQPVEKSVT VTCEFFESQA QVPGDENPAV TQGPQKLPQK NTAPTSSPSV

      310     320     330     340     350     360
TAPRGSIQHL PELDDEKPEE SKGGSPEEAF PVQLDLTTNP QGDTLDVSFL YLEPGDKKLV

      370     380     390
VLPFPGKEQR SAECGPPEKE NNPLVLPPSA HHHHHH
```

Abbildung 43: Aminosäuresequenz des verwendeten Maus Fetuin-B

Propeptid, Fetuinsequenz, His-tag

6.7.4 Fisch-Fetuin

```
      10      20      30      40      50      60
MASAWSHPQF EKISRATGTD VYKCKQKQD KIATLEAESF INDHHRHGYS FKFVSQDSRS

      70      80      90     100     110     120
AEKKTDPCEV VLGITLEETE CHIVNPKPLD QCETRKETQT KVTAKCNVTV SSVEGKAAVK

      130     140     150     160     170     180
RYICDTEPAS HEILVTKCPD CPGLLPLHDP KGLESVKTAL QKFNKESDHK SYFKLMEVGR

      190     200     210     220     230     240
ISTQWMFSGQ SFFSQFAIME TNCTNKEAPQ NEESCKALCG EKARYGFCKS TKVGIEEPEV

      250     260     270     280     290     300
ECEIYEAKNI THPWKHPAQS RRDCFQGFPG PGRPHGTR ASQPELAPED PEDLEHHHHH
```

Abbildung 44: Aminosäuresequenz des verwendeten Fisch Fetuin

Durch die Klonierung eingefügte Aminosäuren, Strep-tag, Fetuinsequenz, His-tag

6.8 Sequenzvergleiche der Nephrosinaktivatoren

6.8.1 MMP2

NP 004521.1 Homo sapiens	1	MEALMARGALTG---PLRALCILGCLLSHAAAAPSPIIKFPGDVAPKTDKELAVQYLNTE	57
AAH76545.1 Danio rerio	1	---MMSVKFSSCRHIVLKVFLVQFLASLOTFAAPSPIIKFPGDHTAHTDKEVALHYLNKE	57
		:* : : * : : : : : * : : * : : * : : * : : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	58	YGCPKESCNLFVLKDTLKKMQKFFGLPQTGDLQNTIHTMRKPRCGNPDVANYNFFPRKE	117
AAH76545.1 Danio rerio	58	YGCPKDRCNLMVFLKDTLKKMQKFFALPETGEIDQKTVEIMKKPRCGVPDVANYNFFHRKE	117
		***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	118	KWDKNQIITYRIIGYTPDLLPETVDDAFARAFQVWSDVTPLEFSRIHGDGEADIMINFGRW	177
AAH76545.1 Danio rerio	118	KWGQKNVTYRILGHTPDLLEDITIDDAFYRAFKVWSDVTPLEFTRIMDGEADIMINFGRNE	177
		* : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	178	HGDGYPFDGKDLLAHAFAPGTVGGDSHFDDDELWTLGEGQVVRVKYGNADGEYCKFFP	237
AAH76545.1 Danio rerio	178	HGDGYPFDGKDLLAHAFAPGPIGGDSHFDDDEQWTLGEGQVVKYGNADGEYCKFFP	237
		***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	238	LENGKEYNSCTDTRSDGFLWCSTTYNFEKDGKYGFCPHEALFTMGNAEGQPCCKPFFR	297
AAH76545.1 Danio rerio	238	LEFMKEYNSCTSQGRDGLFLWCSTTYNFEKDGKYGFCPHEALFTLGGNADGAPCKPFFR	297
		** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	298	QGTSYDSCCTTEGRTDGYRWCGTTEDYDRDKKYGFCPETAMSTVGGNSEGAPCVFPFTFLG	357
AAH76545.1 Danio rerio	298	QGDKYDSCCTTSGRDDGYRWCAETEDYDKDKTYGFCPETAMSTSGGNSDGAPCVFPFKFLG	357
		** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	358	NKYESCTSAGRSDGKMWCATTANYDDDRKWGFCPDQGYSLFLVAAHEFGHAMGLEHSODE	417
AAH76545.1 Danio rerio	358	DSYDSCCTTSGRNDGKMWCAVTKSFDDDRKWGFCPDQGYSLFLVAAHEFGHALGLEHSDDP	417
		: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	418	GALMAPIYTYTKNFRSLQDDIKGIQELYGASPDIDLGTPETLGPVTPPEICKQDIVEFDG	477
AAH76545.1 Danio rerio	418	GALMAPIYTFKTLRLSDDVKGIQELYGEPTIKPLPHHTPE---VTPMDVNCENITIFDA	474
		***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	478	IAQIRGEIFFFKDRFIWRIVTPRDKPMGPLLVAFWPELPEKIDAVYEAFAQEAKAVFFAG	537
AAH76545.1 Danio rerio	475	VAQIRGEIFFFKDRFLFRITADVRRKPTGEMLVATFWSLEPEKIDAAAYENPLEERTVFFAG	534
		: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	538	NEYWIYSASTLERGYPKPLTSLGLEPDVQRVDAAFNWSKNKKTYIFAGDKFWRYNEVKKK	597
AAH76545.1 Danio rerio	535	DEMNVYSASTLEREYPKKISSMGLFSDLHGIDAAYSFHKTKKTYIFAGNKFWRYNAAKKK	594
		: * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	598	MDPGFPKLIADAWNAIPDNLDAVVDLQGGHSYFFKGAAYLKLLENQSLKSVKFGSISKSDW	657
AAH76545.1 Danio rerio	595	MDPGFPKIIADSWTAVPDDLGDALSLNGDGHSYFFKDSHYLKMDDSTLKIIRVGEVKKDW	654
		***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP 004521.1 Homo sapiens	658	IGC	660
AAH76545.1 Danio rerio	655	LRC	657
		* *	

Abbildung 45: Sequenzvergleich von MMP2 von Mensch und Zebrafisch

Das Sequenzalignment wurde auf der Internetseite <https://www.uniprot.com/align/> mit den Standardeinstellungen durchgeführt. Als Visualisierungsoption wurde Similarity (Ähnlichkeit) ausgewählt. Je stärker die graue Farbe im Alignment ist, desto konservierter sind die Sequenzen untereinander. * bedeuten identische Aminosäuren und : chemisch ähnliche Aminosäuren. Grün umrandet ist die Sequenz des zinkbindenden Motivs.

6.9 Buchstabencode der Aminosäuren

Tabelle 34: Übersicht der Aminosäuren und deren Vorkommen in *E. coli*

Gezeigt sind die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren mit ihren chemischen Eigenschaften sowie deren relative Häufigkeit im *E. coli* Proteom

Aminosäure	Drei-/Einbuchstabencode	Chemische Eigenschaft	Vorkommen in <i>E. coli</i> [%]
Alanin	Ala, A	unpolar	8,6
Arginin	Arg, R	positiv geladen	5,7
Asparagin	Asn, N	polar	4,9
Aspartat	Asp, D	negativ geladen	5,4
Cystein	Cys, C	polar	1,0
Glutamin	Gln, Q	polar	4,0
Glutamat	Glu, E	negativ geladen	5,6
Glycin	Gly, G	unpolar	7,5
Histidin	His, H	polar	2,0
Isoleucin	Ile, I	unpolar	5,9
Leucin	Leu, L	unpolar	9,3
Lysin	Lys, K	positiv geladen	5,6
Methionin	Met, M	unpolar	2,3
Phenylalanin	Phe, F	unpolar	3,9
Prolin	Pro, P	unpolar	4,0
Serin	Ser, S	polar	7,1
Threonin	Thr, T	polar	5,9
Tryptophan	Trp, W	unpolar	1,4
Tyrosin	Tyr, Y	polar	3,3
Valin	Val, V	unpolar	6,5

Lebenslauf

Mario Olf

Persönliches

Geb.: 23. November 1983 in Daun

Staatsangehörigkeit: deutsch

Verheiratet:

Kinder:

Publikationen

Tagungsbeiträge

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bisher weder veröffentlicht noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe bisher keinen weiteren Promotionsversuch unternommen.

Nackenheim, den 16.02.2021

Mario Olf