

GEN *KNOCKDOWN* DER
METALLOPROTEASEN MEPRIN
 α_1 , α_2 UND β IM ZEBRABÄRBLING *DANIO*
RERIO

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

AM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
IN MAINZ

ANDRÉ SCHÜTTE
GEB. AM 28.04.1980 IN OLPE

MAINZ, 2009

JOHANNES
GUTENBERG
UNIVERSITÄT
MAINZ

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Diese Dissertation wurde kumulativ angefertigt. Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse wurden in drei Veröffentlichungen detailliert beschrieben. Im Folgenden werden diese und weiterführende Arbeiten zusammengefasst und erläutert.

Mainz, im Juli 2009

INHALT

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Meprin-Metalloproteasen.....	2
2.2	Der Zebrafisch: Ein Modelltier der biologischen Forschung.....	5
2.3	Darm und Haut des Zebrafisches.....	5
2.4	Blockierung der Translation durch Morpholino-Oligonukleotide	7
2.5	Angiogenese beim Zebrafisch.....	9
2.6	Ziele dieser Arbeit.....	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Amplifizierung der drei Meprin-Gene und Zwischenklonierung in den pGEM [®] -T Vektor.....	11
3.2	Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide in <i>E. coli</i> JM109.....	13
3.3	Bakterienselektion und -kultivierung	14
3.4	Isolierung und Reinigung der Plasmide aus <i>E. coli</i> JM109.....	14
3.5	Herstellung von expressionsfähigen Konstrukten im pFastBac [™] -Vektor	14
3.6	Transposition und Isolierung rekombinanter Bacmide	16
3.7	Transfektion, Virenreplikation und Expression in HighFive [™] Insektenzellen	16
3.8	Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	18
3.9	Reinigung des rekombinanten Proteins per Affinitätschromatographie	18
3.10	Injektion der Morpholinos und Bestimmung der Injektionsvolumina	19
4	Ergebnisse.....	21
4.1	Nachweis der Meprine in <i>Danio rerio</i>	21
4.2	Phylogenetische Analysen und intramolekulare Interaktionen der Meprine.....	23
4.3	„knockdown“ der Meprine durch Morpholinos	25
4.4	Weitere Ergebnisse	26
4.4.1	Isolierung der drei Meprine und Klonierung in den Expressionsvektor pFastBac [™] 1....	26
4.4.2	Affinitätschromatographische Reinigung von Meprin α_2	27

5	Diskussion	29
6	Ausblick.....	30
7	Literaturliste	31
8	Anhang.....	i
8.1	Veröffentlichung 1: <i>Meprins in zebrafish</i>	i
8.2	Veröffentlichung 2: <i>Astacins from Horseshoe Crab</i>	ii
8.3	Veröffentlichung 3: <i>Meprins affect angiogenesis</i>	iii
8.4	Sequenz von Meprin α_1 aus <i>Danio rerio</i>	iv
8.5	Sequenz von Meprin α_2 aus <i>Danio rerio</i>	v
8.6	Sequenz von Meprin β aus <i>Danio rerio</i>	vi
8.7	Verwendete Vektoren	vii
8.8	Plasmidkarte von pFastBac™ mit Meprin α_1	viii
8.9	Plasmidkarte von pFastBac™ mit Meprin α_2	ix
8.10	Plasmidkarte von pFastBac™ mit Meprin β	x
8.11	<i>Accession numbers</i> der in der Arbeit beschriebenen Proteine	xi
8.12	Abkürzungen.....	xii

Eidesstattliche Erklärung

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloproteasen Meprin α und β übernehmen Schlüsselfunktionen in vielen (patho-) physiologischen Prozessen. So sind sie beteiligt an der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, an immunologischen Reaktionen oder an entzündlichen Gewebeerkrankungen. Die beiden Enzyme kommen hauptsächlich in den Bürstensaummembranen von Niere und Darm sowie in der Haut von Vertebraten vor. Für die Erforschung der biologischen Aktivität der Meprine wurde in dieser Arbeit der Modellorganismus *Danio rerio* verwendet, der vor allem durch die Möglichkeit der gentechnischen Manipulation prädestiniert ist. Im Fisch konnten drei homologe Enzyme (Meprin α_1 , α_2 und β) nachgewiesen werden. Während mRNA-Analysen eine nahezu ubiquitäre Verteilung der Meprine offenbarten, konnte ich mittels spezifischer Antikörper die Expression auf Proteinebene nachweisen. Während Meprin α_1 und β verstärkt im Darmepithel und in der Epidermis lokalisiert sind, konnte Meprin α_2 ausschließlich in der *Lamina propria* des Darms identifiziert werden.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit zielt auf die spezifische Reduzierung des Expressionslevels der Meprine in Embryonen des Zebrafischblings. Dies wurde durch die Mikroinjektion von sogenannten Morpholinos in die Zygote erzielt. Morpholinos sind RNA-Moleküle, die spezifisch an die mRNA des Zielproteins binden können und die Translation verhindern. Die auftretenden Effekte durch das Fehlen der Meprine lassen so Rückschlüsse auf ihre physiologische Funktion zu. Nach der Injektion von Morpholinos gegen Meprin α_1 zeigten sich lediglich leichte epidermale Deformationen. Bei Meprin β hingegen kam es zu einer massiven Fehlbildung von Organen im Rumpf- und Schwanzbereich. Dieses führte zu erheblichen Defekten; die Embryonen starben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Befruchtung. Demzufolge müssen Meprin α_1 und Meprin β insbesondere an der Gewebsdifferenzierung beteiligt sein. Dies korreliert mit verschiedenen Experimenten, u.a. an *knockout* Mäusen, aus denen hervorgeht, dass die Prozessierung und Aktivierung der Cytokine Interleukin-1 β oder Interleukin-18 durch Meprin β erfolgen kann.

Die Injektion von Meprin α_2 -Morpholinos erbrachte ein weiteres, eindrucksvolles Ergebnis: Das Blutgefäßsystem von injizierten Embryonen war vollständig unterbrochen und es sammelten sich Erythrozyten im Bereich der Caudalvene an. Diese Phänotypen gleichen den *knockdown*-Experimenten mit dem *vascular endothelial growth factor* VEGF-A, dem entscheidenden Wachstumsfaktor in der Angiogenese (Blutgefäßbildung). Eine Inkubation des humanen VEGF-A mit (humanem) rekombinantem Meprin α bzw. β führte zu einer differenzierten Prozessierung des Moleküls. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Meprin α pro-angiogenetisch wirkt, indem es VEGF-A prozessiert und damit die Gefäßbildung aktiviert. Aus den Daten dieser Arbeit wird die hohe Signifikanz der Meprine für die Proliferation und Differenzierung spezieller Gewebe deutlich, welche somit eine wichtige Grundlage für Studien an höheren Vertebraten darstellt.

2 EINLEITUNG

2.1 MEPRIN-METALLOPROTEASEN

Beim Menschen wurden Meprine durch einen unerwarteten Befund entdeckt: Trotz der Entfernung der Bauchspeicheldrüse konnten Patienten den diagnostischen Marker für die Pankreasfunktion – N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoessäure (PABA-Peptid) – umsetzen. Das PABA-Peptid ist ein Substrat für Chymotrypsin, einer Serinprotease, die ausschließlich in der Bauchspeicheldrüse synthetisiert wird. Meprine sind aber ebenfalls in der Lage, dieses Peptid zu spalten. Infolgedessen wurden diese Enzyme beim Menschen erstmals in den Bürstensaummembranen des Dünndarms identifiziert (STERCHI *ET AL.* 1982). Der Name „Meprin“ (*metalloprotease from renal tissue*) beruht auf der Entdeckung der Protease im Nierengewebe der Maus (BEYNON *ET AL.* 1981). Bald darauf wurden oligomere Formen gefunden, bei denen zwei homologe Varianten der Protease, nämlich Meprin α und β , unterschieden werden konnten (BUTLER, BOND 1988; GORBEA *ET AL.* 1991). In der Zwischenzeit sind neben der Niere etliche weitere Expressionsorte beschrieben worden. So fand man die Meprine in apikalen Bereichen der Epithelzellen im Darm des Menschen und der Maus sowie in der menschlichen Haut (KUMAR, BOND 2001; BECKER-PAULY *ET AL.* 2007). In der Haut ist humanes Meprin α an der Proliferation und Meprin β an der terminalen Differenzierung von Keratinozyten beteiligt. Zudem wurden die Enzyme auch unter bestimmten pathologischen Situationen in Colonkarzinomzellen (CaCo2), auf Leukozyten der *Lamina propria* und Makrophagen nachgewiesen (LOTTAZ *ET AL.* 1999; CRISMAN *ET AL.* 2004). Doch nicht nur in den Säugetieren, auch in anderen Vertebraten werden Meprine exprimiert. Im Zebrafisch weisen die Proteasen ein ubiquitäres Expressionsmuster auf, allerdings werden, im Gegensatz zu den Säugern, im Zebrafisch drei Enzyme exprimiert, zwei α -Homologe und eine β -Variante (SCHÜTTE *ET AL.* 2007). Alle drei Gene sind auf dem Chromosom 20 lokalisiert, während die Meprin-Gene in anderen Vertebraten auf unterschiedliche Chromosomen verteilt sind.

Als Mitglieder der Astacin-Familie gehören Meprine zu den Metalloproteasen, genauer zu den Metzinkinen, die ein katalytisch wirksames Zinkion (Zn^{2+}) in ihrem aktiven Zentrum besitzen. Das Zinkion wird von drei Histidinseitenketten, einer Glutamatseitenkette (über ein Wassermolekül) und einem Tyrosinrest komplexiert. Dieses Zinkbindemotiv (HExxHxxGxxH) ist in der Aminosäuresequenz aller Astacine hoch konserviert. Ein weiteres typisches Merkmal ist das in einem 1,4- β -turn angeordnete Methionin, der sogenannte Methionin-*turn* mit der Sequenz SxMHY (GOMIS-RÜTH 2003; STÖCKER *ET AL.* 1995; STÖCKER *ET AL.* 1993).

Wie alle anderen Proteasen der Astacin-Familie, werden Meprine als Zymogene (inaktive Vorstufen) synthetisiert. Sie müssen zunächst aktiviert werden, um proteolytisch wirksam zu sein. Diese Aktivierung erfolgt durch die Abspaltung eines Propeptids, im Falle von Meprin α beispielsweise durch Trypsin und Plasmin oder bei Meprin β durch Trypsin und die Kallikrein-ähnliche Peptidase KLK4.

Die einzig bekannte Ausnahme hiervon ist die im Ergebnisteil beschriebene Astacin-Protease LAST_MAM des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus*, die sogar mit dem Propeptid proteolytische Aktivität zeigt (BECKER-PAULY *ET AL.* 2009).

Die Meprine der Säugetiere unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich ihrer Domänenstruktur. Beide besitzen ein Propeptid, die Astacin-ähnliche Proteasedomäne, eine MAM-Domäne (*meprin, A5 protein, receptor tyrosine phosphatase μ*) und eine TRAF-Domäne (*tumor necrosis factor-receptor associated factor*), eine EGF- (*epidermal growth factor*) und eine Transmembran-Domäne (siehe Abbildung 1). Die MAM- und TRAF-Domänen sind für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich und führen durch intermolekulare Disulfidbrücken zur Oligomerisierung der Proteasen. Meprine werden meist als Homooligomere exprimiert, können aber auch kolokalisiert als Heterooligomere vorliegen, wobei die Basisuntereinheit ein disulfidverbrücktes Dimer ist und weitere Assoziationen über nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Meprin α Homooligomere assoziieren zu Komplexen mit 10-100 Untereinheiten, die bis zu 6 Megadalton an Masse erreichen können und somit zu den größten sezernierten Proteasen zählen, während Meprin β stets als Dimer vorliegt (BECKER *ET AL.* 2003; BERTENSHAW *ET AL.* 2003). Heterooligomere (Di- oder Tetramere) aus Meprin α und β vereinen die proteolytische Aktivität beider Enzyme und verankern gleichzeitig die normalerweise sezernierte α -Variante an der Zelloberfläche, wodurch vermutlich ein Enzym mit neuer Substratspezifität präsentiert wird. Für die Sekretion von Meprin α ist die *inserted*-Domäne verantwortlich, die nur in den α -Varianten vorkommt. Sie enthält eine Spaltstelle für Furin-ähnliche Konvertasen des sekretorischen Weges. Durch diese können die Transmembran-Domäne und die übrige cytoplasmatische Domäne abgespalten werden. Dabei verliert die Protease ihren Membrananker und wird sezerniert. Meprin β hingegen besitzt keine Furin-Spaltstelle. Daher bleibt die Transmembran-Domäne und damit die Membranständigkeit erhalten. Dieses Enzym stellt somit den einzig bekannten membrangebundenen Vertreter der Astacine dar.

Die Meprine des Zebrafisches heben sich von dieser Struktur ab. So besitzt Meprin α_2 eine verkürzte *inserted*-Domäne, die aber dennoch eine mögliche Schnittstelle für Furin-ähnliche Proteasen enthält. Bei Meprin α_1 hingegen fehlen sogar alle C-terminalen Domänen nach der TRAF-Domäne (siehe Abbildung 1).

Neben diesen Unterschieden gibt es in dieser Protease noch einen signifikanten Unterschied im Zinkbindemotiv. Hier ist das zweite Glutamat des Motivs gegen ein Methionin ausgetauscht (HExxHxxGxxHM statt HExxHxxGxxHE). Im Falle der Astacine bildet dieses Glutamat eine Salzbrücke zum N-Terminus des reifen Proteins. Der Verlust dieser Wechselwirkung führt bei *Astacus*-Astacin zu einer reduzierten Thermostabilität, wie anhand von Mutanten (Astacin E103A und E103Q) gezeigt wurde (YIALLOUROS *ET AL.* 2002). Ob dies auch für Meprin α_1 ebenso zutreffen könnte, ist noch unklar.

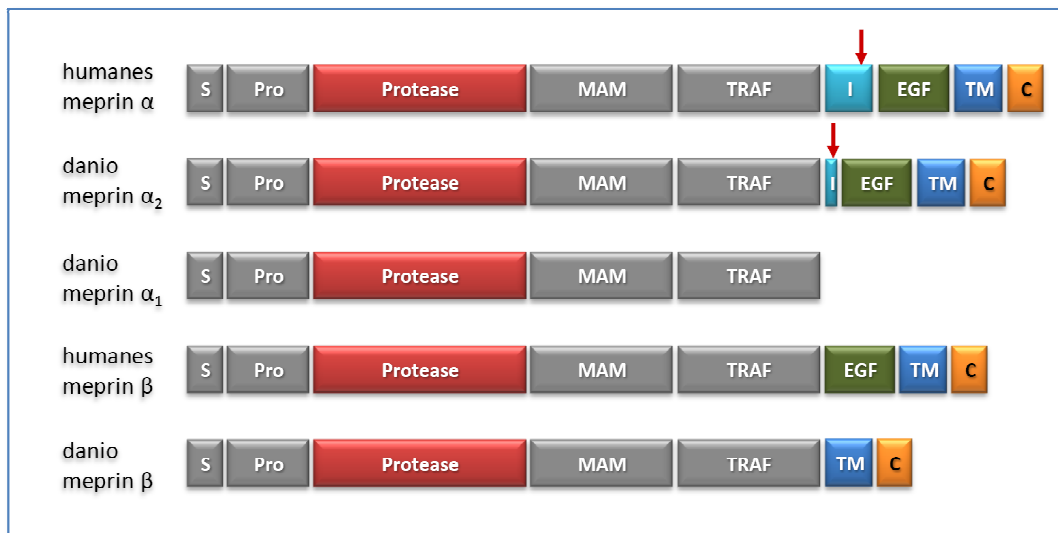


Abbildung 1: Domänenstruktur der humanen und Zebrafis (Danio)-Meprine im Vergleich. Die roten Pfeile markieren die mögliche Schnittstelle für Furin-ähnliche Proteasen. Domänen: S: Signalpeptid; Pro: Propeptid; Protease: katalytische Domäne; MAM: Meprin A5 protein, receptor tyrosine phosphatase μ -Domäne; TRAF: tumor necrosis factor receptor associated factor; I: inserted-Domäne; EGF: epidermal growth factor-Domäne; TM: Transmembran-Domäne; C: cytoplasmatische Domäne

Die physiologischen Funktionen der Meprine sind immer noch weitgehend unbekannt. Doch gibt es etliche *in vitro*-Untersuchungen, die auf wichtige Rollen der Enzyme in Entwicklung, Auf- und Umbau von Geweben, immunologischen Reaktionen oder in pathologischen Situationen schließen lassen. So können Meprine viele Proteine der extrazellulären Matrix spalten, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen IV und V. Auch Peptidhormone wie Bradykinin oder Osteopontin sind Substrate für diese Enzyme (BECKER *ET AL.* 2003; BERTENSHAW *ET AL.* 2001). Dass sie auch an immunologischen Reaktionen beteiligt sind, zeigt beispielsweise die Fähigkeit von Meprin β , Pro-Interleukin-1 β und Pro-Interleukin 18 zu aktivieren und so die Inflammation von Leukozyten zu begünstigen (HERZOG *ET AL.* 2005; BANERJEE, BOND 2008; BANERJEE *ET AL.* 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit offenbaren entscheidende, neue Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Funktionen der Meprin-Metalloproteasen. Dafür wurden im Tiermodell *Danio rerio* (Zebrafis) spezifische *in vivo knockdown*-Studien mit sogenannten „Morpholinos“ durchgeführt (siehe 3.10 und 4.3). Die Resultate weisen darauf hin, dass die Metalloprotease Meprin α_1 pro-angiogenetisch wirkt, indem einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren zur Bildung neuer Blutgefäße, VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*), prozessiert und somit aktiviert wird (siehe 2.5 und 4.3).

2.2 DER ZEBRABÄRBLING: EIN MODELLTIER DER BIOLOGISCHEN FORSCHUNG

Im Bereich der „*Life Sciences*“ trifft man häufig auf die Verwendung von Modellorganismen. Anhand derer wird beispielhaft die Forschung an biologischen Prozessen, die zum Verständnis des menschlichen Körpers und seiner Eigenschaften beitragen sollen, betrieben. So versucht man, sowohl viele physiologische als auch pathologische Situationen in Modelltieren nachzustellen und zu verstehen (TREDE *ET AL.* 2007).

Neben Maus und Ratte, die als Säugetiere dem Menschen unter den klassischen Versuchstieren am nächsten verwandt sind, wird immer häufiger auch der Zebraärbling *Danio rerio* verwendet.

Für die Erforschung der Meprin-Metalloproteasen bietet der Zebraärbling als Modelltier entscheidende Vorteile, unter anderem einen kurzen Generationszyklus, eine hohe Laichfrequenz und Zucht unter unkomplizierten Haltungsbedingungen (THISSE, ZON 2002). Darüber hinaus ist auch die Transparenz der Chorionhülle, verbunden mit der kompletten Entwicklung des Fisches außerhalb des Muttertiers, ein entscheidender Vorteil bei Studien zur Embryonalentwicklung der Tiere im Hinblick auf die durch die RNA-Interferenz möglichen morphologischen Ausprägungen. Die Embryonen sind dadurch in jedem Entwicklungsstadium optimal auswertbar, zudem sind auch Manipulationen der heranwachsenden Fische *ex utero* möglich. Aus diesem Grund ist – im Vergleich zu *knockout*-Mäusen – der Zebraärbling eine Alternative für die Untersuchung der Embryonalentwicklung. Eine Furchungsteilung vollzieht sich etwa alle 15 min, sodass der komplett entwickelte Zebraärbling nach ca. drei Tagen schlüpfen kann. Ein adultes Weibchen produziert in der Woche bis zu 300 Eier. Das macht den Fisch auch für genetische Analysen interessant. Durch seine Hilfe erwartet man Einblicke in grundlegende physiologische Prozesse, die letztendlich auch auf den Menschen übertragbar sein können.

2.3 DARM UND HAUT DES ZEBRABÄRBLINGS

Wie sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, werden die Meprine unterschiedlich, hauptsächlich aber im Darm und in der Haut des Zebraärblings exprimiert. Diese beiden Organe zeigen Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Organen im Menschen, sind jedoch im Vergleich weniger komplex aufgebaut (siehe Abbildung 2). Schon bei der Übersicht der Zebraärbling-Anatomie fällt auf, dass die Fische keinen Magen besitzen. Der Oesophagus geht dabei direkt in einen großlumigen Darm mit tiefen Ausstülpungen über, der möglicherweise eine Speicherfunktion besitzt (WALLACE *ET AL.* 2005). In diesem Bereich ist auch die Expression von Verdauungsenzymen beschrieben worden. Doch zwei weitere Teile des Darms können beim Zebraärbling unterschieden werden. Die mittlere Region könnte immunologische Bedeutung haben und deshalb dem menschlichen Ileum ähnlich sein (WALLACE *ET AL.* 2005). Von den vier hauptsächlich Zelltypen des menschlichen Dünndarms sind beim

Zebrabärbling histologisch aber nur drei zu unterscheiden: Enterozyten, schleimproduzierende Becherzellen und enteroendokrine Zellen. Paneth-Zellen, die für die Sekretion von Lysozymen oder Defensinen zuständig sind, konnten bisher nicht identifiziert werden (HOLMBERG *ET AL.* 2004). In einem dritten, relativ kurzen Teil des Cypriniden-Darms, der dem Säugetier-Colon entspricht, sind kleinere Ausstülpungen des Darmepithels sichtbar, jedoch fehlen die tiefen *LIEBERKÜHN*-Krypten. Der histologische Aufbau des Darms ist bei den Säugern ebenfalls ähnlich (siehe Abbildung 2 A und B). Es gibt jedoch einige grundlegende Unterschiede zu *Danio rerio*: Es fehlt die Muskelschicht, die mit der *Muscularis mucosa* vergleichbar wäre. Diese trennt bei den Säugetieren die *Lamina propria* von der *Submucosa*. Stattdessen gibt es beim Zebrabärbling nur eine dünne Bindegewebsschicht, die das Epithel von der Ring- und Längsmuskelschicht abgrenzt. Nur in diesen Muskelschichten gibt es vereinzelte Nervenzellen, während im Darm der Säugetiere zu Ganglien gebündelte Nervenzellen auch in der *Submucosa* vorkommen.

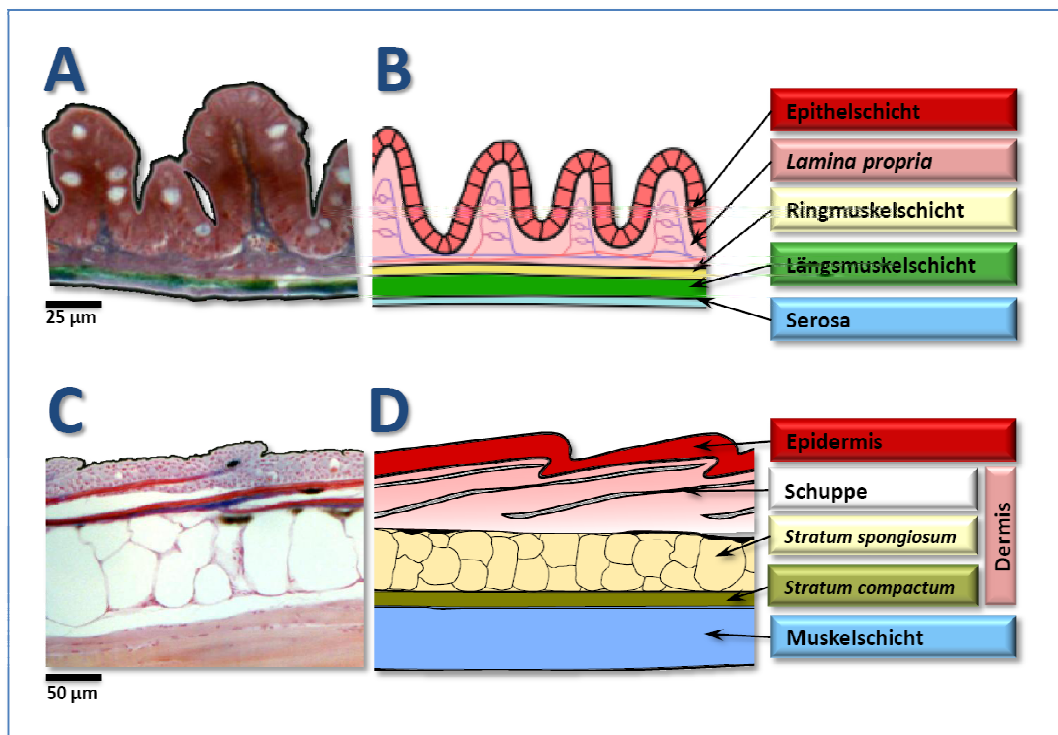


Abbildung 2: Aufbau des Darms (A,B) und der Haut (C,D) des Zebrabärblings. (A) und (C) zeigen jeweils histologische Schnitte (Trichromfärbung), passend dazu beschreiben jeweils (B) und (D) schematisch den Aufbau der einzelnen Gewebeschichten.

Die Haut des Zebrabärblings ist im Vergleich zur menschlichen Haut wesentlich einfacher strukturiert. Es gibt beim adulten Fisch drei Schichten: die Epidermis, die Dermis und die Muskelschicht. Die Schuppen sind in die Dermis eingelagert und können in die epidermale Schicht hineinragen (WEBB *ET AL.* 2008) (siehe Abbildung 2 C und D). Die relativ dünne Epidermis kann im Gegensatz zu der viel-

schichtigen Epidermis des Menschen in nur drei Ebenen unterteilt werden: in die einzellige Oberflächenschicht, die basale Schicht und eine Zwischenschicht (LE GUELLEC *ET AL.* 2004).

Davon trägt nur die Zwischenschicht undifferenzierte Zellen, die proliferieren und Zellen der Oberflächenschicht ersetzen können. Weiterhin besitzt die Haut der Zebrafische keine abgestorbenen Zellen, die zu einer verhornten Zellschicht führen könnten. Die Metalloproteasen Meprin α_1 und β werden in der Epidermis des Fisches exprimiert, wie die Ergebnisse aus immunhistochemischen Analysen bestätigen (siehe 4.1 und 4.3). Die Expression konnte bisher jedoch nicht spezifisch auf eine der drei epidermalen Schichten begrenzt werden. Auch in der menschlichen Haut sind Meprin α und β in der Epidermis, und zwar in unterschiedlichen Ebenen, nämlich im *Stratum basale* (Meprin α) und im *Stratum granulosum* (Meprin β), zu finden (BECKER-PAULY *ET AL.* 2007).

2.4 BLOCKIERUNG DER TRANSLATION DURCH MORPHOLINO-OLIGONUKLEOTIDE

Schon lange wird nach Möglichkeiten zur gezielten Genregulierung und -ausschaltung geforscht. Ein sehr vielversprechender Ansatz ist dabei die Mikroinjektion von synthetischen RNA-Oligomeren, die mit der *messenger RNA* (mRNA) des Organismus interferieren und damit das Ablesen des Stranges bei der Translation verhindert. Für die Entdeckung der Methode der RNA-Interferenz erhielten Mello und Fire 2006 den Medizinnobelpreis (FIRE *ET AL.* 1998). Im Hinblick auf das Promotionsprojekt wird ein ähnliches Verfahren angewandt, um die Expression der Meprin-Gene im Zebrafisch spezifisch zu reduzieren. Dabei werden chemisch veränderte RNA-Oligomere, sogenannte „Morpholinos“, verwendet (NASEVICIUS, EKKER 2000). Sie inhibieren effektiv die Translationsprozesse der gewünschten mRNA *in vivo*. Wie in dieser Arbeit beschrieben, zeigt die Injektion von Anti-Meprin-Morpholinos in frühe Stadien der Embryonalentwicklung des Zebrafisches erhebliche Auswirkungen auf den Organismus.

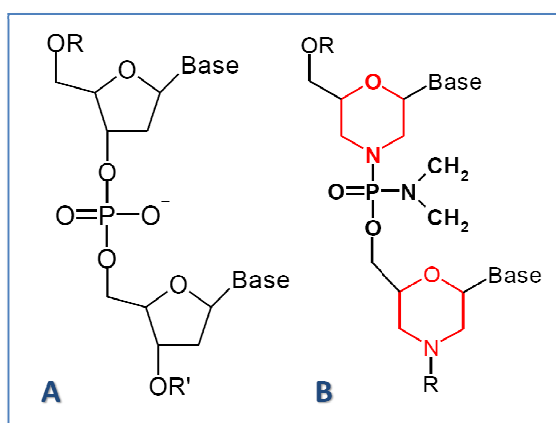


Abbildung 3: RNA-Molekül (A) und chemisch verändertes „Morpholino“-Oligonukleotid (B). Die Ribose aus dem RNA-Grundgerüst ist hier durch einen Morpholinring (rot) ausgetauscht.

RNA-Moleküle bestehen im Regelfall aus einem Grundgerüst aus Ribosephosphaten, die durch Phosphodiesterbindungen verknüpft sind (siehe Abbildung 3A). „Morpholinos“ sind RNA-Oligonukleotide, bei denen diese Zuckermoleküle gegen einen Morpholin-Ring ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 3B), wodurch sie inert gegenüber Nukleasen sind. Meist sind diese Moleküle ca. 25 Basen lang und gegen eine spezifische Sequenz im Bereich des Startcodons der Ziel-mRNA gerichtet (MOULTON, YAN 2008). Durch die Bindung in diesem Bereich sind sie in der Lage, das Ablesen der mRNA durch die 40S-ribosomale Untereinheit effektiv zu inhibieren. Demzufolge kann die entsprechende kodierende Sequenz (CDS) des Gens nicht mehr translatiert werden, das Protein wird nicht synthetisiert (siehe Abbildung 4).

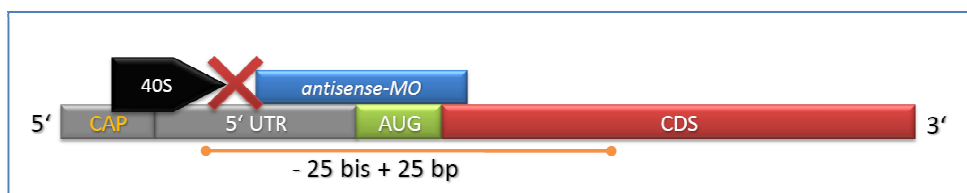


Abbildung 4: Funktionsweise der Morpholino-Oligonukleotide (antisense-MO). Durch die Bindung an einen Bereich in der mRNA um das Startcodon (AUG) wird das Ablesen der kodierenden Sequenz (CDS) durch die 40S-ribosomale Untereinheit verhindert. (UTR: untranslated region; CAP: *cap*-Struktur der mRNA)

Morpholinos können auf unterschiedlichen Wegen in den Organismus eingebracht werden. So existieren sogenannte „Endoportere“, die die Oligonukleotide über ein Vesikelsystem in gewünschte Bereiche einbringen. Eine andere Methode ist die Mikroinjektion (siehe 3.10). Diese ist besonders geeignet, um Morpholinos frühzeitig (während des Ein- oder Zweizellstadiums, siehe Abbildung 5) in die Zygote zu injizieren, damit eine möglichst homogene Verteilung der Translationsblocker im späteren Embryo gewährleistet ist. Um diese Verteilung unter dem Mikroskop besser verfolgen zu können, lassen sich die Morpholino-Oligonukleotide mit fluorogenen Substanzen, wie zum Beispiel Carboxyfluoreszein, koppeln.

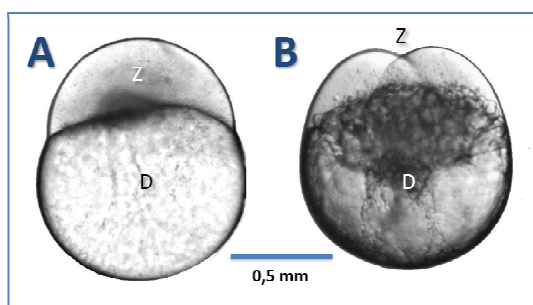


Abbildung 5: Ein-Zell-Stadium (A) und Zwei-Zell-Stadium (B) der Zygote zu Beginn der Entwicklung eines Zebrafischlings. Die Eizelle besteht aus der Zygote (Z) und dem Dotter (D).

2.5 ANGIOGENESE BEIM ZEBRABÄRBLING

Im Laufe der Promotionsarbeit stellte sich nach Beobachtung der Meprin α_2 -*knockdown*-Phänotypen heraus, dass Meprin-Metalloproteasen in der Lage sind, die Angiogenese zu stimulieren (siehe 4.3). Während dieses Vorganges bilden sich durch Sprossung aus bereits vorhandenen Blutgefäßen neue Kapillaren (CARMELIET 2003). Dieser Prozess spielt eine besondere Rolle während der Embryonalentwicklung, aber auch bei Krankheiten, Verletzungen und Entzündungsreaktionen (Wundheilung). Um die Angiogenese steuern zu können, produziert der Körper bestimmte Wachstumsfaktoren, die entweder pro- oder anti-angiogenetisch wirken. Ein zentrales Regulatormolekül der Angiogenese ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A). Dieses Protein wirkt stimulierend auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen und wirkt daher gefäßbildend. Auch aus medizinischer Sicht ist VEGF ein therapeutisches Ziel, um die Angiogenese bei bestimmten pathologischen Situationen kontrollieren zu können. Aufgrund alternativen Spleißens gibt es beim Menschen verschiedene Isoformen von VEGF-A, die sich in ihrer Exon-Zusammensetzung und damit in der Länge ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. So findet sich beispielsweise VEGF mit 121, 165, 189 und 215 Aminosäuren, wobei VEGF₁₆₅ die häufigste Form ist (TISCHER *ET AL.* 1991; HICKLIN, ELLIS 2005). Sie kann sowohl membrangebunden als auch löslich vorliegen (KEYT *ET AL.* 1996). Mittlerweile ist auch eine weitere Spleißform von VEGF₁₆₅ bekannt – nämlich VEGF_{165b} – die anti-angiogenetisch wirkt (VAREY *ET AL.* 2008). Diese verschiedenen Isoformen der VEGF-Signalproteine binden an zwei VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (*flt-1*) und VEGFR-2 (*flk-1*) und lösen damit den Angiogenese stimulierenden Effekt aus. Wie genau die Signaltransduktion abläuft, ist aber noch weitgehend unklar (NEUFELD *ET AL.* 1999).

Im Zebrafisch wurden bisher lediglich die beiden Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ (LIANG *ET AL.* 2001; LIANG *ET AL.* 1998) beschrieben. Während VEGF₁₂₁ hauptsächlich im Embryo vorkommt, ist VEGF₁₆₅ erst im adulten Tier die häufigste Variante (GONG *ET AL.* 2004). Bei einer Reduzierung der VEGF-A-Expression in Zebrafisch-Embryonen wurden erhebliche Effekte auf die Bildung der Blutgefäße während der Embryonalentwicklung beobachtet (NASEVICIUS *ET AL.* 2000). Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit generierten Meprin α_2 -Morphanten zeigten sich dramatische Auswirkungen auf die Entwicklung des Blutgefäßsystems, was auf eine essentielle Beteiligung der Meprine an der Angiogenese schließen lässt (siehe 4.3).

2.6 ZIELE DIESER ARBEIT

Der Schwerpunkt des Promotionsprojektes war die gezielte Reduzierung des Expressionslevels (*knockdown*) der Meprin-Metalloproteasen im Zebrafisch durch die Injektion von chemisch veränderten RNA-Oligonukleotiden, sogenannten Morpholinos (siehe 2.4 und 3.10). Diese Experimente sollten Aufschluss darüber geben, welche morphologischen und funktionellen Auswirkungen der Ausfall der Enzyme in unterschiedlichen Entwicklungsstadien hat, an welchen Prozessen die Proteasen beteiligt sind und letztendlich, welche physiologisch relevanten Substrate von ihnen gespalten werden können. Die bisher beschriebenen Funktionen bei Immunreaktionen, Zellmigration und -differenzierung oder Tumorpheriferation weisen auf die Signifikanz dieser Meprine hin. Dabei eröffnet die Nutzung des Zebrafisches als flexibler Modellorganismus neue Wege zur Erforschung dieser Metalloproteasen *in vivo*.

3 MATERIAL UND METHODEN

Zusätzlich zu den in den Veröffentlichungen (siehe 8.1, 8.2 und 8.3) beschriebenen Methoden werden im Folgenden weitere Applikationen erläutert.

Sofern nicht anders deklariert, wurden alle chemischen Substanzen von den Firmen Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Für alle Arbeiten wurde ausschließlich Wasser verwendet, das durch spezielle Filterung einer MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach) gereinigt wurde. Arbeiten mit RNA und DNA wurden mit DEPC (Diethylen-Pyrocyanat)-haltigem Wasser (Roth, Karlsruhe) durchgeführt.

3.1 AMPLIFIZIERUNG DER DREI MEPRIN-GENE UND ZWISCHENKLONIERUNG IN DEN pGEM®-T VEKTOR

Nach der Isolierung und reversen Transkription der mRNA zu cDNA konnten die Gene mit Hilfe von spezifischen Primern durch eine Polymerase-Kettenreaktion (siehe Tabelle 1) amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Primer synthetisiert, die zusätzlich zur genspezifischen Sequenz schon Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthielten, damit diese Sequenz bei weiteren Klonierungsschritten an diesen Punkten herausgetrennt und in einen Expressionsvektor überführt werden konnten.

Tabelle 1: PCR-Ansatz mit spezifischen Primern zur Amplifikation der Meprin-cDNA

Reagenzien	Volumina
Template DNA	1 µl
Taq Polymerase (NEB, Frankfurt)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
10X Reaktionspuffer	2,5 µl
Primer forward und reverse	Je 0,5 µl
DEPC-H ₂ O	19,5 µl
	25 µl

Für Meprin α_1 und α_2 war die Bindung der Primer erst zum Beginn der Proteasedomäne vorgesehen, sodass Konstrukte ohne Signal- und Propeptid entstanden. Für Meprin β hingegen umfassten die Primer die Gensequenz bis zum Beginn der Transmembran-Domäne und eine erweiterte Nukleotidfolge, die für einen Streptavidin-*tag* codiert. Dieser *tag* wird später zur affinitätschromatographischen Reinigung der rekombinanten Enzyme verwendet (siehe 3.9).

Tabelle 2: PCR-Programm zur Amplifikation der Meprin-cDNA

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	94°C	5 min
2	Denaturierung	94°C	1 min
3	Primer-Annealing	56°C	45 s
4	Elongation	72°C	1,5 min
5	Terminale Elongation	72°C	5 min

} 40 x

Die so amplifizierten cDNA-Fragmente wurden nun in das pGEM[®]-T Vektorsystem (Promega, Mannheim) zwischenkloniert. Dies geschah über eine T4-DNA-Ligase, die die Thyminüberhänge des Vektors und die Adeninüberhänge des cDNA-Amplifikates verknüpft. So bleibt die Sequenz stabil, kann jederzeit vervielfältigt und nicht leicht über DNasen abgebaut werden. Der Ligationsansatz wurde wie in Tabelle 3 entsprechend dem Herstellerprotokoll angesetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tabelle 3: Ligationsansatz zur Zwischenklonierung in den pGEM[®]-T-Vektor

Reagenzien	Volumina
PCR-Amplifikat	2 μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l
Ligationspuffer (2x)	5 μ l
pGEM [®] -T Vektor (50 ng/ μ l)	1 μ l
DEPC-H ₂ O	1 μ l
	10 μl

3.2 VERVIELFÄLTIGUNG DER REKOMBINANTEN PLASMIDE IN *E. COLI* JM109

Um die Vektoren (pGEM[®]-T bzw. pFastBac[™]1) für die weiteren Klonierungsarbeiten zu vervielfältigen, wurden 100 µl kompetente *E. coli* JM109 Zellen (Promega, Mannheim) mit dem Ligationsansatz (V=10 µl) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Damit die Bakterienzellen die Vektor-DNA aufnehmen können, folgte eine Hitzeschockbehandlung für 45 s bei 42°C. Nach der Zugabe von 1 ml SOC-Medium (siehe Tabelle 4) wurden die Ansätze auf dem Schüttel-Inkubator für 3 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien bei 2000 x g für 1 min zentrifugiert, das entstandene Pellet in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Zur Selektion wurden der LB-Agarplatte im Vorhinein das Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml), 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactosidase (X-Gal, 50 µg/ml) und Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt (40 µg/ml). Das Wachstum der Kolonien auf dieser Agarplatte erfolgte über Nacht bei 37°C.

Tabelle 4: Verwendete Medien für die Klonierungsarbeiten

Medien	Zusammensetzung
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton 1 % NaCl ad 1 l H ₂ O, autoklaviert
LB-Agar	1,5 % Agar ad 1 l LB-Medium
SOB-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,05 % NaCl ad 980 ml H ₂ O autoklaviert
SOC-Medium	1 ml Glucoselösung (2 M) 1 ml 1 M MgCl ₂ , sterilfiltriert ad 100 ml mit SOB-Medium

3.3 BAKTERIENSELEKTION UND -KULTIVIERUNG

Nach dem Wachstum konnten Kolonien über die sogenannte Blau-Weiß-Selektion ausgewählt werden. Das *lacZ*-Gen des pGEM[®]-T-Vektors wird durch das erfolgreiche Insertieren einer DNA-Sequenz in die *Multiple Cloning Site* (MCS) unterbrochen. Nach der Transformation der *E.coli*-Bakterien mit dem Vektor kann die Expression des *lacZ*-Gens durch IPTG induziert werden. Ist das *lacZ*-Gen komplett, kommt es zur Synthese des Enzyms β -Galaktosidase. Das Enzym spaltet das zugefügte X-Gal in einen blauen Farbstoff. Ist das *lacZ*-Gen des pGEM[®]-T Vektors durch ein Insert unterbrochen, wird die β -Galaktosidase nicht synthetisiert. Die Kolonien zeigen dann keine blaue Färbung und haben den Vektor mit Insert erfolgreich aufgenommen. Zudem trägt der Vektor eine Antibiotika-Resistenz, d.h. ausschließlich transformierte Bakterien können wachsen. Mit einem sterilen Holzstäbchen wurden diese einzelnen Kolonien in 8 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika überführt und für 12-16 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Zur Lagerung und späteren Verwendung wurden 750 μ l der Bakterienkultur mit 750 μ l einer 87 %igen sterilen Glycerol-Lösung versetzt und bei -80°C aufbewahrt („Glycerin-Stammkultur“).

3.4 ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER PLASMIDE AUS *E. COLI* JM109

Die Isolierung der Plasmide aus den Bakterienkulturen wurde mit Hilfe des Nucleobond[®] Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Von jeder Bakterien suspension wurden 6 ml zur Plasmidisolierung eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde die Plasmid-DNA nicht mit dem gelieferten Elutionspuffer, sondern mit 50 μ l DEPC-H₂O (Diethylenpyrocarbonat-enthaltendes Wasser) eluiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Um den Klonierungserfolg zu kontrollieren und die Richtigkeit der Vektorinserts zu überprüfen, wurden die Plasmide durch die Fa. GENterprise Genomics (Mainz) sequenziert.

3.5 HERSTELLUNG VON EXPRESSIONSFÄHIGEN KONSTRUKTEN IM pFASTBAC[™]-VEKTOR

Die im pGEM[®]-T Vektor zwischenklonierten Meprin-Gene wurden mit den zuvor eingefügten Schnittstellen aus diesem Zwischenvektor herausgeschnitten. Dazu dienten entsprechende Restriktionsenzyme: *SpeI*, *NcoI*, *BamHI* und *EcoRI* (siehe Abbildung 6). Danach erfolgte die Ligation in den pFastBac[™]1 Vektor (Invitrogen, Mannheim). Im Falle von Meprin α_1 konnte ein pFastBac[™]1-Vektor verwendet werden, der bereits ein Konstrukt aus dem Signalpeptid von humanem Meprin α mit Strep-tag enthielt. Für die Klonierung von Meprin α_2 enthielt der Vektor bereits das Signalpeptid

eines Meprin β/α -Konstruktes sowie einen 6x Histidin-*tag* (HIS-*tag*). Die Amplifikation und Reinigung von pFastBac™1 wurde entsprechend der bereits beschriebenen Methoden durchgeführt (siehe 3.1.1 bis 3.4). Dabei war jedoch die Blau-Weiß-Selektion nicht möglich, da der Vektor pFastBac™1 kein *lacZ*-Gen trägt.

Tabelle 5: Ansatz zur Restriktion von Vektoren

Reagenzien	Volumina
Template DNA	5 μ l
Restriktionsenzym 1 <i>SpeI</i> oder <i>NcoI</i> oder <i>BamHI</i>	0,5 μ l
Restriktionsenzym 2 <i>ecoRI</i> oder <i>SpeI</i>	0,5 μ l
10X Reaktionspuffer	2 μ l
BSA 10 mg/ μ l	0,2 μ l
DEPC-H ₂ O	11,8 μ l
	20 μl

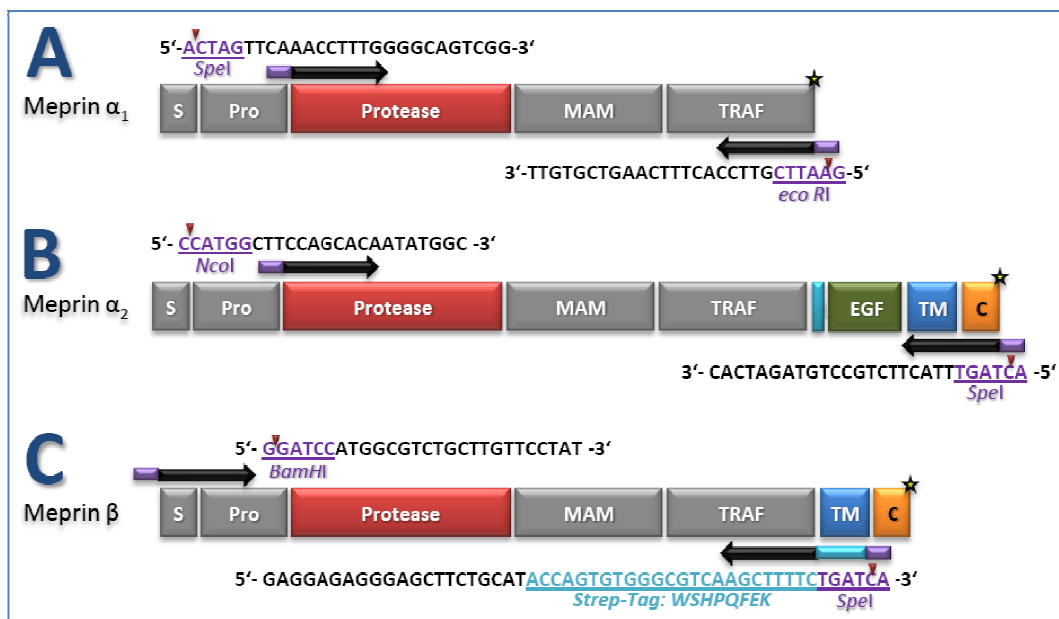


Abbildung 6: Bindungsstellen der Primer (Schwarze Pfeile: forward/reverse) innerhalb der Meprine α_1 (A), α_2 (B) und β (C). Die Sequenzen der Primer tragen Restriktionsschnittstellen für die angegebenen Restriktionsenzyme (violett). In Meprin β (C) wurde zudem ein Strep-*tag* (blau) eingefügt. Die Sterne am C-Terminale Teil der Domänenstruktur symbolisieren vorhandene STOP-Codons.

3.6 TRANSPOSITION UND ISOLIERUNG REKOMBINANTER BACMIDE

Zur Erzeugung rekombinanter Bacmide wurde eine Transposition durchgeführt: Zuerst wurden 100 µl *E.coli* DH10bac-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis aufgetaut und mit 1 ng des pFastBac™1 mit Insert vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz einem Hitzeschock bei 42°C für 45s unterzogen und sofort auf Eis abgekühlt. Dann wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 5 h auf einem Schüttler bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 2000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, welche die Antibiotika Tetracyclin (10 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Gentamycin (8 µg/ml) sowie die Zusätze IPTG (40 µg/ml) und X-Gal (50 µg/ml) enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Selektieren der Kolonien konnten Übernachtskulturen mit 8 ml LB-Medium angesetzt und für 48 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert werden. Die Bacmidisolierung erfolgte anschließend wie unter 3.4 beschrieben.

3.7 TRANSFEKTION, VIRENAMPLIFIKATION UND EXPRESSION IN HIGHFIVE™ INSEKTENZELLEN

Für die Expression wurde das Bac-to-Bac-Expressionssystem (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Hier nutzt man Baculoviren, die in Sf9-Insektenzellen (Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda*) das über Transfektion eingebrachte Bacmid amplifizieren. Hierfür wurde das PAA *Transfection Kit* (PAA Laboratories GmbH; Pasching) nach Herstellerangaben verwendet. 100 µl bzw. 50 µl Bacmid-DNA wurden mit 150 µl bzw. 200 µl NaCl-Lösung vermischt. Parallel wurden 16 µl Nanofectin mit 234 µl NaCl-Lösung versetzt. Beide Lösungen wurden zusammengeführt, mehrmals invertiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Nanofectin-DNA-Gemisch wurde tröpfchenweise dem frischen Vollmedium von zu 80 % konfluenten Sf9-Zellen zugegeben. Nach 72 h Virenamplifikation wurden die Viren bis zum Tertiärstadium jeweils abgenommen und in eine größere Zellkulturflasche (25 cm², 75 cm² und 175 cm²) mit frischem Vollmedium (siehe Tabelle 6) übertragen. Vor der Virenzugabe wuchsen die Sf9-Zellen in diesen Zellkulturflaschen jeweils bei 27°C, bis sie eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. 10 ml der Tertiärviren wurden auf HighFive™-Zellen (Eizellen von *Trichoplusia ni*) gegeben, die das so eingebrachte Gen exprimieren sollten. Auf einem Schüttler bei 260 rpm wurden die HighFive™ Zellen in Expressionsmedium 72 Stunden inkubiert.

Tabelle 6: Medien für die Insekten-Zellkultur

Reagenzien	Zusammensetzung
Vollmedium	50 U/ml Penicillin
„Graces Insect Medium“ (Invitrogen, D-Karlsruhe)	50 Vg/ml Streptomycin
supplementiert	4 mM Glutamin
	10% FCS (Kälberserumalbumin)
Expressionsmedium	50 U/ml Penicillin
„ExpressFive® SFM“	50 Vg/ml Streptomycin
Serumfrei	4 mM Glutamin

Um diese Zellsuspension durch biochemische Analysen (zum Beispiel durch Western-Blots) auf exprimierte Proteine testen zu können, wurden Zell-Lysate hergestellt. Dazu wurde 1 ml Zellsuspension bei 2000 xg 5 min lang zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen und Zentrifugieren konnte das Pellet in 300 µl Lysispuffer 30 min bei 4°C inkubiert werden (siehe Tabelle 7). Anschließend folgte eine Zentrifugation des resuspendierten Pellets bei 13000 xg für 10 min, um Zellreste abzutrennen.

Tabelle 7: Puffer zum Herstellen von Zell-Lysaten

Reagenzien	Zusammensetzung
PBS-Puffer	135 mM NaCl, pH 7,4
	2,7 mM KCl
	9,2 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄
Lysispuffer	1 % Triton X-100 in PBS - Puffer
	1 µM Pepstatin
	1 µM E64
	2 mM Pefabloc

3.8 AMMONIUMSULFATFÄLLUNG UND DIALYSE

Dem HighFive™-Zellkulturmedium wurde nach der Expression langsam Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, bis eine 60%ige Sättigung erreicht wurde. Das Gemisch rührte über Nacht bei 8°C. Hierbei wurden die Meprine und andere Proteine des Mediums ausgefällt. Das Präzipitat wurde bei 4°C und 9000 x g 2 h lang zentrifugiert und in 100 ml Dialysepuffer aufgenommen (siehe Tabelle 8). Durch eine anschließende Dialyse in einem Dialyseschlauch (Visking MVCO 12000-16000, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) über Nacht mit mehrmaligem Pufferwechsel (siehe Tabelle 8) wurde das Ammoniumsulfat aus der Lösung entfernt.

Tabelle 8: Puffer für die Dialyse und Affinitätschromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Dialysepuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ 300 mM NaCl pH 8.0
Auftragspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8.0
Waschpuffer I	Auftragspuffer +20 mM Imidazol
Elutionspuffer I	Auftragspuffer +50 mM Imidazol
Elutionspuffer II	Auftragspuffer +100 mM Imidazol

3.9 REINIGUNG DES REKOMBINANTEN PROTEINS PER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Durch das Einbringen einer „Markierung“ (*tag*) durch sechs Histidine (*HIS-tag*) während der Klonierung konnte Meprin α_2 spezifisch aus dem Dialysat isoliert werden. Dies wurde durch die Verwendung eines Nickel-Nitrilo-Triessigsäure (Ni-NTA)-Materials erreicht. Bei der Inkubation des Dialysats mit Ni-NTA über Nacht kommt es zur Chelat-Bildung der Histidine mit dem Nickelion. Die Säule wurde zunächst mit dem Auftragspuffer equilibriert, anschließend mit 100 ml Waschpuffer gewa-

schen, damit nicht gewünschte Proteine von der Säule entfernt wurden. Um das Zielprotein von der Säule zu eluieren, wurde der Auftragspuffer mit einer steigenden Imidazolkonzentration (20, 50 und 100 mM) versetzt. Dabei konkurriert das Imidazol mit den Histidinen des *tags* und löst so das Protein von der Ni-NTA Matrix. Es wurden vom Auftragen des Waschpuffers an jeweils Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml aufgefangen, die photometrisch auf den Proteingehalt ($\lambda=280$ nm) überprüft wurden. Das Eluat sollte das gewünschte Protein hochrein enthalten.

3.10 INJEKTION DER MORPHOLINOS UND BESTIMMUNG DER INJEKTIONSVOLUMINA

Zur Verwendung als „Embryohalter“ wurden 1,5 % Agarose in „Zebrafish Embryonalmedium E3“ (KANE, KIMMEL 1993) (20 ml) in einer Petrischale ausgegossen und mit einem speziellen Stempel versehen. Mit Hilfe dieses Stempels wurden 1 mm schmale Furchen in die ausgehärtete Agaroseplatte eingebracht, um die Eier des Zebrafischarbblings aufzureihen. Dann wurde die Injektionskapillare (Eppendorf Femtotips® II, Eppendorf, Hamburg) per Mikroloader®-Pipettenspitzen mit 2 μ l Morpholino-Lösung (1 mM) beladen, am Mikromanipulator (Märzhäuser, Wetzlar) angebracht und an den Kompressor (Transjector 5246, Eppendorf, Hamburg) angeschlossen.

Tabelle 9: Embryonalmedium für die Mikro-injektion und Haltung der injizierten Embryonen

Medium	Zusammensetzung
E3-Medium	15,00 mM NaCl
	0,50 mM KCl
	0,05 mM Na ₂ HPO ₄
	0,15 mM KH ₂ PO ₄
	1,00 mM CaCl ₂
	0,70 mM NaHCO ₃
	+ 0,002% (v/v) Methylenblau

Die Kapillare wurde dann bis zur Zygote (im Einzell- oder Zweizellstadium; siehe 2.4) herangefahren, dort eingestochen und der Injektionsvorgang gestartet. Überprüft wurde die Injektion direkt durch die Fluoreszenz-Einrichtung des Mikroskops (Leica DM IRBE; Leica Microsystems, Wetzlar), da die Morpholinos einen Fluorescein-*tag* besitzen. Dies führte zu einer sichtbaren Verteilung der Morpholino-Lösung in der Zelle. Die Anregungswellenlänge von Fluorescein beträgt: $\lambda_A = 495$ nm, die Emissionswellenlänge $\lambda_E = 517$ nm. Einstellungen für den Kompensationsdruck P_c zum Ausgleich der Kapillarwirkung waren $P_c = 30$ hPa, für den Injektionsdruck $P_i = 1500$ hPa. Das Injektionsvolumen

wurde über die Dauer t_i der Injektion beeinflusst. Die Bestimmung des Injektionsvolumens geschah durch die Injektion der Morpholino-Lösung (oder Wasser) in Mineralöl. Dadurch formte sich eine fast ideale Kugel, deren Durchmesser mit einem Objektiv-Mikrometer unter dem Mikroskop gemessen wird. Aus der Formel für das Volumen einer Kugel ließ sich das Injektionsvolumen berechnen (siehe Abbildung 7).

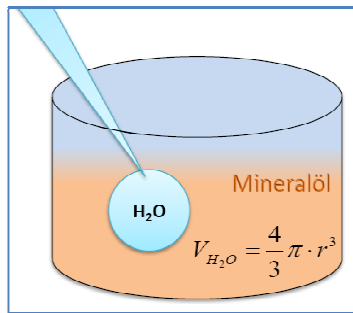


Abbildung 7: Injektion von Wasser in Mineralöl zur Bestimmung des Injektionsvolumens. Die Formel beschreibt das Volumen der wassergefüllten Kugel.

Bei der Verwendung baugleicher Kapillare und einheitlichen Injektionsparametern (Druck, Zeit) sind diese Daten für weitere Injektionsvorgänge verwendbar. Das Diagramm zeigt die Eichgerade einer Volumenbestimmung (siehe Abbildung 8).

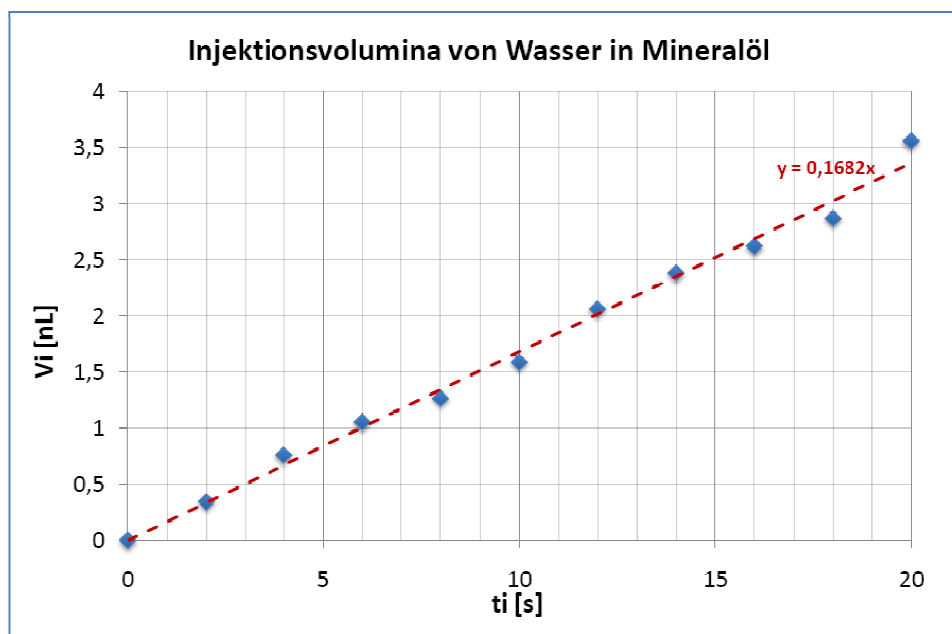


Abbildung 8: Eichgerade der Injektion von Wasser in Mineralöl zur Bestimmung des Injektionsvolumens. Die Ordinate zeigt das injizierte Volumen V_i , aufgetragen gegen die Injektionszeit t_i (auf der Abszisse). Mit Hilfe der Steigung lässt sich die Eichgerade berechnen ($y=0,1682x$).

Zur weiteren Beobachtung und Entwicklung wurden die Eizellen nach der Injektion auf 96-well-Mikrotiterplatten übertragen. Sie wurden in 200 μ l Embryonalmedium E3 pro well bei $T=27^\circ\text{C}$ bis nach dem Schlüpfvorgang gelagert.

4 ERGEBNISSE

Dieser Teil der Arbeit fasst alle Ergebnisse aus den drei Veröffentlichungen (siehe 8.1, 8.2 und 8.3) zusammen.

4.1 NACHWEIS DER MEPRINE IN *DANIO RERIO*

Beim Zebra­bärbling *Danio rerio* wurden die Meprine auf genetischer und auf Proteinebene nachgewiesen (SCHÜTTE ET AL. 2007). Durch bioinformatische Methoden und Datenbankanalysen konnten – im Gegensatz zu den bisher beschriebenen zwei Meprin-Proteasen der Säugetiere – drei individuelle Enzyme beim Zebra­bärbling identifiziert werden. Bei *Danio rerio* existieren zwei auf Aminosäuresequenzebene zu etwa 48 % identische α -Enzyme (α_1 und α_2) und eine β -Variante. Alle Astacin-typischen Merkmale (Zinkbindemotiv und Methionin-*turn*) sind in den Sequenzen zu finden (siehe 2.1). Bemerkenswert ist, dass alle drei Gene kolokalisiert auf dem Chromosom 20 des Zebra­bärblings vorkommen, während die Meprin-Gene der Säugetiere auf unterschiedlichen Chromosomen liegen. Durch den Vergleich der konservierten Sequenz der katalytischen Domäne mit dazu homologen Sequenzen anderer Tierarten konnten Verwandtschaftsverhältnisse ermittelt werden. Die statistische Anzahl identischer und ähnlicher Aminosäuren lieferte dabei die Grundlage für eine evolutive Einordnung und diente somit der phylogenetischen Stammbaumerstellung. Dabei zeigte sich, dass sich die Meprine des Zebra­bärblings entwicklungs­geschichtlich frühzeitig von den homologen Proteasen der Säugetiere getrennt haben (SCHÜTTE ET AL. 2007).

In dreidimensionalen Strukturmodellen, die auf der Röntgenkristallstruktur von Astacin aus dem Flusskreb­ basieren, wurde deutlich, dass sich die Meprine von *Danio rerio* und den Säugern in charakteristischen basischen und sauren Aminosäuren am aktiven Zentrum unterscheiden. Diese Unterschiede beeinflussen möglicherweise die Spezifität der Substratbindung.

Der Nachweis der Meprine gelang für diverse Organe und Gewebe des Fisches zum einen durch die Analyse der *messenger* RNA (mRNA) und zum anderen auf Proteinebene in histologischen Schnittpräparaten durch Antikörper.

Zur Analyse auf RNA-Ebene wurde die Methode der RT-PCR, der reversen Transkription der mRNA in den komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR), herangezogen. Mit Hilfe der aus einzelnen Organen isolierten mRNA konnten unter anderem Darm, Niere, Leber, Kiemen, Gehirn und Epidermis als Meprin-exprimierende Organe identifiziert werden.

Zur Detektion der Meprine auf Proteinebene dienten zunächst Antikörper, die gegen Epitope in der Proteasedomäne von humanen Meprin-Untereinheiten gerichtet sind. Aufgrund der Homologie dieser Domäne zu den menschlichen Meprinen eigneten sich diese Antikörper auch zur Erkennung der Meprine des Zebra­bärblings. Auf Schnittpräparaten des Fisches lieferten sie Hinweise auf die Expres-

sion dieser Metalloproteasen in bestimmten Organen (Darm, Epidermis, (Kopf-)Niere, Kiemen), jedoch war eine Differenzierung der drei Enzyme durch diese Antikörper beim Zebrafärbliug vorerst nicht möglich. Im Verlauf der Promotionsarbeit konnten Peptid-Antikörper generiert werden, die spezifisch die einzelnen Meprin-Untereinheiten detektieren (siehe 4.3 SCHÜTTE *ET AL.* 2009).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen resultierten in einem Artikel mit dem Titel „*Two alpha and one beta subunits of the zinc-endopeptidase meprin are differentially expressed in the zebrafish Danio rerio*“, erschienen im Mai 2007 im Journal „Biological Chemistry“ des Verlags Walter de Gruyter (SCHÜTTE *ET AL.* 2007) (siehe 8.1). Erwähnenswert ist, dass der Verlag die Autoren aufforderte, ein Foto zur Gestaltung der Titelseite der Ausgabe zu liefern. Das Bild zeigt Zebrafärbliuge in ihrem natürlichen Habitat (siehe Abbildung 9).

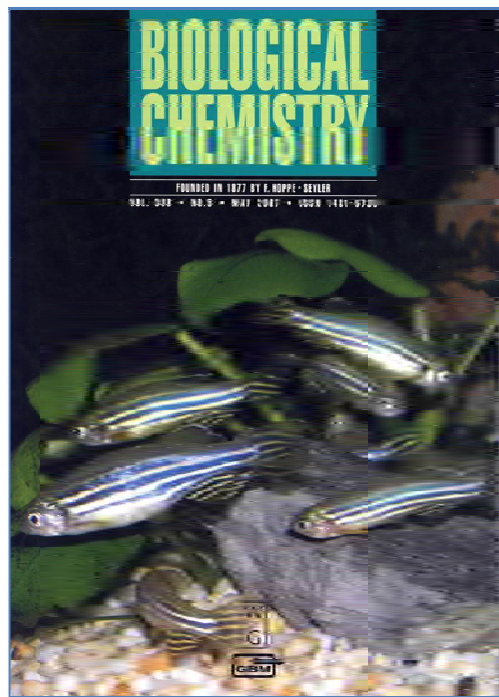


Abbildung 9: Titelbild des Journals „Biological Chemistry“, Ausgabe 388, Mai 2007. (Foto: Schüttele, A.; Becker-Pauly, C. und Stöcker, W.)

4.2 PHYLOGENETISCHE ANALYSEN UND INTRAMOLEKULARE INTERAKTIONEN DER MEPRINE

Die zufällige Entdeckung zweier Astacin-ähnlichen cDNA-Sequenzen im Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* stellte sich als Glücksfall heraus. Mit Hilfe dieses „lebenden Fossils“, das sich seit etwa 450 Millionen Jahren kaum verändert hat, lässt sich die phylogenetische Entwicklung und die Beziehung der Astacine, insbesondere der Meprine, rekonstruieren. Die „*Limulus*-Astacine“ (LAST und LAST_MAM, *Accession numbers* siehe 8.11) bestehen aus einem Propeptid und einer katalytischen Domäne, jedoch trägt ein Enzym zusätzlich eine MAM-Domäne, die Homologien zu den entsprechenden Domänen der Meprine aufweist (LAST_MAM). Auf mRNA- und Proteinebene konnte Letzteres (LAST_MAM) im Pfeilschwanzkrebs ubiquitär nachgewiesen werden, während die Expression von LAST auf das Nervensystem (Auge, Hirn) beschränkt war. Nach der Expression der beiden rekombinanten *Limulus*-Astacine in heterologen eukaryotischen Systemen wurden weitere biochemische Analysen wie Gelatin-Zymographien, Azocasein-Aktivitätsassays, Western Blots und N-terminaler Sequenzierung, durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass LAST_MAM sogar in seiner zymogenen Form aktiv ist. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur zwei Vertreter der Metzinkine (MMP-2 und MMP-9) bekannt, die ohne eine vorherige Aktivierung (zum Beispiel durch Trypsin; siehe 2.1) ihre proteolytische Funktion wahrnehmen konnten. Die Inkubation von LAST_MAM mit Trypsin führte nicht in erster Linie zur erwarteten Abspaltung des Propeptids, sondern ließ auf eine Schnittstelle in der Linker-Region zwischen Protease- und MAM-Domäne schließen. Diese Region beinhaltet eine Prolin-reiche Sequenz (4x Pro) in Form einer α -Helix, C-terminal davon die mögliche Trypsin-Schnittstelle (Lys254), welche inzwischen durch N-terminale Sequenzierung belegt wurde (Becker-Pauly *et al.*, unveröffentlicht). Aus diesen Resultaten lässt sich entnehmen, dass das Propeptid von LAST_MAM seine eigentliche Funktion, proteolytische Aktivität zu inhibieren, nicht mehr besitzt. Weiterhin konnte die Aktivität beider Astacin-Proteasen des Cheliceraten durch Inhibitoren, die generell Astacine hemmen (Actinonin, Prolin-Leucin-Glutamat-Hydroxamat (PLG-NHOH) oder α_2 -Makroglobulin), reduziert werden. Diese Ergebnisse weisen auf die korrekte Faltung der Proteine nach der Biosynthese im heterologen Insektenzell-Expressionssystem hin.

Der Hauptanteil meiner Arbeit am *Limulus*-Projekt war die Erstellung und Interpretation der phylogenetischen Berechnungen anhand bioinformatischer Methoden, die 3D-Modellierung der Proteasedomäne sowie der MAM-Domäne aufgrund der Kristallstruktur von der Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase μ . Die Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Daten der humanen Meprine verglichen. Im Rahmen dieser phylogenetischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die MAM-Domänen bzw. die Protease-Domänen der Astacine kein gemeinsames Vorläufermolekül besitzen und somit eine unabhängige evolutive Entwicklung erfahren haben. Die Meprine hingegen scheinen sich anders evolviert zu haben.

Demnach ist Meprin α aus einem gemeinsamen β -Vorgänger entstanden. Darauf deutet auch die zusätzliche „*inserted*“-Domäne in Meprin α hin. Die Modellierungen aufgrund der mittlerweile verfügbaren Kristallstruktur einer MAM-Domäne (der Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase μ , RPTP μ) brachte neue Hinweise zur intramolekularen Interaktion dieses Moduls bei den Meprinen. Typisch für diese Domänen sind vier Cysteine, die zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Im Gegensatz zu anderen Astacinen mit MAM-Domäne besitzen die Meprine aber ein zusätzliches freies Cystein. Berücksichtigt man, dass RPTP μ Zelladhäsionen durch *trans*-Dimerisierungen vermittelt, und dass Meprine dazu neigen, Dimere oder höhere oligomere Formen zu bilden, ist dieses freie Cystein möglicherweise für intermolekulare Interaktionen verantwortlich, indem es mit dem freien Cystein einer weiteren MAM-Domäne eine Disulfidbrücke bildet. LAST_MAM hingegen bildet unter nicht-reduzierenden Bedingungen (in der SDS-Gelelektrophorese) keine Oligomere, sodass die Domänen nicht allein durch kovalente Bindungen zu interagieren scheinen. MAM-Domänen können demnach auf mehrere unterschiedliche Arten Wechselwirkungen eingehen, wie auch für RPTP μ beschrieben. Während diese Domänen bei den Meprinen wahrscheinlich primär strukturelle Funktionen haben, könnten sie bei den anderen Astacinen an der Substraterkennung beteiligt sein.

Die Identifizierung der beiden Astacine beim Pfeilschwanzkrebs erbrachte neue Hinweise auf die besonderen Funktionen dieser Proteasen, insbesondere im Hinblick auf die abweichende Evolution der Astacine mit MAM-Domäne. Ein Artikel dazu erschien 2009 im *Journal of Molecular Biology* unter dem Titel „*News from an Ancient World: Two novel Astacin metalloproteases from the horseshoe crab*“ (BECKER-PAULY ET AL. 2009).

4.3 ‚KNOCKDOWN‘ DER MEPRINE DURCH MORPHOLINOS

Die Ergebnisse des Hauptprojektes dieser Promotionsarbeit wurden in einem Manuskript zusammengefasst, das zur Veröffentlichung eingereicht wurde (SCHÜTTE *ET AL.* 2009). Diese Resultate umfassen die Identifizierung der einzelnen Meprine des Zebrafisches durch spezifische Peptidantikörper und die Reduzierung des Expressionslevels dieser Proteasen durch die Injektion von Morpholinos *in vivo*. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten die drei Meprine differenziert in den Organen des Zebrafisches nachgewiesen werden. Während Meprin α_1 und β hauptsächlich kolokalisiert in den Darmepithelien und der Epidermis gefunden wurde, konnte Meprin α_2 ausschließlich in der *Lamina propria* des Darmes identifiziert werden.

Durch die Injektion von spezifischen Morpholino-Oligonukleotiden kann die Translation der Meprine reduziert werden. Die Injektion von Meprin α_1 -Morpholinos offenbarte Defekte an 44% der sich entwickelnden Zebrafisch-Embryonen, zum Beispiel Dilatationen des Perikards. Das Fehlen von Meprin β hingegen zeigte sehr deutliche Auswirkungen bei einem Großteil (66%) der injizierten Embryonen: Hier war die Differenzierung des Rumpf- und Schwanzgewebes gestört und so gut wie nicht ausgeprägt. Die Tiere waren zunächst lebensfähig, starben aber bereits in den ersten 24 Stunden nach der Befruchtung.

Die interessantesten Auswirkungen wurden nach der Injektion von Morpholinos gegen Meprin α_2 sichtbar. Hier zeigte sich in 52% der injizierten Embryonen eine unzulängliche, fehlerhafte epidermale Differenzierung im Rumpf- und Schwanzbereich des Embryos. Dabei kam es zu erheblichen Deformationen des Caudalbereichs. Zum Teil wurden in dem Bereich Ansammlungen von Erythrozyten beobachtet, die auf Defekte im Vaskularsystem deuten. Zudem wurde bei diesen Tieren eine Verlangsamung des Blutflusses bis hin zum Stillstand beobachtet. Um dieses weiter zu analysieren, wurde eine Mikroangiographie bei 48 hpf (*hours post fertilization*) alten Embryonen durchgeführt. Dazu wurde das Fluorophor Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) in die Blutgefäße von Wildtyp und Morphanten injiziert. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Fischen hatten sich bei den Meprin α_2 -Morphanten keine intersegmentalen Blutgefäße ausgebildet, sondern es existierte ausschließlich das Haupt-Blutgefäß: die dorsale Aorta, die in die caudale Aorta, dann in die Caudalvene übergeht. Folglich muss die Reduzierung der Expression von Meprin α_2 deutliche Auswirkungen auf die Entwicklung des Kardiovaskularsystems haben.

Einer der Hauptfaktoren, die für die Bildung des Blutgefäßsystems (Angiogenese) verantwortlich sind, ist das Cytokin *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A) (siehe 2.5). Um diesen Anhaltspunkt weiter zu studieren, wurde rekombinantes humanes Meprin α und β mit rekombinantem humanem VEGF-A₁₆₅ inkubiert, und mittels Western-Blot analysiert. In einer Zeitreihe konnte gezeigt werden, dass sowohl Meprin α als auch β in der Lage sind, VEGF-A an unterschiedlichen Stellen zu prozessieren.

Letztendlich kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass Meprin α_2 des Zebrafisches, genau wie humanes Meprin α und β , die Angiogenese durch eine Aktivierung des Wachstumsfaktors VEGF-A stimuliert und für die Entwicklung des Vaskularsystems mitverantwortlich ist.

4.4 WEITERE ERGEBNISSE

4.4.1 ISOLIERUNG DER DREI MEPRINE UND KLONIERUNG IN DEN EXPRESSIONSVEKTOR pFASTBAC™1

Zur heterologen Expression in Insektenzellen wurden die Gene der drei Meprine des Zebrafisches in den pFastBac™1-Vektor inseriert. Dabei konnte auf verfügbare pFastBac™1-Konstrukte mit humanen Meprin-Genen zurückgegriffen werden, die einen HIS- oder Strep-*tag* besaßen (Meprin α HIS und Meprin β Strep). Die Klonierungsstrategie war, bereits vorhandene Signalpeptide mit entsprechendem *tag* dieser Konstrukte zu verwenden, um die Enzyme des Zebrafisches klonieren und exprimieren zu können. Die Vektoren mit humanen Meprin-Konstrukten enthielten bereits entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme, mit deren Hilfe die gewünschte cDNA an der passenden Position nach der Sequenz für das Signalpeptid inseriert werden konnte (siehe Plasmidkarten 8.8, 8.9 und 8.10).

Meprin α_1 sollte in das Konstrukt mit humanem Meprin α und STREP-*tag* eingefügt werden. Dies wurde mit Hilfe der *EcoRI*- und *SpeI*-Schnittstelle erreicht. Für Meprin α_2 hingegen konnte ein Plasmid mit der sogenannten „*tailswitch*“-Mutante des humanen Meprin α und β verwendet werden, das am Propeptid einen 6x HIS-*tag* enthielt. Hierfür waren die Schnittstellen *NcoI* und *SpeI* geeignet. Zum Einfügen von Meprin β des Zebrafisches wurde ein pFastBac™1-Vektor verwendet, der noch keine verfügbaren Konstrukte enthielt. Damit das Protein nach der Expression ins Medium sekretiert wird, wurde die cDNA von Meprin β ohne die Sequenzen für die Transmembran- und Cytoplasmatische Domäne in den Vektor eingefügt. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen (*BamHI* und *SpeI*) der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors verwendet und beim einzubringenden Gen ein Strep-*tag* über Primer eingefügt.

Das Einbringen der Gene von Meprin α_2 und β in den entsprechenden pFastBac™1-Vektor war erfolgreich. Meprin α_1 konnte zwar in den pFastBac™1-Vektor kloniert werden, ließ sich aber nicht in das Bacmid zur Virenreplikation einbauen.

4.4.2 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG VON MEPRIN α_2

In dieser Arbeit wurde die Expression von Meprin α_2 bis zur Reinigung durchgeführt. Nach der Expression in heterologen HighFive®-Insektenzellen konnte das Protein mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert werden. Hierfür wurde ein Wasch- und Elutionsprofil erstellt (siehe Abbildung 10).

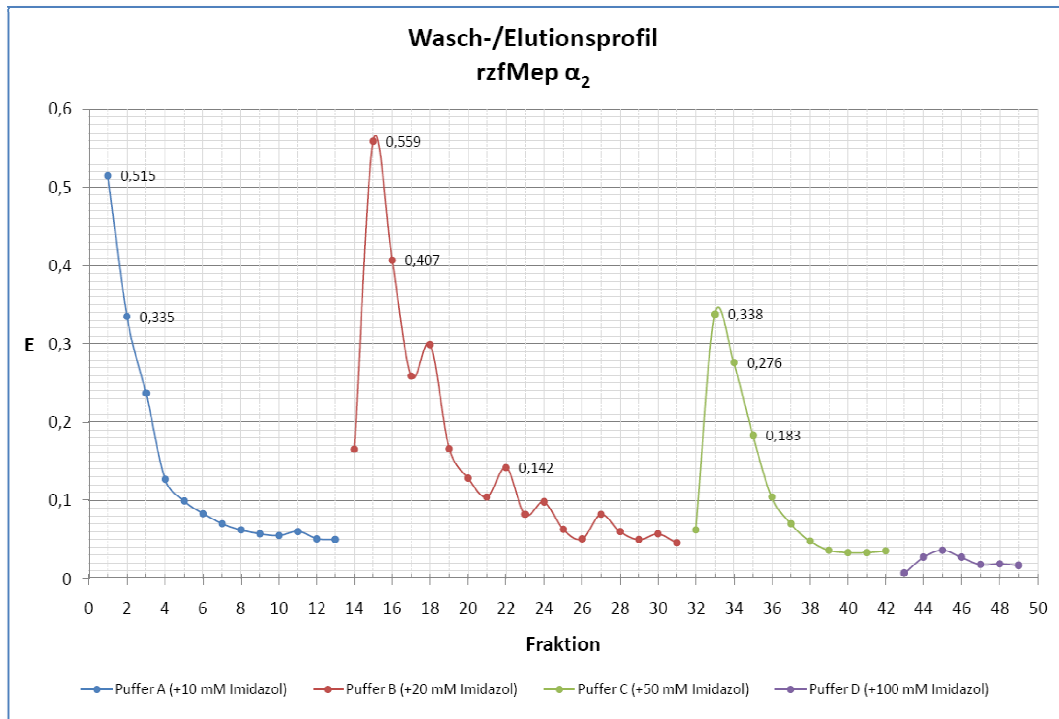


Abbildung 10: Wasch- und Elutionsprofil der Affinitätschromatographischen Reinigung von rekombinantem Zebrafisch (zrf)-Meprin α_2 . Auf der X-Achse ist die Anzahl der Fraktionen (V=2 ml) aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Werte der Extinktion bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen.

Das Elutionsprofil zeigt den höchsten photometrisch bestimmten Wert ($E_{280\text{ nm}}=0,559$) in Fraktion 15. Das deutet auf die erfolgreiche Reinigung von Meprin α_2 hin. In einem Western-Blot wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern (anti-HIS-tag und anti-zfMep α_2) eine Bande detektiert (bei ca. 95 kDa, lanes 3,4,6), die das gewünschte Produkt (zfMeprin α_2 mit His-tag) nachweist (siehe Abbildung 11). Zur Kontrolle wurden hier die Zell-Überstände der Tertiärviren sowie humanes Meprin β (83 kDa, lane 5) aufgetragen.

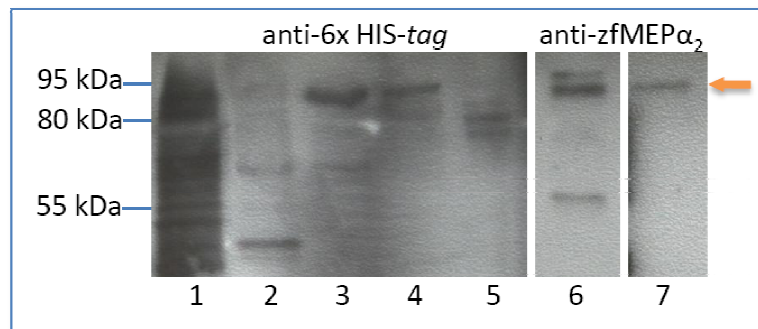


Abbildung 11: Western Blot mit Antikörpern gegen den HIS-Tag sowie Meprin α_2 . Lane 1 zeigt die Zellüberstände der Tertiärviren, lane 2 eine Waschfraktion, lanes 3 und 4 die Fraktionen mit den höchsten photometrischen Werten aus der Elution mit 20 mM Imidazol (3) und mit 50 mM Imidazol (4). Eine Kontrolle (humanes Meprin β) ist in lane 5 aufgetragen. Meprin α_2 konnte durch die Verwendung des Anti-zfMeprin α_2 -Antikörpers in den Zellüberständen der Tertiärviren (6) und in der Elution mit 20 mM Imidazol (7) nachgewiesen werden.

Wie man dem Elutionsprofil und dem Western Blot entnehmen kann, ist das Protein bereits bei der Zugabe von 20 mM Imidazol eluiert worden. Um dieses rekombinant produzierte Enzym für biochemische Analysen nutzen zu können, muss sich der Reinigung eine Aktivierung (zum Beispiel mit Trypsin) anschließen. Somit steht für zukünftige biochemische Arbeiten ein erfolgreich etabliertes System zur Expression von Meprin α_2 aus dem Zebrabärbling zur Verfügung.

5 DISKUSSION

Die Expression der Meprine im Zebraabrling und die Ergebnisse der Morpholino-*knockdowns* weisen auf wichtige Rollen dieser Enzyme in Gewebsdifferenzierung, der Immunreaktionen und der Angiogenese hin. Meprin α und β sind beispielsweise in der humanen Epidermis in unterschiedlichen Schichten vorhanden. Dort besitzen sie unterschiedliche Funktionen: Während Meprin β apoptotisch wirkt, hat Meprin α in der Basalschicht eine proliferative Aufgabe (BECKER-PAULY *ET AL.* 2007). Auch im Zebraabrling sind für die Meprine unterschiedliche Rollen wahrscheinlich, wie auch der *knockdown* von Meprin α_1 und β in Zebraabrling-Embryonen zeigt. Werden Morpholinos injiziert, die eine Translation von Meprin α_1 inhibieren, kommt es zu sichtbaren Effekten wie Erweiterungen des Perikards oder Defekte in der Gewebsdifferenzierung des Rumpfes. Meprin β -reduzierte Embryonen bilden kein differenziertes Gewebe in Rumpf- und Schwanzregion aus und sterben schon innerhalb der ersten 24 hpf (*hours post fertilization*). Diese drastischen Defekte lassen sich durch die fehlende Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie bspw. IL-18 oder IL-1 β (BANERJEE, BOND 2008; HERZOG *ET AL.* 2005), erklären.

Werden jedoch Morpholinos gegen Meprin α_2 in den Embryo eingebracht, kommt es in vielen Fällen zur Ausbildung von erheblichen epidermalen Defekten, gerade im Bereich der Schwanzflosse. In vielen Fällen treten dabei sogar Ansammlungen von Erythrozyten auf, die auf Defekte des Blutgefäßsystems hinweisen. Fehlt Meprin α_2 , entwickelt sich in den Embryonen (48 hpf) kein ausgeprägtes vasculäres System, es werden beispielsweise keine intersegmentalen Gefäße ausgebildet, wie die Mikroangiographie zeigt. Interessanterweise wird Meprin α_2 hauptsächlich in der *Lamina propria* exprimiert, die von Blutgefäßen, also Endothelzellen durchzogen wird. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Meprin α_2 ein möglicher Kandidat zur Aktivierung von gefäßbildenden Faktoren ist. Zudem wurde bereits in einem sogenannten „*Aortic Ring assay*“ demonstriert, dass humanes Meprin α in der Lage ist, pro-angiogenetisch zu wirken: Dabei wurden Teile einer Rattenaorta mit der rekombinanten Protease inkubiert und beobachtet, dass sich weitere Blutgefäße in ihrer Peripherie ausbilden (persönliche Mitteilung Daniel Lottaz, Universität Bern, Schweiz).

Einer der für die Angiogenese verantwortlichen Wachstumsfaktoren ist VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*), der tatsächlich von humanem Meprin α und β *in vitro* gespalten wird. Dabei entstehen unterschiedliche Fragmente, die auf verschiedene Spaltstellen der beiden Metalloproteasen hindeuten. Darüber hinaus konnte VEGF-A mittels massenspektrometrisch basierter Methoden bereits als Substrat für humanes Meprin α identifiziert werden (persönliche Mitteilung Christoph Becker-Pauly, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). So könnte beispielsweise auch der C-terminale Teil von VEGF-A₁₆₅ von der Prozessierung betroffen sein. Eine Isoform von VEGF-A₁₆₅ (VEGF-A_{165b}), die

sich in 8 Aminosäuren C-terminal unterscheidet, bewirkt die Inhibierung der Angiogenese (VAREY *ET AL.* 2008; HARPER, BATES 2008). Würde dieser Teil von Meprin abgespalten, könnte das resultierende Protein wiederum die Angiogenese stimulieren. Hier müssen sich weitere Studien anschließen, um die genauen Prozessierungsschnittstellen zu identifizieren und Details bezüglich der Effekte von Meprin-prozessiertem VEGF-A auf die Angiogenese zu analysieren.

6 AUSBLICK

Alle Untersuchungen an den Meprinen des Zebrafisches unterstreichen deutlich die Signifikanz dieser Proteasen in essentiellen biologischen Prozessen. Dass die Funktionen durchaus hohe medizinische Relevanz aufweisen, zeigen die Studien zur Angiogenese. Für die weitere Charakterisierung dieser Enzyme sind die rekombinanten Proteine aus dem Zebrafisch hilfreich. Meprin α_2 konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits in heterologen Zellsystemen exprimiert werden, während die Expression von Meprin α_1 und β durch Klonierungsarbeiten vorbereitet wurde.

2008 startete zudem ein Projekt, finanziert durch ein EUFP7-Programm, um die Rolle der Meprine in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der *inflammatory bowel disease* (IBD), Morbus Crohn (MC) oder *ulcerative Kolitis* (UC) zu erforschen. Im Rahmen dieses Programms nimmt auch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stöcker und Dr. Christoph Becker-Pauly (Institut für Zoologie, Universität Mainz) durch die Untersuchungen am Beispiel des Zebrafisches teil. Hierbei soll ein Modell für die erwähnten Darmkrankheiten im Zebrafisch entworfen und etabliert werden. Nach abgeschlossener Promotion werde ich dieses Projekt als Wissenschaftlicher Mitarbeiter angehen. Dabei wird natürlich das im Rahmen dieser Arbeit erworbene *know-how* sehr hilfreich sein.

7 LITERATURLISTE

- BANERJEE, S.; ONEDA, B.; YAP, L. M.; JEWELL, D. P.; MATTERS, G. L.; FITZPATRICK, L. R. *ET AL.* (2009): MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. In: *Mucosal immunology*. Online verfügbar unter doi:10.1038/mi.2009.3.
- BANERJEE, S.; BOND, J. S. (2008): Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 283, H. 46, S. 31371–31377. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M802814200.
- BECKER, C.; KRUSE, M.-N.; SLOTTY, K. A.; KÖHLER, D.; HARRIS, J. R.; RÖSMANN, S. *ET AL.* (2003): Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. In: *Biological chemistry*, Jg. 384, H. 5, S. 825–831.
- BECKER-PAULY, C.; BRUNS, B.; DAMM, O.; SCHÜTTE, A.; HAMMOUTI, K.; BURMESTER, T.; STÖCKER, W. (2009): News from an Ancient World: Two Novel Astacin Metalloproteases from the Horseshoe Crab. In: *Journal of molecular biology*, Jg. 385, H. 1, S. 236–248. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jmb.2008.10.062.
- BECKER-PAULY, C.; HÖWEL, M.; WALKER, T.; VLAD, A.; AUFENVENNE, K.; OJI, V. *ET AL.* (2007): The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. In: *The Journal of investigative dermatology*, Jg. 127, H. 5, S. 1115–1125. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.jid.5700675.
- BERTENSHAW, G. P.; TURK, B. E.; HUBBARD, S. J.; MATTERS, G. L.; BYLANDER, J. E.; CRISMAN, J. M. *ET AL.* (2001): Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 276, H. 16, S. 13248–13255. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M011414200.
- BERTENSHAW, G. P.; NORCUM, M. T.; BOND, J. S. (2003): Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 278, H. 4, S. 2522–2532. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M208808200.
- BEYNON, R. J.; SHANNON, J. D.; BOND, J. S. (1981): Purification and characterization of a metalloendoprotease from mouse kidney. In: *The Biochemical journal*, Jg. 199, H. 3, S. 591–598.
- BUTLER, P. E.; BOND, J. S. (1988): A latent proteinase in mouse kidney membranes. Characterization and relationship to meprin. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 263, H. 26, S. 13419–13426.
- CARMELIET, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. In: *Nature medicine*, Jg. 9, H. 6, S. 653–660. Online verfügbar unter doi:10.1038/nm0603-653.
- CRISMAN, J. M.; ZHANG, B.; NORMAN, L. P.; BOND, J. S. (2004): Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 172, H. 7, S. 4510–4519.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature*, Jg. 391, H. 6669, S. 806–811. Online verfügbar unter doi:10.1038/35888.
-

- GOMIS-RÜTH, F. X. (2003): Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. In: *Molecular biotechnology*, Jg. 24, H. 2, S. 157–202. Online verfügbar unter doi:10.1385/MB:24:2:157.
- GONG, B.; LIANG, D.; CHEW, T.-G.; GE, R. (2004): Characterization of the zebrafish vascular endothelial growth factor A gene: comparison with vegf-A genes in mammals and Fugu. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1676, H. 1, S. 33–40.
- GORBEA, C. M.; FLANNERY, A. V.; BOND, J. S. (1991): Homo- and heterotetrameric forms of the membrane-bound metalloendopeptidases meprin A and B. In: *Archives of biochemistry and biophysics*, Jg. 290, H. 2, S. 549–553.
- HARPER, S. J.; BATES, D. O. (2008): VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 8, H. 11, S. 880–887. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc2505.
- HERZOG, C.; KAUSHAL, G. P.; HAUN, R. S. (2005): Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. In: *Cytokine*, Jg. 31, H. 5, S. 394–403. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cyto.2005.06.012.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. (2005): Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 23, H. 5, S. 1011–1027. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- HOLMBERG, A.; SCHWERTE, T.; PELSTER, B.; HOLMGREN, S. (2004): Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. In: *The Journal of experimental biology*, Jg. 207, H. Pt 23, S. 4085–4094. Online verfügbar unter doi:10.1242/jeb.01260.
- KANE, D. A.; KIMMEL, C. B. (1993): The zebrafish midblastula transition. In: *Development (Cambridge, England)*, Jg. 119, H. 2, S. 447–456.
- KEYT, B. A.; NGUYEN, H. V.; BERLEAU, L. T.; DUARTE, C. M.; PARK, J.; CHEN, H.; FERRARA, N. (1996): Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 271, H. 10, S. 5638–5646.
- KUMAR, J. M.; BOND, J. S. (2001): Developmental expression of meprin metalloprotease subunits in ICR and C3H/He mouse kidney and intestine in the embryo, postnatally and after weaning. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1518, H. 1-2, S. 106–114.
- LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G.; SIRE, J.-Y. (2004): Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). In: *The International journal of developmental biology*, Jg. 48, H. 2-3, S. 217–231. Online verfügbar unter doi:10.1387/ijdb.031768dg.
- LIANG, D.; CHANG, J. R.; CHIN, A. J.; SMITH, A.; KELLY, C.; WEINBERG, E. S.; GE, R. (2001): The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. In: *Mechanisms of development*, Jg. 108, H. 1-2, S. 29–43.
- LIANG, D.; XU, X.; CHIN, A. J.; BALASUBRAMANIYAN, N. V.; TEO, M. A.; LAM, T. J. *ET AL.* (1998): Cloning and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) from zebrafish, *Danio rerio*. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1397, H. 1, S. 14–20.
-

- LOTTAZ, D.; MAURER, C. A.; HAHN, D.; BÜCHLER, M. W.; STERCHI, E. E. (1999): Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. In: *Cancer research*, Jg. 59, H. 5, S. 1127–1133.
- MOULTON, J. D.; YAN, Y.-L. (2008): Using Morpholinos to control gene expression. In: *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.], Jg. Chapter 26, S. Unit 26.8. Online verfügbar unter doi:10.1002/0471142727.mb2608s83.
- NASEVICIUS, A.; EKKER, S. C. (2000): Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. In: *Nature genetics*, Jg. 26, H. 2, S. 216–220. Online verfügbar unter doi:10.1038/79951.
- NASEVICIUS, A.; LARSON, J.; EKKER, S. C. (2000): Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant. In: *Yeast (Chichester, England)*, Jg. 17, H. 4, S. 294–301. Online verfügbar unter doi:10.1002/1097-0061(200012)17:4<294::AID-YEA54>3.0.CO;2-5.
- NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. In: *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jg. 13, H. 1, S. 9–22.
- SCHÜTTE, A.; LOTTAZ, D.; STERCHI, E. E.; STÖCKER, W.; BECKER-PAULY, C. (2007): Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*. In: *Biological chemistry*, Jg. 388, H. 5, S. 523–531. Online verfügbar unter doi:10.1515/BC.2007.060.
- SCHÜTTE, A.; STÖCKER, W.; BECKER-PAULY, C. (2009): The metalloprotease meprin α stimulates angiogenesis by VEGF-A processing. *Zur Publikation eingereicht.*
- STERCHI, E. E.; GREEN, J. R.; LENTZE, M. J. (1982): Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. In: *Clinical science (London, England : 1979)*, Jg. 62, H. 5, S. 557–560.
- STÖCKER, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; BODE, W.; ZWILLING, R. (1993): Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. In: *European journal of biochemistry / FEBS*, Jg. 214, H. 1, S. 215–231.
- STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RÜTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. (1995): The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. In: *Protein science : a publication of the Protein Society*, Jg. 4, H. 5, S. 823–840. Online verfügbar unter doi:10.1002/pro.5560040502.
- THISSE, C.; ZON, L. I. (2002): Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 295, H. 5554, S. 457–462. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1063654.
- TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T.; SILVA, M.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J. C.; ABRAHAM, J. A. (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 266, H. 18, S. 11947–11954.
-

- TREDE, N.; MEIJER, A. H.; SNAAR-JAGALSKA, B. E.; SPAINK, H. P. (2007): Model systems for infectious disease and cancer in zebrafish: a report on an EMBO workshop held at the Lorentz Center, Leiden, The Netherlands, July 16-18, 2007. In: *Zebrafish*, Jg. 4, H. 4, S. 287–292. Online verfügbar unter doi:10.1089/zeb.2007.9981.
- VAREY, A. H. R.; RENNEL, E. S.; QIU, Y.; BEVAN, H. S.; PERRIN, R. M.; RAFFY, S. *ET AL.* (2008): VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. In: *British journal of cancer*, Jg. 98, H. 8, S. 1366–1379. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6604308.
- WALLACE, K. N.; AKHTER, S.; SMITH, E. M.; LORENT, K.; PACK, M. (2005): Intestinal growth and differentiation in zebrafish. In: *Mechanisms of development*, Jg. 122, H. 2, S. 157–173. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.mod.2004.10.009.
- WEBB, A. E.; DRIEVER, W.; KIMELMAN, D. (2008): psoriasis regulates epidermal development in zebrafish. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, Jg. 237, H. 4, S. 1153–1164. Online verfügbar unter doi:10.1002/dvdy.21509.
- YIALLOUROS, I.; KAPPELHOFF, R.; SCHILLING, O.; WEGMANN, F.; HELMS, M. W.; AUGE, A. *ET AL.* (2002): Activation mechanism of pro-astacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. In: *Journal of molecular biology*, Jg. 324, H. 2, S. 237–246.
-

8 ANHANG

8.1 VERÖFFENTLICHUNG 1: *MEPRINS IN ZEBRAFISH*

- Schütte, Andre; Lottaz, Daniel; Sterchi, Erwin E.; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph (2007): *Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish Danio rerio*. In: *Biological chemistry*, Jg. 388, H. 5, S. 523–531. Online verfügbar unter doi:10.1515/BC.2007.060.

Biol. Chem., Vol. 388, pp. 523–531, May 2007 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/BC.2007.060

Two α subunits and one β subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*

Andre Schütte¹, Daniel Lottaz², Erwin E. Sterchi², Walter Stöcker¹ and Christoph Becker-Pauly^{1,*}

¹Institute of Zoology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, D-55128 Mainz, Germany

²Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern, Bühlstraße 28, CH-3012 Bern, Switzerland

*Corresponding author
e-mail: beckerpa@uni-mainz.de

Two α subunits and one β subunit of meprin zinc- endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*

Andre Schütte¹, Daniel Lottaz², Erwin E. Sterchi², Walter Stöcker¹ and Christoph Becker-Pauly^{1,*}

¹Institute of Zoology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, D-55128 Mainz, Germany

²Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern, Bülhstraße 28, CH-3012 Bern, Switzerland

*Corresponding author
e-mail: beckerpa@uni-mainz.de

Abstract

Meprins are members of the astacin family of metalloproteases expressed in epithelial tissues, intestinal leukocytes and certain cancer cells. In mammals, there are two homologous subunits, which form complex glycosylated disulfide-bonded homo- and heterooligomers. Both human meprin α and meprin β cleave several basement membrane components, suggesting a role in epithelial differentiation and cell migration. There is also evidence that meprin β is involved in immune defence owing to its capability of activating interleukin-1 β and the diminished mobility of intestinal leukocytes in meprin β -knockout mice. Here we show for the first time by reverse transcription PCR, immunoblotting and immunofluorescence analyses that meprins are expressed not only in mammals, but also in the zebrafish *Danio rerio*. In contrast to the human, mouse and rat enzymes, zebrafish meprins are encoded by three genes, corresponding to two homologous α subunits and one β subunit. Observations at both the mRNA and protein level indicate a broad distribution of meprins in zebrafish. However, there are strikingly different expression patterns of the three subunits, which is consistent with meprin expression in mammals. Hence, *D. rerio* appears to be a suitable model to gain insight into the basic physiological functions of meprin metalloproteases.

Keywords: astacin; metalloprotease; metzincin; zebrafish.

Introduction

Meprins are members of the astacin family of endopeptidases (Bond and Beynon, 1995). They contain the conserved zinc-binding motif (HExxHxxGxxHxxxRxDR) and a methionine-containing 1,4- β -turn (SxMHY) typical for the metzincins (Stöcker et al., 1993, 1995; Gomis-Rüth, 2003). Mammalian meprins comprise two homologous, highly glycosylated multidomain subunits, α and β , of

approximately 75 and 85 kDa, respectively (Becker et al., 2003; Bertenshaw et al., 2003). The two subunits are encoded on chromosomes 6 and 18 in humans and 17 and 18 in mice, respectively (Bond et al., 1995). Meprins are translated with an amino-terminal signal peptide directing the protein chain to the endoplasmic reticulum, an amino-terminal propeptide, an astacin-like protease domain, a MAM (meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ) and a TRAF domain (tumour necrosis factor receptor-associated factor), which are thought to mediate protein-protein interactions, followed by an EGF (epidermal growth factor)-like module, the C-terminal transmembrane domain and a cytosolic tail (Ishmael et al., 2005). In contrast to the β subunit, meprin α contains an additional inserted domain (I-domain) that is proteolytically cleaved on the secretory pathway, resulting in the loss of the EGF-like and the transmembrane domains and secretion into the extracellular space. While meprin β is integrated into the plasma membrane as a type I integral protein, in human cells it may also be shed from there (Johnson and Hersh, 1994; Hahn et al., 2003). If expressed alone, both meprin subunits form homooligomers. These can reach a size of several megadaltons in the case of meprin α , whereas the β subunits merely form homodimers. If α and β are coexpressed, they are organised as heterodimers and (mostly) heterotetramers (Bertenshaw et al., 2003).

Proteases of the astacin family are synthesised as zymogens, and thus need to be activated by cleavage of the propeptide to gain full proteolytic activity (Yiallourou et al., 2002). In the case of meprins, this activation is mostly achieved by serine proteases such as trypsin, whereas many other astacins, such as BMP-1, are activated by the proprotein convertase furin (Bode et al., 1992; Leighton and Kadler, 2003). Outside the intestinal tract, in the absence of pancreatic trypsin, promeprin α , but not β , can be activated by plasmin, as shown in colorectal cancer cells (Rösmann et al., 2002; Becker et al., 2003). Recently we demonstrated that promeprin β , but not α can be activated by human kallikrein-4 in human skin (Becker-Pauly et al., 2007).

Both meprin subunits cleave a wide range of proteins and biologically active peptides, although they differ considerably in their cleavage specificity (Kruse et al., 2004). They can process compounds of the extracellular matrix such as laminin-V, collagen-IV, fibronectin and nidogen 1, as well as growth factors, cytokines and peptide hormones, including bradykinin, angiotensins and gastrin (Yamaguchi et al., 1992; Skidgel, 1992; Bertenshaw et al., 2001; Kruse et al., 2004). Furthermore, the ability of meprin β to activate interleukin-1 β is indicative of a role for meprins in the immune system (Herzog et al., 2005). These observations are supported by the work of Cris-

man et al. (2004), who showed that compared to leukocytes from wild-type animals, macrophages from meprin β knockout mice exhibited retarded migration through the extracellular matrix, resulting in a diminished immune response (Crisman et al., 2004). In general, meprin β knockout mice are viable and do not show a dramatic phenotype, but their offspring are smaller than wild-type littermates and the newborn grow more slowly (Norman et al., 2003).

Meprin zinc-endopeptidases were originally found in the epithelia of proximal tubules of mouse kidney and in brush border membranes of human intestine (Sterchi et al., 1982, 1983, 1988). Other meprin-expressing tissues such as spleen, pancreas and liver were identified via EST analyses (Merops peptidase database, <http://merops.sanger.ac.uk>; EMBL-EBI ArrayExpress Warehouse, <http://www.ebi.ac.uk/aedw>). The enzyme was also found in human skin epithelia, in leukocytes of the intestinal lamina propria mucosae and in colorectal cancer cells (Lottaz et al., 1999a,b; Becker-Pauly et al., 2007). In these cultured colon carcinoma cells, meprin α is secreted not only apically, but also basolaterally. Hence, the proteolytic potential of meprins is directed towards the extracellular matrix, which may effect the proliferation and migration of tumour cells into the surrounding tissue (Kaushal et al., 1994). Similar observations have been made in mice suffering from acute renal failure (Kaushal et al., 1994; Trachtman et al., 1995). Carmago et al. (2002) demonstrated that a mixture of meprin α homooligomers and α/β heterooligomers has a negative effect on the viability of certain strains of kidney cells (LLC-PK₁, immortalised porcine epithelial cells and MDCK, Madin-Darby canine kidney cells). Furthermore, it was shown that meprin β can reduce the cell number of cultured keratinocytes (HaCaT) by inducing apoptosis (Becker-Pauly et al., 2007).

Taken together, these findings suggest a contribution of meprins to epithelial differentiation, matrix remodelling and cell migration, as well as to inflammatory processes, tumour growth and metastasis. *In vivo* substrates of meprins are known, but precise biological mechanisms have not been elucidated yet. In this context we suggest that the zebrafish *Danio rerio* might be a suitable model

to gain insight into the physiological functions of meprins (Trede et al., 2004).

In the present work we identified three individual meprin subunits in *Danio rerio*. They are expressed in kidney, liver, intestine, epidermis, brain, heart and gills, albeit at different levels. Varying residues around the active site cleft that are critical for cleavage specificity support this individuality. The domain structure of the meprins described reveals striking differences compared to mammalian homologues. For example, one α subunit lacks the C-terminus including the I-domain, most probably resulting in a soluble form without posttranslational processing. In the case of meprin β , no EGF-like domain could be identified so far. These differences in expression and domain structure indicate unique functions for each subunit.

Results

Three individual subunits of zebrafish meprin are encoded on chromosome 20

Database analyses of the *Danio rerio* genome revealed three genes encoding meprin α subunits [Swiss-Prot accession nos. Q5RHM1, Q5RKM1 (both meprin α_1) and Q5RHM2 (meprin α_2)]. The first and second one turned out to be identical, probably due to gene duplication. In contrast, a single gene encodes the meprin β subunit, as observed for other classes of vertebrates (Swiss-Prot accession no. Q5RH57). All genes are localised on chromosome 20 (α_1 from 26 340 765 to 26 349 044 bp and α_2 from 26 352 145 to 26 363 302 bp), whereas the β gene is located further upstream (from 44 259 211 to 44 276 969 bp; Vertebrate Genome Annotations database, <http://vega.sanger.ac.uk>). As the meprin α_1 cDNA deposited in the database was only a fragment, we identified the 3'-end including the amino-terminal signal peptide by *in silico* analyses of genomic DNA. Interestingly, zebrafish meprin α_1 cDNA contains a stop codon immediately downstream of the region encoding the TRAF domain. Therefore, zebrafish meprin α_1 does not contain EGF-like, transmembrane or cytosolic domains (Figure 1). Furthermore, the typical RxK(or R)R sequence in the

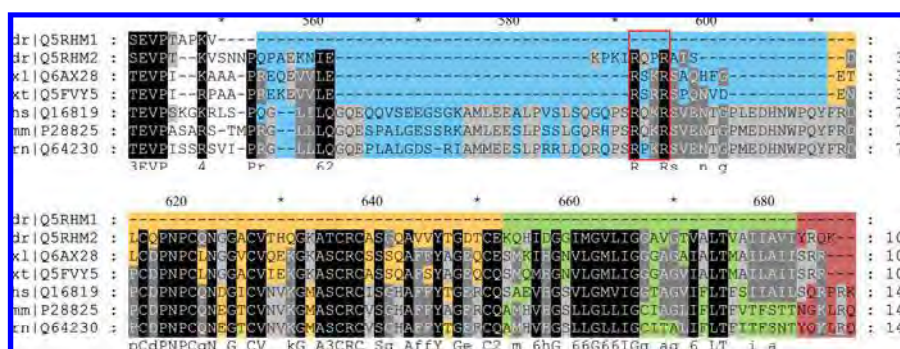


Figure 1 Alignment of the C-terminal domains of meprin α subunits.

In contrast to other vertebrate meprins, the zebrafish α_1 subunit has a truncated domain structure. The inserted domain, which is fragmented in zebrafish α_2 and *Xenopus* meprins, is highlighted in blue. Putative furin-like recognition sequences are marked by a red box. The EGF domain, containing six cysteine residues, is indicated in orange and the transmembrane domain in green. The cytosolic tail is displayed in dark red. Species names and Swiss-Prot accession numbers are shown in the left column (dr, *Danio rerio*; xl, *Xenopus laevis*; xt, *Xenopus tropicalis*; hs, *Homo sapiens*; mm, *Mus musculus*; rn, *Rattus norvegicus*).

I-domain, which is present in all mammalian and in amphibian (*Xenopus*) meprin α chains, is a potential cleavage site for the prohormone convertase furin. This motif is mutated in meprin α_2 of *Danio rerio* to RxPR, which might influence proteolytic processing during biosynthesis.

Sequence alignment of the catalytic domains demonstrates the high similarity to other astacins, particularly to mammalian meprins (Figure 2). The meprin α_1 and α_2 subunits of zebrafish show 71% identity to each other and 68% and 71% to human α , respectively. The two α subunits are 54% and 57% identical to zebrafish β . In all aligned sequences, the typical zinc-binding motif and the methionine turn are present. However, there is a significant point mutation in the HExxHxxGxxHE sequence of zebrafish meprin α_1 , whereby the second glutamate (Glu101) found in all other meprins and most astacins is mutated to a methionine (Met101) (Figure 2). Based on this alignment, a phylogenetic tree was computed to visualise the evolutionary correlation between meprins from different organisms on a molecular level (Figure 3). All proteases exhibit subunit-specific clustering, with the β cluster branching before α . This provides evidence that the β subunit is the phylogenetic precursor of other meprin subunits. Moreover, all zebrafish meprins separate early from their mammalian homologues. Meprin α_1 with the mutated zinc-binding motif branches most basi-

cally and seems to be more distantly related to mammalian meprin α than the α_2 subunit of *D. rerio*.

In comparison to other meprins, zebrafish homologues show significant differences in residues critical for cleavage specificity

Based on the crystal structure of crayfish astacin, three-dimensional homology models of the catalytic domains of zebrafish and human meprins were generated (Figure 4). The zinc-binding motif, the Met-turn and the astacin-typical secondary structure elements, comprising a five stranded β -sheet and four α -helices, are displayed in a ribbon model in Figure 4A–C. The surface models visualise significant differences with regard to basic and acidic residues in the substrate-binding region (Figure 4D–H). Human meprin β has positively charged Arg85 and Arg123 (Figure 4H), which might be responsible for the distinct substrate specificity for negatively charged side chains of this subunit (Bertenshaw et al., 2001). In zebrafish meprin β , only Lys123 was identified as a positively charged residue around the active site (Figure 4F). Zebrafish meprin α_1 contains Asp61, which is also in human meprin α (Figure 4G), and Arg150 (Figure 4D). The α_2 subunit has other charged residues on the outskirts of the active site region, namely Glu80 and a Lys122 (Figure 4E).

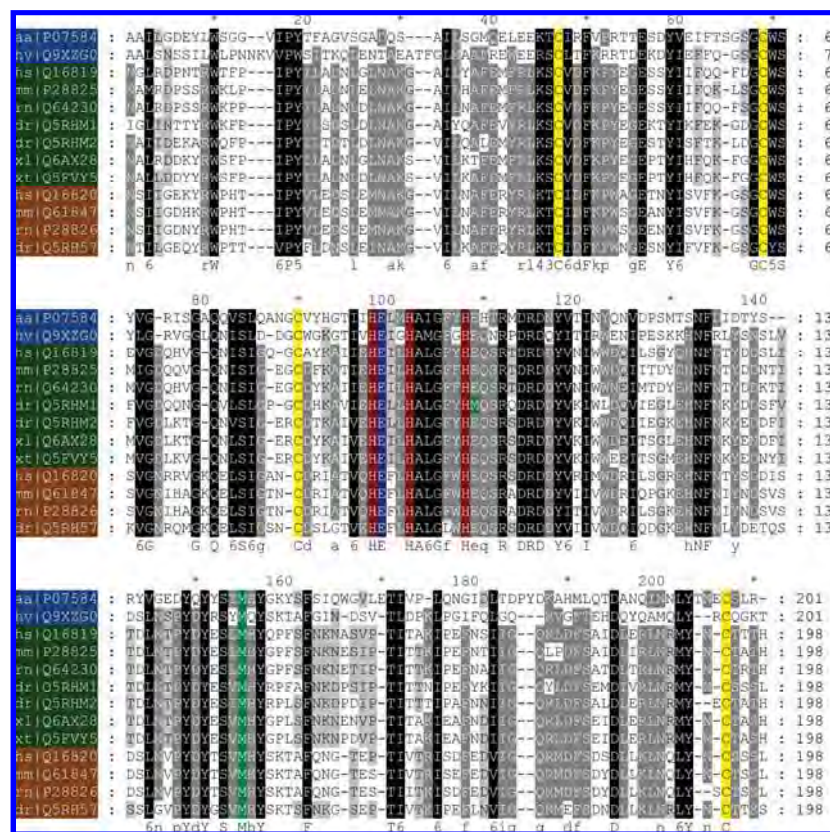


Figure 2 Alignment of the amino acid sequences of the catalytic domains of vertebrate meprins and astacins of crayfish and hydra. The labels provide the species names and the Swiss-Prot accession numbers (aa, *Astacus astacus*; hv, *Hydra vulgaris*; hs, *Homo sapiens*; mm, *Mus musculus*; rn, *Rattus norvegicus*; dr, *Danio rerio*; xl, *Xenopus laevis*; xt, *Xenopus tropicalis*). Astacins are shown in blue, meprin α subunits in green, and meprin β subunits in brown. The three histidines belonging to the characteristic zinc-binding motif are highlighted in red. The catalytic active glutamate is marked in blue. In all sequences, four cysteines (yellow) forming two disulfide bonds are evident. Methionines in the zinc-binding motif of meprin α_1 and in the typical met-turn of all astacins displayed are coloured in green.

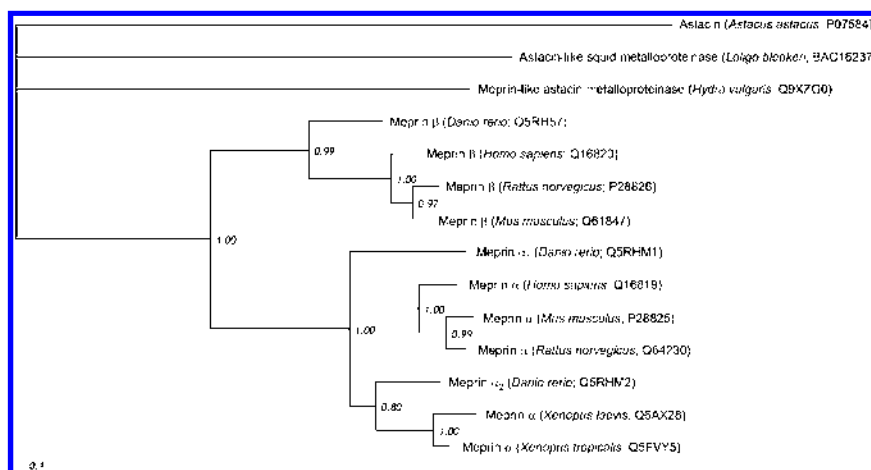


Figure 3 Phylogenetic tree of meprins and astacins from different species.

The numbers show the relative probability of branching (1.00 corresponds to 100%). Astacin from crayfish *Astacus astacus* was defined as an outgroup.

mRNA of the meprin subunits is expressed in different zebrafish tissues

The three meprin subunits could be identified in different zebrafish tissues by RT-PCR. After isolation of the RNA and reverse transcription into cDNA, PCR was performed with primers specific for each meprin subunit gene. These primers flank cDNA fragments of 381 bp for meprin α_1 , 405 bp for meprin α_2 and 442 bp for meprin β . Except for meprin α_1 , which was absent from kidney, all other subunits were detected in kidney, intestine, liver, gills, brain, heart and epidermis, albeit at different intensities (Figure 5A).

Meprins are detected in zebrafish lysates by Western blot analysis

For the detection of zebrafish meprins, polyclonal antisera directed against human meprin subunits were applied. Two antibodies generated against peptides spanning the catalytic domains of human meprin α and β were found to cross-react with zebrafish meprins because of the high sequence similarity of the protease domains of human and fish enzymes. To demonstrate meprin expression by Western blotting, total zebrafish lysates of three individual animals were analysed (Figure 5B). In all samples, a single band could be identified corresponding to a molecular mass of about 73 kDa (Figure 5B, lanes 2–5). Compared to the recombinant proforms of human meprins from insect cells with a molecular mass of approximately 78 kDa (Figure 5B, lanes 6 and 7) it is most likely that the visualised bands in the lysate samples correspond to active meprin α_1 and α_2 . However, it is not clear whether zebrafish meprins are as highly glycosylated as mammalian meprins.

Distribution of meprins in zebrafish visualised by immunofluorescence microscopy

The antisera directed against human meprins were also used to analyse cryosections of zebrafish whole mounts for meprin expression (Figure 6). The fluorescence signals obtained by the antisera were localised to head kid-

ney, epidermis, gills and intestine. These sites of meprin expression confirm in part the reported expression sites in mammals, as well as the results obtained by RT-PCR for zebrafish tissues (Figure 5A).

Table 1 provides a summary of all identified zebrafish tissues expressing meprins in comparison to their mammalian homologues. It is evident that meprin expression is not restricted to certain tissues, but is widely distributed over a variety of vertebrate epithelia.

Discussion

So far, meprins were only reported to exist in mammals (human, mouse and rat). Based on genomic sequences, meprin homologues could also be found in several other vertebrate taxa, e.g., in the clawed frog *Xenopus laevis* [Swiss-Prot accession no. Q6AX28] and *Xenopus tropicalis* [Swiss-Prot accession no. Q5FVY5]. Here we have reported on four cDNA sequences encoding three meprin subunits in the zebrafish *D. rerio*. We identified the critical amino acid residues in the active site, which presumably define substrate specificity, and revealed their expression and tissue distribution at the mRNA and protein levels in zebrafish.

In contrast to mammalian meprins, three meprin genes were found in zebrafish by database analyses. They encode two different α subunits [Swiss-Prot accession nos. Q5RHM1 (meprin α_1) and Q5RHM2 (meprin α_2)] and one β subunit [Swiss-Prot accession no. Q5RH57]. In humans, the gene encoding meprin α is located on chromosome 6 close to the gene of the major histocompatibility complex II (MHC II), whereas the gene for meprin β is on chromosome 18. In the mouse genome, the latter gene is also on chromosome 18, while the gene for meprin α is encoded on chromosome 17. Both subunits are expressed coordinately and separately in mammals. In contrast to the genomic localisation of meprin genes in mammals, all three zebrafish meprin genes are encoded on chromosome 20. The two genes coding for the α subunit are in close proximity. The co-transcriptional processes observed in mammals are also conceivable in

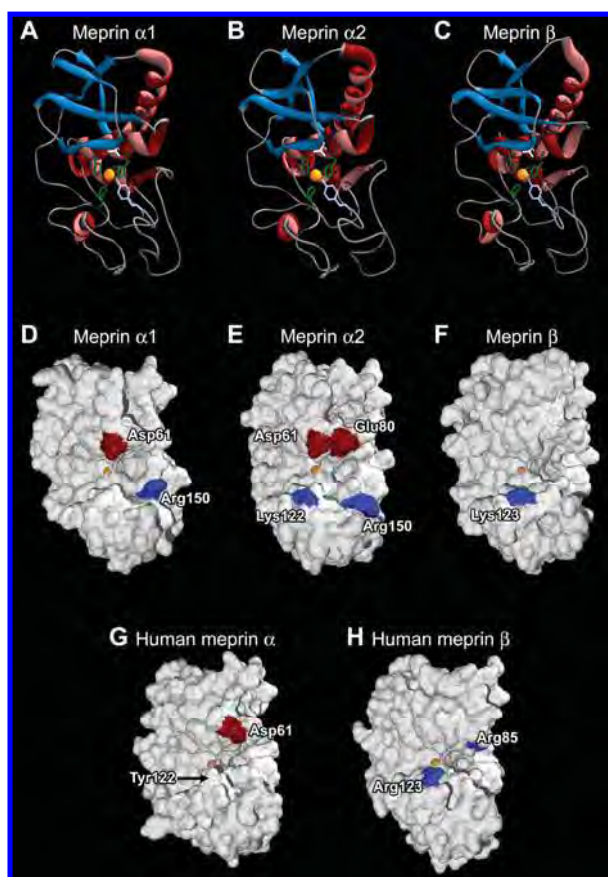


Figure 4 Homology models of the catalytic domains of zebrafish and human meprins.

The ribbon models (A–C) show the active site with the zinc ion in its centre (orange), complexed by three histidines (green). The catalytically active glutamate (white) and the fifth zinc ligand tyrosine (lilac) rise into the active site cleft. Astacin characteristic secondary structural elements are marked in blue (β -strands) and red (α -helices). The homology surface models (D–H) were computed based on the crystal structure of astacin from *Astacus astacus*. All zebrafish subunits (D–F) differ in characteristic acidic (red) and basic (blue) residues around the cleavage site with the central zinc ion (orange). In zebrafish, meprin α_1 offers Asp61 and Arg150 (D), while meprin α_2 additionally offers Glu80 and Lys122 (E). The meprin β subunit possesses only one basic residue (Lys123) around the active site (F). Critical residues in human meprins are Asp61 and Tyr122 (arrow) in the α subunit (G), and Arg85 and Arg123 in the β subunit (H).

zebrafish. The existence of two different α subunits and their local proximity at the chromosomal level could be due to single gene duplication. Interestingly, the sequences of the two α subunits have diverged considerably, resulting in an overall sequence identity of approximately 48%. Both α subunits are expressed at the mRNA level, and hence they are both presumably translated, but the functional properties of the proteins remain to be proven.

All three meprin subunits identified in zebrafish contain the typical astacin domain. The zinc-binding motif [HExxHxxGxxHE(or M)], the Met-turn (SxMHY) and the four cysteine residues that form two disulfide bonds are highly conserved in all mammalian, amphibian and fish meprins. Interestingly, in the α_1 subunit of *D. rerio*, the second glutamate (Glu101) of the zinc-binding motif is mutated to a methionine. In astacin, the corresponding

glutamate (Glu103) is responsible for a salt bridge to the mature N-terminus (Stöcker et al., 1993). By mutating this glutamate to an alanine in crayfish astacin, Stöcker and co-workers showed that the enzyme is more active than the wild-type protease, but is extremely heat labile (Yiallourous et al., 2002). Therefore, zebrafish meprin α_1 could be as active, but not as stable as the mammalian subunit. This may be a regulatory mechanism to diminish extended meprin activity by easier degradation of the protein. The mutation of this second glutamate in the zinc-binding motif could also be rarely observed in other astacins, although this has never been analysed at the protein functional level.

Zebrafish meprin α subunits also differ from mammalian meprins regarding their C-terminal domains. It is apparent that meprin α_1 and α_2 do not contain a complete I-domain. Interestingly, this is the same for *Xenopus* meprins, indicating that a complete I-domain might be specific for mammals. Furthermore, the furin cleavage site RxK(or R)R, which might be responsible for proteolytic processing of meprin α during biosynthesis, resulting in a secreted homooligomer, is mutated to RxPR in the α_2 subunit. Furin-like proteases are able to cleave RxxR sites, albeit with lower cleavage efficiency (Duckert et al., 2004; Henrich et al., 2005). Therefore, there might be less efficient processing of zebrafish meprin α_2 . In contrast, Marchand et al. (1995) showed that mutations

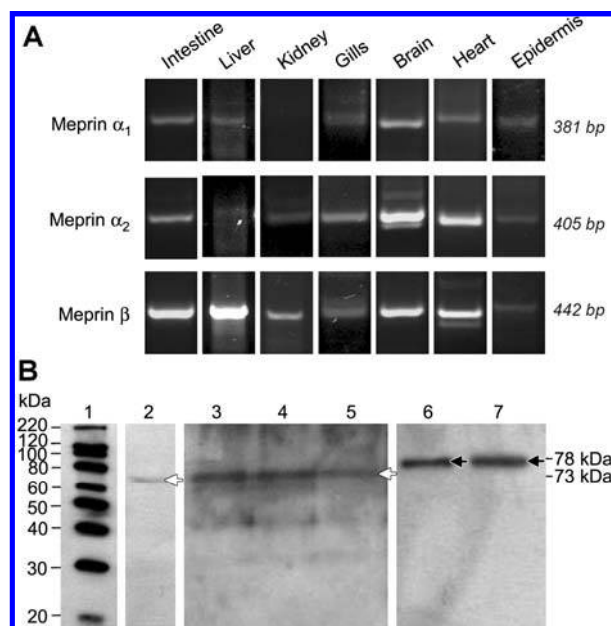


Figure 5 Detection of meprins in different zebrafish tissues via RT-PCR and Western blot analysis.

(A) All three subunits, two α and one β , were identified at the mRNA level in several tissues, except for α_1 in kidney. The gene-specific primers used flank PCR fragments of 381 bp (meprin α_1), 405 bp (meprin α_2) and 442 bp (meprin β). (B) At the protein level, meprins could be detected using antibodies directed against the homologous human proteins. Samples of whole fish lysates were subjected to SDS-gel electrophoresis and immunoblotting. The bands detected (white arrows) most likely pinpoint the active protease with a molecular mass of approximately 73 kDa (lanes 2–5). As controls, recombinant human meprin zymogens (78 kDa) were loaded (black arrows; meprin α , lane 6; meprin β , lane 7).

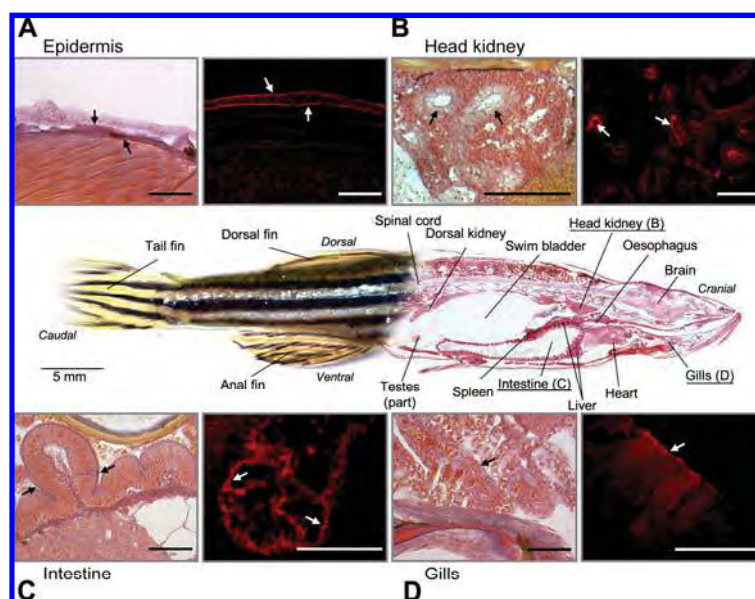


Figure 6 Tissue distribution of zebrafish meprins in whole-mount sections.

The small images show a magnification of meprin-expressing tissues on the left and the expression pattern visualised by immunofluorescence microscopy on the right. In general, in mammals and in zebrafish, meprin expression occurs in the same tissues, such as kidney (head kidney, B) and intestine (C). In addition, in *Danio rerio* fluorescence signals could be detected in the epidermis (A) and gills (D). The white arrows indicate the fluorescence signals based on meprin expression, while the black arrows mark the orientation of these signals inside the corresponding tissue (scale bars represent 50 μm).

in the furin cleavage site did not prevent C-terminal proteolytic processing, whereas deletion of the I-domain resulted in accumulation of unprocessed subunits (Marchand et al., 1994, 1995). It might be assumed that zebrafish α_2 and *Xenopus* meprin α subunits, which lack the complete I-domain, are not C-terminally cleaved during biosynthesis. However, it is remarkable that these subunits still contain the conserved furin-like cleavage site. Zebrafish meprin α_1 lacks the complete C-terminal part, including the EGF, transmembrane and cytosolic domains, due to a stop codon at the beginning of the region encoding the I-domain. Therefore, no posttranslational processing is necessary to obtain soluble protein. In this context, mutagenesis studies of the I-domains of mouse meprin α showed that the enzyme, truncated after the TRAF domain, is secreted directly after biosynthesis (Marchand et al., 1994). A recent database entry [Swiss-Prot accession no. Q08CC4], identical to Q5RH57,

shows an elongated C-terminal sequence for the β subunit. It contains the transmembrane and cytosolic domains, but not the EGF-like domain. This striking difference in amino acid sequence in comparison to mammalian homologues could also be identified by *in silico* analysis of the genomic DNA (data not shown).

The phylogenetic tree reveals the evolutionary relationship between zebrafish and mammalian meprins. It is evident that the meprin β cluster arose before the α subunits, which means that the membrane-bound form of the protease is the precursor molecule. The α subunits originated presumably by duplication of the β gene. At a later stage, insertion of the I-domain into the α gene gave rise to a new secreted enzyme, for which the C-terminal part, including the membrane anchor, is cleaved off in the secretory pathway. This leads to evolution of protease activity at a completely new destination, apart from cell surface proteins.

Human, mouse and rat meprin subunits can cleave a wide variety of substrates *in vitro*. Based on sequence alignments and computer modelling of the zebrafish subunits, essential differences in cleavage specificity of both subunits can be expected in comparison to mammalian meprins. For example, human and mouse meprin β contain positively charged residues, namely Arg147 and Lys185 in mouse and Arg85 and Arg123 in human in the S1' and S2' positions. These amino acids are responsible for the preference of acidic side chains in P1' and P2' substrate positions (Villa et al., 2003; Kruse et al., 2004). Human and mouse meprin α does not contain charged residues in the corresponding positions, leading to broader subsite specificity (Kruse et al., 2004). Tyr122 in human meprin α has been suggested to serve as a 'gatekeeper', which controls entrance into the active site cleft. The importance of these positions has been dem-

Table 1 Comparison of meprin-expressing tissues from zebrafish and mammals.

Tissue	Human	Mouse	Zebrafish	
			mRNA	Protein
Intestine	+	+	+	+
Kidney	+	+	+	+
Liver and pancreas	?	+	+	?
Respiratory organs	?	?	+	+
Epidermis	+	+	+	+
Brain	+	+	+	?
Leukocytes, tumour cells	+	+	?	?

+, meprin expression sites already identified; ?, tissues for which meprin expression has not been reported so far.

onstrated by site-directed mutagenesis in mouse meprin α , which was able to cleave gastrin, a meprin β specific substrate, after exchange of a hydrophobic (Tyr199) to a basic amino acid (Lys199) (Villa et al., 2003). In contrast to all mammalian meprins, the β subunit of *D. rerio* contains just one positively charged residue (Lys123) in the presumed S1' subsite. In contrast, both meprin α_1 and α_2 contain charged residues in positions critical for substrate binding. These are Asp61 and Arg150, as well as Glu80 and Lys122 in α_2 ; the latter is also present in the β subunit. With regard to human and mouse meprins, these molecular differences most likely affect the cleavage specificity of zebrafish meprins and presumably also their physiological functions.

The distribution of zebrafish meprins *in situ* has been demonstrated by immunofluorescence microscopy using primary antibodies directed against epitopes of human meprins. Unfortunately, the antisera do not allow discrimination between the α and β subunits, or between the inactive pro form and the active form in zebrafish. Nevertheless, the expression pattern in intestine, epidermis and kidney is obviously comparable to that of mammals. Moreover, zebrafish liver and head kidney also exhibit strong meprin expression. The phylogenetically old head kidney mainly acts as a haematopoietic and lymphoid organ, producing lymphocytes and erythrocytes (Rijkers, 1981; Willett et al., 1999; Trede et al., 2004). These findings support a possible immunological role of meprins. This potential function was originally suggested owing to meprin expression in mammalian leukocytes of the intestinal lamina propria mucosae and in macrophages of mesenteric lymph nodes (Lottaz et al., 1999a). Furthermore, meprin β knockout mice show an immune-deficient phenotype (Crisman et al., 2004). Functional evidence of an immunological role of meprins has been provided by the observation that meprin β can activate interleukin-1 β , which facilitates the differentiation of B- and T-cells (Crisman et al., 2004; Herzog et al., 2005).

At the mRNA level, the well-described expression loci for meprin in mammals, the intestine and kidney, could be verified for zebrafish. In addition, meprin expression has been shown in zebrafish heart and brain. The presence of meprin mRNA could also be identified in mouse brain (data not shown) and in brain ventricles and the choroid plexus during rat embryonic development by *in situ* hybridisation experiments (Spencer-Dene et al., 1994; Becker-Pauly et al., 2007).

In zebrafish we also found that the respiratory organs were positive for meprin expression, where the enzymes were identified in epithelial cells of the gill lamellae at the mRNA and protein levels. Interestingly, meprins are also present in zebrafish epidermis. This correlates well with the observation of meprin subunits in human keratinocytes (Becker-Pauly et al., 2007), where both subunits are not colocalised, but expressed in epidermal cells of the basal layer (meprin α) and in more differentiated keratinocytes of the stratum granulosum (meprin β). These expression loci indicate possible functions of these proteases during cell proliferation (meprin α) and differentiation (meprin β) with regard to the influence of human meprins on cultured HaCaT cells. Similar observations have been made in mice suffering acute renal dysfunction (Carmago et al., 2002).

Conclusions

We have shown that the expression of meprin metalloproteinases is not restricted to mammals or to the limited number of tissues reported previously. The cDNA and amino acid sequences of zebrafish meprins are indicative of many similarities with their mammalian counterparts. However, there are also many individual properties that should affect secretion and cleavage specificity. Taken together, these observations open a new research field to study the physiological functions of meprins in a well-described animal model.

Materials and methods

All chemicals were of analytical grade and, unless stated otherwise, were obtained from Amersham Bioscience (Freiburg, Germany), Applichem (Darmstadt, Germany), Serva (Heidelberg, Germany), Bio-Rad (Munich, Germany), Bachem (Heidelberg, Germany), Sigma/Aldrich (Deisenhofen, Germany) or Merck (Darmstadt, Germany). For all experiments, ultrapure water generated by a Milli-Q system (Millipore, Eschborn, Germany) was used.

Fish maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) were bred and kept under constant conditions at a temperature of 28°C and a schedule of 14 h of light and 10 h of darkness. From embryonic stadium, fish were fed daily with dry food and monthly with living food (*Artemia salina*).

RNA isolation and reverse transcription PCR

All materials for RNA isolation and PCR were obtained from Peqlab (Erlangen, Germany). Water containing diethylpyrocarbonate (DEPC) as an inhibitor for RNases was used for all work on RNA and DNA.

Total RNA from zebrafish was prepared from tissues using the peqGOLD Total RNA Kit. Equal amounts of RNA (1 μ g) were transcribed into cDNA in 25- μ l reaction mixtures using MMLV-Reverse Transcriptase (200 U/ μ l), unspecific oligo d(T)₁₈₋₂₁ primers (10 mM; Roth, Karlsruhe, Germany), additional RNase inhibitor (30 U/ μ l) and dNTPs (200 μ M). After transcription, 2 μ l of the newly synthesised cDNA was used as a template for PCR, which was performed with 2.5 U of Taq DNA polymerase (GoTaq; Promega, Mannheim, Germany), 200 μ M dNTP Mix and 0.2 μ M of each primer (sense and antisense).

The following primers (Biomers, Ulm, Germany) were used: meprin α_1 (Swiss-Prot accession no. Q5RHM1), sense 5'-CGGCTGTGATCATAAGGCTGT-3', antisense 5'-CAAAGCACTGGTCCAGC-3'; meprin α_2 (Q5RHM2), sense 5'-TCCC-AAAGAGAATTGTTTGA-3', antisense 5'-AATGATTTGATCC-CACCAGAT-3'; and meprin β (Q5RH57), sense 5'-TGCATTGACTTTAAACCTTGG-3', antisense 5'-TCAGCTTGAGCAAATCATTGT-3'. After initial denaturation at 95°C for 5 min, PCR was carried out for 45 cycles of 94°C for 60 s, 56°C for 30 s and 72°C for 60 s. Equal amounts of the PCR products were visualised by separation on a 1% agarose gel containing 0.04% ethidium bromide.

Sequencing of purified PCR fragments was performed by GENTERprise (Mainz, Germany).

Cell lysis and Western blot analysis

Homogenised fish were incubated in lysis buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1% Triton X-

100, pH 7.4) overnight at 4°C. After separation from cell debris by centrifugation at 13 200 g for 5 min, the lysate was concentrated using Amicon centrifugal filter units with an exclusion size of 50 kDa (Millipore).

For immunoblot analysis, proteins were subjected to 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) under reducing conditions and then transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF)-membrane (Immobilon P, Millipore) by electroblotting (80 mA, 75 min). For detection with meprin-specific antibodies, the membrane was saturated with 5% dry milk in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h at room temperature, incubated with the first antibody (polyclonal rabbit anti-meprin antibodies, 1:1000) for 1 h and then with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:10 000) for 45 min at room temperature. Detection was performed with Rotilumin (Roth) according to the manufacturer's instructions using X-ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Magic Mark XP (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as a molecular mass marker.

Alignments and homology models

The catalytic domains of zebrafish meprins were aligned against one another and mammalian meprin catalytic domains using the ClustalX method (Thompson et al., 1997). They were edited using GeneDoc software (Nicholas et al., 1997).

After alignment, the molecular structures of the catalytic domains were predicted using the SwissMODEL module (Kopp and Schwede, 2004). Modelling was performed with the SwissPDB Viewer software (Kaplan and Littlejohn, 2001) based on the crystal structure of astacin from *Astacus astacus* (Bode et al., 1992).

Phylogenetic trees of meprins from different species were computed with MrBayes software (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) using the PAM-Dayhoff distance matrix and consensus trees were visualised using TreeView software (Page, 1996).

Whole-mount tissue fixation, embedding and cutting of zebrafish

For an anatomical overview, adult zebrafish were fixed in Bouin's fixative [150 ml of ethanol, 1 g of picric acid, 60 ml of formaldehyde (37%), 15 ml of acetic acid] for 48 h (Ortiz-Hidalgo, 1992). After washing in an ethanol series (from 70% to 96% in four steps), the fixed zebrafish were embedded in methacrylate, dried for 48 h at 50°C and 60°C, and finally stained with Cason's Trichrom stain (Cason, 1950). Collagen-rich and reticular tissues and acid mucosubstances are coloured in blue, while erythrocytes, glia fibrils and nuclei are stained in red. After staining, sections of 10 µm in thickness were cut on a SuperCut microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The samples were viewed and visualised using a Zeiss Axioskop microscope (Zeiss, Jena, Germany) with bright-field and differential interference contrast (DIC) optics.

Immunofluorescence analysis

Cryosections of unfixed adult zebrafish prepared with a HM 560 cryostat (Microm, Walldorf, Germany) were incubated with 5% goat serum in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) to block non-specific binding. Then the samples were incubated for 2 h at 4°C with polyclonal serum antibodies (1:200 in 0.5% goat serum/PBS). Cross-reactive rabbit polyclonal antisera were generated against two peptides. One is directed against a fragment of 420 aa including the propeptide, the protease and MAM domain of human meprin α. The other recognises a peptide comprising 150 aa of the TRAF domain of the human β subunit. All antigen peptides were expressed in *Escherichia coli* (Dumer-

muth et al., 1993; Lottaz et al., 1999a). After removal of unbound primary antibody by washing with PBS, the samples were incubated with Alexa 568 goat anti-rabbit IgG fluorescent antibody (1:400 in 0.5% goat serum/PBS, Invitrogen) for 90 min. 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) was added to label the nuclei. Immunofluorescence detection was carried out using a Zeiss Axioskop microscope with fluorescence capability.

Acknowledgements

We thank Katja Lotz for her excellent technical assistance in histology. This work was supported by a start-up grant from the Johannes Gutenberg-University of Mainz to C.B-P., Germany and the Swiss National Science Foundation (Grant no. 3100A0-100772 to E.S.).

References

- Becker, C., Kruse, M.N., Sloty, K.A., Kohler, D., Harris, J.R., Rösmann, S., Sterchi, E.E., and Stöcker, W. (2003). Differences in the activation mechanism between the α and β subunits of human meprin. *Biol. Chem.* 384, 825–831.
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E.E., Debela, M., Magdolen, V., et al. (2007). The α and β subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, DOI: 10.1038/sj.jid.5700675.
- Bertenshaw, G.P., Turk, B.E., Hubbard, S.J., Matters, G.L., Bylander, J.E., Crisman, J.M., Cantley, L.C., and Bond, J.S. (2001). Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 13248–13255.
- Bertenshaw, G.P., Norcum, M.T., and Bond, J.S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* 278, 2522–2532.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Huber, R., Zwilling, R., and Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* 358, 164–167.
- Bond, J.S. and Beynon, R.J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 4, 1247–1261.
- Bond, J.S., Rojas, K., Overhauser, J., Zoghbi, H.Y., and Jiang, W. (1995). The structural genes, MEP1A and MEP1B, for the α and β subunits of the metalloendopeptidase meprin map to human chromosomes 6p and 18q, respectively. *Genomics* 25, 300–303.
- Carmago, S., Shah, S.V., and Walker, P.D. (2002). Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats. *Kidney Int.* 61, 959–966.
- Cason, J.E. (1950). A rapid one-step Mallory-Heidenhain stain for connective tissue. *Stain Technol.* 25, 225–226.
- Crisman, J.M., Zhang, B., Norman, L.P., and Bond, J.S. (2004). Deletion of the mouse meprin β metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J. Immunol.* 172, 4510–4519.
- Duckert, P., Brunak, S., and Blom, N. (2004). Prediction of pro-protein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 107–112.
- Dumermuth, E., Eldering, J.A., Grunberg, J., Jiang, W., and Sterchi, E.E. (1993). Cloning of the PABA peptide hydrolase α subunit (PPH α) from human small intestine and its expression in COS-1 cells. *FEBS Lett.* 335, 367–375.
- Gomis-Rüth, F.X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* 24, 157–202.

- Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M.K., Leuenberger, B., Luginbuehl, U., and Sterchi, E.E. (2003). Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin β metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **278**, 42829–42839.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., and Than, M.E. (2005). Pro-protein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J. Mol. Biol.* **345**, 211–227.
- Herzog, C., Kaushal, G.P., and Haun, R.S. (2005). Generation of biologically active interleukin-1 β by meprin B. *Cytokine* **31**, 394–403.
- Ishmael, F.T., Shier, V.K., Ishmael, S.S., and Bond, J.S. (2005). Intersubunit and domain interactions of the meprin B metalloproteinase. Disulfide bonds and protein-protein interactions in the MAM and TRAF domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 13895–13901.
- Johnson, G.D. and Hersh, L.B. (1994). Expression of meprin subunit precursors. Membrane anchoring through the β subunit and mechanism of zymogen activation. *J. Biol. Chem.* **269**, 7682–7688.
- Kaplan, W. and Littlejohn, T.G. (2001). Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Brief Bioinform.* **2**, 195–197.
- Kaushal, G.P., Walker, P.D., and Shah, S.V. (1994). An old enzyme with a new function: purification and characterization of a distinct matrix-degrading metalloproteinase in rat kidney cortex and its identification as meprin. *J. Cell Biol.* **126**, 1319–1327.
- Kopp, J. and Schwede, T. (2004). The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* **32**, D230–D234.
- Kruse, M.N., Becker, C., Lottaz, D., Köhler, D., Yiallourous, I., Krell, H.W., Sterchi, E.E., and Stöcker, W. (2004). Human meprin α and β homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 383–389.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Leighton, M. and Kadler, K.E. (2003). Paired basic/Furin-like pro-protein convertase cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* **278**, 18478–18484.
- Lottaz, D., Hahn, D., Müller, S., Müller, C., and Sterchi, E.E. (1999a). Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the α and β subunits. *Eur. J. Biochem.* **259**, 496–504.
- Lottaz, D., Maurer, C.A., Hahn, D., Buchler, M.W., and Sterchi, E.E. (1999b). Nonpolarized secretion of human meprin α in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res.* **59**, 1127–1133.
- Marchand, P., Tang, J., and Bond, J.S. (1994). Membrane association and oligomeric organization of the α and β subunits of mouse meprin A. *J. Biol. Chem.* **269**, 15388–15393.
- Marchand, P., Tang, J., Johnson, G.D., and Bond, J.S. (1995). COOH-terminal proteolytic processing of secreted and membrane forms of the α subunit of the metalloprotease meprin A. Requirement of the I domain for processing in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 5449–5456.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., and Deerfield, D.W. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News* **4**, 14.
- Norman, L.P., Jiang, W., Han, X., Saunders, T.L., and Bond, J.S. (2003). Targeted disruption of the meprin β gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1221–1230.
- Ortiz-Hidalgo, C. (1992). Pol Andre Bouin, MD (1870–1962). Bouin's fixative and other contributions to medicine. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **116**, 882–884.
- Page, R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357–358.
- Rijkers, G.T. (1981). Introduction to fish immunology. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 527–534.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Rösmann, S., Hahn, D., Lottaz, D., Kruse, M.N., Stöcker, W., and Sterchi, E.E. (2002). Activation of human meprin- α in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J. Biol. Chem.* **277**, 40650–40658.
- Skidgel, R.A. (1992). Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20** (Suppl. 9), S4–S9.
- Spencer-Dene, B., Thorogood, P., Nair, S., Kenny, A.J., Harris, M., and Henderson, B. (1994). Distribution of, and a putative role for, the cell-surface neutral metallo-endopeptidases during mammalian craniofacial development. *Development* **120**, 3213–3226.
- Sterchi, E.E., Green, J.R., and Lentze, M.J. (1982). Non-pancreatic hydrolysis of *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clin. Sci. (Lond.)* **62**, 557–560.
- Sterchi, E.E., Green, J.R., and Lentze, M.J. (1983). Nonpancreatic hydrolysis of *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid (PABA peptide) in the rat small intestine. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2**, 539–547.
- Sterchi, E.E., Naim, H.Y., Lentze, M.J., Hauri, H.P., and Fransen, J.A. (1988). *N*-Benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid hydrolase: a metalloendopeptidase of the human intestinal microvillus membrane which degrades biologically active peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 105–118.
- Stöcker, W., Gomis-Rüth, F.X., Bode, W., and Zwilling, R. (1993). Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur. J. Biochem.* **214**, 215–231.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F.X., McKay, D.B., and Bode, W. (1995). The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823–840.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Trachtman, H., Valderrama, E., Dietrich, J.M., and Bond, J.S. (1995). The role of meprin A in the pathogenesis of acute renal failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 498–505.
- Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T., and Zon, L.I. (2004). The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**, 367–379.
- Villa, J.P., Bertenshaw, G.P., and Bond, J.S. (2003). Critical amino acids in the active site of meprin metalloproteinases for substrate and peptide bond specificity. *J. Biol. Chem.* **278**, 42545–42550.
- Willett, C.E., Cortes, A., Zuasti, A., and Zapata, A.G. (1999). Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.* **214**, 323–336.
- Yamaguchi, T., Kido, H., and Katunuma, N. (1992). A membrane-bound metallo-endopeptidase from rat kidney. Characteristics of its hydrolysis of peptide hormones and neuropeptides. *Eur. J. Biochem.* **204**, 547–552.
- Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Schilling, O., Wegmann, F., Helms, M.W., Auge, A., Brachtendorf, G., Berkhoff, E.G., Beermann, B., Hinz, H.J., et al. (2002). Activation mechanism of proastacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoprolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. *J. Mol. Biol.* **324**, 237–246.

8.2 VERÖFFENTLICHUNG 2: *ASTACINS FROM HORSESHOE CRAB*

- Becker-Pauly, Christoph; Bruns, Bernd; Damm, Olga; Schütte, Andre; Hammouti, Kada; Burmester, Thorsten; Stöcker, Walter (2009): *News from an Ancient World: Two Novel Astacin Metalloproteases from the Horseshoe Crab*. In: Journal of molecular biology, Jg. 385, H. 1, S. 236–248. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jmb.2008.10.062.

doi:10.1016/j.jmb.2008.10.062 J. Mol. Biol. (2009) 385, 236–248

JMB Available online at www.sciencedirect.com  ScienceDirect  ELSEVIER

News from an Ancient World: Two Novel Astacin Metalloproteases from the Horseshoe Crab

Christoph Becker-Pauly^{1*}, Bernd Cem Bruns¹, Olga Damm¹, André Schütte¹, Kada Hammouti², Thorsten Burmester² and Walter Stöcker¹

News from an Ancient World: Two Novel Astacin Metalloproteases from the Horseshoe Crab

Christoph Becker-Pauly^{1*}, Bernd Cem Bruns¹, Olga Damm¹,
André Schütte¹, Kada Hammouti², Thorsten Burmester²
and Walter Stöcker¹

¹Institute of Zoology, Cell and Matrix Biology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, D-55128 Mainz, Germany

²Institute of Zoology, Biozentrum Grindel, University of Hamburg, D-20146 Hamburg, Germany

Received 4 August 2008;
received in revised form
16 October 2008;
accepted 22 October 2008
Available online
30 October 2008

In this work, we report the cloning, heterologous expression, and characterization of two novel astacin proteases from the chelicerate *Limulus polyphemus* (horseshoe crab), designated as LAST (*Limulus astacin*) and LAST_MAM (*Limulus astacin* containing a MAM domain), respectively. The expression pattern showed ubiquitous occurrence of LAST_MAM, while LAST was predominantly restricted to the eyes and brain, indicating a function in the nervous system. Both enzymes contain the characteristic metzincin-type zinc-binding region and Met turn. While LAST is made up only of the typical prodomain and astacin-like protease domain, LAST_MAM contains an additional MAM (meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ) domain, which so far only has been found in few astacins such as the vertebrate meprin *Hydra* and squid enzymes, and in a number of other extracellular proteins such as A5 protein and tyrosine phosphatase μ . These gave rise to the designation MAM for this protein module. MAM domains have been shown to be responsible for protein oligomerization in meprin proteases and tyrosine phosphatase μ . Since the horseshoe crab has kept its body plan for almost half a billion years, it is therefore a privileged organism for the study of protease evolution. In this context, we could show by phylogenetic analysis that this protease is not related to the other MAM-domain-containing astacins indicating different evolutionary origins of these proteins. Moreover, we clearly demonstrated the divergent evolution of the MAM module itself, and not only with regard to proteases. However, there are some unique functional features that are not shared by other members of this protein family. For example, LAST_MAM is the only astacin protease known so far that is active in its zymogen form, indicating that the presence of the N-terminal propeptide does not prevent proteolytic activity.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: metalloprotease; astacin; MAM domain; horseshoe crab; evolution

Edited by R. Huber

Introduction

The astacin family of metalloproteinases comprises a versatile and diverse group of enzymes with

respect to function and evolutionary history. They have been found in bacteria and in the animal kingdom, but not as yet in plants and fungi.¹ Currently, more than 400 members of this family are found in protein and DNA databases. The protease family has been named after the digestive enzyme astacin from decapod crustacea.² However, their physiological roles span a variety of key functions beyond food digestion. For example, there is a large group of astacins specialized to cleave egg envelopes during embryonic hatching.^{3,4} Another group, comprising bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), and tolloid-like enzymes, is indispensable

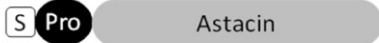
*Corresponding author. E-mail address:
beckerpa@uni-mainz.de.

Abbreviations used: BMP-1, bone morphogenetic protein-1; PLG-NHOH, benzyloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-hydroxamate; HMP2, *Hydra* metalloproteinase 2; RPTP μ , receptor protein tyrosine phosphatase μ ; EMBL, European Molecular Biology Laboratory.

(a)

```

1  atgaaactgatgagattaccattgctggtgacctctgctgtcgcagcacatggtatccca
   M K L M S I T L L L T S A V A A H V I P
61  cttccaaaattggccttgcagaataccgacttgttcgaaggagatattttgggaattggc
   L P K L A L Q N T D L F E G D I L G I G
121 agccctgaggaacagcaaacgccattcctaatacgacagtcacacgctggacagagggcgcgatt
   S P E D R N A I P N D S Q R W T E G A I
181 ccttacgtgattgacagttctctttctggtttgacacaaatgatacagcaggcaatgaac
   P Y V I D S S L S G L T Q M I Q Q A M N
241 cagtatcacaatacacctgcatcagattcaagaaggactacggagaccactatgtc
   Q Y H K Y T C I R F K K R T T E T H Y V
301 agaatggtcaaaaggacaaggttgcaattcctctggttggaaacatccatagaggagcgcag
   R M F K G Q G C N S F V G N I H R G A Q
361 aatttctcttaggctacggatgtgaatatcttggactgtcgtacacgaattgggacat
   N L S L G Y G C E Y L G T V V H E L G H
421 gcggtcggattttggcatgaacatactcggctgacagggacgattatcttaattcac
   A V G F W H E H T R S D R D D Y L N I H
481 tgggaaaacatcatgaatgggatggaaatctggtttaaaaagatgagtgtatttggaaac
   W E N I M N G M E I W F K K M S V F E N
541 cgctgcttgatagctttgactatgactccataatggtatctggggagacatcgttctcc
   R L L D T F D Y D S I M L Y G E T S F S
601 aaagacggacggttcacgtgcatgactgcaaaagacggaacttcttgaagagccctac
   K D G R S R V M T A K D G T F L K E P Y
661 aataagcctggtttgagcaaaagtgacattctccgatcaataagctgatgaatgtaat
   N K P G L S K S D I L R I N K L Y E C N
    
```



(b)

```

1  atgatcctgtagttttgctgattggttttgcattggggaacaccagtggttagacct
   M I L L V L F V I G F A W G T P V G R P
61  cttgaaaacttaggactcttccactgtaccactctaactctcttcgagggtgacatagca
   L E N L G D L P L Y H S N L F E G D I A
121 ggagtttagcccatatgcagataaaaatgccattggtgaccacacacttttggcctgga
   G V S P Y A D K N A I V D H T L L W P G
181 ggaattgttattacgaactagcgcagctgcccagcatccggaatcaaatcttgaa
   G I V Y Y E L A P A A A S I R N Q I L E
241 ggcatgaaagaataaccagaaaaaacatgtattcaattcaagaaaggactgctggagtg
   G M K E Y H E K T C I Q F K E R T A G V
301 aaagattatataaggattaatcgttacgatggttggctggtcaatggtgggtcgacaaggt
   K D Y I R I N R Y D G C W S M V G R Q G
361 ggaatgcaagaactctgctgggatatggatgtgaatggaaaggtctggttgtaacgaa
   G M Q E L S L G Y G C E W K G L V V H E
421 cttggacacgctgtaggatctggcatgaacaaaacagagctgatagagatgattacatc
   L G H A V G F W H E Q N R A D R D D Y I
481 gaggtaatctgggacaataactccaaagtatgcaatacaacttcaataaaatggacca
   E V I W D N I L Q S M Q Y N F N K M E P
541 tgggaaaataattacctaatacgaacgatttactacaactcggttatgtatacggagag
   W E N N Y L N E R F D Y K S V M L Y G E
601 actgcattttccaaggaatggaacctctcactggttaggcctaacaaccgggtggtgt
   T A F S K D G T S P T V R P K Q P G V V
661 attggtcctgtctggaagaaacctggttttagtgaaagtgcggttaggagagtgatcgt
   I G P V W K K P G F S E S D V R R V N R
721 ctttacgaatgttttggtaggtacgtccaccgcccgaaaaataaccagacttcaatcgt
   L Y E C F G E V R P P P P K I P D F I C
781 gactttgaaagcaatgactgtgggttggaaaatcaagtaggcatgcgtggtgaatttcaa
   D F E S N D C G L E N Q V G M R G E F Q
841 agaaaatacagataactcttggcggacggacaggctacttcatggtactgagtggttacatcg
   R K Y D T L G G R T G Y F M V L S V T S
901 agtggtaacttacgctgacagtcggttaattacaccatattttggagcatatggcaaccag
   S G T Y A D S R L I T P Y F G A Y G N Q
961 gatgtctgtatgtctgtggatgtatatatgtcaggaccagcagctacgtgatgttgaatt
   D V C M S V D V Y M S G P A V R D V E I
1021 tctcgcaagactcgaatcgggaatccattggcaagtaactgaggtctctaatctcgtgg
   S R Q D S N T E S I G K Y T E V S N S W
1081 gtgactcgttaacttcaacctcaaggcaggtcgtgaagatatgaggttctttatttttggct
   V T R N F N L K A G R E D M R F F I F A
1141 gctttggactccttattatggagatggagtagtggctgtggacaactaaaagttcaaacgc
   A L D P Y Y G D G V V A V D N L K F K R
1201 aaaccttgt
      K P C
    
```



Fig. 1. cDNA and amino acid sequences of (a) LAST and (b) LAST_MAM. The coding sequences of the signal peptides (S), propeptides (Pro), protease domains (astacin), and MAM domain are shaded according to the schematic presentation of the domain structures below the sequences. The conserved zinc-binding motif and the astacin-typical Met turn are boxed. The arginine (R45) and lysine (K48) residues in LAST_MAM, highlighted in bold letters and located within a linker region between the protease domain and the MAM domain, underlined in black, indicate potential tryptic cleavage sites.

for embryonic development due to its importance in the specific processing of precursors of extracellular matrix proteins such as procollagens and proteoglycans.⁵ In addition, they are involved in dorsoventral patterning of the embryo by their cleavage of growth factors and growth factor antagonists.⁶

A distinguished group of astacins are the meprin proteases, which so far have been only observed in vertebrates.⁷ Meprins are the only membrane-anchored astacins and have been implicated in immune reaction, cell migration, and tissue differentiation.^{8–10}

The divergence of astacins at the functional level is reflected in the differing multidomain structures of the astacins.¹¹ Like all proteases of the metzincin superfamily, their minimal domain structure comprises a propeptide that has to be cleaved off for activation¹² and a topologically similar catalytic domain containing the typical zinc-binding motif HExxHxxGxxH/N joined by a unique methionin-containing β -hairpin, Met turn.^{2,13,14} There are few astacins restricted to this minimal domain structure. However, the majority have additional domains C-terminal of the astacin-like protease unit. The more common motifs within this protease family are the EGF (epidermal-growth-factor-like) domain and the CUB (complement, sea urchin μ EGF and BMP-1) domain.^{15–17} For BMP-1, it is known that exosites formed by these additional domains are important for substrate recognition, thereby influencing enzyme specificity.⁶

As mentioned above, meprins are special astacins that can be membrane-bound or may be able to form huge oligomeric structures up to the megadalton range.^{18,19} This is facilitated by a disulfide bond formed between the unique MAM (meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ) domains C-terminal to the protease domain.²⁰ MAM domains are rarely present in other astacins and are generally thought to be responsible for protein–protein interactions.²¹

Although astacins are always secreted extracellularly, they differ in their domain structure and function, building a quite heterogeneous enzyme family. To understand the contribution of single astacins to the degradome as a whole, it is necessary to pursue several strategies. On one hand, one should use proteomics approaches to identify relevant substrates, preferably in an *in vivo* situation.²² On the other hand, it would be extremely helpful to get insights into the evolution of those molecules, which might provide valuable evidence for functional interrelationships.

In this work, we report the discovery of two novel astacin proteases from the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. This ancient chelicerate species is considered a living fossil because it has not changed its overall morphology since the Cambrian period. One of these astacins contains a MAM domain and is active as a proenzyme. On the basis of these observations, we propose that MAM-domain-containing astacins have divergent origins and that proforms of

astacins must not necessarily be proteolytically inactive.

Results

cDNA and amino acid sequences of LAST and LAST_MAM

cDNAs of two novel astacins were obtained from a phage library from the horseshoe crab *L. polyphemus*. The cDNA sequence of LAST (*Limulus astacin*) covers 720 bp and codes for a protein of 240 amino acids; the coding sequence of LAST_MAM (*Limulus astacin* containing a MAM domain) includes 1209 bp, encoding a protein of 403 amino acids (Fig. 1). Both enzymes consist of a signal domain, a prodomain, and a catalytic domain, with the latter including the astacin-typical zinc-binding motif HExxHxxGxxHE and the Met-turn SxMxY. LAST_MAM has an additional N-terminal MAM domain. The terminal amino acid of the propeptide is arginine (LAST) or lysine (LAST_MAM) (Fig. 1), indicating that proteolytic activation occurs *via* cleavage by a tryptic enzyme.

LAST_MAM mRNA is expressed ubiquitously, whereas LAST expression is dominant in the nervous system

To analyze the tissue-specific mRNA expression of LAST and LAST_MAM in *L. polyphemus*, total RNA was extracted from the muscle, gills, esophagus, brain, hepatopancreas, eye, proventriculus, and intestine. Using reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) with pairs of specific oligonucleotide primers, LAST mRNA was detected predominantly in the eye, and at lower levels also in the brain and esophagus (Fig. 2). By contrast, LAST_MAM signals were detected in all investigated tissues, most dominantly in the proventriculus and muscle.

LAST and LAST_MAM were heterologously expressed in insect cells yielding functional proteolytic enzymes

In order to express LAST and LAST_MAM in insect cells, the sequences encoding the signal pep-

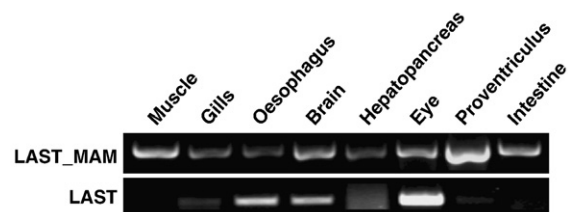


Fig. 2. Tissue-specific expression of LAST and LAST_MAM. The total RNA of isolated tissues from *L. polyphemus* was amplified by RT-PCR, followed by PCR using protease-specific primers corresponding to a fragment of 371 bp for LAST (from 48 bp to 419 bp) and to a fragment of 386 bp for LAST_MAM (from 42 bp to 428 bp).

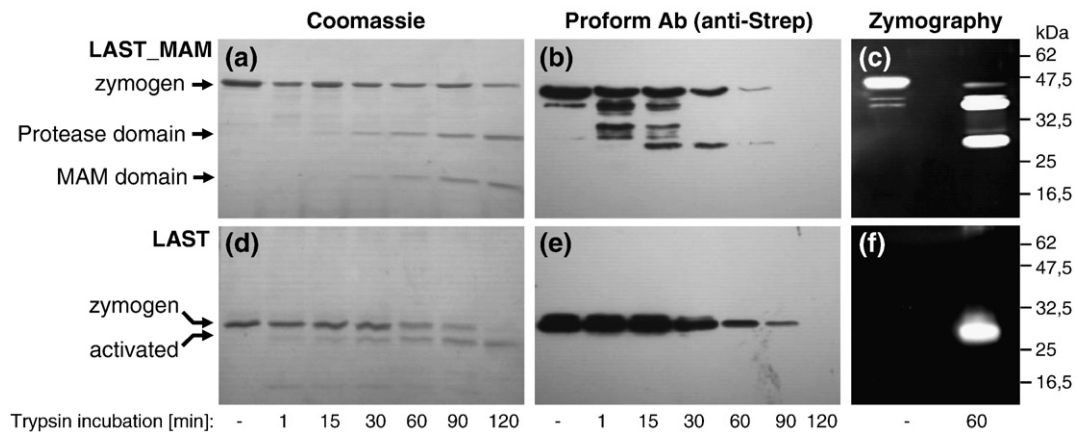


Fig. 3. Activation of LAST and LAST_MAM with trypsin. Both affinity-purified astacin proteases were incubated with 500 nM trypsin at 37 °C for given periods of time, as indicated beneath the gels. (a and d) The resulting proteins in an SDS gel stained with Coomassie. (b and e) The same protein analyzed by Western blot analysis using an anti-Strep-tag antibody detecting the proform. (c and f) Gelatin zymography displaying the activity of LAST and LAST_MAM in its zymogen form and preincubated with trypsin.

tide of human meprin alpha, including an adjacent Strep-tag, were attached to the cDNA of LAST and LAST_MAM following established protocols.^{10,17} (Fig. 1). The yield of proteins expressed in insect cells (Hi5) was about 3 mg/l medium. For proteolytic activation cleavage, purified enzymes were incubated with pancreatic trypsin (Fig. 3), which, in the case of LAST_MAM, yielded three major fragments with molecular masses of 45 kDa, 30 kDa, and 16 kDa on SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 3a). The full-length zymogen migrated as a 45-kDa band whose intensity successively decreased upon trypsin treatment within the 120-min incubation period (Fig. 3a and b). However, the mature active form, which should migrate based on a molecular mass of about 40 kDa, was not visible. It was possible to visualize the full-length LAST_MAM protein, in addition to C-terminally truncated protein variants, using an antibody directed against the Strep-tag attached to the aminoterminal of the propeptide (Fig. 3b). The intensity of the full-length form of LAST_MAM decreased after prolonged trypsin incubation (Fig. 3b). Moreover, a band of about 30 kDa corresponding to the one detected by Coomassie staining appeared, indicating cleavage of the protein C-terminal to the protease domain. By contrast, the 16-kDa band (Fig. 3a) was not detectable with the Strep-tag antibody. With regard to the molecular mass of the cleavage products of LAST_MAM caused by trypsin, it is most obvious that this processing occurs at two sites: between the protease domain and the MAM domain, and between the propeptide and the protease domain.

The tryptic processing of LAST resulted in a mature enzyme of about 26 kDa due to loss of the propeptide (Fig. 3d). In addition, detection of the N-terminal Strep-tag by Western blot analysis revealed only a single band of about 30 kDa that decreased in intensity after prolonged trypsin incubation (Fig. 3e).

To test whether LAST and LAST_MAM exhibit proteolytic activity after trypsin incubation, gelatin zymography was performed. While LAST degraded the substrate in a distinct band (Fig. 3f), LAST_MAM activity was detected in two major bands of 40 kDa and 28 kDa (Fig. 3c), corresponding to the signals detected by the anti Strep-tag antibody (Fig. 3b). Even the untreated proform of LAST_MAM showed activity and was therefore able to degrade gelatin (Fig. 3c). This was not observed for the zymogen of LAST (Fig. 3f) and has not been reported for any other astacin protease so far.

LAST and LAST_MAM cleave azocasein and matrix proteins, but not intact collagen I

Gelatin zymography in the presence of SDS (Fig. 3c and f) is based on denaturation and renaturation of the protein. The activity of both LASTs

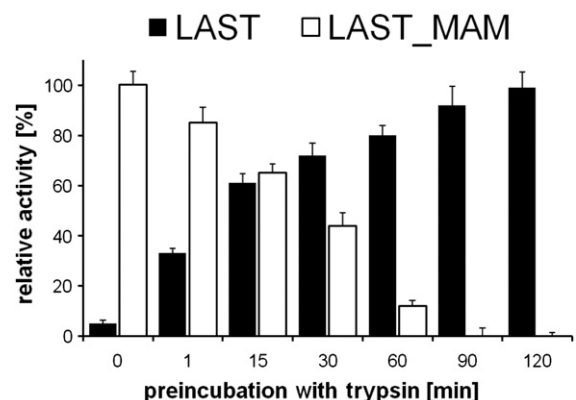


Fig. 4. Enzymatic activities of trypsin-incubated LAST and LAST_MAM. Purified LAST (black) and LAST_MAM (white) were activated using 500 nM trypsin at 37 °C for given periods of time and afterwards tested for azocasein-degrading activity. Trypsin was inhibited by addition of 10 μ M ovomucoid. The data represent averages of three independent activity assays.

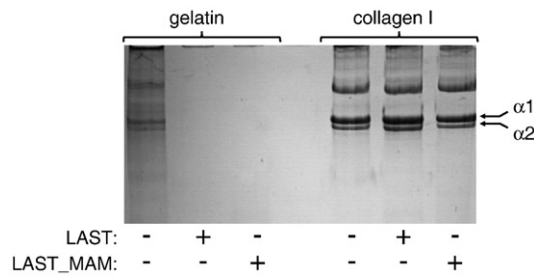


Fig. 5. Proteolytic activity of LAST and LAST_MAM against gelatin and collagen I. Portions of 10 μ g of gelatin and 20 μ g of collagen I were incubated with 500 nM purified LAST (trypsin-activated) and LAST_MAM (zymogen) for 20 h at 37 $^{\circ}$ C in 0.1 M Tris/HCl(pH 7.5) in a total volume of 30 μ l. Afterwards, samples were separated on 7.5% (wt/vol) polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue. Controls (lanes C) contained substrates only.

under non-denaturing conditions was tested with azocasein as substrate (Fig. 4). As expected, the relative activity of LAST increased after prolonged incubation with trypsin. By contrast, LAST_MAM showed the highest proteolytic activity in its zymogen form, while the potential to cleave azocasein decreased after trypsin incubation, probably due to successive degradation.

Because all known astacins, including those from *L. polyphemus*, are secreted proteins, we were interested on whether LAST and LAST_MAM were capable of cleaving extracellular proteins (e.g., collagen I and gelatin). Both enzymes showed gelatinolytic activity, whereas the α -1 and α -2 chains of triple-helical collagen I stayed intact (Fig. 5). In addition, we observed cleavage of the extracellular matrix components fibronectin, collagen IV, and laminin I, and of the laminin I/nidogen I complex, by LAST and LAST_MAM (data not shown). Thus, both proteases have the ability to modulate the extracellular matrix.

Metalloprotease inhibitors PLG hydroxamate and actinonin inhibit LAST_MAM more strongly than LAST

The activity of both LAST and LAST_MAM was strongly inhibited by *ortho*-phenanthroline, which acts as a general metalloprotease inhibitor by chela-

ting the catalytic zinc (Table 1). However, both enzymes showed significant differences with more specific inhibitors. While the proteolytic activity of LAST was only weakly influenced by benzyloxy-carbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-hydroxamate (PLG-NHOH) and actinonin (83% and 89% remaining activity, respectively), it was completely abolished by the plasma inhibitor α -2 macroglobulin. By contrast, LAST_MAM is highly sensitive to PLG-NHOH (about 15% remaining activity) and showed also effects with α -2 macroglobulin and actinonin (about 45% remaining activity).

Three-dimensional homology models of the protease domains of LAST and LAST_MAM, based on the structure of astacin, revealed that the first has no charged residue and that the latter has only a single charged residue (Asp62) within the active-site cleft, which might influence substrate specificity (Fig. 6). This indicates no striking preference for polar amino acids in the positions P1-P1'.²³ Nevertheless, the active-site cleft of LAST is narrower than that of LAST_MAM, indicating lower accessibility for bigger residues such as tryptophan or tyrosine and possibly explaining the different sensitivities to the tested inhibitors.

LAST and LAST_MAM are grouped in a chelicerate clade of astacin proteases

A multiple-sequence alignment was constructed from amino acid sequences of the catalytic domains of selected astacins from various selected species (Fig. 7). The final alignment includes the amino acid residues 46–240 and 48–248 of LAST and LAST_MAM, respectively.

Phylogenetic analysis employing a Bayesian method identified several distinct clades within the astacin family (Fig. 7). Meprins, hatching enzymes, and tolloids were grouped together in well-supported monophyletic clades. In other branches, groups of proteases—which are restricted to distinct taxa such as the astacins from Cnidaria, Chelicerata, Nematoda, Decapoda, and Cephalopoda—were combined. Interestingly, there is obviously no close phylogenetic relation between the MAM-domain-containing astacins. By contrast, these proteases clustered separately [i.e., LAST_MAM, vertebrate meprins, squid myosinases, *Hydra* metalloproteinase 2 (HMP2) from *Hydra*, and NVE MAM (*Nematostella vectensis* containing a MAM domain) from a sea anemone].

Table 1. Inhibition of LASTs

	1,10 <i>ortho</i> -phenanthroline (1.0 mM) [%]	PLG-NHOH (0.4×10^{-6} M) [%]	α -2-macroglobulin (0.5×10^{-6} M) [%]	Actinonin (0.6×10^{-6} M) [%]
LAST	10 \pm 3.6	83 \pm 4.6	1.5 \pm 0.3	89 \pm 3.6
LAST_MAM	12 \pm 1.7	15.5 \pm 2.3	42 \pm 1.3	45 \pm 2.6

(%) Remaining activity.

Trypsin-activated LAST and the zymogen of LAST_MAM were preincubated with different inhibitors for 30 min at 37 $^{\circ}$ C in the given final concentrations and afterwards tested for azocasein-cleaving activity. The results show the remaining activity compared to those of untreated positive controls. Data represent the means of three independent activity assays with standard deviations (\pm).

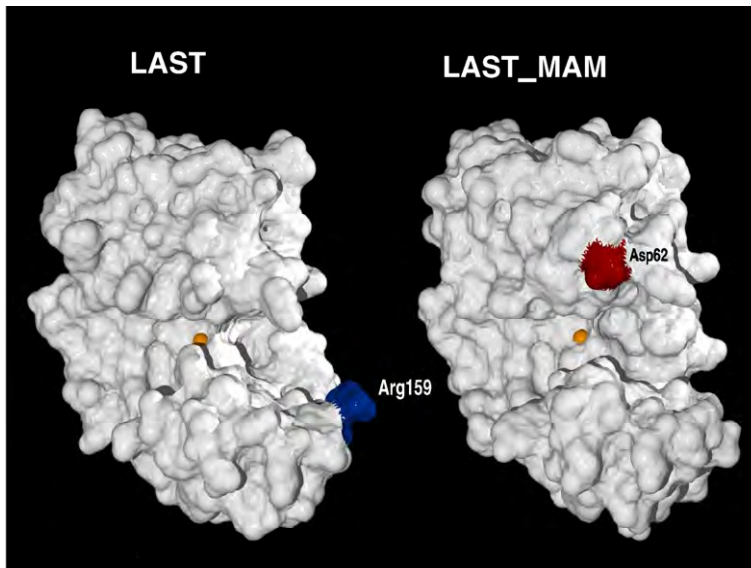


Fig. 6. Homology models of the catalytic domains of LAST and LAST_MAM. The homology surface models were computed based on the crystal structure of astacin from *A. astacus*. Highlighted are characteristic acidic (red) and basic (blue) residues around the cleavage site with the central zinc ion (orange).

Homology models and phylogenetic analysis indicate a heterogeneous origin for MAM domains

In order to elucidate whether the MAM-containing astacins are monophyletic within the astacin family, we extended the phylogenetic study by comparing the MAM domains from meprins, squid myosinases, HMP2, NVE MAM, and LAST_MAM. These sequences were compared to the MAM moieties of nonastacin proteins such as receptor protein tyrosine phosphatase μ (RPTP μ), neuropilin, and zonadhesin.^{24–26} Within the vertebrate meprins, the MAM-derived phylogenetic tree was identical with that based on the protease domains (Figs. 7 and 8). The MAM domains from invertebrate astacins were clearly separated into two clusters. The first cluster contained proteases from *Hydra vulgaris* (HMP2), *N. vectensis* (NVE MAM), and *L. polyphemus* (LAST_MAM), whereas the second cluster included the squid myosinases.

Interestingly, only the MAM domains of zonadhesins show no relation to astacins, thus building a separate cluster. Furthermore, there seems to be a closer phylogenetic relation between the MAM domains from RPTP μ and meprins (Fig. 8, dark gray over light-gray background), as well as between those from myosinases and neuropilins (Fig. 8, light gray over dark-gray background), compared to the MAM domains from the other astacins.

The striking differences between the MAM domains of LAST_MAM, human meprins, HMP2, and RPTP μ were further confirmed upon examination of homology models, based on the crystal structure of human RPTP μ ²⁴ (Fig. 9). There are two disulfide bonds: one linking the first cysteine residue with the second cysteine residue, and another linking the third cysteine residue with the fourth cysteine residue. These four cysteine residues are conserved within all MAM domains (Fig. 9a). By contrast, meprins contain a fifth cysteine within an

external loop, which is not present in the other MAM domains (Fig. 9b). The fifth cysteine is most likely relevant to dimerization of meprin monomers by intermolecular covalent linkage (Fig. 9c).

Discussion

In the present work, we characterized two novel astacins from the horseshoe crab *L. polyphemus* at the mRNA, cDNA, protein, and phylogenetic levels. The shorter enzyme LAST is composed of a propeptide and a catalytic domain, and resembles the prototypical crayfish astacin from *Astacus astacus* in terms of its domain structure. Hence, one might assume that LAST might likewise act as a digestive enzyme.²⁷ Indeed, analyses of tissue-specific distribution in the horseshoe crab revealed that LAST is expressed in the so-called proventriculus—a valve-like compartment of the digestive tract positioned approximately before the stomach. However, LAST mRNA is predominantly expressed in the eye and also in brain tissue. Therefore, a specific role of LAST in the nervous system is more likely than a digestive function.

The second identified LAST, LAST_MAM, contains an additional MAM domain. This C-terminal module is also present in a few other astacin peptidases, namely, in myosinases from squids,²⁸ in NVE MAM from the sea anemone *N. vectensis*, in HMP2 from *H. vulgaris*,²⁹ and in meprins.¹⁸ Meprins have so far been identified only in vertebrates⁷ and include additional domains C-terminal to the MAM domain, determining their uniqueness, namely, a TRAF (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor) domain, an inserted (in the case of alpha) domain, an EGF domain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic domain. The physiological function of the MAM-containing astacin proteases is still poorly understood, with the exception of HMP2, which is involved in the foot morphogene-

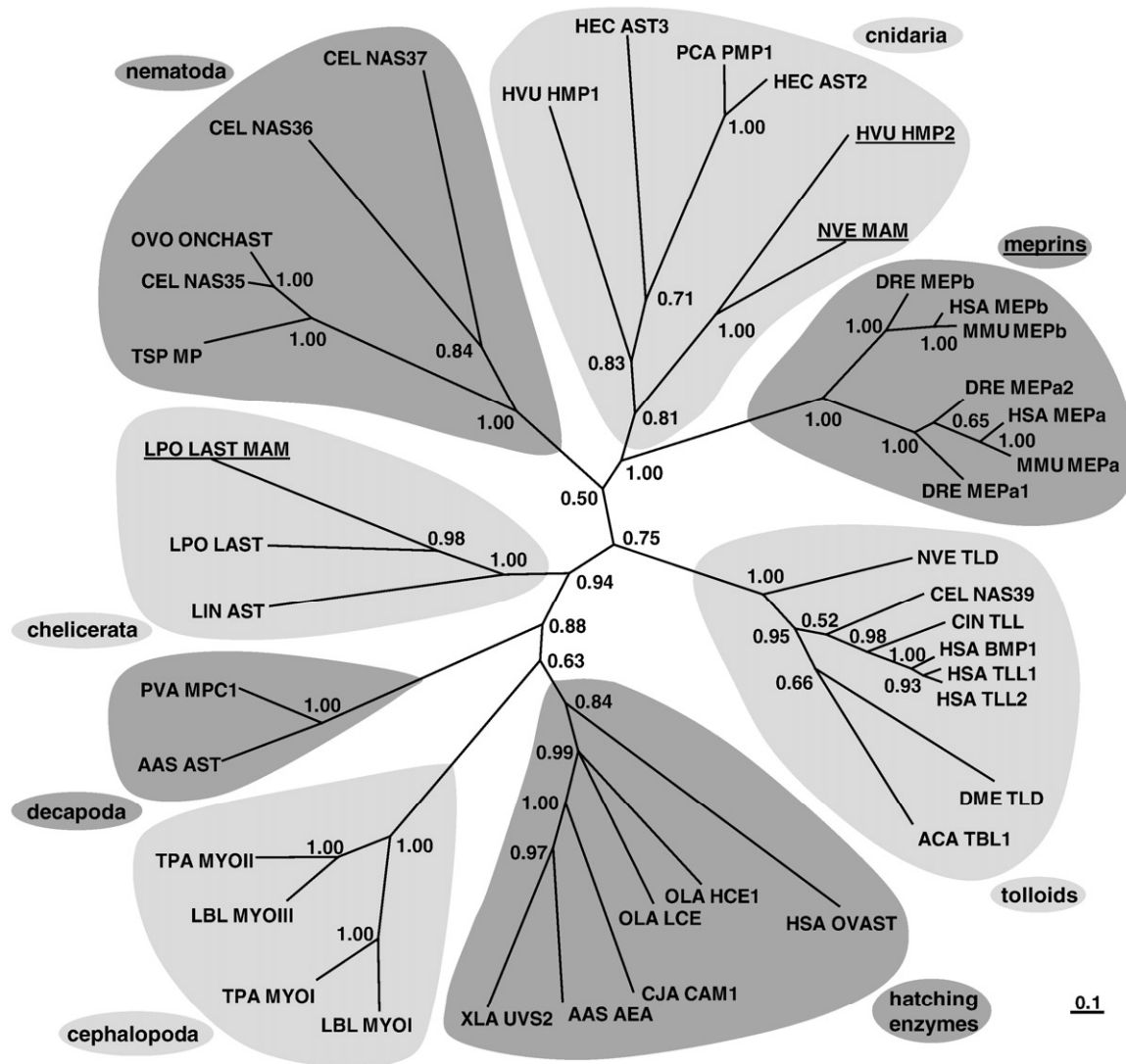


Fig. 7. Phylogenetic tree of astacins. The tree is generated using an alignment of the catalytic domains of all displayed proteases. All astacins containing a MAM domain are underlined. Protein clusters are shown against light-gray and dark-gray backgrounds. The numbers show the relative probability of branching. The SwissProt/EMBL accession numbers of the astacins are as follows: AAS AEA (O44072); AAS AST (P07584); ACA TBL1 (P91972); CEL NAS35 (P98060); CEL NAS36 (Q18206); CEL NAS37 (Q93243); CEL NAS39 (Q20176); CIN TLL (Q4H2P2); CJA CAM1 (P42662); DME TLD (P25723); DRE MEPa1 (Q5RHM1); DRE MEPa2 (Q5RHM2); DRE MEPb (Q08CC4); HEC AST2 (Q2MCX8); HEC AST3 (Q2MCX7); HSA BMP-1 (P13497); HSA MEPa (Q16819); HSA MEPb (q16820); HSA OVAST (Q6HA08); HSA TLL1 (O43897); HSA TLL2 (Q9Y6L7); HVU HMP1 (Q25174); HVU HMP2 (Q9XZG0); LBL MYOI (Q8IU47); LBL MYOIII (Q8IU44); LIN AST (A0FKN6); LPO LAST (B4F319); LPO LAST_MAM (B4F320); MMU MEPa (P28825); MMU MEPb (Q61847); NVE MAM (A7S13); NVE TLD (Q27W05); OLA HCE1 (P31580); HCE LCE (P31579); OVO ONCHAST (Q2YFS7); PCA PMP1 (O62558); PVA MPC1 (Q20AS7); TPA MYOI (Q8IU46); TPA MYOII (Q8IU45); TSP MP (Q8T5Z5); XLA UVS2 (P42664).

sis of *H. vulgaris*.²⁹ Thereby, it is also possible that both LAST proteases play roles in embryonic development. Nevertheless, the enzymes are definitively

abundant and active in the physiology of the adult organism. The proposed function of the myosinases from squids—that of cleaving myosin^{30,31}—has to

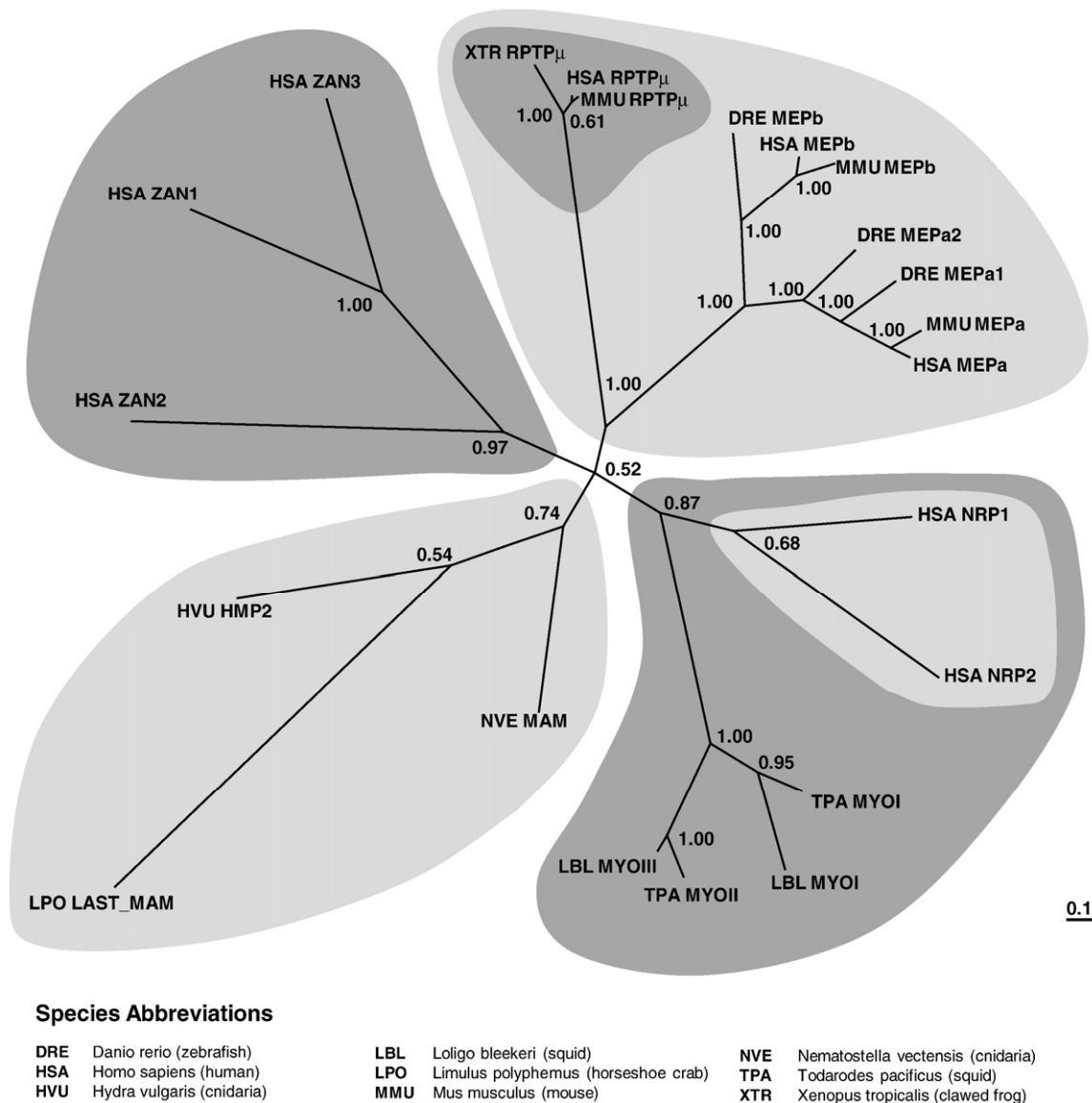


Fig. 8. Phylogenetic tree of MAM domains from astacins and other proteins. Protein clusters are shown against light-gray and dark-gray backgrounds. The numbers show the relative probability of branching. The SwissProt/EMBL accession numbers of the proteins are as follows: DRE MEPa1 (Q5RHM1); DRE MEPa2 (Q5RHM2); DRE MEPb (Q08CC4); HSA MEPa (Q16819); HSA MEPb (q16820); HSA NRP1 (O14786); HSA NRP2 (O60462); HSA RPTP μ (P28827); HSA ZAN1,2,3 (Q9Y493); HVU HMP2 (Q9XZG0); LBL MYOII (Q8IU47); LBL MYOIII (Q8IU44); LPO LAST_MAM (B4F320); MMU MEPa (P28825); MMU MEPb (Q61847); MMU RPTP μ (P28828); NVE MAM (A7SJ13); TPA MYOII (Q8IU45); TPA MYOIII (Q8IU46); XTR RPTP μ (A8WGH6).

be treated with caution, since their myosin-cleaving activity has been observed only *in vitro*. Astacins are generally secreted proteins and are not in contact with cytoplasmic proteins such as myosin, except in food digestion. At this point, the physiological function of LAST_MAM is likewise unclear. The tissue-specific expression reveals a rather ubiquitous distribution indicating a more general function in the remodeling of the extracellular matrix during cell proliferation, as it is also discussed for the meprins. In this context, we characterized both recombinant enzymes with regard to their activation, proteolytic activity, and inhibition, revealing unique molecular features.

While LAST is a typical astacin that can be activated by cleaving off the propeptide by trypsin, LAST_MAM activity decreases with prolonged incubation with the serine protease. *Via* gelatin zymography, azocasein assay, and Western blot analysis, we could identify LAST_MAM as the first astacin that is already active in its zymogen form. This is known so far only for matrix metalloproteases 2 and 9.³² However, in the case of matrix metalloproteases, this behavior only is observed in SDS-PAGE zymography-based assays, implying denaturation and renaturation of the protease. In the case of LAST_MAM, the zymogen was also active in the nondenaturing azocasein assay. By comparison of

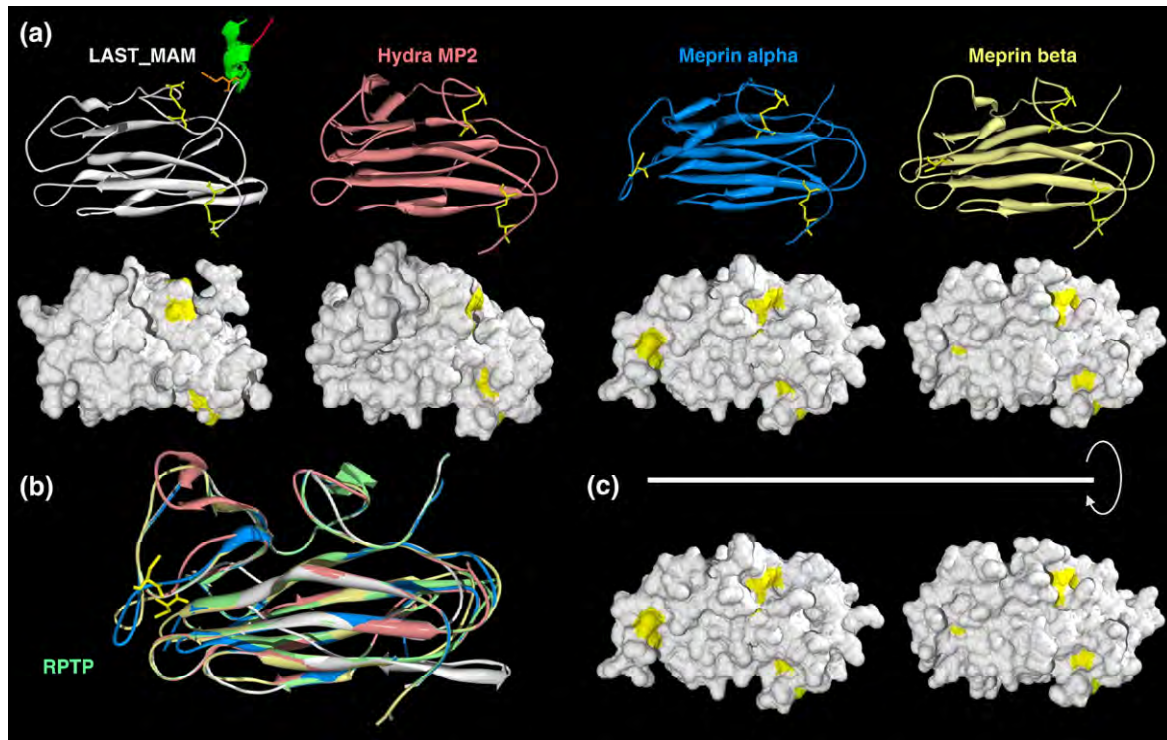


Fig. 9. Homology models of the MAM domains from LAST, LAST_MAM, HMP2, and meprins. The ribbon models (a) show typical beta strand folding and conserved disulfide bonds (yellow). The MAM domains of meprins reveal an additional cysteine residue in an external loop (a) that is clearly visible in an overlay with the other MAM domains (b). Since this residue is located at the surface (a), it might be responsible for meprin dimerization, building an intermolecular disulfide bond with the respective residue of the other MAM domain (c).

the amino acid sequences of the propeptides of several astacins, no striking difference between LAST, LAST_MAM, and other members of this family could be identified. Indeed, there is a deletion resulting in the loss of a conserved leucine residue (FxGDIxL) in the propeptide of LAST_MAM, but this can also be seen in a few other astacins such as UVS2 from *Xaenopus* or in carp nephrosin (data not shown). However, since the only available structure of an astacin so far is solved from the mature enzyme, it is still speculative how the propeptide interacts with the active-site cleft to prevent proteolytic activity.³³

Interestingly, incubation of LAST_MAM with pancreatic trypsin did not lead predominantly to the processing of the propeptide of LAST_MAM, but rather to cleavage in the linker region between the protease and the MAM domain. This was confirmed by the results of the Western blot analysis, using a proform antibody, and by gelatin zymography. Both assays showed neither signal nor activity, respectively, in the region of about 16 kDa corresponding to the band seen in the Coomassie-stained gel. The most probable cleavage site (in red in Fig. 1b) is a lysine (K254) C-terminal to a 4× proline helix, connecting the protease and the MAM domain. We further tested whether LAST_MAM is activated autocatalytically, like it is known for astacin from crayfish.¹² However, long-term incu-

bation of LAST_MAM in the absence of another protease did not result in specific processing of the propeptide (data not shown). Additionally, we cloned and expressed an inactive mutant by substitution of the catalytically essential glutamate for an alanine. Although the E/A mutant could be detected in the cell lysate, it was not possible to purify it from the medium, indicating that it was not secreted by the cells (data not shown). This might be due to misfolding of the protein. Nevertheless, since there are no structural data of such an inactive mutant available, it is highly speculative. Furthermore, we incubated LAST_MAM with several other serine proteases, namely, plasmin, human kallikrein-related peptidases KLK4, KLK5, KLK6, KLK10, and KLK11, which all lead to the cleavage of the protein like that seen for trypsin (data not shown). Taken together, these data suggest that, in the case of LAST_MAM, the propeptide has lost its function to prevent early proteolytic activity. It appears very unlikely that these observations are due to incorrect folding of the protein because the recombinant protease was expressed in a eukaryotic system and correctly secreted to the cell media. Proper folding of the protein was also supported by inhibition studies.

As expected, LAST and LAST_MAM showed strongly decreased activity after incubation with the metal chelator *ortho*-phenanthroline. By using

PLG-NHOH and the naturally occurring hydroxamate actinonin, a more specific inhibition of LAST_MAM is detectable. This correlates with the homology models of the active sites of both *Limulus* proteases based on the crystal structure of astacin. The active-site cleft of LAST is much narrower than that of LAST_MAM, indicating a more restricted access for inhibiting molecules. In contrast, the broad-spectrum plasma inhibitor alpha-2 macroglobulin is a very strong inhibitor for the smaller LAST protease, and a much weaker one for the MAM-domain-containing LAST_MAM, which is consistent with the limited access of larger proteases to the reactive bait region of this protease scavenger.³⁴

Furthermore, we showed that both enzymes are able to degrade gelatin but not triple-helical collagen I. Additionally, collagens IV and VI, fibronectin, laminin I, and the laminin I/nidogen I complex could be processed *in vitro*, albeit with different cleavage patterns (data not shown). Nevertheless, this is no striking indication for *in vivo* functions of LAST and LAST_MAM, since it is more important to determine if the protease and the substrate are colocalized in the interstitium. Here, the function of the MAM domain could be an intermolecular interaction with the physiological counterpart. A scenario of a proteolytic cascade is possible, while the release of the protease domain by tryptic cleavage might then lead to better access of the truncated version of LAST_MAM to other proteins and, therefore, to substrates. Nevertheless, this assumption has to be proofed by further investigations.

The phylogenetic analyses based on the proteolytic domains suggest two distinct levels of evolution within the astacin family of metalloproteases.

On one hand, there is clustering of orthologous and/or functionally related proteases, regardless of organism; examples are the meprins, the hatching enzymes, and the tolloid-like astacins. On the other hand, there are clusters of astacins that are predominantly present in certain taxa and therefore form distinct branches, such as many astacins from Cnidaria or Nematoda.

Here, it was of special interest to know whether all MAM-domain-containing astacins share universal features and are derived from a common precursor, or whether these peptidases have divergent evolutionary origins. Phylogenetic studies with the protease domains clearly indicate an independent evolution of MAM-containing astacins. While the meprins and the squid myosinases form common clades, all other structurally related enzymes branch out separately. LAST_MAM groups with LAST and with the astacin peptidase from the spider *Loxosceles intermedia*, thus building a chelicerate cluster. *Loxosceles* astacin-like metalloprotease could be characterized as a toxin in the venom glands of the brown spider, being responsible for extracorporeal digestion.³⁵ Since *Limulus* does not possess venomous chelicera, there is no direct functional relation between the proteases of the horseshoe crab and of the spider astacin.

Because this phylogenetic analysis is based only on the protease domains of astacins, we further tested if the MAM domains themselves show comparable development. Again, it turned out that this type of module has no common origin within the astacin family. Indeed, LAST_MAM built a cluster with HMP2 from *H. vulgaris* and NVE MAM from *N. vectensis*, but it is definitely evolutionarily separated from the meprins and myosinases. Furthermore, it could be seen that meprins' MAM domains cluster in a branch together with the nonproteolytic RPTP μ , whereas the myosinase MAMs are related to those in neuropilins. Consequently, MAM-domain-containing astacins do not have a common precursor molecule. In fact, this would imply that there were possibly four different joining events between an astacin-like protease domain and a MAM module in metazoan evolution. This is nicely exemplified in the case of meprins. Here, the protease cluster emerged from a single precursor molecule. The meprin alpha branch diverged from the beta paralogue, most likely by gene duplication. The phylogenetic trees derived from the protease and the MAM domains are identical, suggesting that the conserved domain structure of meprins appeared already in the primordial meprin precursor.

In order to obtain more detailed information about structural similarities and differences explaining the phylogenetic analysis, we generated homology models of the homologue MAM domains from several astacins, based on the crystal structure of RPTP μ .²⁴ The beta strands, as well as the two intramolecular disulfide bonds, are highly conserved as typical structural elements. But there is one striking difference observed with the meprins. Here, the MAM domains cover an additional external loop containing a fifth cysteine residue. Since it is known that meprins build dimers covalently linked by a disulfide bond, it appears most probable that this occurs between the MAM domains of two monomers. Ishmael *et al.* suggested that the responsible residues for meprin dimerization are the second and third cysteines in the MAM domains.²⁰ The authors postulated two intermolecular disulfide bonds and, additionally, one intramolecular bond between the first and the last cysteine residues, whereas the fourth cysteine residue was supposed to be free. However, this scenario appears unlikely in light of the now available three-dimensional structure of a MAM domain. With regard to meprins and considering the fact that RPTP μ mediates cell adhesiveness by *trans* dimerization,^{21,36} we also tested whether LAST_MAM would be able to form disulfide-linked oligomers using nonreducing SDS-PAGE. However, under these conditions, the LAST_MAM monomers did not form covalently linked oligomers (data not shown). As known from RPTP μ ,²⁴ protein-protein interactions between MAM domains must not necessarily be mediated by disulfide bonds. It appears that MAM domains can offer various options for binding. In the case of meprins, MAM domains seem to have a more structural function, whereas those from the other

astacins might be involved in protease–substrate recognition.

In conclusion, the identification and molecular characterization of LAST and LAST_MAM from *L. polyphemus* revealed unique features in new members of the astacin family of zinc endopeptidases. Moreover, the phylogenetic analysis of these astacins, together with several other MAM-domain-containing proteins, unveiled the divergent evolution of MAM-containing astacins and MAM proteins in general.

Materials and Methods

L. polyphemus maintenance

Horseshoe crabs (*L. polyphemus*) were obtained from the Marine Biological Laboratory (Woods Hole, MA 02543, USA). Animals were kept in artificial seawater under constant conditions at a temperature of 18 °C and a schedule of 14 h light/10 h darkness.

RNA isolation and RT-PCR

All materials for RNA isolation and polymerase chain reaction were obtained from Peqlab (Erlangen, Germany). The entire work on RNA and DNA was performed with water containing diethylpyrocarbonate as inhibitor for RNases. The total RNA of *L. polyphemus* was prepared from tissues using the peqGOLD Total RNA Kit. Equal amounts of RNA (1 µg) were transcribed into cDNA in 25-µl reaction mixtures using MMLV reverse transcriptase (200 U/µl), unspecific oligo d(T)_{18–21} primers (10 mM; Roth, Karlsruhe, Germany), additional RNase inhibitor (30 U/µl), and dNTPs (200 µM). After transcription, 2 µl of the newly synthesized cDNA was used as template for PCR, which was performed with 2.5 U of *Taq* Polymerase (NEB, Frankfurt aM, Germany), 200 µM dNTP mix, and 0.2 pM of each primer (sense and antisense).

The following primers (Biomers GmbH, Ulm, Germany) were used:

LAST [European Molecular Biology Laboratory (EMBL) nucleotide database accession no. AM946032]: sense 5'-CATGTTATCCCACTTCCA-3'; antisense 5'-TGTC-CCAATTCGTGTACGA-3'

LAST_MAM (EMBL nucleotide database accession no. AM946033): sense 5'-ACACCAGTGGGTAGACCT-3'; antisense 5'-TGTCCAAGTTCGTGTACAA-3'.

After initial denaturing at 95 °C for 5 min, PCR was carried out in 35 cycles consisting of 94 °C for 60 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s. Equal amounts of the PCR products were visualized by separation on a 1% agarose gel containing 0.04% ethidium bromide. Sequencing of purified PCR fragments was performed by GENterprise (Mainz, Germany).

Protein expression and purification

Cloning was performed following standard procedures,³⁷ using human meprin alpha cDNA in pFastBac 1 (Gibco Life Technologies, Paisley, UK)¹⁰ and pBK CMV Phagemid vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA) containing the cDNA of LAST and LAST_MAM. The following

primers were used to insert each cDNA (beginning with the propeptide) into the meprin alpha vector, attached directly to the 3'-end of the signal peptide and the Strep-tag:

LAST and LAST_MAM: sense 5'-CCGCGGCCGC-TCTAGAAGTAC-3'

LAST: antisense 5'-GAGAGAATTCATGTTATCC-GACTT-3'

LAST_MAM: antisense 5'-GAGAGAATTCCTCCA-GTGGGTAGA-3'

Primers were synthesized by Biomers GmbH; sequences of constructs were verified by DNA sequencing (GENterprise). Recombinant protein was expressed using the Bac-to-Bac expression system (Gibco Life Technologies) following the manufacturer's instructions. All media and supplements were obtained from Gibco Life Technologies. Recombinant baculoviruses were amplified in adherently growing *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells at 27 °C in Grace's insect medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. Protein expression was performed in 500-ml suspension cultures of HighFive insect cells (*Trichoplysia ni*) growing in Express Five SFM supplemented with 4 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin in Fernbach flasks using a Multitron orbital shaker (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). Cells were infected at a density of 2×10^6 cells/ml with an amplified viral stock at a multiplicity of infection of ~10. Protein expression was stopped after 72 h; media were stored at -20 °C until further use. Recombinant protein was further purified from the media by ammonium sulfate precipitation (60% saturation), with stirring overnight at 4 °C, followed by centrifugation at 11,000g for 2 h at 4 °C. Pellets were dissolved in 1/10 vol of 100 mM Tris and 50 mM NaCl (pH 8.0), and dialyzed against the same buffer. Protein solution was then loaded on a Streptactin column (IBA GmbH, Göttingen, Germany). After a washing step using the Tris buffer, the protein was eluted with 100 mM Tris, 50 mM NaCl, and 2.5 mM desthiobiotin (pH 8.0) under native conditions.

SDS-PAGE and Western blot analysis

For Coomassie staining and immunoblot analysis, proteins were subjected to 10% SDS-PAGE³⁸ under reducing conditions. Proteins were visualized with Coomassie brilliant blue G-250 or transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon P; Millipore, Eschborn, Germany) by electroblotting (80 mA per minigel for 75 min). For detection with specific antibodies, the membrane was saturated with 5% albumin in Tris-buffered saline for 1 h at room temperature, incubated with the first antibody (monoclonal mouse anti-Strep-tag antibodies, 1:1000; IBA GmbH) for 1 h, and, afterwards, incubated with horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000; Dianova GmbH, Hamburg, Germany) for 45 min at room temperature. Detection was performed with Rotilumin (Roth) following the manufacturer's instructions using X-ray film (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Magic Mark XP (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as a molecular weight marker.

Activation assays

For activation assays, the zymogens of LAST and LAST_MAM (10 µM each) were incubated with 500 nM

porcine trypsin (Fluka, Deisenhofen, Germany) for given periods of time at 37 °C. Afterwards, trypsin was inhibited using 10 µM chicken ovomucoid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Enzyme activity was determined using azocasein as substrate. Activated enzyme was incubated with 11 mg/ml azocasein in 20 mM ethanolamine and 140 mM NaCl (pH 9.5) at 37 °C. After an incubation time depending on enzyme concentration, the protein was precipitated by adding trichloroacetic acid up to a final concentration of 3.5% and by centrifuging at 13,000g for 4 min. Product concentration in the supernatant was measured photo-metrically at 340 nm.

Proteolytic activity of unreduced proteins (1 µg of each sample) was also assayed by zymography using SDS polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin.³⁹ Staining was performed immediately after electrophoresis.

Proteolytic activity of LASTs against extracellular matrix components

LAST and LAST_MAM (50 nM in the final concentration) were incubated with 20 µg of collagen I, collagen IV, and gelatin from human placenta (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), fibronectin from human plasma (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and recombinant human nidogen-1 [kindly provided by Dr. Takako Sasaki and Dr. Rupert Timpl (deceased), Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany] for 20 h at 37 °C in 0.1 M Tris/HCl (pH 7.5) in a total volume of 50 µl. The reactions were terminated by addition of sample buffer containing dithiothreitol. The samples were boiled and subjected to electrophoresis on a 7.5% polyacrylamide gel. Proteins were visualized with Coomassie brilliant blue G-250.

Inhibition assays

The following inhibitors were tested for their inhibitory effect on LAST and LAST_MAM (the final concentrations are in parentheses): 1,10-ortho-phenanthroline (0.8 mM), Pro-Leu-Gly-hydroxamate (0.4×10^{-6} M; Bachem, Heidelberg, Germany), α_2 -macroglobulin (0.5×10^{-6} M), and actinonin (0.6×10^{-6} M; Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Protease activities were determined using azocasein as described above. LAST and LAST_MAM were used at a final concentration of 500 nM.

Alignments, phylogenetic analysis, and homology models

Sequences were aligned using ClustalX 2.0,⁴⁰ setting opening GAP penalties to 5.0. Sequence alignments were edited with GeneDoc 2.6.02⁴¹ and comprised the complete catalytic domains up to Cys198 (astacin numbering).

After alignment, the molecular structures of the catalytic and MAM domains were predicted by Swiss-MODEL.⁴² Modeling was performed with DeepView SwissPDB Viewer 3.7⁴³ based on the crystal structure of astacin from *A. astacus*² (PDB code 1AST) and the crystal structure of the MAM domain of RPTP μ ²⁴ (PDB code 2C9A).

Phylogenetic trees of astacins from different species were computed with MrBayes 3⁴⁴ using the PAM-Dayhoff distance matrix, and consensus trees were visualized by TreeView 1.16.7.⁴⁵

Acknowledgements

We thank Dr. Viktor Magdolen and Dr. Mekdes Debela for providing us human kallikrein-related peptidases, and Dr. Jürgen Markl for providing us tissue samples from *L. polyphemus*.

References

- Gomis-Rüth, F. X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* **24**, 157–202.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., Huber, R., Zwilling, R. & Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*, **358**, 164–167.
- Quesada, V., Sanchez, L. M., Alvarez, J. & Lopez-Otin, C. (2004). Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. *J. Biol. Chem.* **279**, 26627–26634.
- Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Hiroi, J., Naruse, K., Inoue, M. & Iuchi, I. (2006). Evolution of teleostean hatching enzyme genes and their paralogous genes. *Dev. Genes Evol.* **216**, 769–784.
- Hopkins, D. R., Keles, S. & Greenspan, D. S. (2007). The bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol.* **26**, 508–523.
- Hintze, V., Höwel, M., Wermter, C., Grosse Berkhoff, E., Becker-Pauly, C., Beermann, B. *et al.* (2006). The interaction of recombinant subdomains of the procollagen C-proteinase with procollagen I provides a quantitative explanation for functional differences between the two splice variants, mammalian tolloid and bone morphogenetic protein 1. *Biochemistry*, **45**, 6741–6748.
- Schütte, A., Lottaz, D., Sterchi, E. E., Stöcker, W. & Becker-Pauly, C. (2007). Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*. *Biol. Chem.* **388**, 523–531.
- Crisman, J. M., Zhang, B., Norman, L. P. & Bond, J. S. (2004). Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J. Immunol.* **172**, 4510–4519.
- Herzog, C., Kaushal, G. P. & Haun, R. S. (2005). Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. *Cytokine*, **31**, 394–403.
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufvenne, K., Oji, V. *et al.* (2007). The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1115–1125.
- Möhrlen, F., Maniura, M., Plickert, G., Frohme, M. & Frank, U. (2006). Evolution of astacin-like metalloproteases in animals and their function in development. *Evol. Dev.* **8**, 223–231.
- Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Schilling, O., Wegmann, F., Helms, M. W., Auge, A. *et al.* (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.

13. Stöcker, W. & Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 383–390.
14. Stöcker, W., Gomis-Rüth, F. X., Bode, W. & Zwilling, R. (1993). Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur. J. Biochem.* **214**, 215–231.
15. Möhrlein, F., Hutter, H. & Zwilling, R. (2003). The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4909–4920.
16. Blanc, G., Font, B., Eichenberger, D., Moreau, C., Ricard-Blum, S., Hulmes, D. J. & Moali, C. (2007). Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold: conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 16924–16933.
17. Borchert, N., Becker-Pauly, C., Wagner, A., Fischer, P., Stöcker, W. & Brattig, N. W. (2007). Identification and characterization of onchoastacin, an astacin-like metalloproteinase from the filaria *Onchocerca volvulus*. *Microb. Infect.* **9**, 498–506.
18. Becker, C., Kruse, M. N., Sloty, K. A., Köhler, D., Harris, J. R., Rösmann, S. *et al.* (2003). Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol. Chem.* **384**, 825–831.
19. Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T. & Bond, J. S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* **278**, 2522–2532.
20. Ishmael, F. T., Shier, V. K., Ishmael, S. S. & Bond, J. S. (2005). Intersubunit and domain interactions of the meprin B metalloproteinase. Disulfide bonds and protein–protein interactions in the MAM and TRAF domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 13895–13901.
21. Aricescu, A. R., Siebold, C., Choudhuri, K., Chang, V. T., Lu, W., Davis, S. J. *et al.* (2007). Structure of a tyrosine phosphatase adhesive interaction reveals a spacer-clamp mechanism. *Science*, **317**, 1217–1220.
22. Overall, C. M. & Blobel, C. P. (2007). In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 245–257.
23. Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases: I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162.
24. Aricescu, A. R., Hon, W. C., Siebold, C., Lu, W., van der Merwe, P. A. & Jones, E. Y. (2006). Molecular analysis of receptor protein tyrosine phosphatase mediated cell adhesion. *EMBO J.* **25**, 701–712.
25. Gao, Z. & Garbers, D. L. (1998). Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 3415–3421.
26. Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G. & Strittmatter, S. M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron*, **21**, 1093–1100.
27. Vogt, G., Stocker, W., Storch, V. & Zwilling, R. (1989). Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry*, **91**, 373–381.
28. Kanzawa, N., Yabuta, H., Fujimi, T. J. & Tsuchiya, T. (2004). Solubility properties of a 65-kDa peptide prepared by restricted digestion of myosin with astacin-like squid metalloprotease. *Zool. Sci.* **21**, 159–162.
29. Yan, L., Fei, K., Zhang, J., Dexter, S. & Sarras, M. P., Jr (2000). Identification and characterization of *Hydra* metalloproteinase 2 (HMP2): a meprin-like astacin metalloproteinase that functions in foot morphogenesis. *Development*, **127**, 129–141.
30. Kanzawa, N., Ogawa, T., Asakura, M., Okiyama, K., Honda, M. & Tsuchiya, T. (2008). Comparative expression and tissue distribution analyses of astacin-like squid metalloprotease in squid and cuttlefish. *Zool. Sci.* **25**, 14–21.
31. Kanzawa, N., Tatewaki, S., Watanabe, R., Kuniyama, I., Iwahashi, H., Nakamura, K. & Tsuchiya, T. (2005). Expression and tissue distribution of astacin-like squid metalloprotease (ALSM). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **142**, 153–163.
32. Kenney, M. C., Chwa, M., Opbroek, A. J. & Brown, D. J. (1994). Increased gelatinolytic activity in keratoconus keratocyte cultures. A correlation to an altered matrix metalloproteinase-2/tissue inhibitor of metalloproteinase ratio. *Cornea*, **13**, 114–124.
33. Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., Huber, R., Zwilling, R. & Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*, **358**, 164–167.
34. Barrett, A. J. & Starkey, P. M. (1973). The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **133**, 709–724.
35. da Silveira, R. B., Wille, A. C., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R. *et al.* (2007). Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* **406**, 355–363.
36. Aricescu, A. R., Siebold, C. & Jones, E. Y. (2008). Receptor protein tyrosine phosphatase mu: measuring where to stick. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 167–172.
37. Sambrook, J. & Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, **342**, 224–225.
38. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
39. Yiallourous, I., Grosse Berkhoff, E. & Stöcker, W. (2000). The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases. *FEBS Lett.* **484**, 224–228.
40. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
41. Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Jr & Deerfield, D. W., II (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEWNEWS*, **4**, 14.
42. Kopp, J. & Schwede, T. (2004). The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* **32**, D230–D234.
43. Kaplan, W. & Littlejohn, T. G. (2001). Swiss-PDB Viewer (deep view). *Brief. Bioinform.* **2**, 195–197.
44. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574.
45. Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357–358.

8.3 VERÖFFENTLICHUNG 3: *MEPRINS AFFECT ANGIOGENESIS*

- Schütte, Andre; Stöcker, Walter; Becker-Pauly, Christoph (2009): *The metalloprotease meprin α stimulates angiogenesis by VEGF-A processing.*
Zur Publikation eingereichtes Manuskript.
-

MANUSCRIPT

The metalloprotease meprin α stimulates angiogenesis by VEGF-A processing

André Schütte, Walter Stöcker and Christoph Becker-Pauly§

Institute of Zoology, Cell and Matrix Biology, Johannes Gutenberg-University, Johannes-von-Müller-Weg 6, D-55128 Mainz, Germany

§ *Corresponding author*

Dr. Christoph Becker-Pauly

Email: beckerpa@uni-mainz.de

Institute of Zoology,

Phone: 0049-6131-3926656

Department of Cell and Matrix Biology,

Fax: 0049-6131-3923835

Johannes Gutenberg University

Johannes von Müller-Weg 6,

D-55128 Mainz, Germany

Abstract

Angiogenesis, the sprouting and branching of blood vessels, is strongly regulated by the *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Several isoforms of VEGF-A are described, all stimulating the proliferation and differentiation of endothelial cells. Only VEGF-A_{xxx}b, a variant that contains a unique 8 aa long region C-terminally, is known to promote an anti-angiogenic effect. However, the regulation of blood vessel formation due to proteolytic processing of VEGF is poorly understood and so far only described for matrixmetalloproteases (MMPs)¹. Here we show by Morpholino knockdown in zebrafish embryos a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin α_2 mediated by specific cleavage of VEGF. We found that meprin α_2 morphants exhibited a dramatically degenerated vascular system. The blood circulation was largely diminished resulting in erythrocyte accumulation. These phenotypes mimic the previously described VEGF-A morphant², revealing a significant role of meprin α in VEGF-A activation, subsequently responsible for angiogenic sprouting of blood vessels. Our results demonstrate that meprin metalloproteases are important for cell differentiation and proliferation already during embryogenesis, predominantly by the activation of growth factors. This is supported by studies on interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β) showing the transformation of these molecules to their mature forms by meprins^{3,4}. We anticipate the specific proteolytic triggering of VEGF providing tissues with dissolved oxygen in normal physiology. Moreover this might also explain the overexpression of human meprin α in certain cancer cells⁵, subsequently supporting the growth of tumors.

Meprin α and β exhibit unique features within the astacin family of zinc endopeptidases and the metzincin superfamily^{6,7}. So far they could only be identified in vertebrates like fish, platypus, rodents and human⁸⁻¹¹. Striking are the molecular properties, revealing meprin α as the largest secreted protease known so far, due to oligomerisation up to 6 mega Dalton units^{12,13}. Moreover, meprin β is the only astacin that stays predominantly membrane bound¹⁴.

Originally, meprin expression has been observed on the apical side of epithelial brush borders in kidney proximal tubules and small intestine^{10,11}. In the meantime, various other tissues have been found to express meprins differentially^{15,16}. Meprins are secreted as zymogens, which are activated by proteolytic removal of amino terminal propeptides. Several ways for activation have been unraveled, depending on the expressing tissue. In the gut, both human enzymes are converted to their mature forms by trypsin¹². Outside the intestine, there is selective activation of meprin α by plasmin¹⁷, and of meprin β by tissue kallikrein-related peptidase 4 (klk4)¹⁵, respectively. Upon secretion into the extracellular matrix (ECM), meprins are able to cleave a number of ECM proteins like laminin, fibronectin, collagen IV and nidogen, peptide hormones like bradykinin^{14,18}, as well as cytokines and growth factors like TGF- α , interleukin-1 β and interleukin-18^{3,4,16,18}.

The observed activation of interleukins by meprins and their expression in leukocytes of the intestinal *lamina propria* indicate a function in the immune response. This is supported by reports on a role for meprins in inflammatory bowel disease or Crohn's disease^{19,20}. Furthermore, meprin α is expressed in certain tumors such as colorectal cancer and, hence, might play a role in tumor cell migration, invasion and progression^{17,21}. Other sites of expression are human keratinocytes, where meprin α and β are found in the *Stratum basale* and in the *Stratum granulosum*, respectively¹⁵.

In zebrafish, meprins are expressed in a broad array of tissues. Besides intestine and skin, the proteases could be found in kidney, head kidney, brain, gills, heart and liver⁸. Thus, the zebrafish appeared as a well suited model for studying the physiological function of meprins *in vivo*, which is made feasible by using morpholinos for knocking down meprin genes in zebrafish embryos.

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

Peptide antibodies were generated against each of the three variants to detect meprins specifically and differentially in homogenates of zebrafish tissues by immunoblotting (data not shown).

Additionally, these antibodies were used to examine cryosections of 16 weeks old zebrafish by immuno fluorescence microscopy, which revealed the intestine as the main expression site for all meprins, and the epidermis for meprin α_1 and β . Within the gut, meprin α_1 as well as β could be observed only in the brush border cells of the intestinal epithelia (Figure 1A, E), whereas meprin α_2 signals were detected in the *lamina propria mucosae* (Figure 1C). The distribution of fluorescence signals implies that meprin α_2 expression could occur in close proximity to endothelial cells (Figure 1D). The distinct expression pattern of all three proteases indicates different functions *in vivo*. Recently it was shown that meprins are involved in certain intestinal pathologies like inflammatory bowel disease (IBD) or ulcerative colitis ²⁴. Meprin $\beta^{-/-}$ mice exhibit a diminished activation of pro-interleukin-18 (IL-18), which plays a key role in IBD ³. Similar to IL-18, also IL-1 β is processed by meprin β to its mature form ⁴.

Expression of meprin α_1 and β in zebrafish epidermis (Figure 1B, F) correlates to the situation in human skin. We could show that meprin α and β are expressed in separate cell layers of human epidermis ¹⁵. This is reflected by diverse effects of the recombinant enzymes on cultured keratinocytes (HaCaT). Here, meprin β induced a dramatic change in cell morphology and reduced the cell number, whereas meprin α seem to play a role in basal keratinocyte proliferation.

To elucidate the functions of the three zebrafish meprins *in vivo*, we created knockdown embryos using morpholinos targeting each protease specifically ²⁵. As controls, “standard morpholino oligomers” were injected, not targeting any gene in zebrafish. Consequently, 98% of the injected control larvae did not show any morphant phenotype and the remaining 2% are due to the natural embryo mortality, likewise observed for untreated embryos (Figure 2B, F). To prove the successful knockdown we compared the intensity of fluorescence signals for meprin α_2 in cryosections of injected and wild type animals (see Figure 1G, H). Obviously, the expression of meprin α_2 in the *lamina propria* of zebrafish intestine was significantly decreased in morphant embryos (Figure 1H). Meprin α_1 knockdown animals showed relatively mild, but clearly distinct alterations in comparison to wild type animals (Figure 2C, A respectively). 44% of the injected embryos revealed a dilated pericardium or a distorted trunk and tail tissue, probably due to disorders in cell differentiation (Figure 2F). By contrast, meprin β knockdown animals exhibited strikingly abnormal disorders of the whole trunk and tail in early development (Figure 2D). Overall, the tissues seemed to be unstructured lacking any normal cell differentiation. The morphant embryos are viable in the beginning, but die within 24 hours post injection. This phenotype reveals very distinct and fundamental functions for meprin β in the differentiation of cells during embryonic development.

In the case of meprin α_2 knockdowns the epidermal cell layers seem to be widely disorganized in the trunk and especially in the tail region (Figure 2E). But the most prominent phenotype became visible in meprin α_2 morphants beyond the age of 48 hpf. These embryos exhibited a dramatically degenerated vascular system and the blood circulation was largely diminished or even completely interrupted (Figure 3B). Consequently, red blood cells accumulated ventrally in the caudal region of a considerable number of phenotypes (see Figure 3C). To visualize the blood vessels in living embryos, tetramethyl rhodamine isothiocyanate-Dextran (TRITC-Dextran) was injected at the age of 48 hpf for microangiography²⁶. This method uncovered the almost complete absence of intersegmental vessels (ISV) (Figure 3B), which normally begin to sprout at the 26-somite stage (21 hpf)²⁷ in wild type embryos (Figure 3A). The only prominent vessel was the large dorsal aorta (DA) extending ventrally from the heart to the tail vessels (Figure 3B; movie supplemental). These phenotypes mimic even in detail previously described VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) morphants, regarding the reduced vascular system and erythrocyte accumulation². In corresponding morphants, the loss of the VEGF receptor flk-1 (VEGFR-2) resulted in the absence of angiogenic sprouting of all blood vessels as a consequence of disorganized endothelia²⁸. Based on the morphant phenotypes observed here, we argued that meprin α_2 might be involved in angiogenic blood vessel formation by activating VEGF-A. To test this hypothesis, we incubated recombinant human meprin α and β with recombinant human VEGF-A₁₆₅, which is the predominant isoform in humans. By western blot analysis using a specific VEGF-A antibody, we were able to demonstrate that both human meprin α and β cleaved VEGF-A by limited proteolysis. This yielded in two distinct fragments of 19 kDa (meprin α) and 20 kDa (meprin β), derived from the 24 kDa unprocessed VEGF-A molecule (Figure 4). Moreover, by western blotting we detected zebrafish VEGF in cell lysates of wildtype fish, displaying the same cleavage pattern in accordance to the cleavage of human VEGF-A by meprin α (Figure 4). This is further evidence for the physiological activation of VEGF-A by meprin metalloproteases, which might trigger angiogenesis in two possible ways. On one hand, activation could occur by direct processing of the growth factor, thereby increasing its potential to enhance endothelial cell proliferation. On the other hand, removal of the inhibitory C-terminal region from the anti-angiogenic factor VEGF-A_{xxx}b would likewise cause a pro-angiogenic effect²⁹.

The disturbed organization of the epidermal cells and the deformation of tail and trunk as seen in meprin α and β morphants could be due to the proteolytic activity of meprins on cytokines like VEGF. This assumption is supported by the co-localization of meprins and VEGF in human keratinocytes. Here, VEGF plays an important role in permeability barrier homeostasis and dermal angiogenesis³⁰. It has been shown previously that meprins cleave various other cytokines, growth factors and peptides,

which take part in different situations like cell migration or tissue formation. For instance, TGF- α and IL-8 are processed and thereby activated by meprin α during inflammatory disease in human lung¹⁶.

In summary, we could demonstrate by *in vivo* knockdown studies that meprins have fundamental physiological effects in the early embryonic development of zebrafish. The data shows that meprin metalloproteases are involved in general tissue differentiation. Moreover, we conclude that meprin α_2 is required to proteolytically activate VEGF-A, thereby triggering angiogenesis in the zebrafish.

Methods

Fish maintenance. Zebrafish (*Danio rerio*) were bred and kept under constant conditions at a temperature of 28°C and a schedule of 14 h light and 10 h darkness. From embryonic stadium, fish were fed daily with dry food and weekly with living food (*Artemia salina*). Embryos were staged according to morphological criteria²³.

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

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

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

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

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

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

Microangiography. Embryos of the age of 2 days post fertilization (dpf) were anesthetized using tricaine (MS-222, 40 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Then, TRITC (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate, 20 mg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) was injected into the

circular system through the posterior cardinal vein using the microinjection system described above²⁶. The injected embryos were then examined by fluorescence microscopy, using a DM IRBE microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Tissue lysis and Western blot analysis. Homogenized adult fish were incubated in lysis buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1 % Triton X-100, pH 7.4) overnight at 4°C. After separation from cell debris by centrifugation at 13.200xg for 5 min., the lysate was concentrated using Amicon centrifugal filter units with an exclusion size of 50 kDa (Millipore, Eschborn, Germany). For immunoblot analysis proteins were subjected to 14 % SDS-PAGE³¹ under reducing conditions and afterwards transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF)-membrane (Immobilon P, Millipore, Eschborn, Germany) by electro blotting (80 mA, 75 min). For blocking, the membrane was saturated with 3 % bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature (RT), incubated with the primary monoclonal anti-zebrafish VEGF-A antibody (1:200; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) for 1 h and afterwards with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:6250) for 45 min at room temperature. Between all these steps, the membrane was washed with TBS-T (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween20, 0.2 % Triton-X-100) and TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl). Detection was performed using Rotilumin (Roth, Karlsruhe, Germany) following the manufacturer's instructions using X-ray film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). MagicMark XP (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as a molecular weight marker.

VEGF-A Substrate assay. 500 ng of recombinant human VEGF-A₁₆₅ (Immunotools, Friesoythe, Germany) was incubated with 70 nM meprin α or meprin β , respectively, for different times (1, 5, 15 and 30 minutes) at 37°C. By western blotting, the resulting fragments were identified using an anti-human VEGF-A antibody (1:200, VEGF(C-1) sc7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Recombinant human meprin α and β were expressed, purified and activated as described before^{12, 15}.

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

meprin α_1 : NH₂-CTLDPSDGFWRGPSK-CONH₂

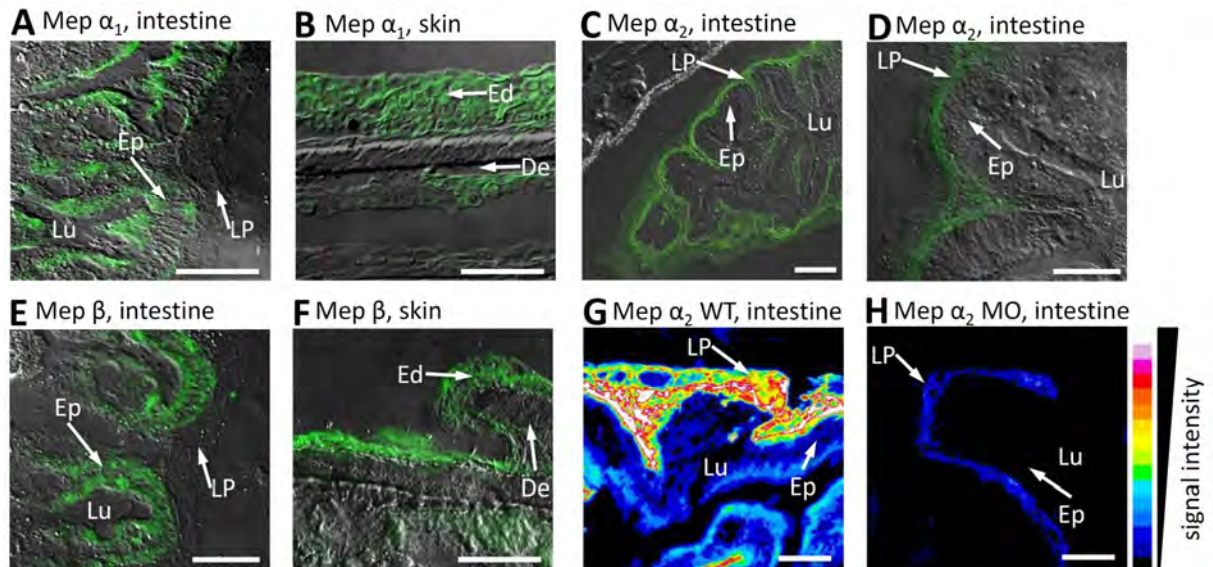
mep α_2 : NH₂-CHDAKVQSERFYNSEGYAY-CONH₂

mep β : NH₂-CVREYTAENPKGDLRL-CONH₂

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

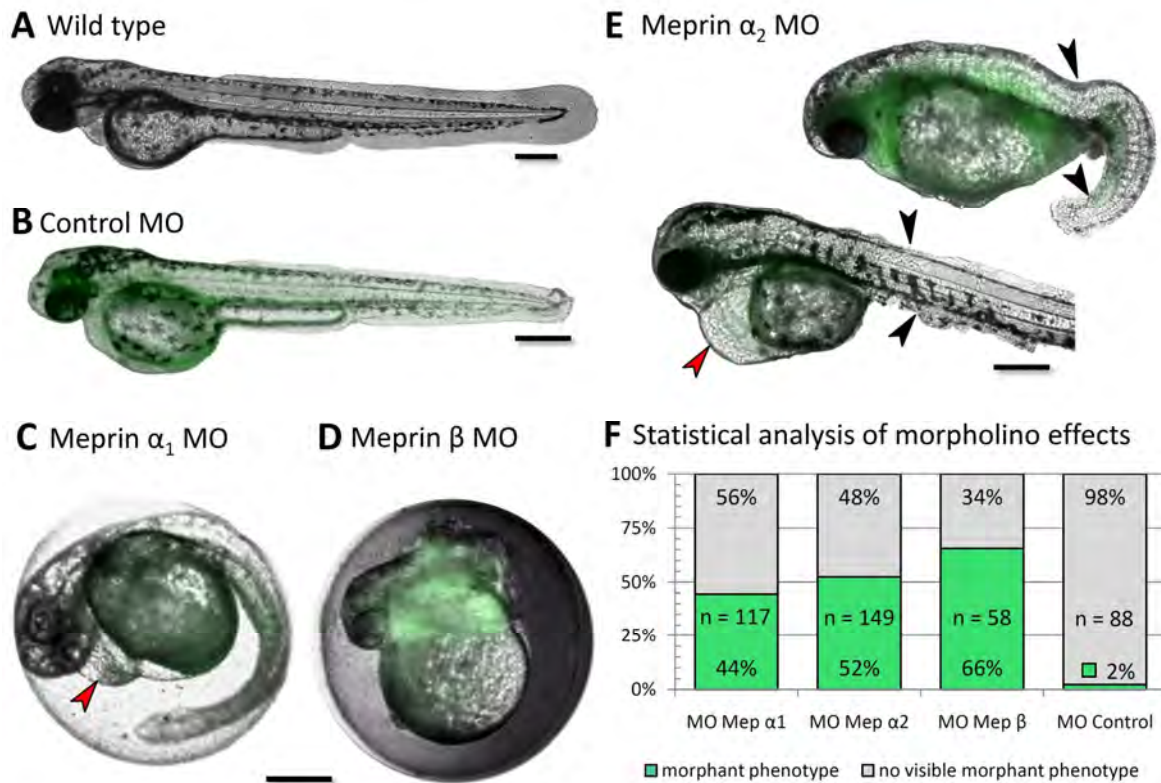
Figures

Figure 1



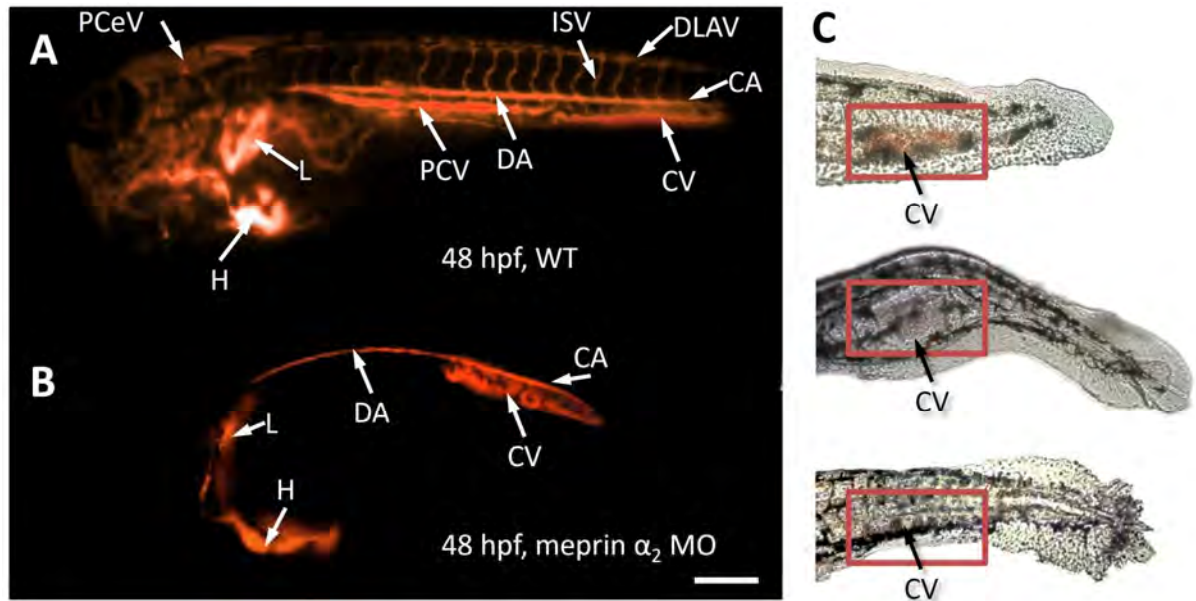
Distribution of meprin α_1 , α_2 and β in zebrafish tissues. Immunofluorescence microscopy of cryosections from whole mount zebrafish, using specific peptide antibodies, revealed meprin α_1 in the brush border cells of intestinal epithelia (Ep) (A) and epidermis (B), whereas meprin α_2 was observed in the *lamina propria mucosae* (LP) only (C, D). Additionally, meprin β signals could be detected in the zebrafish intestine (Ep) and epidermis (Ed) (E, F respectively). To verify the efficiency of meprin knockdowns due to morpholino injection, we compared the fluorescence signal intensity in cryosections of wild type (G) and meprin α_2 deficient embryos (H). Evidently, the expression of meprin α_2 in the *lamina propria* (LP) of the intestine is largely decreased (G, H). (Ep: epithelium; Lu: lumen; LP: lamina propria; Ed: epidermis; De: dermis; scale bars: 25 μm ; signal intensity was calculated with ImageJ V.1.41o).

Figure 2



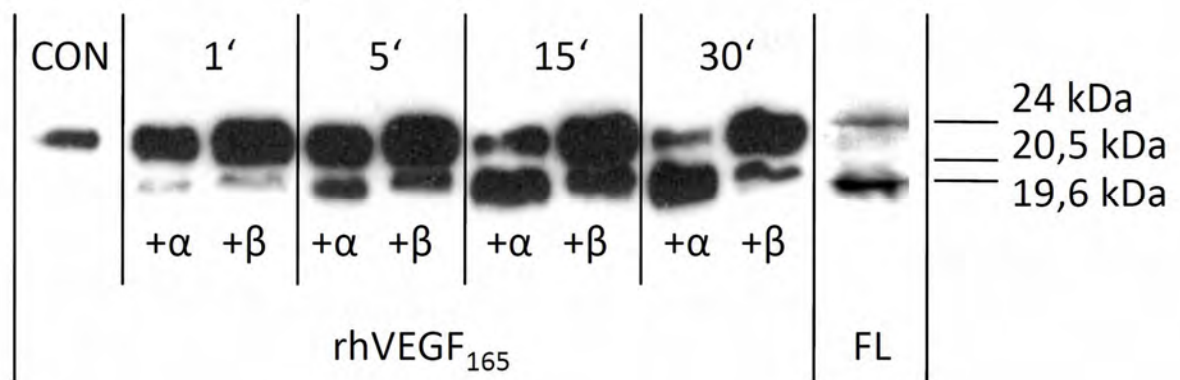
Morpholino knockdown in zebrafish embryos exhibit severe phenotypes of meprin α_1 , α_2 and β (C-E). Wild type (A, 60 hpf) and control fish (B, 42 hpf) did not show any defects in embryonic morphology and development. In meprin α_1 morphants (C, 32 hpf), only slight defects like the dilation of pericard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

Figure 3



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

Figure 4



Human meprin α and β are capable of processing VEGF-A specifically. The cleavage of VEGF-A₁₆₅ (CON, 24 kDa) by recombinant meprin α and β (each 70 nM) for 1 to 30 min resulted in two fragments of different molecular weight (19.6 kDa in case of meprin α , 20.5 kDa by meprin β), visualized by western blot analysis. In wild type zebrafish whole lysates (FL), VEGF-A could be detected using specific antibodies indicating a fragment similar to that produced by meprin processing.

References

1. Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D. & Iruela-Arispe, M. L. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 169, 681-91 (2005).
2. Nasevicius, A., Larson, J. & Ekker, S. C. Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant. *Yeast (Chichester, England)* 17, 294-301 (2000).
3. Banerjee, S. & Bond, J. S. Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *The Journal of biological chemistry* 283, 31371-31377 (2008).
4. Herzog, C., Kaushal, G. P. & Haun, R. S. Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. *Cytokine* 31, 394-403 (2005).
5. Lottaz, D., Maurer, C. A., Hahn, D., Büchler, M. W. & Sterchi, E. E. Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer research* 59, 1127-1133 (1999).
6. Bond, J. S. & Beynon, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4, 1247-1261 (1995).
7. Stöcker, W. et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science: a publication of the Protein Society* 4, 823-840 (1995).
8. Schütte, A., Lottaz, D., Sterchi, E. E., Stöcker, W. & Becker-Pauly, C. Two alpha subunits and one beta subunit of meprin zinc-endopeptidases are differentially expressed in the zebrafish *Danio rerio*. *Biological chemistry* 388, 523-531 (2007).
9. Warren, W. C. et al. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453, 175-183 (2008).
10. Beynon, R. J., Shannon, J. D. & Bond, J. S. Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *The Biochemical journal* 199, 591-598 (1981).
11. Sterchi, E. E., Green, J. R. & Lentze, M. J. Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clinical science (London, England: 1979)* 62, 557-560 (1982).
12. Becker, C. et al. Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biological chemistry* 384, 825-831 (2003).
13. Ishmael, F. T., Norcum, M. T., Benkovic, S. J. & Bond, J. S. Multimeric structure of the secreted meprin A metalloproteinase and characterization of the functional protomer. *The Journal of biological chemistry* 276, 23207-23211 (2001).
14. Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T. & Bond, J. S. Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *The Journal of biological chemistry* 278, 2522-2532 (2003).

15. Becker-Pauly, C. et al. The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 127, 1115-1125 (2007).
16. Bergin, D. A. et al. Activation of EGFR by a novel metalloprotease pathway. *The Journal of biological chemistry* (2008).
17. Rösman, S. et al. Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *The Journal of biological chemistry* 277, 40650-40658 (2002).
18. Kounnas, M. Z., Wolz, R. L., Gorbea, C. M. & Bond, J. S. Meprin-A and -B. Cell surface endopeptidases of the mouse kidney. *The Journal of biological chemistry* 266, 17350-17357 (1991).
19. Lottaz, D., Hahn, D., Müller, S., Müller, C. & Sterchi, E. E. Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the alpha and beta subunits. *European journal of biochemistry / FEBS* 259, 496-504 (1999).
20. Lottaz, D. et al. Compartmentalised expression of meprin in small intestinal mucosa: enhanced expression in lamina propria in coeliac disease. *Biological chemistry* 388, 337-341 (2007).
21. Matters, G. L., Manni, A. & Bond, J. S. Inhibitors of polyamine biosynthesis decrease the expression of the metalloproteases meprin alpha and MMP-7 in hormone-independent human breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* 22, 331-339 (2005).
22. Kane, D. A. & Kimmel, C. B. The zebrafish midblastula transition. *Development (Cambridge, England)* 119, 447-456 (1993).
23. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 203, 253-310 (1995).
24. Banerjee, S. et al. MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal immunology* (2009).
25. Nasevicius, A. & Ekker, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26, 216-220 (2000).
26. Weinstein, B. M., Stemple, D. L., Driever, W. & Fishman, M. C. Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nature medicine* 1, 1143-1147 (1995).
27. Fouquet, B., Weinstein, B. M., Serluca, F. C. & Fishman, M. C. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Developmental biology* 183, 37-48 (1997).
28. Habeck, H., Odenthal, J., Walderich, B., Maischein, H. & Schulte-Merker, S. Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis. *Current biology: CB* 12, 1405-1412 (2002).
29. Harper, S. J. & Bates, D. O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews. Cancer* 8, 880-887 (2008).

30. Elias, P. M. et al. Epidermal vascular endothelial growth factor production is required for permeability barrier homeostasis, dermal angiogenesis, and the development of epidermal hyperplasia: implications for the pathogenesis of psoriasis. *The American journal of pathology* 173, 689-699 (2008).

Accession numbers. Proteins described in this work are deposited in the uniprot / TrEMBL database: Q5RHM1 (meprin α_1), B3DKP9 (meprin α_2), Q08CC4 (meprin β), BQ16819 (human meprin α), BQ16820 (human meprin β), P15692 (human VEGF-A).

Acknowledgements. The work was supported by the DFG (BE-4086/1-1) to C.B., the EU FP7 Health IBDase to C.B. and W.S., a start-up grant to C.B. and a PhD fellowship to A.S. from the Johannes Gutenberg-University of Mainz, Germany.

8.4 SEQUENZ VON MEPRIN α_1 AUS *DANIO RERIO*

```

1 M L L Q R L L I F A V L A A V L H A V P L S S R V H E V E D
1 atgcttttacagagactgctcatcttcgcagtgctggctgcagtgacttcatgctgttccactttcaagtcgtgcatgaggttgaagat
1 tacgaaaatgtctctgacgagtagaagcgtcacgaccgacgctcatgaagtacgacaaggtgaaagttcagacacaagttactccaacttcta
31 E P N F N P F I N L G A K T R L I E G D I A L P P G R I G L
91 gaaccaatttttaaccctttcatcaatcttggagcaaaaaccggctgattgaggagacatagccttacctccaggtcgaattggtctt
91 cttgggttaaaattgggaaagttagttagaacctcgtttttggccgactaacctcctctgtatcggaatggaggtccagcttaaccagaa
61 I N T T Y R W K F P I P Y I L S D S L D L N A K G A I Y Q A
181 atcaacacacatacagatggaagttccctattccttacattctgtctgacagtgctggacctaaccgcaaaaggtgcaatctatcaggca
181 tagttgtgtgtatgtctaccttcaagggataaggaatgtaagacagactgtcagacctggaattgcgttttccaggttagatagtcctgt
91 F E V Y R L K S C V D F K P Y E G E K T Y I K F E K G D G C
271 tttgaagtgtaaccgtctaaaagtcattgtgttgaattcaaacctatgaggagagaagacatacatcaaatttgagaagagagatgggtgt
271 aaacttcacatggcagatttcagtagacacaactaaagtttgggatactccctcctctgtatgtatgtttaaactctttcctctaccaca
121 W S C F V G D Q Q N G Q V L S L G P G C D H K A V I E H E L L
361 tggctctttgttggagatcaacagacaagttcttcttcttggccggctgtgatataagctgtttagatgagactgactgctg
361 accagaaaaaacctctagttgtcttgcctgttcaagaagagaccccgccgacactagttatccgacactaacctgacttgcagcagc
151 H A L G F Y H M Q S R Q D R D D Y V K I W L D Q V I E G L E
451 cagccttgggcttttaccacatgcagctctgccaggaccgagacgactatgtgaagatctggcttgatcaggtcattgaaggttggag
451 gtgcggaaccgaaaaatgggtgtacgtcagagcggctcctggctctgctgatacacttctagaccgaactagtcagtaacttccgaacctc
181 H N F N K Y D D S F V T D L N T P Y D Y E S V M H Y R P F A
541 cataattttaacaaatgatgatgacagttttgtcagacgctaaacacacacatatgactacgagtgctgttatgcatatctgctccatttgc
541 gtattaaaattgtttataactactgtcaaaacagtgctggattttgtgtggtatactgatgctcagacaactcgaatagcaggtaaacga
211 F N K D P S I P T I T T N I P E F Y K I I G Q Y L D F S E M
631 ttcaacaaagaccctctattcctactattaccaccaacatcccagagttctacaaaatcatcggacaataacctggactcagtgagatg
631 aagttgttctggggagataagatgataatgggtgttstgtaggctcaagatgttttagtagcctgtttagcactgaaactgactctac
241 D I V R L N R M Y N C S S L T L L D Q C A F E K I N I C G
721 gatattgtcagactgaatcgaatgtacaactgctcctcttcttaccctgctggaccagtgctctttgaaaagatcaacatctgtggg
721 ctataacagtgctgacttagcttcatgttgacgaggagaagagaatgggacgacctgggtcacacgaaaaacttttctagttgtgacagccc
271 M V Q S S T D D G D W V H L K S S E D H T L S G Q C R D L G
811 atggtacagagttcagactgatgatggcgattgggtccatcttaagagctctgaggatcatactctcagcggacaatgcagagatttagga
811 taccatgtctcaagctgactactaccgctaacccaggtagaattctcagactcctagatgatgagagtcgctgttactcgtctcaaatcct
301 Y T M H F D T S S G Q A E R S A L I E S R I L Y P K R K L Q
901 tatactatgcactttgacacgtccagtgagcaggcagagagatctgctctaatcagagtcgccgatcctatatacaaaaaaggaagctgcag
901 atatgatacgtgaaactgtgcaggtcacctgtccgtctcctagacagattagctcagggcgtagatagattaggttttctcctcgacgctc
331 C L Q F F Y K M T G S A K D R L V I W A R M D D G T G E V R
991 tgcctacagtttttctacaaaaatgacggggagtgcaaaaggacaggttagtgatttgggcccaggtgagtggaacggggaaggtcgt
991 acggatgtcaaaaagatgttttactgcccctcacgtttcctgtccgatcactaaacccggctcctactactaccttgcctcttcacgca
361 K L K K L Q T I W A D E D K T W K I A H V P M Q V G A K F R
1081 aaattaagaacctgcaaaacatctgggctgatgaagacaaaacatggaagattgcccagtgcccgatgcaagttggggcaaaatccgc
1081 ttttaatttctttgacgtttgttagacccgactacttctgtttgtaccttctaacgggtacacggctacgttcaaccccgtttaaggcg
391 Y A F Q A V K G D S S S S G G G I F I D D I S L T E T H C P
1171 tatgcatccaagcagtgaaaggtgattcagcagctctggagggtatattcatagatgacatcagcctaacagagacacactgtcca
1171 atacgtaaggttcgtcactttccactaagctcgtcagacactcctccatataagatctactgtagtcggatttctctgtgtgacaggt
421 A A V W R I Q N F S S I L E K A D Y S T V L N S P R F Y S P
1261 gccgtgtctggcgcatccaaaacttctccagatccttgaaaaggcagactacagcactgtgctgaaacagccctcgtttctacagccct
1261 cggcgacagaccgctaggttttgaagagctataggaacttttccgtctgatgtcgtgacacgacttgcgggagcaaaagatgtcggga
451 E G Y G F G I Q V I P L S G Y S D Y A G N Y T G L Y F H L I
1351 gagggttatggttttgggattcaagtgattccactgtctggctattctgattatgctggttaactacactggctgtacttccatttgatc
1351 ctcccatacaaaaacctaaagttcactaaaggtgacagaccgataaagactaaacagaccattgatgtgaccagacatgaaggtaaactag
481 S G D N D I V M Q W P A V N R Q A T I V V M D Q D P D I R L
1441 agtggtgacaatgacattgtgatgcagtgccctgctgtgaaccgcccagccactatagtggtgatggaccaagatccggatattaggttg
1441 tcaccactgttactgtaacactacgtcaccggacgacacttggcggctccggatgacatcaccactacctggttctagcctataatccaac
511 R M S S A R S L T T D L S K G N G E Q L L W D N P K K V G T
1531 aggatgtcttctgctcgtagcctcaccactgacctgagcaaaaggaatggagaacaactattgtgggacaatccaaaaaggttgggacc
1531 tcctacagaagacgagcatcggagtggtgactggactcgtttcctttacctctgttgataacacctgttaggttttttccaacctgg
541 L D P S D G F W R G P S K G C W N T F I K H Y D L H R R N Y L
1621 cttgaccacaagcagatggtttttggcgaggaccatcaaaaggatggaatactttcataaagcactacgatttacacagacgaaattacctg
1621 gaactgggttcgctacaaaaaccgctcctggtagttttccctacctatgaaagtatttctgtgatgctaaatgtctctcttaattggac
571 K N D G L I I F V D F E D L T S L I K S E V P T A P K V *
1711 aaaaatdgalcctcatcttctgtttagactttgaagacttaaacgctgataaagatgaggttccgactgccccaaaggtttga
1711 ttttactactggagtagtagaacaactgaaacttctgaattgttccgactatttctcactccaaagcctgacgggtttccaaact

```

Abbildung 12: cDNA-Sequenz von Meprin α_1 aus dem Zebrafisch (Q5RHM1) mit komplementärem Strang und Aminosäuresequenz. Sequenzbereiche, die für Primerbindungsstellen herangezogen wurden, sind gelb (*forward*) bzw. rot (*reverse*) unterlegt.

8.5 SEQUENZ VON MEPRIN α_2 AUS *DANIO RERIO*

```

1 M W R I S L F F V L L A L K A C A L P A Q Y G E D A D A G E
1 atgtggagaatcagcctcttcttacttcttagcgctcaaggcatgtgccccttccagcacaatatggcgaagatgcagatgcaaggtgaa
1 tacacctttagtcgggagaagaacaatgaagatcgcgagttccgtacacgggaaggtcgtgtatataccgcttctacgtctacgtccactt
31 L R E D I L E I N L D S Q R E L F E G D I A G D P R R N A I
1 ttacgggaggacatttctgaaattaatttagattcccaagagaattggttgaaggagatattgcaggtgatccacgaagaatgcaata
91 aatgcctctgtaagaactttaataatctaagggtttcttaacaaacttctctataacgtccactaggtgcttcttactcgttat
61 I D E K A R W Q F P I P Y I L T D T L D L N A K G V I L Q A
181 atagatgaaaagcaagatggcagtttccattccatatactcacagacacattggatctgaatgcaaaggagtgatccttcaagca
181 tatctacttttctgcttaccgtcaagggttaaggtatataatgagtgctgtgtaacctagacttactgttttctcactaggaaggtcgt
91 L E M Y R L K S C V D F K P Y E G E S T Y I S F T K L D G C
271 cttgaaatgtatcgtctgaagtctgtgtggactttaagccctatgaaggagaagcaacctacatttcttccacaaaactggatggatgt
271 gaactttacatagcagacttcagaacacacctgaaattcgggatacttctcttctggtgatgaaagaaaggttttgacctactaca
121 W S F V G D L K T G Q N V S I G E R C D T K A I V E H E L L
361 tggctattgttaggagatttaagacagccagacacttccactcggggagagatgtgacactaaagccattgtagaactgagcttctc
361 accagtaaacatcctctaaaatttctgctcgggtctgacagaggtagccctctctacactgtgatttcggttaacatctgtactcgaag
151 H A L G F Y H E Q S R S D R D D Y V K I W W D Q I I E G K E
451 catgactgggttctatcatgagcaatcccgcctcagaccgggacgactatgtcaaaatctggtgggatcaaatcattgaagaaagga
451 gtacgtgacccaagatagtagctcgttagggcgagctggccctgctgatacagttttagaccacctagtttagtaacttcttctc
181 H N F N K Y E D D F I T D L N T P Y D Y E S I M H Y R P L S
541 cacaatttaataagtagcaggtatgtttatcactgatttgaacacacctatgattatgagtcacatgacactacagccctctgtc
541 gtgttaaaattatcactgctcctactaaaatagtgactaaaacttgtgtgggataactaactcaggtagtagcgtgtgacgtgacagc
211 F N K D P D I P T I T T T I P A F N N I I G Q R L D F S A L
631 ttcaacaagatcctgatattcctactataaccaccacatccctgcttcaacaacatcataggacagcgttagactcagtgactt
631 aagtgttcttaggactataagatgatattggtggtggttaggacggaagttgtgtagtagtctgctgcaatcgaagtcagtgaa
241 D L E R L N R M Y E C T A T H T T L L D Q C A F E Q I N I C G
721 gatctggagagactcaatcgcatgtatgaatgactgcaaccacactctgctggatcagtgctgctttagcagatcaacatttggga
721 ctgacctctctgagttagcgtacatacttactgacgttgggtgtgagacgacctagtcacacggaaactcgtctagttgtaaacct
271 M I Q N D E D D A D W V Q T L L S S T D L K D H T L G G Q C R
811 atgattcagaatgatgaggatgatgctgactgggtccagactttgagctctacagatttaaaggatcacacacttggaggacaatgcaga
811 tactaagcttactactcctactacgactgaccaggtctgaaactcgagatgtcctaaatttcttagtgtgaaactcctgttactcgt
301 D S G Y F M K F D T D N K T E G H S A L L E S R I L Y P K R
901 gattcaggttatttcatgaagtttgacaccgataacaagaccggggacacagtgcttggctggagtacggattcttaccacaagagg
901 ctaagtccaataaagtagtctcaaacgtggtctatgttctgctcctcctgctcagcaaacgacctcagtgctcaagaagatggggtctcc
331 N Q Q C L E F F Y R M S G E P G D K L I I W V R T D D G T G
991 aaccagcagtgctttagtttcttctacagatgagtgagagccagggcacaagctcatcatctgggtcagaactgacagatggaactggc
991 ttggtcgtcaccggaactcaagaagatgctcctactcacctctcgggtccgctgctcagtagtagaccagctttagctgctaccttgaccg
361 N V N K V R K V H T I T G H G D N S W N I A Q V T L N V K E
1081 aatgtgaacaagtcaggaaagtccacacaatcacagctgctgggataactccttggaaacttgcaaacctcctaaagttaagaa
1081 ttacactgtttcagtccttcaagtggttagtgcagtagtaccctatttgagaaccttgtaacgtgttcagtgagattacaattcctt
391 K F R Y F F Q G I V G P N K T S G I F I D D I I L T E T S C
1171 aaattccggtagtcttccagggatgtgtgggcccccaaaaactcagggatctttagatgacattatctgactgaaacatcatgt
1171 ttaaggccatgaagaaggtccataaacacccgggttgtttgtagctcctagaataatctactgtaataagactgatttagtaca
421 P N T V W R I Q N F T N L L N T L P H D A K V Q S E R F Y N
1261 ccaaacactgctggaggatccagaactttaccaacctcctcaataactctcccacatgatgccaaggttcagagtgaaacttttacaac
1261 ggtttgtgacagacctcctaggtcttgaatggttggaggttagtaggggtgactacggtttcaagctcactgttcaaaaatgtttg
451 S E G Y A Y G I N V Y P N G R V N S S K E F V G I T F N L F
1351 tctgaggtttagccttatggaattaatgtttatccaaatggcaggtgaaatcactcaaaagattttagggattacgtttaaactttt
1351 agactcccaatgcgaatccttaattacaataggtttaccgtccacttaagttagatttctcaaacactcctaagattagaagaag
481 G G E N D A V L E W P A V N R Q V T V T A K D Q N P D A T L
1441 ggtggtgagaatgatgagattagaatggcctcgggtgaatcggaagtcactgttacagcaaaaggacaaaatccagatgcaacctg
1441 ccaccacttactactcgtataactcttaccggacgccacttagccgttcagtgacaatgtcgttctcgtgttttaggtctacgttggac
511 Q M S N S R S F T T D A D M R W N K P S T F E Q W D D S C L
1531 caaatgtccaacagcagaagctttaccactgatgctgacatcggtggaataaacatctacatttgacaatgggatgatagttgcctt
1531 gtttagcaggttgcgtcttcaaatggtagctacgactgtagccaccttatttggtagatgtaaacctgttacctactatacaacggaa
541 C F R G P E F G W G T F I S H D Q L R R R D F L K N D D L I
1621 tgcttcagaggaccagagtttggctgggtaccttcatatctcacgatcagctccgcaggagagacttctcaagaacgacgacctgatc
1621 acgaagtctcctggtctcaaacggacccccatggaagttagagtgctagtgcagggcgtcctctctgaaagagttctgtcgtggtgactag
571 I T I N F D L A H L V K S E V P T K V S N N P Q P A E K N
1711 atcactattaattttagtatttggacacttctgtaaaatcgaagttccaaccaaggtctcaaaccaacccccagcctgcagaaaaaac
1711 tagtgataataaaactactaaacgtgtagaacattttagacttcaaggttggtttccagagtttgggtggggcggacgtctttttttg
601 I E K P K I R Q P R A I S D L C Q P N P C Q N G G A C V T H
1801 attgagaaaacaaaatccgacaaccacagcaatcagtgatctgtgtcaaccaaacctgcaaaaatggaggagcgtgtgtcacacat
1801 taactcttgggttttaggtgtgtgctcgttagtactagacacagttggtttggggacggttttacctcctgcacacagtggtgta
631 Q G K A T C R C A S G Q A V V Y T G D T C E K Q H I D G G I
1891 caggggaaagcaacatgcaggtgctcctcctggacaggtgtgtgtacacagggagacacttggagaaacaacattgacggagaaat
1891 gtcccccttctggttagctccacacggagacctgtccgacaacacatgtgtcctctgtgaacactcttgtgtgtaactgctccttaa
661 M G V L I G G A V G T V A L T V A I I A V I Y R Q K *
1981 atgggagttttagtggggtgctgttggaaactgtagcacttactgtgtatcatgtcagtgatctacaggcagaagtaa
1981 taccctcaaaactaacccccagcaaccttgacatcgtgaatgacaacgatagtaacctcactagatgtccgtctcatt

```

Abbildung 13: cDNA-Sequenz von Meprin α_2 aus dem Zebrafärbling (B3DKP9) mit komplementärem Strang und Aminosäuresequenz. Sequenzbereiche, die für Primerbindungsstellen herangezogen wurden, sind gelb (*forward*) bzw. rot (*reverse*) unterlegt.

8.7 VERWENDETE VEKTOREN

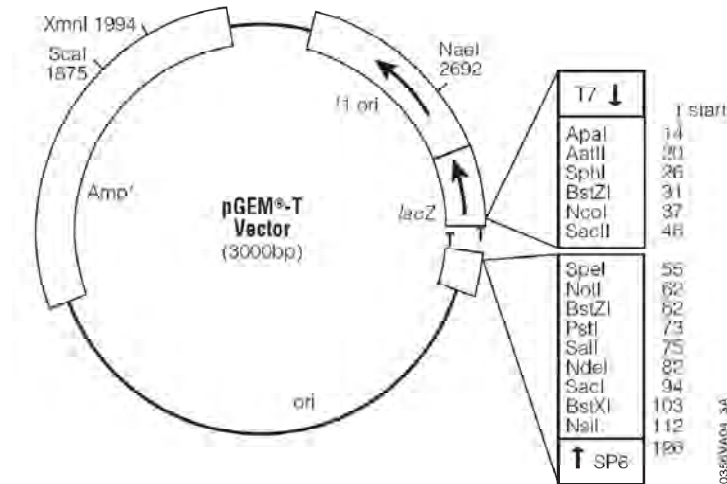


Abbildung 15: pGEM[®]-T Vektor (Promega, Mannheim). Der Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion, sowie ein *lacZ*-Gen, in dem sich eine *multiple cloning site* (MCS) zur Insertion der gewünschten Fremd-DNA befindet.

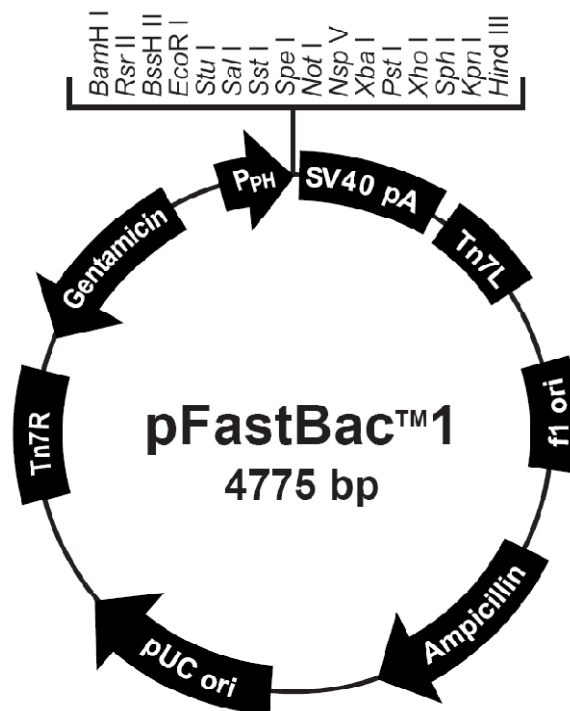


Abbildung 16: Der Expressionsvektor pFastBac[™]1 aus dem Baculovirus-Expressionssystem (Invitrogen, Karlsruhe). Der Vektor trägt unter anderem ein Gentamycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen. Durch den Polyhedrin-Promotor (P_{PH}) lässt sich die Insertregion regulieren.

8.8 PLASMIDKARTE VON pFASTBAC™ MIT MEPRIN α_1

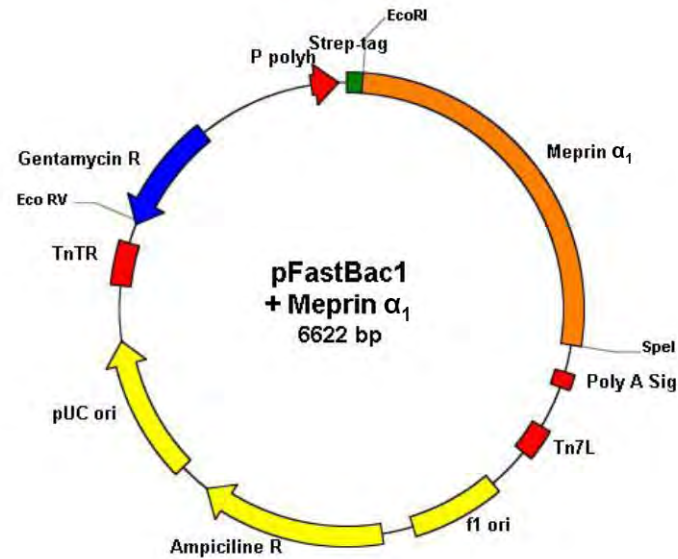


Abbildung 17: Expressionsvektor pFastBac™1 mit eingefügter *Danio*-Meprin α_1 -Sequenz. Bereits im Vektor vorhanden war ein Stück des humanen Meprin α -Gens mit Strep-tag und Propeptid-Sequenz (grün). Der Vektor trägt unter anderem ein Gentamycin- (blauer Pfeil) und ein Ampicillin-Resistenzgen (gelber Pfeil). Durch den Polyhedrin-Promotor (roter Pfeil) lässt sich die Insertregion regulieren.

8.9 PLASMIDKARTE VON pFASTBAC™ MIT MEPRIN α_2

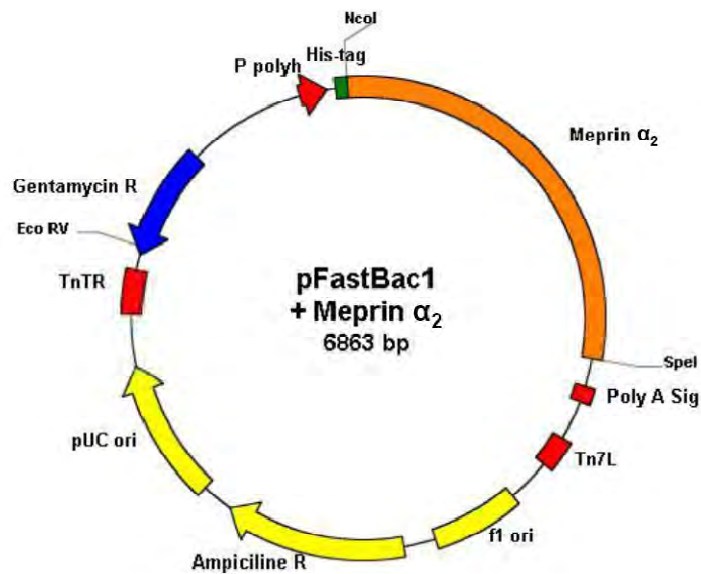


Abbildung 18: Expressionsvektor pFastBac™1 mit eingefügter *Danio*-Meprin α_2 -Sequenz. Bereits im Vektor vorhanden war ein Teil des humanen Meprin β/α - *tailswitch*-Konstruktes mit His-tag und Propeptid-Sequenz (grün). Der Vektor trägt unter anderem ein Gentamycin- (blauer Pfeil) und ein Ampicillin-Resistenzgen (gelber Pfeil). Durch den Polyhedrin-Promotor (roter Pfeil) lässt sich die Insertregion regulieren.

8.10 PLASMIDKARTE VON pFASTBAC™ MIT MEPRIN β

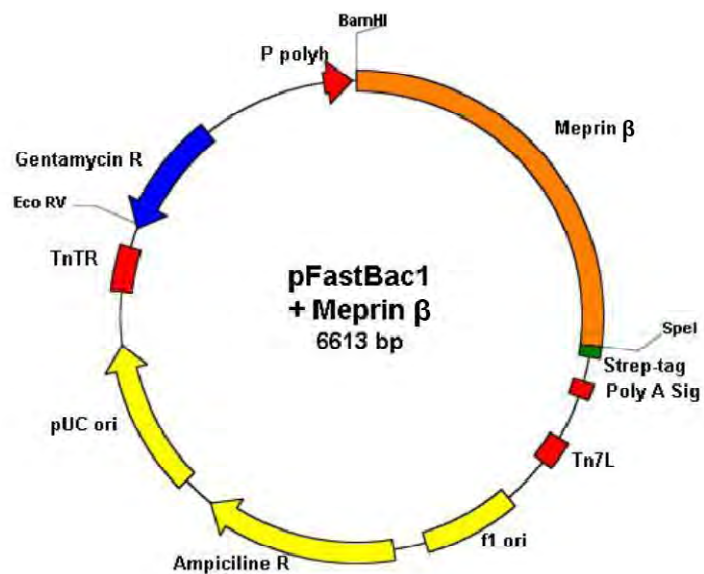


Abbildung 19: Expressionsvektor pFastBac™1 mit eingefügter *Danio*-Meprin β -Sequenz. Durch Primer wurde bereits bei der Amplifikation der cDNA ein Strep-tag (grün) eingefügt. Der Vektor trägt unter anderem ein Gentamycin- (blauer Pfeil) und ein Ampicillin-Resistenzgen (gelber Pfeil). Durch den Polyhedrin-Promotor (roter Pfeil) lässt sich die Insertregion regulieren.

8.11 ACCESSION NUMBERS DER IN DER ARBEIT BESCHRIEBENEN PROTEINE

Tabelle 10: *Accession numbers* aus der UniPROT / TrEMBL-Datenbank (www.uniprot.org).

Accession number	Protein	Organismus
Q5RHM1	Meprin α_1	<i>Danio rerio</i>
B3DKP9	Meprin α_2	<i>Danio rerio</i>
Q08CC4	Meprin β	<i>Danio rerio</i>
Q16819	Meprin α	<i>Homo sapiens</i>
Q16820	Meprin β	<i>Homo sapiens</i>
P28825	Meprin α	<i>Mus musculus</i>
Q61847	Meprin β	<i>Mus musculus</i>
P28826	Meprin α	<i>Rattus norvegicus</i>
Q64230	Meprin β	<i>Rattus norvegicus</i>
O73682	VEGF-A	<i>Danio rerio</i>
P15692	VEGF-A	<i>Homo sapiens</i>

8.12 ABKÜRZUNGEN

Tabelle 11: Verwendete Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
BamHI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CAP	<i>capping</i> -sequenz
CD	<i>Crohn's disease</i> , (siehe auch MC)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
DEPC	Diethylen-Pyrocbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EcoRI	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i>
His-tag	Markierung durch Penta-Histidin
hpf	<i>hours post fertilization</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
lacZ	Gen zur Codierung der β -Galactosidase
LB	<i>lysogeny broth</i>
MC	Morbus Crohn, (siehe auch CD)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MO	Morpholino
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NcoI	Restriktionsenzym aus <i>Nocardia corallina</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
RPTPμ	<i>receptor protein tyrosine phosphatase μ</i>
SOB	<i>Salt-Optimized Broth</i>
SOC	<i>Salt-Optimized + Carbon</i>
SpeI	Restriktionsenzym aus <i>Sphaerotilus sp.</i>
Strep-tag	Markierung durch Streptavidin
tag	<i>engl.</i> : Markierung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
UC	<i>ulcerative colitis</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Mainz, 21.07.2009

André Schütte

