



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

**AKTIVITÄT DER HUMANEN MEPRIN  
METALLOPROTEASEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG  
POTENTIELLER AKTIVATOREN**

**DISSERTATION**

**ZUR ERLANGUNG DES GRADES**

**“DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“**

**AM FACHBEREICH BIOLOGIE**

**DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ**

**VORGELEGT VON ANKE OHLER**

**GEBOREN AM 02.07.1982 IN MAINZ**

**MAINZ, 2011**

---

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2011

## VORWORT

Diese Dissertation wurde kumulativ angefertigt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wurden in den folgenden drei Veröffentlichungen, detailliert beschrieben.

BECKER-PAULY C., BARRÉ O., SCHILLING O., AUF DEM KELLER U., OHLER A., BRODER C., SCHÜTTE A., KAPPELHOFF R., STÖCKER W., OVERALL C.M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates.

*Mol Cell Proteomics*. 2011 Jun 21 [Epub ahead of print]

OHLER A., DEBELA M., WAGNER S., MAGDOLEN V., BECKER-PAULY C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation.

*Biol Chem*. **391**, 455-460.

OHLER A. AND BECKER-PAULY C. (2011) Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion.

*Biol Chem*. **392**, 653-664.

Im Folgenden werden die Resultate im Zusammenhang dargestellt und weitere Ergebnisse näher erläutert. Berücksichtigung erfahren auch Zellkulturtechniken und Methoden die in den Publikationen nur kurz dargelegt wurden.

Mainz, im Februar 2011

Anke Ohler

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
2.1 PROTEASEN UND DAS PROTEOLYTISCHE NETZWERK .....	2
2.2 MEPRIN METALLOPROTEASEN .....	3
2.3 ZIELE DIESER ARBEIT .....	7
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
3.1 MORPHOLINO MIKROINJEKTION.....	8
3.2 METHACRYLAT-EINBETTUNG UND TRICHROM-FÄRBUNG .....	10
3.2.1 <i>Bouin Fixierung</i> .....	10
3.2.2 <i>Styrol-Methacrylat-Einbettung</i> .....	11
3.2.3 <i>Trichrom-Färbung nach Cason</i> .....	12
3.3 RASTERELEKTRONEN-MIKROSKOPIE (REM).....	12
3.4 MOLEKULARBIOLOGIE.....	15
3.4.1 <i>Generierung einer inaktiven Mutante von LAST_MAM</i> .....	15
3.5 INSEKTENZELLKULTUR UND PROTEINEXPRESSION.....	16
3.5.1 <i>Das Baculovirus-Expressionssystem</i> .....	16
3.5.2 <i>Transposition, Isolierung und Überprüfung rekombinanter Bacmide</i> .....	17
3.5.3 <i>Transfektion von Insektenzellen mit rekombinanten Bacmiden</i> .....	20
3.5.4 <i>Virusamplifikation und Expression in HIGHFIVE™ Insektenzellen</i> .....	20
3.5.5 <i>Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem HIGHFIVE™ Zellkulturmedium</i> .....	21
3.5.6 <i>Ammoniumsulfatfällung und Dialyse der E92A-Mutante von LAST_MAM</i> .....	21
3.5.7 <i>Reinigung der E92A-Mutante mittels Affinitätschromatographie</i> .....	22
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>23</b>
4.1 PROTEOMICS- UND STRUKTURANALYSEN DER ASTACIN METALLOPROTEASE FAMILIE.....	23
4.2 INTERAKTION DER MEPRIN METALLOPROTEASEN UND KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASES IM BEZUG AUF EIN PROTEOLYTISCHES NETZWERK IN DER HUMANEN HAUT.....	26
4.3 MORPHOLINO KNOCKDOWN DER TRANSMEMBRAN SERINPROTEASE TMPRSS4 .....	28
<b>5. WEITERE ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
5.1 HETEROLOGE EXPRESSION DER E92A MUTANTE VON LAST_MAM FÜR DIE KRISTALLISATION.....	31
5.1.1 <i>Transposition der E92A Mutante und Überprüfung rekombinanter Bacmide</i> .....	32
5.1.2 <i>Transfektion rekombinanter Bacmide und affinitätschromatographische Reinigung der LAST_MAM E92A Mutante</i> .....	33
5.1.3 <i>Kristallisation der LAST_MAM E92A Mutante zur Aufklärung der Struktur</i> .....	34
<b>6. AUSBLICK.....</b>	<b>35</b>

<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>37</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>I</b>
8.1 VERÖFFENTLICHUNG 1: PROTEOMICS- UND STRUKTURANALYSEN DER ASTACIN METALLOPROTEASE FAMILIE .....	I
8.2 VERÖFFENTLICHUNG 2: ANALYSE DES PROTEOLYTISCHEN NETZWERKES IN DER HUMANEN HAUT .....	II
8.3 VERÖFFENTLICHUNG 3: MORPHOLINO KNOCKDOWN DER TRANSMEMBRAN SERINPROTEASE TMPRSS4 .....	III
8.4 ABKÜRZUNGEN .....	IV
8.5 EIN-UND DREI-BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN .....	V
8.6 TABELLE DER FLUOROGENEN PEPTID-SUBSTRATE .....	VI

## **CURRICULUM VITAE**

## **DANKSAGUNG**

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR DER HUMANEN MEPRINE. ....	5
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTIONSWEISE DER MORPHOLINO OLIGONUKLEOTIDE (MO).....	9
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PRINZIPS DES RASTERELEKTRONENMIKROSKOPS. ....	13
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES BACULOVIRUS EXPRESSIONSSYSTEM BASIEREND AUF DEM BAC-TO- BAC® SYSTEM (INVITROGEN) (VILCINSKAS, 2011). ....	17
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PCR-ANALYSE REKOMBINANTER BACMIDE. ....	18
ABBILDUNG 6: VALIDIERUNG DER SPALTSPEZIFITÄT DER FÜNF ASTACIN METALLOPROTEASEN MIT HILFE VON FLUOROGENEN SUBSTRATEN. ....	25
ABBILDUNG 7: HOMOLOGIEMODELLE DER KATALYTISCHEN DOMÄNE VON MEPRIN A UND MEPRIN B. ....	26
ABBILDUNG 8: PROTEOLYTISCHES NETZWERK DER MEPRIN METALLOPROTEASEN UND DER KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASES. ....	27
ABBILDUNG 9: MORPHOLINO KNOCKDOWN VON TMPRSS4A IN ZEBRABÄRBLING EMBRYONEN. ....	30
ABBILDUNG 10: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE DER TMPRSS4A KNOCKDOWN EMBRYONEN. ....	30
ABBILDUNG 11: ÜBERPRÜFUNG REKOMBINANTER BACMIDE MITTELS PCR. ....	32
ABBILDUNG 12: ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION DER E92A MUTANTE VON LAST_MAM. ....	33
ABBILDUNG 13: KRISTALL DER E92A MUTANTE VON LAST_MAM. ....	34

## TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: PUFFERZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE MIKROINJEKTION UND HALTUNG DER INJIZIERTEN EMBRYONEN. ....	10
TABELLE 2: CHEMIKALIENZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE METHACRYLAT-EINBETTUNG UND TRICHROM-FÄRBUNG. ....	12
TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG DER PCR ANSÄTZE ZUR ÜBERPRÜFUNG REKOMBINANTER BACMIDE. ....	19
TABELLE 4: PCR-PROGRAMM ZUR ÜBERPRÜFUNG REKOMBINANTER BACMIDE. ....	19
TABELLE 5: MEDIEN FÜR DIE KULTIVIERUNG VON INSEKTENZELLEN. ....	20
TABELLE 6: PUFFER FÜR DIE DIALYSE UND DIE STREP-TACTIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE. ....	22
TABELLE 7: EIN- UND DREI-BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN. ....	V
TABELLE 8: FLUOROGENE PEPTID-SUBSTRATE FÜR DIE DATEN-VALIDIERUNG. ....	VI

### 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloproteasen Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind an essentiellen (patho)physiologischen Prozessen beteiligt. Um die Funktion dieser Proteasen zu verstehen, ist es von Bedeutung, sie nicht isoliert, sondern im gesamten proteolytischen Netzwerk zu betrachten.

Die Meprine werden in einer Vielzahl von Geweben, in Leukozyten, aber auch in Krebszellen exprimiert. In der Haut konnten die beiden Enzyme in unterschiedlichen dermalen Schichten detektiert werden, wo sie u.a. an der Kollagenassemblierung durch Abspaltung der Propeptide beteiligt sind.

Im Zuge von *Proteomics* Analysen konnten mehr als 3000 proteolytische Schnittstellen von fünf Astacin-Metalloproteasen (Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$ , Astacin, LAST und LAST\_MAM) in Peptiden und nativen Substraten identifiziert werden und somit eine Aussage über die Spaltspezifität getroffen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Spaltspezifitäten mit Hilfe von fluorogenen Substraten *in vitro* verifiziert werden. Bemerkenswert hierbei ist die starke Präferenz der beiden Meprine und LAST\_MAM für die Aminosäuren Aspartat und Glutamat in der P1' Position.

Meprine werden als Zymogene exprimiert und müssen durch proteolytische Prozessierung einer tryptischen Protease aktiviert werden. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren Aktivitätsbestimmungen beider Meprine unter Berücksichtigung potentieller Aktivatoren und Substrate. Es konnten die *kallikrein-related peptidases* (KLK) 4, 5 und 8 als spezifische Aktivatoren identifiziert werden, wobei nur KLK5 beide Proteasen aktiviert. Sowohl KLK4 als auch KLK8 sind lediglich in der Lage, das Propeptid von Meprin  $\beta$  abzuspalten. Außerdem konnte biochemisch und mittels *Proteomics* gezeigt werden, dass proKLK7 von Meprin  $\beta$  prozessiert wird. Durch N-terminale Sequenzierung wurde eine Schnittstelle zwei Aminosäuren N-terminal der eigentlichen Aktivierungsstelle identifiziert. Dieser Schritt beschleunigt die Aktivierung von KLK7, wenn durch Trypsin noch das verbliebene Dipeptid abgespalten wird.

Da einige Vertreter der humanen *kallikrein-related peptidases* (KLK) als Meprin-Aktivatoren identifiziert werden konnten, sollten diese im Zuge dieser Arbeit im Modellorganismus *Danio rerio* untersucht werden. Durch *in silico* und RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass keine funktionellen KLK-Homologe im Zebrafisch codiert sind. Da somit andere tryptische Proteasen an der Aktivierung der Meprine beteiligt sein müssen, wurde die Transmembran-Serinprotease TMPRSS4 analysiert. In der Tat zeigte die Reduktion des Expressionslevels von TMPRSS4 durch Morpholino-Injektion drastische Störungen in der embryonalen Entwicklung von Zebrafischlarven. Mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie ließ sich eine Fehlbildung der epidermalen Haut bis zu einem Ablösen der Keratinozyten von dem darunter liegenden Gewebe feststellen.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 PROTEASEN UND DAS PROTEOLYTISCHE NETZWERK

Proteasen sind proteolytische Enzyme, die die Fähigkeit besitzen, Peptidbindungen zu hydrolysieren. Mit 566 Mitgliedern bilden sie die größte Enzymfamilie im Menschen. 2% aller humanen Gene codieren für Proteasen oder Protease-Inhibitoren, was die enorme Bedeutung des Proteasoms für den Organismus verdeutlicht (Puenta et al., 2005).

Proteasen spielen eine große Rolle in nahezu allen biologischen Prozessen, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär. Neben ihrer Beteiligung am Auf-, Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix sind sie in der Lage Signaltransduktionskaskaden zu beeinflussen, indem sie andere Proteine durch limitierte Proteolyse aktivieren oder deaktivieren. Darüber hinaus ist die proteolytische Aktivität essentiell für die dynamische Regulation der Zellfunktion, deren Störung häufig die Ursache vieler Krankheiten ist.

Proteolytische Enzyme lassen sich aufgrund der Konformation und Zusammensetzung des aktiven Zentrums und des damit verbunden spezifischen Katalysemechanismus in sieben Klassen unterteilen: Asparagin-, Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen (<http://.merops.sanger.ac.uk>). Die Proteasen der verschiedenen Klassen agieren jedoch nicht isoliert voneinander, vielmehr bilden sie Signalkaskaden und regulatorische Netzwerke. Dabei interagieren sie nicht nur untereinander, sondern auch mit ihren Substraten und Inhibitoren. Diese Prozesse müssen streng reguliert werden und auch die Lokalisation der einzelnen Komponenten spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Overall und Kleifeld beschrieben die Komplexität dieser Interaktionen als *proteolytic web* (Proteolytisches Netzwerk) (Overall & Kleifeld, 2006). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich dieses Netzwerk in einem Gleichgewicht. Kleinste Veränderungen einzelner Faktoren, wie z.B. die Expressionsrate oder die Aktivität einzelner Komponenten, führen zwangsläufig dazu, dass das System aus dem Gleichgewicht gerät. Dies ist häufig die Ursache für das Auftreten von Krankheiten.

2009 prägte Krüger den Begriff des „proteolytischen Internets“, wonach einzelne regionale proteolytische Netzwerke in bestimmten Organen über z.B. Hormone oder Zytokine untereinander kommunizieren können (Krüger, 2009).

All dies verdeutlicht, dass es von höchster Priorität ist, die einzelnen Komponenten des proteolytischen Netzwerkes zu identifizieren und zu charakterisieren, um die Rolle der Proteasen in physiologischen aber auch pathologischen Prozessen zu verstehen.

## 2.2 MEPRIN METALLOPROTEASEN

Die Meprine sind Metalloproteasen der Astacin-Familie und der Metzinkin-Superfamilie.

In Mäusen wurden sie bereits 1981 von Beynon et al. im Nierengewebe entdeckt und erhielten aufgrund dessen ihren noch heute gängigen Namen: Meprin (*Metalloprotease from renal tissue*) (Beynon et al., 1981). Die humanen Zink-Endopeptidasen wurden erstmals 1982 als PABA-Peptid-Hydrolase in der Bürstensaummembran des Dünndarms beschrieben (Sterchi et al., 1982). Bei Routineuntersuchungen in der klinischen Diagnostik konnte beobachtet werden, dass Patienten trotz der Entfernung der Bauchspeicheldrüse weiterhin in der Lage waren, den diagnostischen Marker für die Pankreasfunktion, N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoessäure (PABA-Peptid) umzusetzen. Diese PABA-Peptid-Hydrolase konnte aufgrund von topologischen, strukturellen und katalytischen Homologien dem in Mäusen und Ratten bereits beschriebenen Enzym zugeordnet werden.

Circa zehn Jahre später konnten oligomere Formen der Protease identifiziert werden, wobei zwischen zwei homologen Varianten, Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$ , unterschieden werden kann (Gorbea et al., 1991).

Bislang wurden die Meprine lediglich in Vertebraten detektiert (Beynon et al., 1981; Kenny & Ingram, 1987; Schütte et al., 2007; Sterchi et al., 1982; Warren et al., 2008). Neben der Niere und dem Dünndarm konnten jedoch etliche weitere Expressionsorte beschrieben werden. Die beiden Metalloproteasen wurden in apikalen Bereichen der Darm-Epithelzellen des Menschen und der Maus, sowie in der humanen Haut identifiziert (Becker-Pauly et al., 2007; Kronenberg et al., 2010; Kumar & Bond, 2001). Hier konnte bereits gezeigt werden, dass Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  in unterschiedlichen epidermalen Schichten exprimiert werden. Durch Zellkulturversuche an kultivierten Keratinozyten konnten spezifische Funktionen der Proteasen beschrieben werden. Während die Inkubation mit Meprin  $\beta$  zu einer dramatischen Veränderung der Zellmorphologie und zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl führt, scheint Meprin  $\alpha$  einen proliferativen Effekt auf die basalen Keratinozyten auszuüben (Becker-Pauly et al., 2007).

Unter pathologischen Bedingungen wurde Meprin in Leukozyten der *Lamnia propria*, in Makrophagen und in Colonkarzinomzellen identifiziert (Crisman et al., 2004; Lottaz et al., 1999; Rösmann et al., 2002).

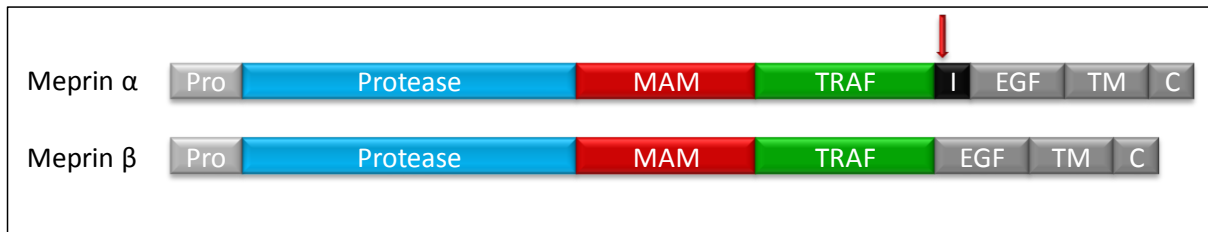
Im Zebrafisch *Danio rerio* konnte ein ubiquitäres Expressionsmuster der Protease beschrieben werden. Im Gegensatz zu den Säugern werden hier jedoch drei Meprin Homologe exprimiert, zwei  $\alpha$ - und eine  $\beta$  Variante (Schütte et al., 2007)

Die Meprin Metalloproteasen sind einzigartig unter den Astacinen, da sie zum einen die größte sekretierte Protease (Meprin  $\alpha$  mit bis zu 6 mega Dalton) und zum anderen das einzige membrangebundene Astacin (Meprin  $\beta$ ) darstellen (Eldering et al., 1997). Als Mitglieder der Metzinkin-Superfamilie weisen sie charakteristische Merkmale auf. So besitzen sie ein katalytisch wirksames Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) in ihrem aktiven Zentrum, das von drei Histidinseitenketten, einer Glutamatseitenkette und einem Tyrosinrest komplexiert wird. Dieses Zinkbindemotiv (HExxHxxGxxH) ist in der Aminosäuresequenz aller Astacine hoch konserviert. Des Weiteren besitzen sie den sogenannten *Met-turn* (SxMHY), ein konservierter Methionin-Rest, angeordnet in einer  $\beta$ -1,4-Schleife, der mit dem bereits erwähnten Tyrosinrest den fünften Zinkliganden stellt (Bode et al., 1993; Gomis-Rüth, 2003; Stöcker et al., 1995).

Wie die meisten Mitglieder der Astacin Familie weisen auch die Meprine eine Multidomänenstruktur auf (siehe Abbildung 1). Auf das N-terminale Signalpeptid folgen bei beiden Enzymen ein Propeptid, eine Astacin-ähnliche Protease-Domäne, eine MAM-Domäne (*meprin, A5 protein, receptor tyrosine phosphatase  $\mu$* ) und eine TRAF-Domäne (*tumor necrosis factor receptor associated factor*). Die MAM- und TRAF-Domänen kommen in zahlreichen Proteinen vor und sind an Zelladhäsionen und Proteininteraktionen beteiligt. Bei den Meprinen sorgen sie durch intermolekulare Disulfidbrücken für die Oligomerisierung der Enzyme (Sterchi et al., 2008). Bei Meprin  $\alpha$  folgt nun die I-Domäne (*inserted*) mit einer Schnittstelle für Furin-ähnliche Konvertasen des sekretorischen Weges. Diese wird während der Biosynthese proteolytisch gespalten, was zum Verlust des Membranankers führt und somit die Sekretion der Protease in den extrazellulären Raum ermöglicht (Marchand et al., 1995). Meprin  $\beta$  besitzt diese Schnittstelle nicht und bleibt somit membrangebunden. 2003 konnten Hahn et al. jedoch sezerniertes Meprin  $\beta$  in transfizierten Zellen beobachten. Sie konnten zeigen, dass Meprin  $\beta$  mehrere O-Glykosylierungsstellen besitzt, welche ein

*ectodomain-shedding* durch TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme*) und somit ein Sezernieren der Protease begünstigen (Hahn et al., 2003).

Am C-terminalen Ende befinden sich bei beiden Proteasen eine EGF- (*epidermal growth factor*) und eine Transmembran-Domäne, sowie ein kurzes intrazelluläres Peptid.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der humanen Meprine.**

Der rote Pfeil markiert die Schnittstelle für Furin-ähnliche Konvertasen. Pro: Propeptid; Protease: Astacin-ähnliche katalytische Domäne; MAM: *meprin A5 protein, receptor tyrosine phosphatase*  $\mu$ -Domäne; TRAF: *tumor necrosis factor receptor associated factor*-Domäne; I: *inserted*-Domäne; EGF: *epidermal growth factor like*-Domäne; TM: Transmembran-Domäne; C: cytoplasmatische Domäne

Da die Meprine als Zymogen exprimiert werden, müssen sie zunächst aktiviert werden. Dies erfolgt durch die proteolytische Abspaltung des Propeptids durch Serinproteasen wie z.B. pankreatisches Trypsin. In der Abwesenheit von Trypsin können die beiden Metalloproteasen durch eine Vielzahl weiterer Serinproteasen aktiviert werden. In kolorektalen Krebszellen konnte gezeigt werden, dass Meprin  $\alpha$ , nicht aber Meprin  $\beta$  durch Plasmin aktiviert wird (Becker et al., 2003; Rösmann et al., 2002). Desweiteren konnte die neutrophile Elastase als Aktivator für Meprin  $\alpha$  in bronchialen Epithelzellen identifiziert werden (Bergin et al., 2008). In der Haut konnte KLK 4 bereits als Aktivator für Meprin  $\beta$ , nicht aber für Meprin  $\alpha$  beschrieben werden (Becker-Pauly et al., 2007; Ohler et al., 2010).

Bereits 2001 zeigten Bertenshaw et al. klare Unterschiede in der Spaltspezifität der beiden Meprine. Während Meprin  $\beta$  eindeutig saure Aminosäuren in P1' präferierte, zeigte Meprin  $\alpha$  eine unspezifische Spaltspezifität für kleine und hydrophobe Aminosäuren in P1' (Bertenshaw et al., 2001).

Die Aktivität von Proteasen unterliegt einer strengen Regulation. Gerade in Hinsicht auf die Bekämpfung von Krankheiten ist die Regulation der proteolytischen Aktivität ein vielversprechender Therapieansatz. *In vivo* kann dies durch die Regulation des Expressionslevels von spezifischen Aktivatoren und endogenen Inhibitoren erreicht werden. Eine streng regulierte Inhibition ist ebenso unerlässlich wie eine gezielte Aktivierung.

Der effektivste, bislang bekannte Inhibitor für Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  ist das natürlich vorkommende Hydroxamat Aktinonin (Kruse et al., 2004; Wang et al., 2011). Erst kürzlich konnten Fetuin-A und Cystatin C als endogene Inhibitoren der Meprine im Blutplasma identifiziert werden (Hedrich et al., 2010).

Trotz intensiver Forschung sind die (patho)physiologischen Funktionen der Meprine bislang noch weitgehend unbekannt. Durch *in vitro*-Studien konnten eine Vielzahl von Proteinen und biologisch aktiven Peptiden als Substrate identifiziert werden, die auf eine wichtige Rolle der Proteasen in der Embryonalentwicklung, der Zell-Migration und -Differenzierung, im Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix, bei immunologischen Reaktionen oder in pathologischen Situationen wie Angiogenese, Krebs und Fibrose, hindeuten (Kronenberg et al., 2010; Lottaz et al., 1999; Rösmann et al., 2002; Schütte et al., 2010).

Zu den potentiellen Substraten zählen die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  und -18 (Banerjee & Bond, 2008; Herzog et al., 2009), sowie der Wachstumsfaktor VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*) und die Peptidhormone Bradykinin, Gastrin und Angiotensin (Bertenshaw et al., 2001; Kruse et al., 2004; Schütte et al., 2010; Skidgel, 1992; Yamaguchi et al., 1992). Desweiteren konnten zahlreiche Bestandteile der extrazellulären Matrix (Kollagen Typ III, IV, Nidogen, Fibronectin und Laminin) als Substrate identifiziert werden (Bertenshaw et al., 2001; Köhler et al., 2000; Kronenberg et al., 2010; Kruse et al., 2004). Unter pathologischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Meprin  $\beta$  die Zelladhäsionseigenschaften von Leukozyten durch die Spaltung von Tenascin-C beeinflusst, wohingegen Meprin  $\alpha$  durch die Abspaltung der Propeptide an der Kollagen-Assemblierung in fibrotischer Haut beteiligt zu sein scheint (Ambort et al., 2010; Kronenberg et al., 2010).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es bereits zahlreiche Ansätze zur Aufklärung der Funktion der Meprin Metalloproteasen gibt. Es ist jedoch weiterhin von großer Bedeutung, Meprin in einem Gesamtkontext aus Substraten, Inhibitoren und Aktivatoren darzustellen und somit neue proteolytische Netzwerke aufzuzeigen.

## 2.3 ZIELE DIESER ARBEIT

Trotz intensiver Forschung konnte die Rolle der Meprin Metalloproteasen in (patho)physiologischen Prozessen bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden. Um die Funktion dieser Proteasen zu verstehen, ist es daher von großer Bedeutung sie nicht isoliert zu untersuchen, sondern im gesamten proteolytischen Netzwerk zu betrachten.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Aufschluss über die Aktivität der Meprin Metalloproteasen hinsichtlich potentieller Aktivatoren und verschiedener Substrate zu liefern. Dabei sollte die Spaltspezifität der Meprine, und die drei weiterer Astacine (LAST, LAST\_MAM und Astacin), mit Hilfe von synthetischen Substraten in fluoreszenzphotometrischen Analysen und mittels MALDI-TOF verifiziert werden.

Außerdem wurden humane *kallikrein-related peptidases* (KLK) hinsichtlich der Meprin Aktivierung untersucht. Die Nutzung des Modellorganismus *Danio rerio* sollte neue Wege zur Erforschung des proteolytischen Netzwerkes eröffnen. Ziel war es bereits bekannte Aktivatoren (z.B. KLKs) aber auch neue potentielle Aktivatoren im Zebrafisch zu identifizieren.

Da es bislang nicht gelungen ist, die dreidimensionale Struktur von Meprin zu entschlüsseln und nur wenige Astacine mit einer MAM-Domäne beschrieben sind, war ein weiteres Teilprojekt der vorliegenden Arbeit die heterologe Expression der Astacin-Metalloprotease LAST\_MAM für die Kristallisation. LAST\_MAM besitzt neben der astacin-ähnlichen katalytischen Domäne eine MAM-Domäne. Da die Kristallisation bei 20°C durchgeführt wird und oftmals eine große Zeitspanne umfasst, ist eine hohe Stabilität des Proteins erforderlich. LAST\_MAM ist bereits als Zymogen aktiv (Becker-Pauly et al., 2009), deshalb war es unerlässlich die inaktive Mutante für die Kristallisation der Protease zu exprimieren. Es sollte eine konstant hohe Expressionsrate erzielt werden, die eine darauffolgende Kristallisation im *Department of Structural Biology* von Dr. Gomis-Rüth (Barcelona Science Park, Spanien) ermöglicht.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Der Großteil der durchgeführten Methoden ist den drei angefügten Publikationen zu entnehmen. Dieser Abschnitt bezieht sich auf Methoden, die nicht ausführlich beschrieben wurden und berücksichtigt solche, die bei bisher unveröffentlichten Daten zur Anwendung gekommen sind.

#### 3.1 MORPHOLINO MIKROINJEKTION

Die Morpholino Mikroinjektion bietet die Möglichkeit einer gezielten Translationsregulierung *in vivo*. Hierbei werden chemisch veränderte Oligonukleotide, die sogenannten Morpholinos, gezielt in die frühen Stadien der Zebrafisch-Embryonen injiziert, was zu einem *knockdown* der mRNA des Zielproteins, bzw. deren Translation führt (Nasevicius & Ekker, 2000). Morpholinos sind RNA-Oligonukleotide, bei denen die Ribosemoleküle des Grundgerüsts gegen einen Morpholin-Ring ausgetauscht wurden. Dies verleiht ihnen eine größere Stabilität und schützt sie vor dem Abbau durch Nukleasen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Morpholino *antisense* Oligonukleotide wurden von der Firma GeneTools (Philomath, USA) synthetisiert und richteten sich gegen jeweils 25 Nukleotide in den 5'UTRs (*untranslated regions*) der kodierenden mRNA Sequenzen (MO1 und Kontrolle) bzw. gegen die Exon-Intron-Grenze von Exon 11 und Intron 11 (MO2) der TMPRSS4a mRNA Sequenz.

MO1 blockiert die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) und verhindert somit die Translation der mRNA, während MO2 einen *splice-inhibiting* Morpholino darstellt und die korrekte Prozessierung der prä-mRNA verhindert (siehe Abbildung 2) (Morcos, 2007; Moulton & Yan, 2008).

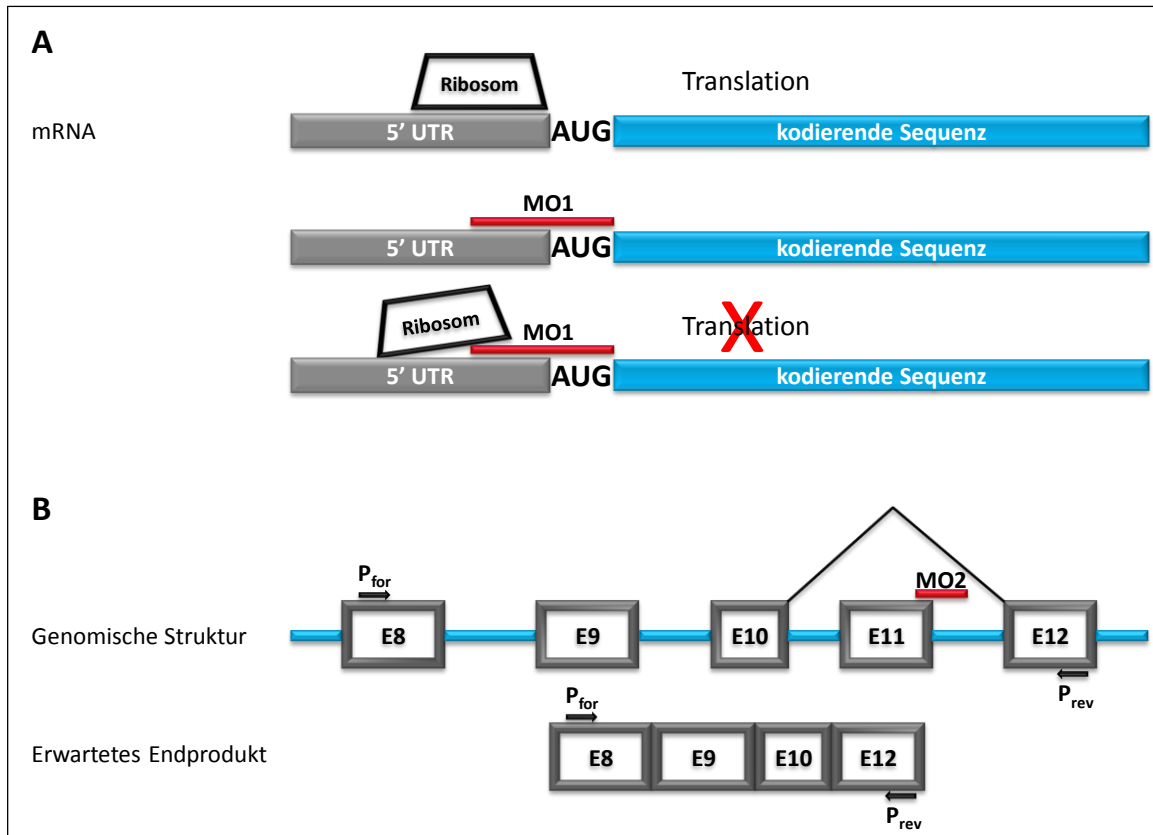
Um die Verbreitung der Morpholinos in den injizierten Embryonen mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachten zu können, waren diese mit 3'-Carboxyfluorescein markiert. Als Kontrolle diente ein Standard-Morpholino, welches gegen eine Mutation im humanen  $\beta$ -Globin Gen gerichtet ist und keinen Einfluss auf die Entwicklung des Zebrafischs ausübt.

*Morpholino Sequenzen*

TMPRSS4-Morpholino1: 5'-CAT GAG TTT TGT GCG TTT TGC AGG C-3'

TMPRSS4-Morpholino2: 5'-ATT CGG AAA ACA CAC AGT ACC TGG A-3'

Kontroll-Morpholino: 5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A- 3'



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Morpholino Oligonukleotide (MO).**

A: Durch die Bindung des Morpholinos (MO1) im Bereich des Startcodons (AUG) wird die Anlagerung der 40S ribosomalen Untereinheit blockiert und somit die Translation verhindert. B: Durch die Bindung des Morpholinos (MO2) wird die *splice-site* der Exon-Intron Grenze von Exon 11 und Intron 11 blockiert, die prä-mRNA wird nicht korrekt prozessiert und es kommt zum Verlust von Exon 11. UTR: *untranslated region*; E: Exon; P: Primer

Die Morpholino Oligonukleotide wurden mit *Danieu*-Puffer auf eine Konzentration von 0,3 mM verdünnt.

Um die Zebrafisch-Eier für die Injektion zu fixieren, wurden 1,5% Agarose in 20 ml *Danio rerio* Embryonalmedium E3 (Westerfield, 1995) in einer Petrischale ausgegossen und mit Hilfe eines speziellen Stempels mit ca. 1 mm breiten Furchen versehen. Daraufhin wurde die Injektionskapillare (Eppendorf Femtotips®II, Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe einer Mikroloader®-Pipettenspitze mit 2 µl Morpholino-Lösung beladen und am Mikromanipulator (Märzhäuser, Wetzlar) angebracht. Dieser war bereits an den Kompressor (Transjector 5246,

Eppendorf, Hamburg) angeschlossen. Für den Kompensationsdruck  $P_c$  zum Ausgleich der Kapillarwirkung wurden  $P_c=30$  hPa und für den Injektionsdruck  $P_i=1500$  hPa gewählt. Das Injektionsvolumen wurde über die Dauer  $t_i$  der Injektion beeinflusst.

Ca. 2-4 ng der Morpholinos in Lösung wurden mit Hilfe des Mikromanipulators und des Mikroinjektors in das Ein- oder Zweizellstadium der Embryonen injiziert. Die injizierten Embryonen wurden in Embryonalmedium E3 in 96-well Mikrotiterplatten bei 27°C gehalten und in gegebenen Zeitabständen dokumentiert. Um einen Pilzwachstum zu verhindern, wurde dem Embryonalmedium 0,1% Methylenblau zugesetzt.

**Tabelle 1: Pufferzusammensetzung für die Mikroinjektion und Haltung der injizierten Embryonen.**

Puffer	Zusammensetzung
<i>Danieu-Puffer</i>	58 mM NaCl
	0.7 mM KCl
	0.4 mM MgSO <sub>4</sub>
	0.6 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	5 mM HEPES, pH 7.6
Embryonalmedium E3	5 mM NaCl
	0,17 mM KCl
	0,33 mM CaCl <sub>2</sub>
	0,33 mM MgSO <sub>4</sub>

## 3.2 METHACRYLAT-EINBETTUNG UND TRICHROM-FÄRBUNG

Die Morpholino injizierten Embryonen sollten des Weiteren mit Hilfe von Methacrylat-Schnitten untersucht werden. Hierfür mussten die Embryonen zunächst fixiert, anschließend eingebettet und zuletzt gefärbt werden.

### 3.2.1 Bouin Fixierung

Die Fixierung ist ein chemischer Prozess, bei dem das gewünschte Gewebe vor Zerfall geschützt wird. Die Bouin's Lösung (15 ml wässrige Pikrinsäure, 5 ml Formaldehyd (37%), 1 ml Eisessig) ist ein Fixativ und eignet sich hervorragend für eine nachfolgende Trichrom-Färbung.

Die „Morphanten“ wurden für 24-48 h in 2 ml Bouin's Lösung fixiert und anschließend in 70% Ethanol überführt. Die Embryonen wurden solange mit 70% Ethanol gewaschen bis die gelbliche Farbe der Bouin's Lösung ausgewaschen war. Daraufhin wurden sie in 50% Ethanol überführt, in 2%igem Agar positioniert und über eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 2x10 min 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 95% EtOH, 99% EtOH) entwässert.

### 3.2.2 Styrol-Methacrylat-Einbettung

Für die Styrol-Methacrylat-Einbettung musste zunächst das n-Butyl-Methacrylat entstabilisiert werden, da der Ester mit 10 ppm Hydrochinonmonomethylether stabilisiert war. Hierfür wurde ein Schütteltrichter mit gleichen Teilen Ester (100 ml) und 2% wässriger NaOH-Lösung (100 ml) gefüllt und per Hand kräftig geschüttelt. Der Stabilisator löst sich in der NaOH-Lösung und bildet die untere Phase. Nach der Trennung der Phasen wurde die untere Phase abgelassen und der Vorgang fünfmal wiederholt. Zur Entfernung des NaOH wurden zehnmal 100 ml *Aqua bidest* in den Kolben gegeben, kräftig geschüttelt und jeweils die untere Phase verworfen. Der so entstandene entstabilisierte Ester wurde durch Zugabe von 15 g grobkörnigem wasserfreiem  $\text{CaCl}_2$  im Erlenmeyerkolben getrocknet und nach einigen Minuten filtriert. Nun konnte die Styrol-Methacrylat-Endmischung hergestellt werden. Hierzu wurden je 25 ml entstabilisierter Ester und Styrol gemischt und als Initiator 4 Gewichtsprozent (2 g/50 ml) wasserhaltiges Benzoylperoxid hinzugegeben. Das Gemisch wurde daraufhin wieder mit 15 g grobkörnigem wasserfreiem  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und anschließend filtriert.

Die Embryonen wurden nun für 1 h in ein Gemisch aus Styrol-Methacrylat und Ethanol im 1:1 Verhältnis überführt und anschließend für 2 h in reinem Styrol-Methacrylat inkubiert. Daraufhin wurde die Styrol-Methacrylat-Lösung gewechselt und es fand eine über-Nacht-Inkubation bei 4°C statt. Abschließend wurde noch einmal die Lösung gewechselt und für weitere 3 h inkubiert.

Die Embryonen wurden in das Styrol-Methacrylat-Gemisch eingebettet und zur Polymerisation des Styrol-Methacrylats für 2 h bei Raumtemperatur, gefolgt von 24 h bei 50°C und 24 h bei 60°C, inkubiert. Die eingebetteten Embryonen wurden mit dem *SuperCut Microtome* (Leica Microsystems) in 10 µm dünne Schnitte geschnitten und anschließend gefärbt.

### 3.2.3 Trichrom-Färbung nach Cason

Die Trichrom-Färbung nach Cason dient zur Darstellung von Kollagenfibrillen (blau), Epithel- und Muskelgewebe (orange) sowie Zellkernen (rot) (Cason, 1950). Der Färbemechanismus basiert auf elektrostatischen Bindungen der negativ geladenen Farbstoffe.

Vor der Färbung musste den Schnitten das Styrol-Methacrylat entzogen werden. Hierfür wurden sie zweimal für je 15 min in Xylol inkubiert und anschließend über eine absteigende Ethanolreihe (jeweils 2x10 min 99% EtOH, 95% EtOH, 90% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH) in destilliertes Wasser überführt.

Nach der Färbung (2-5 min) wurden die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe und dreimaliges Inkubieren für je 15 min in Xylol wieder entwässert. Die Schnitte konnten nun mit Eukitt eingedeckelt und unter dem DMI3000B Mikroskop (Leica Microsystems) untersucht werden.

**Tabelle 2: Chemikalienzusammensetzung für die Methacrylat-Einbettung und Trichrom-Färbung.**

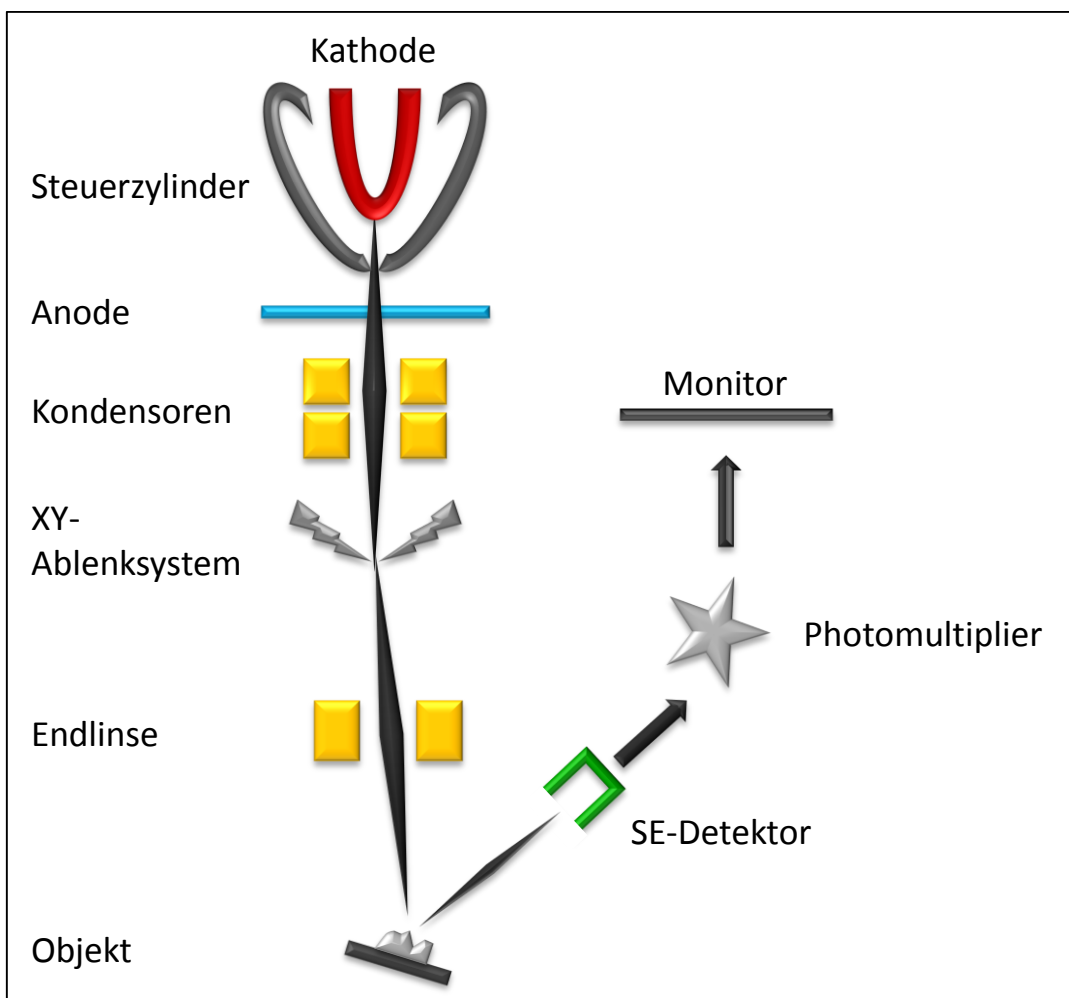
Chemikalie	Zusammensetzung
Bouin's Lösung (21ml)	15 ml wässrige Pikrinsäure (1,2%) 5 ml Formaldehydlösung (37%) 1 ml Eisessig 200 ml dest. H <sub>2</sub> O
Trichrom-Färbelösung (Cason)	1 g Phosphorwolframsäure 2 g Orange G 1 g Anillinblau (wasserlöslich) 3 g Säurefuchsin

## 3.3 RASTERELEKTRONEN-MIKROSKOPIE (REM)

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie ist es möglich, eine Oberfläche mittels eines gebündelten Elektronenstrahls darzustellen. Hierbei wird durch Erhitzen eines Wolframdrahtes (Kathode) ein Primärelektronenstrahl erzeugt, der durch einen Steuerzylinder (Wehnelt Zylinder) fokussiert und durch eine Anode beschleunigt wird. Anschließend wird der Primärelektronenstrahl durch elektromagnetische Spulen (Kondensoren und Endlinse) fein gebündelt und trifft so fokussiert auf das Objekt auf. Mit

Hilfe eines XY-Ablenksystems tastet der Primärelektronenstrahl das Objekt Punkt für Punkt und Zeile für Zeile ab, wobei sogenannte Sekundärelektronen emittiert werden. Die Intensität der Sekundärstrahlung ist vom Neigungswinkel der Objektoberfläche abhängig. Um den Objekten eine Plastizität zu verleihen, werden die Sekundärelektronen von einem seitlich schräg über dem Objekt angebrachten Detektor aufgefangen. Dem Detektor zugewandte Details erscheinen hierbei heller als ihm abgewandte Details.

Am Detektor entstehen in einem Szintillator Lichtblitze, die von einem Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier) elektrisch rückgewandelt und verstärkt werden. Dieses elektrische Signal wird auf den Bildschirm eines Monitors übertragen, wobei das Bild durch zeilenweises Abtasten des Objektes aufgebaut wird (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips des Rasterelektronenmikroskops.**

SE: Sekundärelektronen

Bei der Rasterelektronen-Mikroskopie kann eine bis zu 100.000-fache Vergrößerung erreicht werden, wobei Bildpunkte mit einem Abstand von 1 nm noch unterscheidbar sind.

Um die Phänotypen der Morpholino injizierten Embryonen zu dokumentieren wurden diese mittels Rasterelektronen-Mikroskopie untersucht.

Hierzu wurden die Embryonen 24h in einer wässrigen 4%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert und durch eine Entwässerungsreihe (jeweils 2x10 min 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 95% EtOH, 99% EtOH, 100% Aceton) für die Kritisch-Punkt-Trocknung vorbereitet. Die in 100% Aceton gelagerten Embryonen wurden mit Hilfe des BAL-TEC CPD030 Kritisch-Punkt-Trockner getrocknet und anschließend unter dem Binokular auf REM-Tellerchen orientiert und fixiert.

Da in der Elektronenmikroskopie nur leitende Objekte dargestellt werden können, müssen die Proben zuvor durch Aufdampfen eines Metallfilmes, in diesem Fall Gold, leitend gemacht werden (*sputtern*). Hierbei ist darauf zu achten, dass die Goldschicht nicht zu dick aufgetragen wird, da sonst die feinen Strukturen der Objekte abgedeckt werden.

Die Präparate wurden mit dem BAL-TEC SCD005 *Sputter coater* beschichtet und anschließend mit dem Rasterelektronen Mikroskop (ESEM XL-30, Philips) untersucht.

## 3.4 MOLEKULARBIOLOGIE

### 3.4.1 Generierung einer inaktiven Mutante von LAST\_MAM

Die Herstellung der inaktiven Mutante von LAST\_MAM (E92A) auf cDNA-Ebene wurde bereits im Zuge einer Staatsexamensarbeit (Damm, 2006) durchgeführt und soll hier nur zur Vollständigkeit kurz erläutert werden.

Es wurde die Methode der *Site-Directed-Mutagenesis* angewandt, wobei die Aminosäure Glutamat 92 (E92) der Protease-Domäne gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde. Da Glutamat 92 im aktiven Zentrum als Zinkligand fungiert, führt dies zur Inaktivierung der Protease (Yiallourous et al., 2000).

Die Mutagenese erfolgte mithilfe des *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) und nach Anleitung des Herstellers.

Bei LAST\_MAM wird das Glutamat 92 durch das Triplet GAA codiert. Bei der Mutagenese wurde mithilfe von Primern das mittlere Adenin (A) durch Cytosin (C) ausgetauscht. Das so entstandene Triplet GCA codiert nun für die Aminosäure Alanin.

Die Sequenz der eingesetzten Primer lautet demnach:

*sense:*            5' - TT GTA CAC GCA CTT GGA CA - 3'

*antisense:*      5' - TG TCC AAG TGC GTG TAC AA - 3'

Gelb markiert ist die Position des ausgetauschten Nukleotids.

Als Ausgangsplasmid für die PCR wurde der pFASTBAC™1-Vektor mit integrierter LAST\_MAM Sequenz verwendet. Durch den Einsatz der oben angegebenen Primer kam es zur Punktmutation und somit zur Synthese der Mutation-tragenden cDNA. Daraufhin wurde eine Degradation der methylierten, nicht mutierten *template* Plasmid-DNA, mittels des Restriktionsenzym *Dpn I*, durchgeführt. Somit stand nun der Vektor pFASTBAC™1 mit der für die inaktive LAST\_MAM E92A Mutante kodierenden Sequenz für die Insektenzellkultur zur Verfügung.

## 3.5 INSEKTENZELLKULTUR UND PROTEINEXPRESSION

### 3.5.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem macht man sich für die heterologe Expression rekombinanter, posttranslational korrekt modifizierter Proteine in einem eukaryotischen System zunutze (siehe Abbildung 4).

Bei Baculoviren handelt es sich um natürlich vorkommende stäbchenförmige DNA-Viren mit einem sehr engen Wirtsspektrum. Sie sind auf Arthropoden beschränkt und können sich im Menschen nicht vermehren. Ihr doppelsträngiges zirkuläres Genom ist 80-200 kb lang und besitzt eine Polyhedrinkapsel, die es vor der Umwelt schützt.

Bei dem hier verwendeten Expressionssystem wurde mit dem *Autographa californica NuclearPolyhedrosis Virus* (AcNPV), natürlich vorkommende Pathogene von Insekten der Ordnung *Lepidoptera*, aus dem Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen, Karlsruhe) gearbeitet. Diese wurden gentechnisch derart verändert, dass sie in der Lage sind, artfremde DNA in das Genom von kultivierten Insektenzellen, wie *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni*, zu transferieren. Die virale DNA liegt in diesem Fall in Form eines F-Plasmids (Bacmid; bMON 14272) mit einer Größe von ca. 130 kb vor und kann mittels Transfektion in Insektenzellen eingeschleust werden. Der Einbau der gewünschten cDNA in das Bacmid erfolgt mit Hilfe des Expressionsplasmids pFASTBAC™1. Dieses enthält neben der Expressionskassette eine multiple Klonierungsstelle (MCS) zum Einbau der cDNA unter Kontrolle des für Baculoviren spezifischen Polyhedrin-Promotors (Prom), eine Gentamycin-Resistenz ( $\text{Gen}^R$ ) und ein Simian Virus 40 Poly(A)-Signal (SV 40; Term). *Tn7* Erkennungssequenzen eines prokaryotischen Transposons flankieren die Expressionskassette. Die Expressionskassette des rekombinanten Plasmids kann nun mittels Transformation von *E.coli* DH10Bac-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) in die *lacZ* Region des Bacmids eingebaut werden. Diese Zellen besitzen neben dem Bacmid ein sogenanntes Helferplasmid, welches für die Transposase kodiert und somit den Einbau der Expressionskassette über die *Tn7* Sequenzen ermöglicht. Rekombinante Klone lassen sich also mittels Blau-Weiß Selektion identifizieren.

Die in Bakterienzellen amplifizierte und anschließend isolierten rekombinanten Bacmide werden zur Transfektion von Insektenzellen eingesetzt. Die Zellen produzieren Baculoviren, die amplifiziert und wiederum zur Infektion von Insektenzellen verwendet werden können.

So wird es möglich eine heterologe Expression größerer Mengen von Protein in Suspensionskultur durchzuführen. Das gewünschte Protein kann anschließend aus dem Medium gereinigt werden.

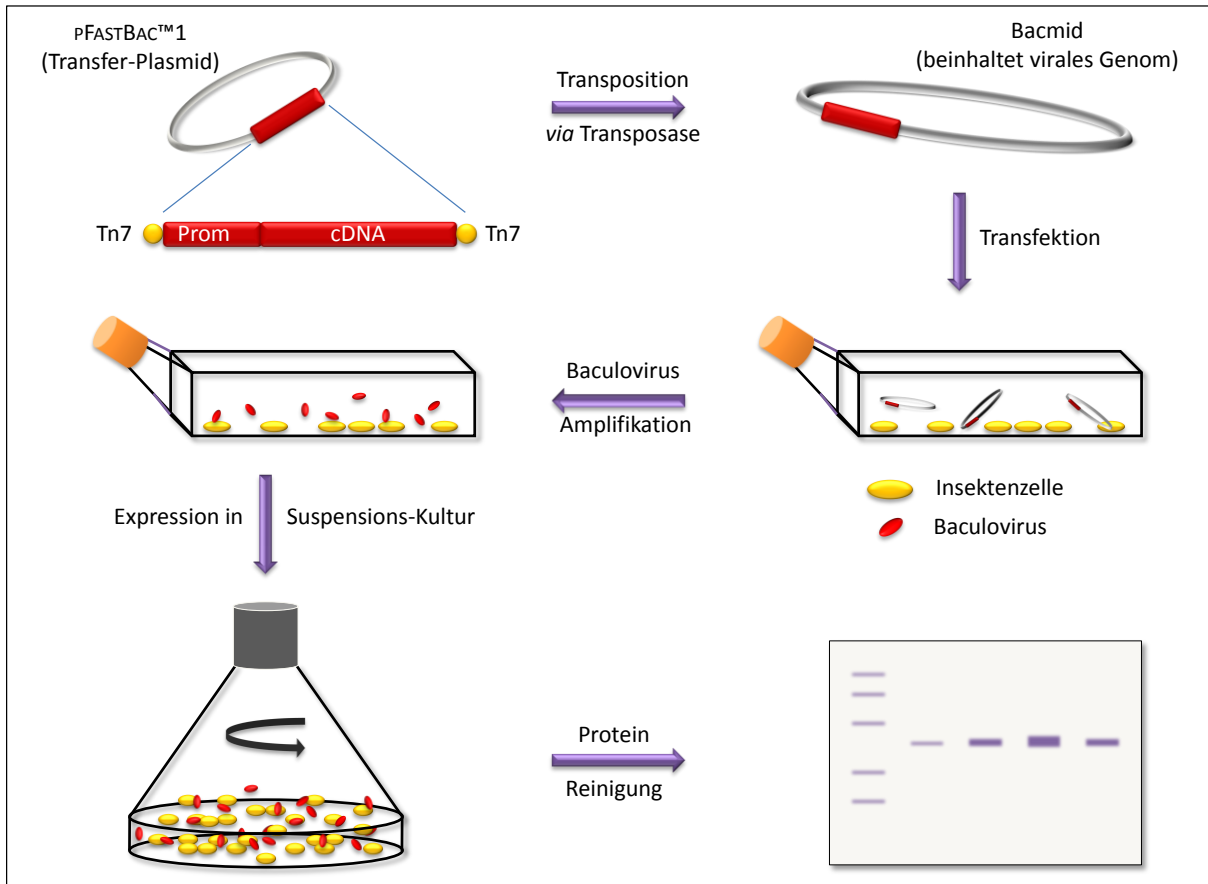


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Baculovirus Expressionssystem basierend auf dem Bac-to-Bac® System (Invitrogen) (Vilcinskas, 2011).

Prom: Polyhedrin Promotor; cDNA: Heterologe DNA des Zielproteins; Tn7: Transposase Erkennungsstelle.

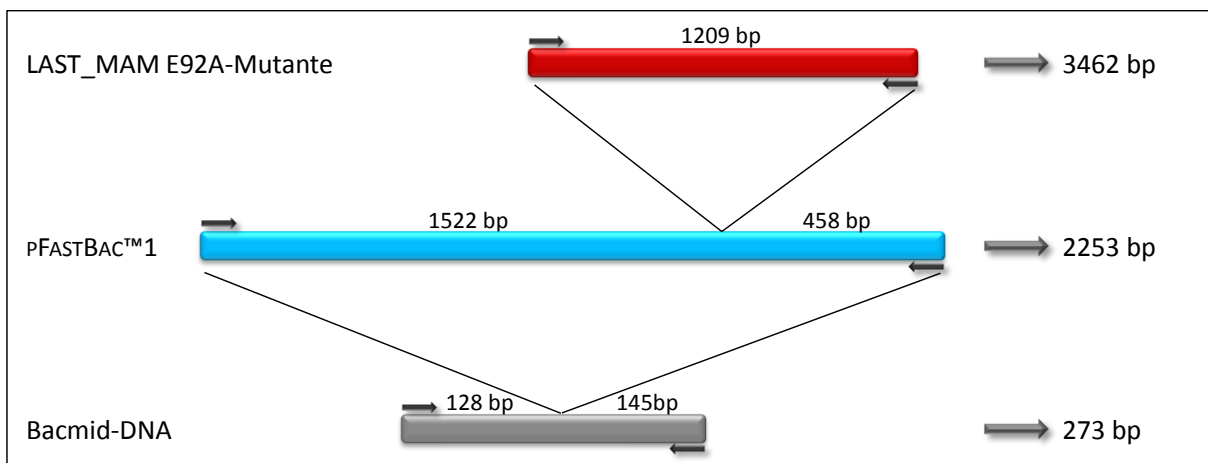
### 3.5.2 Transposition, Isolierung und Überprüfung rekombinanter Bacmide

Die Transposition rekombinanter Bacmide erfolgte in *E. coli* DH10Bac-Zellen. Hierfür wurden 100 µl Hitzeschock-kompetente DH10Bac-Zellen mit 1 ng rekombinantem PFASTBAC™1-Vektor vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Der Ansatz wurde daraufhin für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl SOC-Medium versetzt. Nach einer vier-stündigen Inkubation bei 225 rpm und 37°C wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert (2 min bei 2000 rpm), in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte (10 µg/ml Tetracyclin, 8 µg/ml Gentamycin, 50 µg/ml Kanamycin, 40 µg/ml IPTG, 50 µg/ml X-Gal) ausgestrichen. Die Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert.

Weißer, vermeintlich positive Kolonien, wurden in 8 ml LB-Medium vermehrt. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 225 rpm und 37°C konnten die rekombinanten Bacmide mit Hilfe des Nukleobond® Plasmid Kits (Macherey Nagel) isoliert werden. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers, lediglich die Elution der Plasmid-DNA erfolgte nicht mit dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer, sondern mit 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Der Erfolg der Transposition wurde mittels PCR und Bacmid-spezifischen Primern überprüft. Eine Überprüfung durch Restriktionsanalyse bietet sich hier, aufgrund der Größe der rekombinante Bacmide, nicht an. Die Bacmid-Primer („BacFor“ und „BacRev“) lagern sich am 3'- und 5'-Ende der Tn7-Erkennungssequenzen des Bacmids an. Zwischen den Tn7-Erkennungssequenzen erfolgte der Einbau der Expressionskassette aus dem rekombinanten pFASTBAC™1.

Das gewünschte DNA-Fragment wird amplifiziert und anschließend im 1 %igen Agarosegel sichtbar gemacht. Nicht rekombinante Bacmide liefern ein PCR-Produkt von ca. 300 bp. Die Expressionskassette des Plasmids pFASTBAC™1 ohne Insert liefert ein ca. 2300 bp großes PCR-Produkt. Die Größe der PCR-Fragmente gewünschter transformierter Klone ergibt sich aus der Addition der Fragmentgröße des Inserts und dem Anteil der Expressionskassette aus dem dem pFASTBAC™1 (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der PCR-Analyse rekombinanter Bacmide.**

Dargestellt sind die unterschiedlichen Fragmentgrößen, die nach der Transposition bei der PCR rekombinanter Bacmide entstehen können.

Der graue Balken stellt den Bereich dar, der bei nicht rekombinanten Bacmiden amplifiziert wird. Der blaue Balken stellt die Expressionskassette des pFASTBAC™1 dar und der rote Balken die cDNA Sequenz der LAST-MAM E92A-Mutante. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Bacmidprimer BacFor und BacRev.

Sequenz der Bacmidprimer:

BacFor: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'

BacRev: 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'

Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 3 beschrieben angesetzt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der PCR Ansätze zur Überprüfung rekombinanter Bacmide.**

Reagenzien	Eingesetzte Volumina [ $\mu$ l]
Matrizen-DNA	2
10x Taq-Reaktionspuffer	2,5
Taq-Polymerase	0,5
dNTP-Mix	1
BacFor (10 pmol/ $\mu$ l)	1
BacRev (10 pmol/ $\mu$ l)	1
DEPC-H <sub>2</sub> O	17

**Tabelle 4: PCR-Programm zur Überprüfung rekombinanter Bacmide.**

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2.	Denaturierung	95°C	45 s
3.	<i>Annealing</i>	55°C	30 s
4.	Elongation	72°C	5 min
5.	Terminale Elongation	72°C	10 min

Die Schritte 2-4 wurden 45-mal wiederholt.

Die Bacmidpräparationen rekombinanter Klone wurden bei -80°C gelagert und können im Zuge weiterer Arbeiten zur Transfektion von Insektenzellen eingesetzt werden.

### 3.5.3 Transfektion von Insektenzellen mit rekombinanten Bacmiden

Die Insektenzellkulturen wurden mit den Zelllinien *Sf9* aus *Spodoptera frugiperda* und HighFive® aus *Trichoplusia ni* durchgeführt.

Die Transfektion mit rekombinanten Bacmiden erfolgte in 80% konfluenten *Sf9 Monolayer* Kulturen, mit einer Grundfläche von 25 cm<sup>2</sup> und 5 ml Vollmedium, und dem PAA *Transfection Kit* (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich). 5 µg Bacmid wurden mit der im Kit enthaltenen NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt. Des Weiteren wurden 16 µl Nanofectin mit 234 µl NaCl-Lösung vermischt. Die Nanofectin-NaCl-Lösung wurden daraufhin zu der Bacmid-NaCl-Lösung pipettiert, mehrmals invertiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch tröpfchenweise dem Vollmedium der *Sf9* Zellen zugegeben. Nach 72 h bei 27°C konnte die Virenstammlösung (Primärviren) abgenommen werden. Der Erfolg der Transfektion konnte mittels Western Blot der Zellüberstände überprüft werden.

Alle Medien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen

**Tabelle 5: Medien für die Kultivierung von Insektenzellen.**

Medien	Zusätze
<b>Vollmedium</b> <i>Graces Insect Medium</i> supplementiert)	10% fötales Kälberserum (FCS)
	50 U/ml Penicillin
	50 µg/ml Streptomycin
	4 mM Glutamin
<b>Expressionsmedium</b>	50 U/ml Penicillin
<i>ExpressFive® SFM</i>	50 µg/ml Streptomycin
serumfrei	4 mM Glutamin

### 3.5.4 Virusamplifikation und Expression in HIGHFIVE™ Insektenzellen

Um die Ausbeute der Expression zu steigern wurde zunächst der Virentiter in den *Sf9* Zellen erhöht. Hierfür wurden die Primärviren mehrfach amplifiziert. Zunächst wurde 1 ml Virenstammlösung zu 80% konfluenten *Sf9* Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 4 ml Vollmedium gegeben. Nach 72-stündiger Inkubation bei 27°C konnten die Sekundärviren

abgenommen und durch Zentrifugation (4000 x g, 5 min, 4°C) von den Zellen getrennt werden. Anschließend folgten weitere Amplifikationsschritte in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 4 ml Virenlösung und 21 ml Vollmedium.

Die Proteinexpression erfolgte in 400 ml HighFive™ Suspensionskulturen in Fernbachkolben auf einem Schüttler bei 27°C und 70 rpm. Die Infektion der Insektenzellen erfolgte bei einer Zelldichte von ca. 6x10<sup>5</sup> Zellen/ml mit 25 ml mehrfach amplifizierten Virenlösungen. Nach einer 72 stündigen Expressionsdauer wurden die Zellen abzentrifugiert und das Medium weiter verarbeitet.

### *3.5.5 Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem HIGHFIVE™*

#### *Zellkulturmedium*

Die Reinigung von Meprin α und Meprin β erfolgte wie in Becker et al. (2003) beschrieben und die der beiden *Limulus polyphemus* Astacine, LAST und LAST\_MAM wie in Becker-Pauly et al. (2009) beschrieben (Becker-Pauly et al., 2009; Becker et al., 2003).

Die *kallikrein-related peptidases* wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Viktor Magdolen (Frauen- und Poliklinik der Technischen Universität, München) gereinigt und uns zur Verfügung gestellt (Debela et al., 2006a; Debela et al., 2006b).

Die Expression und Reinigung der E92A-Mutante von LAST\_MAM wurde im Zuge dieser Dissertation erstmals durchgeführt und wird im Folgenden näher erläutert.

### *3.5.6 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse der E92A-Mutante von LAST\_MAM*

Um die im HighFive™ Expressionsmedium enthaltenen Proteine zu fällen, wurde diesem schrittweise Ammoniumsulfat bis zu einer 60%igen Sättigung hinzugefügt und über Nacht bei 8°C gerührt. Das Präzipitat wurde für 2 h bei 9000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend in 1/10 Ausgangsvolumen Dialysepuffer aufgenommen. Um den Ertrag der E92A-Mutante zu erhöhen, wurde der verbleibende Überstand nochmals zentrifugiert (1 h, 9000 x g, 4°C) und das entstandene Pellet im bereits zuvor verwendeten Dialysepuffer aufgenommen.

Um das Ammoniumsulfat aus der Lösung zu entfernen, wurde das gelöste Proteinpellet einer Dialyse unterzogen. Diese erfolgte in einem Visking-Dialyseschlauch (MVCO 12000-16000, Serva, Heidelberg) für 4 h bei 8°C und mehrmaligem Pufferwechsel. Im Anschluss

wurde das Dialysat für 15 min bei 9000 x g und 4°C zentrifugiert, um Proteine, die möglicherweise bei der Dialyse ausgefallen sind, zu entfernen.

### 3.5.7 Reinigung der E92A-Mutante mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung der E92A-Mutante von LAST\_MAM erfolgte mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Dies war möglich, da der Mutante bereits während der Klonierung ein Strep-tag angefügt wurde. Der Strep-tag, ein Peptid aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK), interagiert mit dem Strep-Tactin-Säulenmaterial und ermöglicht so die spezifische Reinigung von *getagten* Proteinen.

Das Dialysat wurde über Nacht bei 4°C mit dem Strep-Tactin-Säulenmaterial inkubiert. Um unerwünschte Proteine aus dem Gemisch zu entfernen wurde das Säulenmaterial solange mit Waschpuffer (ca. 30 ml) gewaschen, bis die Protein-Konzentrationsbestimmung bei 280 nm ( $E_{280}$ ) nahezu null ergab. Daraufhin wurde mit der Elution von LAST\_MAM begonnen. Hierzu wurde Desthiobiotin verwendet, da es eine höhere Affinität zu Streptavidin aufweist als der Strep-tag und diesen somit von der Säule verdrängt. Die Elutionsfraktionen wurden solange gesammelt, bis die Extinktion bei 280 nm ( $E_{280}$ ) wieder bei null lag.

Sowohl Wasch- als auch Elutionsfraktionen wurden in 2 ml Eppendorf Gefäßen gesammelt, photometrisch auf den Proteingehalt ( $E_{280}$ ) überprüft und anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf den Erfolg der Reinigung hin untersucht. Die Detektion von LAST-MAM im Western-Blot erfolgte mit einem spezifischen LAST-MAM Antikörper, hergestellt von der Firma Pineda (Berlin).

**Tabelle 6: Puffer für die Dialyse und die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.**

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

## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da der Großteil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bereits publiziert ist, werden diese im Folgenden kurz zusammengefasst. Noch nicht veröffentlichte Daten werden daraufhin im Detail beschrieben.

### 4.1 PROTEOMICS- UND STRUKTURANALYSEN DER ASTACIN

#### METALLOPROTEASE FAMILIE

Die Astacin Metalloprotease Familie, die im Zuge dieser Arbeit untersucht wurde, umfasst eine große Gruppe von extrazellulären proteolytischen Enzymen in Bakterien und Tieren. Im Menschen sind sechs Vertreter bekannt, darunter Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$  und BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*), die hier analysiert wurden (Bond & Beynon, 1995; Sterchi et al., 1982). Des Weiteren wurden LAST und LAST\_MAM, zwei Proteasen aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (Becker-Pauly et al., 2009) und Astacin aus dem Flusskrebs *Astacus astacus*, der Namensgeber der Familie, untersucht (Stöcker & Zwilling, 1995).

Im Zuge von PICS (*proteomic identification of protease cleavage sites*) und TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) Analysen konnten erstmals die molekularen Spezifitäten einer ganzen Protease Familie ermittelt und somit eine Aussage über die Spaltspezifität getroffen werden (siehe Abbildung 7). Diese Untersuchungen zeigten im Zusammenhang mit 3D Strukturanalysen (siehe Abbildung 8) eine hohe Spezifität dieser Enzyme für die Wahl bestimmter Substrate, mit einer starken Abhängigkeit von den Aminosäureresten der Schnittstellen. Hierbei konnte eine eindeutige Präferenz der Astacine für negativ geladene Aminosäurereste in der P1' Position, vermutlich bedingt durch einen konservierten positiven Rest innerhalb des aktiven Zentrums, beobachtet werden.

Zudem konnte eine starke Präferenz der Enzyme für Prolin in P2' detektiert werden. Bemerkenswert hierbei war, dass alle geschnittenen Peptide mit Prolin in P2' verhältnismäßig weniger negativ geladene Reste in P1' aufwiesen. Umgekehrt zeigten Peptide mit Aspartat oder Glutamat in P1' bedeutsam seltener Prolin in P2'. Diese negative Kooperativität erschien unerwartet, da die Präferenzen für die beiden Reste in P1' und P2' individuell betrachtet sehr hoch waren, und verdeutlicht die Notwendigkeit für weitere

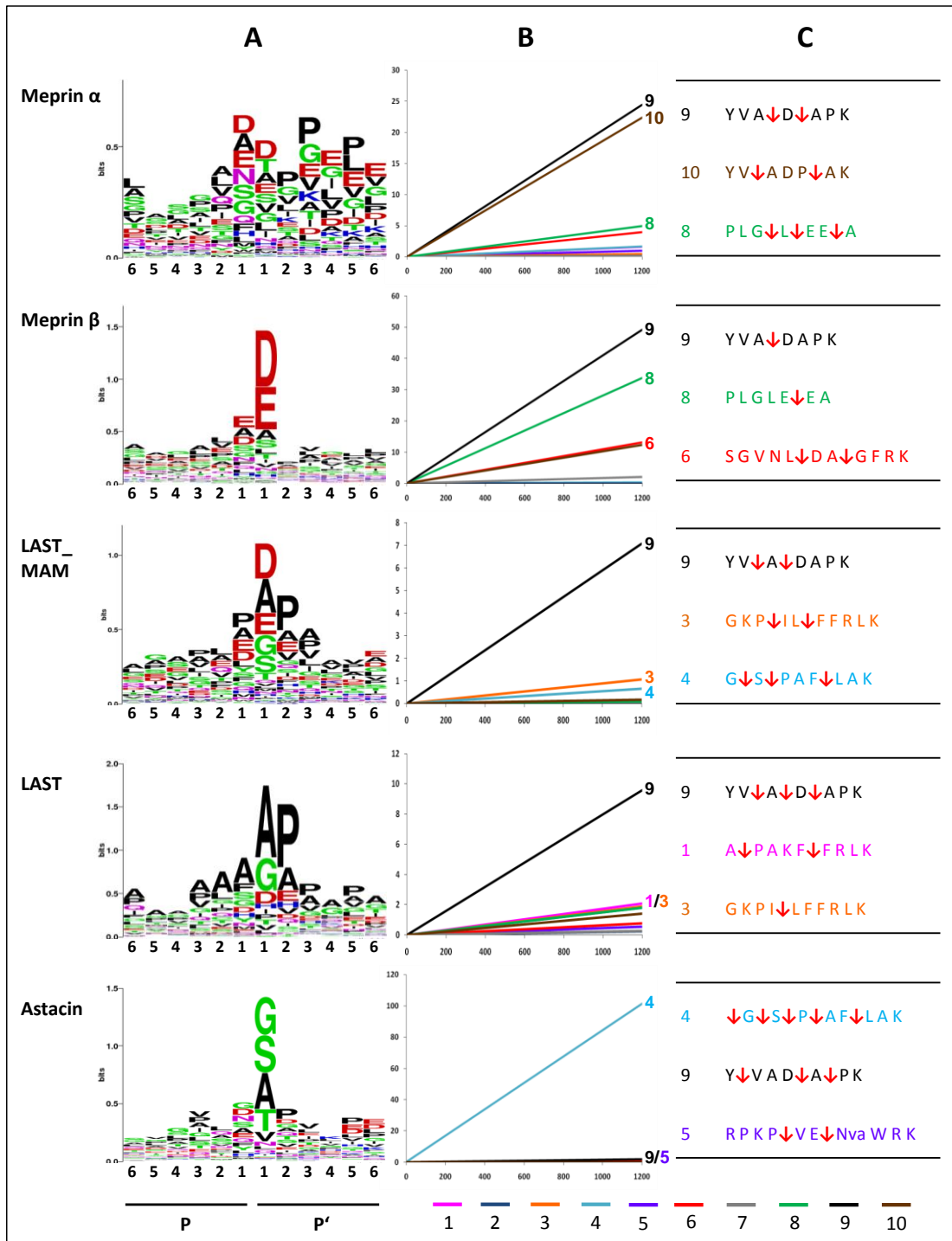
Analysen von unterschiedlichen Peptid-*Libraries*. Obwohl die Präferenz für Prolin in P2' bereits für Astacin beschrieben wurde (Krauchs et al., 1982; Stöcker et al., 1990), zeigen diese Untersuchungen, dass es sich hierbei um ein charakteristisches Merkmal der untersuchten Astacine handelt.

Der Hauptanteil meiner Arbeit an diesem Projekt war es, die Spaltspezifitäten der Astacine und die negative Kooperativität mittels fluorogenen Peptiden zu verifizieren. Dabei wurden 10 Substrate mit vier bis elf unterschiedlichen Aminosäureresten in fluoreszenzspektrometrischen Analysen untersucht (siehe Anhang, 8.6). Um die exakten Schnittstellen zu ermitteln, wurden die Spaltprodukte der drei besten Substrate jedes Enzyms mittels MALDI-TOF analysiert.

Peptid Nr.9 (YVADAPK), konnte als bestes Substrat sowohl für Meprin  $\alpha$  und  $\beta$  als auch für LAST und LAST\_MAM identifiziert werden. Die MALDI-TOF Analyse verifizierte die erwartete Spaltung der Meprine und LAST\_MAM zwischen Alanin und Aspartat. LAST zeigte Spaltungen zwischen Valin und Alanin, Alanin und Aspartat und Aspartat und Alanin. Dies verdeutlicht, dass LAST neben kleinen ungeladenen Resten ebenfalls negativ geladene Aminosäuren in P1 favorisiert.

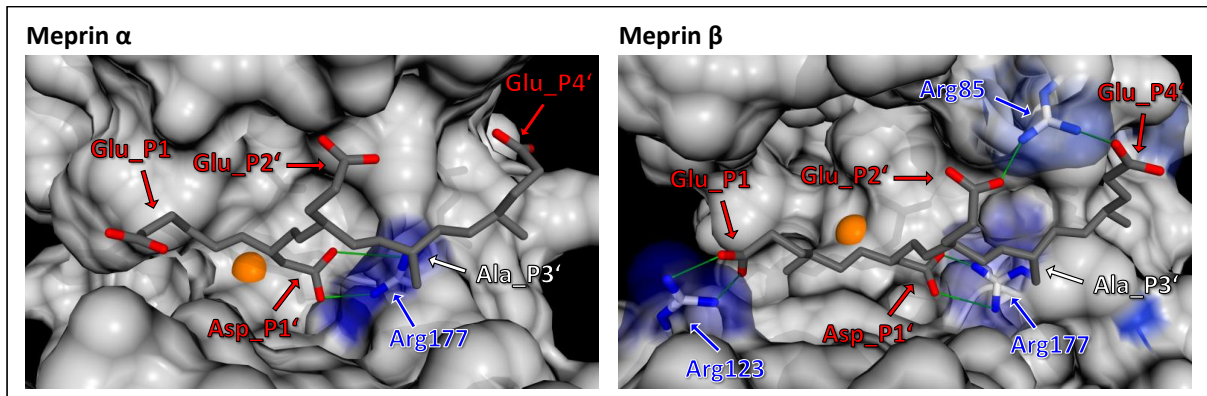
Astacin hingegen zeigte seine höchste Effizienz gegenüber dem Peptid Nr.4 (GSPAFLAK), gefolgt von den Peptiden 9 (YVADAPK), 5 (RPKPVENvaWRK) und 6 (SGVNLDAGFRK). Alle Substrate besitzen mindestens einen kleinen ungeladenen aliphatischen Rest und verifizieren somit die Spaltspezifität dieser Metalloprotease.

Um die negative Kooperativität der Astacine zu untersuchen wurde die Aktivität der Enzyme hinsichtlich des Peptids Nr.10 (YVADPAK) untersucht. Dieses Peptid ist nahezu identisch zu Peptid Nr.9 (YVADAPK), lediglich die Position von Prolin wurde von P3' in P2' getauscht. Wie erwartet wurde Peptid Nr.10 von allen untersuchten Enzymen weniger effizient geschnitten als Peptid Nr.9. Dies bestätigte die aus den PICS Daten hervorgegangene negative Kooperativität für Prolin in S2'.



**Abbildung 6: Validierung der Spaltspezifität der fünf Astacin Metalloproteasen mit Hilfe von fluorogenen Substraten.**

Die linke Seite (A) zeigt das relative Vorkommen der Aminosäuren an den Positionen P1 bis P6' (*WebLogo Style*). Die Höhe der Buchstaben des Ein-Buchstaben Codes für Aminosäuren spiegelt ihre Häufigkeit wider. Saure Aminosäurereste sind rot dargestellt, basische blau, geladene Reste (inklusive Tyrosin und Glycin) grün und hydrophobe Reste (inklusive Alanin und Prolin) schwarz. Um die Spaltspezifitäten zu validieren, wurden fluorogene Substrate (1-10) mit den Metalloproteasen inkubiert. Die relative Menge an Spaltprodukt (Y-Achse) wurde durch die Intensität der Fluoreszenz bei 405 nm berechnet und gegen die Zeit in Sekunden (X-Achse) aufgetragen (B). Die Sequenzen der am besten geschnittenen Substrate sind rechts dargestellt (C). Die Spaltstellen, die durch MALDI-TOF verifiziert werden konnten, sind mit roten Pfeilen markiert. Verändert nach Becker-Pauly et al. (Becker-Pauly et al., in revision).



**Abbildung 7: Homologiemodelle der katalytischen Domäne von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$ .**

Um die eindeutige Spezifität von Meprin  $\beta$  für Aspartat und Glutamat zu verdeutlichen, wurden Homologiemodelle der katalytischen Domänen von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  erstellt. Ein Substrat mit der Sequenz EDEAE wurde in die aktiven Zentren der beiden Proteasen gedockt und zeigt die vielen ionischen Wechselwirkungen des Substrats mit Meprin  $\beta$  im Vergleich zu Meprin  $\alpha$ . Positiv geladene Aminosäuren sind blau dargestellt, negativ geladene rot und das katalytisch essentielle Zinkion durch eine orangene Kugel. Verändert nach Becker-Pauly et al. (Becker-Pauly et al., in revision).

## 4.2 INTERAKTION DER MEPRIN METALLOPROTEASEN UND *KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASES* IM BEZUG AUF EIN PROTEOLYTISCHES NETZWERK IN DER HUMANEN HAUT

In diesem Teil der Arbeit konnten neue Interaktionen zwischen den Meprin Metalloproteasen und den *kallikrein-related peptidases* demonstriert werden, die erste Hinweise auf ein proteolytisches Netzwerk in der Haut aufzeigen (siehe Abbildung 8).

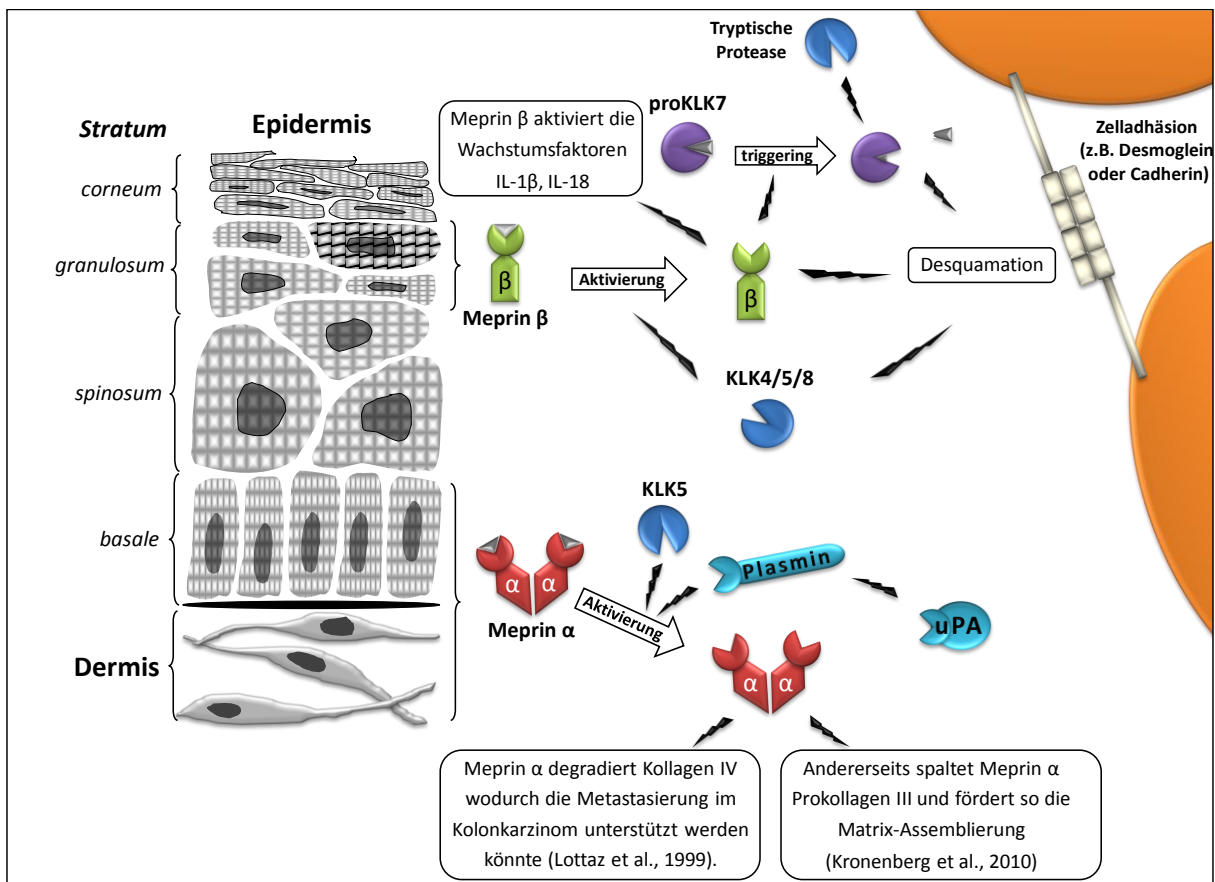
Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  konnten zuvor in unterschiedlichen dermalen Schichten der humanen Haut detektiert werden, was auf spezifische Funktionen beider Proteasen hindeutet. Dies konnte bereits durch Zellkulturversuche an kultivierten Keratinozyten gezeigt werden. Während die Inkubation mit Meprin  $\beta$  zu einer dramatischen Veränderung der Zellmorphologie und zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl führt, übt Meprin  $\alpha$  einen proliferativen Effekt auf die basalen Keratinozyten aus (Becker-Pauly et al., 2007).

Einige Jahre zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass Plasmin in der Lage ist Meprin  $\alpha$ , aber nicht Meprin  $\beta$ , zu aktivieren (Becker et al., 2003). KLK4 hingegen spaltet lediglich das Propeptid von Meprin  $\beta$ , nicht aber das von Meprin  $\alpha$  ab (Becker-Pauly et al., 2007).

Mit Hilfe von Aktivitätstests und Western-Blot Analysen konnten wir die *kallikrein-related peptidases* (KLK) 5 und 8 als spezifische Meprin-Aktivatoren identifizieren, wobei nur KLK5

beide Proteasen aktiviert. KLK8 ist lediglich in der Lage das Propeptid von Meprin  $\beta$  abzuspalten.

Außerdem gelang der Nachweis, dass proKLK7 von Meprin  $\beta$  prozessiert wird. Durch N-terminale Sequenzierung wurde bestätigt, dass Meprin  $\beta$  proKLK7 zwei Aminosäuren N-terminal von der eigentlichen Aktivierungsstelle prozessiert. Dies führt jedoch nicht zur direkten Aktivierung der Protease, interessanterweise aber zu einer beschleunigten Aktivierung durch Trypsin. Trypsin, nicht aber andere tryptische Proteasen wie KLK2, 4, 5, 8, und 11, ist also in der Lage das verbliebene Dipeptid abzuspalten.



**Abbildung 8: Proteolytisches Netzwerk der Meprin Metalloproteasen und der kallikrein-related peptidases.**

Die Abbildung stellt mögliche Kaskaden zwischen Proteasen und potentiellen Substraten in der humanen Haut dar. Meprin  $\alpha$  ist in rot dargestellt, Meprin  $\beta$  in grün. Die Blitze stehen für Proteolyse. Verändert nach Ohler et al. 2010.

### 4.3 MORPHOLINO KNOCKDOWN DER TRANSMEMBRAN SERINPROTEASE TMPRSS4

Die Typ II Transmembran Serinproteasen sind eine erst vor wenigen Jahren identifizierte Enzym Familie. Es handelt sich hierbei um Zelloberflächen-assoziierte Proteine, die sich in weitere Subfamilien, wie beispielsweise die Transmembran Serinprotease Familie, unterteilen lassen. Ein Mitglied dieser Familie ist TMPRSS4 (Transmembran Protease Serin 4), eine Serinprotease, die ursprünglich in Pankreastumoren identifiziert wurde.

Im Menschen konnte TMPRSS4 im Verdauungstrakt, sowie in der Niere und der Blase nachgewiesen werden (Wallrapp et al., 2000). Des Weiteren wird die Protease in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert, was zu einer gesteigerten Invasion, Migration und Metastasierung der Zellen führt (Choi et al., 2008; Kebebew et al., 2005).

In Dickdarm-Krebszellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TMPRSS4 zum Verlust der E-Cadherin Funktion und zur Hochregulierung von Integrin  $\alpha 5$  führt. Dies begünstigt eine epitheliale mesenchymale Transition (EMT), die mit morphologischen Veränderungen und Aktin Reorganisation einhergeht (Jung et al., 2008).

Die molekularen Grundlagen dieser durch TMPRSS4 herbeigeführten Effekte liegen vermutlich in der Regulation von Signaltransduktionskaskaden. Diese Beobachtungen wurden jedoch lediglich unter pathophysiologischen Bedingungen gemacht und lassen sich nicht zwangsläufig auf biologische Ereignisse rückschließen. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung die physiologische Funktion der Protease zu entschlüsseln.

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Reduzierung des Expressionslevels der Transmembran Serinprotease TMPRSS4a durch die Injektion von Morpholinos in Zebrabärbling Embryonen.

Durch RT-PCR Versuche konnten wir zeigen, dass TMPRSS4a bereits fünf Stunden nach der Befruchtung exprimiert wird, was auf eine wichtige Funktion der Protease in den frühen Phasen der Embryonalentwicklung hindeutet.

Durch die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden (MO1) konnten wir die Translation von TMPRSS4a reduzieren und enorme Defekte in der Embryonalentwicklung der Fischembryonen aufzeigen. 50% der injizierten Embryonen zeigten einen stark veränderten Phänotyp mit Störung der Gewebs- und Zelldifferenzierung. Dabei kam es zu erheblichen Deformationen der Skelettmuskulatur, einem stark verlangsamten Herzschlag, sowie einem

degenerierten Vaskularsystem. Die Tiere zeigten einen verlangsamten Blutfluss bis hin zum Stillstand, was zum Tod der Tiere führte.

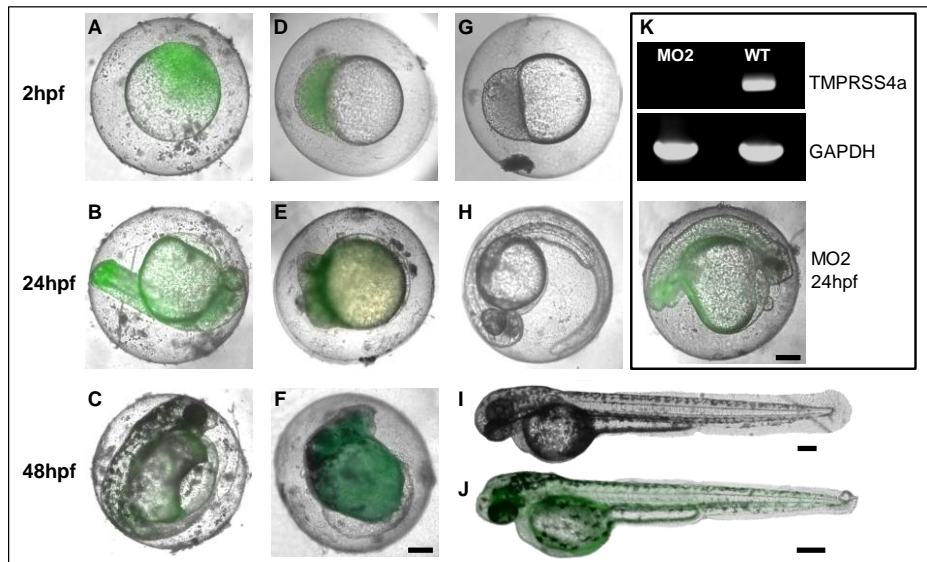
Um die Phänotypen der MO1 injizierten Embryonen zu bestätigen, wurde ein sogenannter *splice-inhibiting* Morpholino verwendet. Dieser blockiert die *splice-site* zwischen Exon 11 und Intron 11 was zu einer inkorrekten Prozessierung der prä-mRNA führt. In der Tat konnten wir vergleichbare Phänotypen mit starken Störungen der Embryonalentwicklung beobachten (siehe Abbildung 9).

Der Einsatz des *splice-inhibiting* Morpholinos bietet die Möglichkeit mittels RT-PCR die Reduzierung des Expressionslevels von TMPRSS4a nachzuweisen. Die RT-PCR Analyse wurde mit isolierter RNA von injizierten Embryonen und Wildtyp-Embryonen durchgeführt und zeigte eine starke Reduktion der korrekt prozessierten mRNA der injizierten Embryonen im Vergleich zu den Wildtyp Tieren (siehe Abbildung 9). Die theoretisch erwartete Bande mit einer geringeren Größe konnte jedoch nicht detektiert werden (siehe Abbildung 2). Dies liegt vermutlich am *nonsense*-vermittelten Abbau der mRNA, ein zellulärer *housekeeping* Mechanismus, der inkorrekt prozessierte Transkripte erkennt und anschließend abbaut (Kowalik & Hudspeth, 2011).

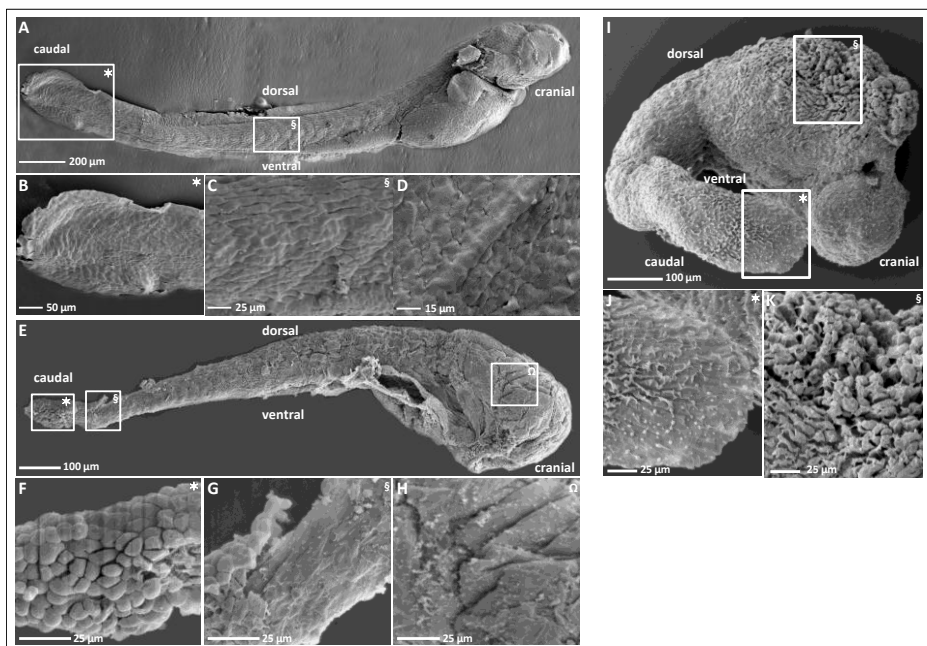
Durch Rasterelektronenmikroskopie der Morpholino injizierten Embryonen konnten wir eine fehlerhafte epidermale Hautdifferenzierung mit deutlich reduzierten Zell-Zell-Kontakten aufzeigen. Dies führte sogar zum Ablösen der Keratinozyten vom darunter liegenden Gewebe (siehe Abbildung 10).

Die Störung der Organogenese im Allgemeinen geht einher mit den Ergebnissen der RT-PCR Untersuchungen, die eine ubiquitäre Expression der Protease lieferten.

Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen die physiologische Funktion von TMPRSS4 zu identifizieren. Diese Ergebnisse verdeutlichen jedoch die wichtige Rolle der Protease in der Gewebs- und Zelldifferenzierung bereits in frühen embryonalen Entwicklungsstadien.



**Abbildung 9: Morpholino knockdown von TMPRSS4a in Zebrafärbaling Embryonen.** Die „Morphanten“, injiziert mit 2 ng (A-C), 4 ng (D-F) MO1 oder MO2 (K), zeigen einen stark veränderten Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp- (G-I) und Kontroll-Embryonen (J). Um die Verbreitung der MOs im Fisch dokumentieren zu können, sind diese mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein markiert. RT-PCR Analysen der TMPRSS4 mRNA von MO2 injizierten Embryonen und Wildtyp-Embryonen zeigen eine starke Reduktion der korrekt prozessierten mRNA (K). GAPDH dient als Kontrolle. Messbalken: 150 µm; hpf: *hours post fertilization*. Verändert nach Ohler and Becker-Pauly (Ohler & Becker-Pauly, accepted).



**Abbildung 10: REM der TMPRSS4a knockdown Embryonen.** Durch die REM werden erhebliche Störungen in der Entwicklung der MO injizierten Embryonen (2 ng MO-Lösung: E-H; 4 ng MO-Lösung: I-K) gegenüber den Wildtyp-Embryonen (A-D, 48hpf) sichtbar. Sie zeigen eine fehlerhafte epidermale Hautdifferenzierung mit deutlich verformten Zell-Zell-Kontakten (F, H, J, K), bis hin zum Ablösen der Keratinozyten vom darunter liegenden Gewebe (G). Die weißen Boxen markieren Bildausschnitte, die in Vergrößerung dargestellt sind (Ohler & Becker-Pauly, accepted).

## 5. WEITERE ERGEBNISSE

### 5.1 HETEROLOGE EXPRESSION DER E92A MUTANTE VON LAST\_MAM FÜR DIE KRISTALLISATION

Trotz jahrelanger Forschung ist es bislang nicht gelungen die dreidimensionale Struktur von Meprin  $\alpha$  und  $\beta$  zu entschlüsseln. Da die Astacin-Metalloprotease LAST\_MAM, wie auch die beiden Meprin Metalloproteasen eine MAM-Domäne besitzen, war ein weiteres Teilprojekt der vorliegenden Arbeit die heterologe Expression von LAST\_MAM für die Kristallisation.

Die Kristallisation wird bei 20°C durchgeführt, umfasst häufig eine große Zeitspanne und erfordert somit eine hohe Stabilität der Proteine. Die Expression einer inaktiven Mutante von LAST\_MAM war unerlässlich, da die Protease bereits als Zymogen aktiv ist (Becker-Pauly et al., 2009).

Bei der Mutagenese der cDNA von LAST\_MAM wurde von einem rekombinanten pFASTBAC™1 Vektor ausgehend mit spezifischen Primern eine Punktmutation durch PCR erzeugt. Dabei wurde das für Glutamat kodierende Codon an der Aminosäure-Position 102 durch ein Alanin-kodierendes Triplet ersetzt. Dies führt zum Verlust eines Zinkliganden im aktiven Zentrum und somit zur Inaktivierung der Protease.

Die Mutagenese und Herstellung des rekombinanten pFASTBAC™1 wurde bereits im Zuge einer Staatsexamensarbeit von Olga Damm 2006 durchgeführt (Damm, 2006).

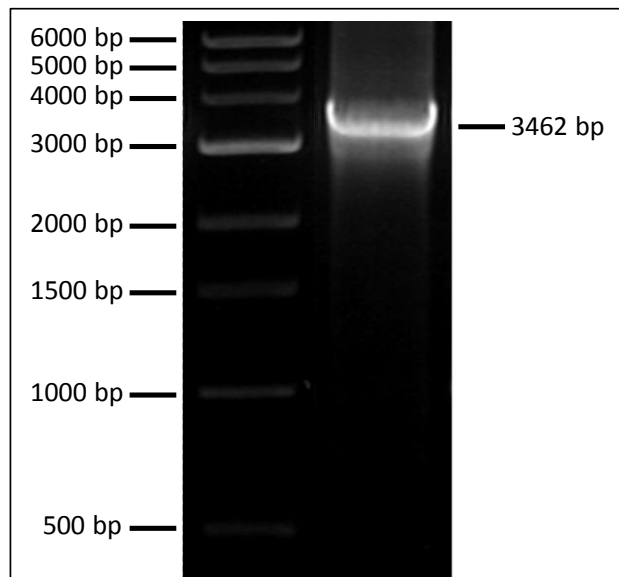
Somit stand der Vektor mit der für die inaktive LAST\_MAM E92A Mutante kodierenden Sequenz und einem angehängten Strep-tag, für die Expression in Insektenzellen zur Verfügung.

### 5.1.1 Transposition der E92A Mutante und Überprüfung rekombinanter Bacmide

Für die heterologe Expression der E92A Mutante musste die Expressionskassette des rekombinanten pFASTBAC™1 Vektors zunächst in das Bacmidgenom transpositioniert und in *E.coli* DH10Bac-Zellen vermehrt werden. Die isolierten rekombinanten Bacmide wurden daraufhin mittels PCR und spezifischen Primern überprüft.

Wie aus Abbildung 11 hervor geht, konnte der Klon der E92A Mutante erfolgreich in das Bacmidgenom transpositioniert werden.

Wie bereits in Abbildung 5 gezeigt wurde, hat die Expressionskassette aus pFASTBAC™1, Bacmid und LAST\_MAM E92A Mutante eine Größe von 3462 bp. Eine entsprechende Bande ist auf dem Agarosegel deutlich sichtbar.



**Abbildung 11: Überprüfung rekombinanter Bacmide mittels PCR.**

1%iges Agarosegel. Linke Spur: 1 kb DNA-Marker. Rechte Spur: Expressionskassette aus pFASTBAC™1, Bacmid und LAST\_MAM E92A Mutante

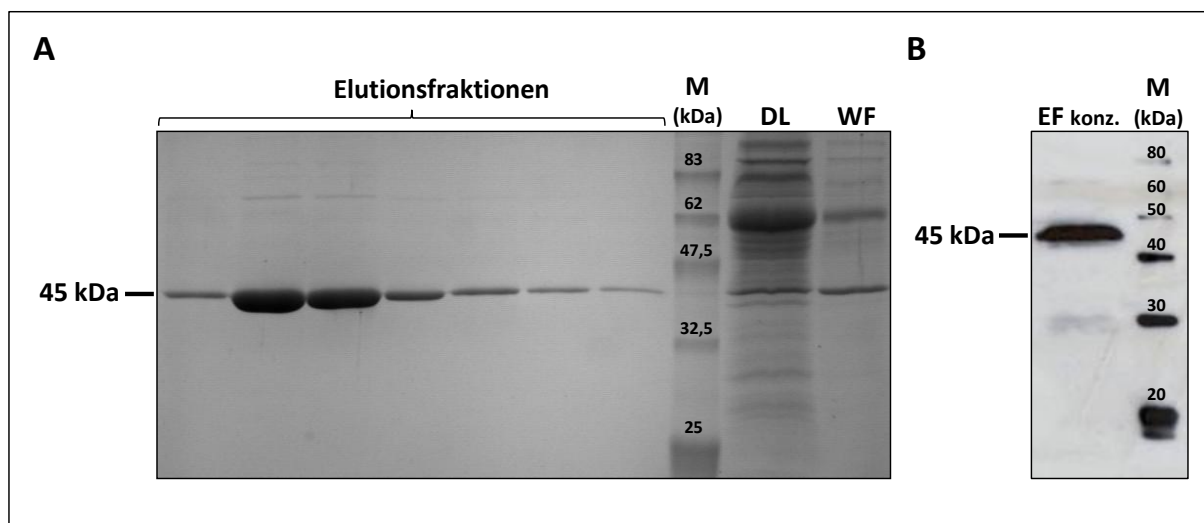
Die rekombinanten Bacmide standen nun für die Transfektion von Insektenzellen zur Verfügung.

### 5.1.2 Transfektion rekombinanter Bacmide und affinitätschromatographische Reinigung der LAST\_MAM E92A Mutante

Nach der erfolgreichen Transfektion der LAST\_MAM E92A Mutante in Sf9-Zellen wurden die Viren mehrfach amplifiziert um einen hohen Virentiter zu erreichen. Die Proteinexpression erfolgte daraufhin mit 5-6fach amplifizierten Viren in Hi5-Zellen.

Nach der Expression wurde die E92A Mutante mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert. Hierbei wurde die Elution in 2 ml Fraktionen gesammelt und der Proteingehalt photometrisch bestimmt. Es konnte eine Ausbeute von ca. 3 mg/l Expressionsvolumen erreicht werden.

Mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurde der Erfolg der Expression überprüft (siehe Abbildung 12). Sowohl auf dem Coomassie gefärbten SDS-Gel, als auch auf dem Western Blot ließ sich die E92A Mutante von LAST\_MAM, mit einer Größe von 45 kDa, nachweisen.



**Abbildung 12: Überprüfung der Expression der E92A Mutante von LAST\_MAM.**

Die Elutionsfraktionen, der Durchlauf (DL) und die Waschfraktion (WF) der Strep-Tactin Säule wurden in einer SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie Färbung detektiert (A). M: *Prestained-Protein-Marker* (NEB); Die Immunodetektion (B) der E92A Mutante von LAST\_MAM erfolgte mit den konzentrierten Elutionsfraktionen (EF konz., 80 ng) und dem LAST\_MAM-AK (1:5000). M: XP Protein-Marker (Invitrogen).

### 5.1.3 Kristallisation der LAST\_MAM E92A Mutante zur Aufklärung der Struktur

Zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Astacin Metalloprotease LAST\_MAM aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*, wird in Kooperation mit Dr. Gomis-Rüth vom *Department of Structural Biology* (Barcelona Science Park, Spanien), die E92A Mutante von LAST\_MAM für die Röntgenkristallstrukturanalyse kristallisiert.

Hierfür wurden bereits etwa 20 mg in Insektenzellen exprimiert und unter verschiedenen Bedingungen kristallisiert.

Abbildung 13 zeigt einen daraus resultierenden Kristall mit einer Auflösung von 3Å. Gegenwärtig wird an einer höheren Auflösung der Kristalle gearbeitet.



**Abbildung 13: Kristall der E92A Mutante von LAST\_MAM.**

Bei der Kristallisation zur Aufklärung der Struktur der E92A Mutante von LAST\_MAM konnte bislang eine Auflösung von 3Å erreicht werden.

## 6. AUSBLICK

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen konnten wichtige Erkenntnisse über die Aktivierung und Spaltspezifität der Meprin Metalloproteasen gewonnen werden. Damit wurden erste Hinweise zur Beteiligung der Proteasen an einem proteolytischen Netzwerk in der humanen Haut aufgezeigt. Mir gelang der Nachweis, dass die Abspaltung der Propeptide von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  durch unterschiedliche *kallikrein-related peptidases* erfolgt, was eine Grundvoraussetzung für eine spezifische Aktivierung der Proteasen *in vivo* ist.

Weitere Studien sollen eine Kollokalisierung der Meprine mit den *kallikrein-related peptidases* im Gewebe aufzeigen. Denn nur so kann es zu einer biologisch relevanten Interaktion der Proteasen kommen.

Im Hinblick auf physiologische, aber auch pathologische Funktionen der Meprine ist es jedoch weiterhin von großem Interesse, einzelne Komponenten proteolytischer Netzwerke zu identifizieren und die Meprine in einem Gesamtkontext darzustellen. Hierbei liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Daten über die Spalt- und Substratspezifität der Proteasen grundlegende Kenntnisse, die für weiterführende Arbeiten unerlässlich sein werden.

Da die *kallikrein-related peptidases* eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Meprine spielen, sollte zudem die Interaktion in dem Modellorganismus *Danio rerio* untersucht werden. Es zeigte sich jedoch, dass im Zebrafisch keine funktionellen KLK-Homologe exprimiert werden, weshalb hier andere tryptische Proteasen an der Aktivierung der Meprine beteiligt sein müssen. Aufgrund dessen wurde die Transmembran-Serinprotease TMPRSS4 (Transmembran Protease Serin 4) analysiert. Durch die Nutzung des Zebrafisch als Tiermodell konnten bedeutende Erkenntnisse über die Funktion der Serinprotease TMPRSS4 in der Embryonalentwicklung der Fische gewonnen werden. Bisher ist es nicht gelungen die biologische Funktion von TMPRSS4 genauer zu charakterisieren. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen jedoch die wichtige Rolle der Protease in der Gewebs- und Zelldifferenzierung bereits in frühen embryonalen Entwicklungsstadien. Es wird offensichtlich, dass TMPRSS4 die Zell-Adhäsion beeinflusst, was zu einer starken Störung der Hautdifferenzierung führt. TMPRSS4 könnte somit eine neue Komponente des proteolytischen Netzwerkes in der Haut darstellen. Unklar bleibt jedoch zunächst, ob die proteolytische Aktivität von TMPRSS4 gegen Adhäsionsmoleküle gerichtet ist, oder aber zur Aktivierung anderer Proteasen, wie z.B. der Meprine führt. Aufgrund dessen ist es

unerlässlich das TMPRSS4-Degradom aus physiologischen Substraten, Inhibitoren und Aktivatoren zu identifizieren und in einem gesamten zellulären Kontext darzustellen. Die heterologe Expression der Protease ist hierbei von großer Bedeutung, denn mit Hilfe neuester *Proteomics* Methoden ist es nun möglich, eine Protease in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Des Weiteren müssen *in vitro* Studien mit dem heterologen Protein hinsichtlich der Aktivierung der Meprine durchgeführt werden. Dies wird helfen unser Wissen über die physiologischen und pathologischen Funktionen von TMPRS4 zu erweitern.

Des Weiteren steht die Aufklärung der Kristallstruktur von LAST\_MAM kurz bevor, da bereits Kristalle mit einer Auflösung von 3Å gezüchtet werden konnten. Liegt die dreidimensionale Struktur der E92A Mutante erst einmal vor, könnte anhand ihrer auch Rückschlüsse auf die Struktur der Meprine gezogen werden, da LAST\_MAM, wie auch Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$ , eine MAM-Domäne besitzt. Darüber hinaus ist es von großem Interesse anhand der Strukturdaten aufzuklären, warum LAST\_MAM das bislang einzig bekannte Astacin ist, das bereits als Zymogen aktiv ist (Becker-Pauly et al., 2009).

Diese Arbeit hat einen großen Beitrag zum strukturellen und funktionellen Verständnis der Meprine und ihrer Interaktionspartner geleistet.

## 7. LITERATUR

AMBORT D, BRELLIER F, BECKER-PAULY C, STÖCKER W, ANDREJEVIC-BLANT S, CHIQUET M & STERCHI EE (2010) Specific processing of tenascin-C by the metalloprotease meprin beta neutralizes its inhibition of cell spreading. *Matrix Biol* 29: 31-42

BANERJEE S & BOND JS (2008) Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J Biol Chem* 283: 31371-31377

BECKER-PAULY C, BARRÉ O, SCHILLING O, AUF DEM KELLER U, OHLER A, SCHÜTTE A, KAPPELHOFF R, STÖCKER W & OVERALL CM (in revision) Global proteomic and structural analysis reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family unique amongst all proteases. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jun 21 [Epub ahead of print]

BECKER-PAULY C, BRUNS BC, DAMM O, SCHÜTTE A, HAMMOUTI K, BURMESTER T & STÖCKER W (2009) News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. *J Mol Biol* 385: 236-248

BECKER-PAULY C, HOWEL M, WALKER T, VLAD A, AUFVENNEN K, OJI V, LOTTAZ D, STERCHI EE, DEBELA M, MAGDOLEN V, TRAUPE H & STÖCKER W (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

BECKER C, KRUSE MN, SLOTTY KA, KÖHLER D, HARRIS JR, RÖSMANN S, STERCHI EE & STÖCKER W (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 384: 825-831

BERGIN DA, GREENE CM, STERCHI EE, KENNA C, GERAGHTY P, BELAAOUAJ A, TAGGART CC, O'NEILL SJ & McELVANEY NG (2008) Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloprotease pathway. *J Biol Chem* 283: 31736-31744

BERTENSHAW GP, TURK BE, HUBBARD SJ, MATTERS GL, BYLANDER JE, CRISMAN JM, CANTLEY LC & BOND JS (2001) Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J Biol Chem* 276: 13248-13255

BEYNON RJ, SHANNON JD & BOND JS (1981) Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J* 199: 591-598

BODE W, GOMIS-RUTH FX & STÖCKLER W (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331: 134-140

BOND JS & BEYNON RJ (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci* 4: 1247-1261

CASON JE (1950) A rapid one-step Mallory-Heidenhain stain for connective tissue. *Stain Technol* 25: 225-226

CHOI SY, SHIN HC, KIM SY & PARK YW (2008) Role of TMPRSS4 during cancer progression. *Drug News Perspect* 21: 417-423

CRISMAN JM, ZHANG B, NORMAN LP & BOND JS (2004) Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J Immunol* 172: 4510-4519

DAMM O (2006) Expression und Charakterisierung von Metalloproteasen der Astacin-Familie aus *Limulus polyphemus*. Staatsexamensarbeit  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Zell- und Matrixbiologie

- DEBELA M, MAGDOLEN V, GRIMMINGER V, SOMMERHOFF C, MESSERSCHMIDT A, HUBER R, FRIEDRICH R, BODE W & GOETTIG P (2006a) Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site. *J Mol Biol* 362: 1094-1107
- DEBELA M, MAGDOLEN V, SCHECHTER N, VALACHOVA M, LOTTSPEICH F, CRAIK CS, CHOE Y, BODE W & GOETTIG P (2006b) Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences. *J Biol Chem* 281: 25678-25688
- ELDERING JA, GRUNBERG J, HAHN D, CROES HJ, FRANSEN JA & STERCHI EE (1997) Polarised expression of human intestinal N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin) alpha and beta subunits in Madin-Darby canine kidney cells. *Eur J Biochem* 247: 920-932
- GOMIS-RÜTH FX (2003) Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol* 24: 157-202
- GORBEA CM, FLANNERY AV & BOND JS (1991) Homo- and heterotetrameric forms of the membrane-bound metalloendopeptidases meprin A and B. *Arch Biochem Biophys* 290: 549-553
- HAHN D, PISCHITZIS A, ROESMANN S, HANSEN MK, LEUENBERGER B, LUGINBUEHL U & STERCHI EE (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease. *J Biol Chem* 278: 42829-42839
- HEDRICH J, LOTTAZ D, MEYER K, YIALLOUROS I, JAHNEN-DECHENT W, STOCKER W & BECKER-PAULY C (2010) Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry* 49: 8599-8607
- HERZOG C, HAUN RS, KAUSHAL V, MAYEUX PR, SHAH SV & KAUSHAL GP (2009) Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 904-908
- JUNG H, LEE KP, PARK SJ, PARK JH, JANG YS, CHOI SY, JUNG JG, JO K, PARK DY, YOON JH, PARK JH, LIM DS, HONG GR, CHOI C, PARK YK, LEE JW, HONG HJ, KIM S & PARK YW (2008) Tmprss4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 27: 2635-2647
- KEBEBEW E, PENG M, REIFF E, DUH QY, CLARK OH & McMILLAN A (2005) ECM1 and Tmprss4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg* 242: 353-361; discussion 361-353
- KENNY AJ & INGRAM J (1987) Proteins of the kidney microvillar membrane. Purification and properties of the phosphoramidon-insensitive endopeptidase ('endopeptidase-2') from rat kidney. *Biochem J* 245: 515-524
- KÖHLER D, KRUSE M, STÖCKER W & STERCHI EE (2000) Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. *FEBS Lett* 465: 2-7
- KOWALIK L & HUDSPETH AJ (2011) A search for factors specifying tonotopy implicates DNER in hair-cell development in the chick's cochlea. *Dev Biol*
- KRAUHS E, DORSAM H, LITTLE M, ZWILLING R & PONSTINGL H (1982) A protease from *Astacus fluviatilis* as an aid in protein sequencing. *Anal Biochem* 119: 153-157
- KRONENBERG D, BRUNS BC, MOALI C, VADON-LE GOFF S, STERCHI EE, TRAUPE H, BOHM M, HULMES DJ, STÖCKER W & BECKER-PAULY C (2010) Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol* 130: 2727-2735

- KRÜGER A (2009) Functional genetic mouse models: promising tools for investigation of the proteolytic internet. *Biol Chem* 390: 91-97
- KRUSE M-N, BECKER C, LOTTAZ D, KÖHLER D, YIALLOUROUOS I, KRELL H-W, STERCHI EE & STÖCKER W (2004) Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J* 378: 383-389
- KUMAR JM & BOND JS (2001) Developmental expression of meprin metalloprotease subunits in ICR and C3H/He mouse kidney and intestine in the embryo, postnatally and after weaning. *Biochim Biophys Acta* 1518: 106-114
- LOTTAZ D, MAURER CA, HAHN D, BUCHLER MW & STERCHI EE (1999) Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res* 59: 1127-1133
- MARCHAND P, TANG J, JOHNSON GD & BOND JS (1995) COOH-terminal proteolytic processing of secreted and membrane forms of the alpha subunit of the metalloprotease meprin A. Requirement of the I domain for processing in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 5449-5456
- MORCOS PA (2007) Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 521-527
- MOULTON JD & YAN YL (2008) Using Morpholinos to control gene expression. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 26: Unit 26 28
- NASEVICIUS A & EKKER SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26: 216-220
- OHLE A & BECKER-PAULY C (accepted) Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion. *Biol Chem* 392: 653-664
- OHLE A, DEBELA M, WAGNER S, MAGDOLEN V & BECKER-PAULY C (2010) Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem* 391: 455-460
- OVERALL CM & KLEIFELD O (2006) Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 227-239
- PUENTE XS, SANCHEZ LM, GUTIERREZ-FERNANDEZ A, VELASCO G & LOPEZ-OTIN C (2005) A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* 33: 331-334
- RÖSMANN S, HAHN D, LOTTAZ D, KRUSE M-N, STÖCKER W & STERCHI EE (2002) Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J Biol Chem* 277: 40650-40658
- SCHÜTTE A, HEDRICH J, STÖCKER W & BECKER-PAULY C (2010) Let it flow: Morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin alpha2. *PLoS One* 5: e8835
- SCHÜTTE A, LOTTAZ D, STERCHI EE, 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
- SKIDGEL RA (1992) Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 9: S4-9

STERCHI EE, GREEN JR & LENTZE MJ (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 EE, STÖCKER W & BOND JS (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: 309-328

STÖCKER W, GRAMS F, BAUMANN U, REINEMER P, GOMIS-RUTH FX, MCKAY DB & 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

STÖCKER W, NG M & AULD DS (1990) Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of Astacus protease. *Biochemistry* 29: 10418-10425

STÖCKER W & ZWILLING R (1995) Astacin. *Methods Enzymol* 248: 305-325

VILCINSKAS A (2011) *Insect Biotechnology*, 1 edn.: Springer Publishing.

WALLRAPP C, HÄHNEL S, MÜLLER-PILLASCH F, BURGHARDT B, IWAMURA T, RUTHENBÜRGER M, LERCH MM, ADLER G & GRESS TM (2000) A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Res* 60: 2602-2606

WANG Z, HERZOG C, KAUSHAL GP, GOKDEN N & MAYEUX PR (2011) Actinonin, a meprin A inhibitor, protects the renal microcirculation during sepsis. *Shock* 35: 141-147

WARREN WCHILLIER LWMARSHALL GRAVES JABIRNEY EPONTING CPGRUTZNER FBELOV KMILLER WCLARKE LCHINWALLA ATYANG SPHEGER ALOCKE DPMIETHKE PWATERS PDVEYRUNES FFULTON LFULTON BGRAVES TWALLIS JPUENTE XSLOPEZ-OTIN CORDONEZ GREICHLER EECHEN LCHENG ZDEAKIN JEALSOP ATHOMPSON Kkirby PPAPENFUSS ATWAKEFIELD MJOLENDER TLANCET DHUTTLEY GASMIT AFPASK ATEMPLE-SMITH PBATZER MAWALKER JAKONKEL MKHARRIS RSWHITTINGTON CMWONG ESGEMMELL NJBUSCHIAZZO EVARGAS JENTZSCH IMMERKEL ASCHMITZ JZEMANN ACHURAKOV GKRIEGS JOBROSIUS JMURCHISON EPSACHIDANANDAM RSMITH CHANNON GJTSEND-AYUSH EMC MILLAN DATTENBOROUGH RRENS WFERGUSON-SMITH MLEFEVRE CM SHARP JANICHOLAS KRRAY DAKUBE MREINHARDT RPRINGLE TH TAYLOR JJONES RCNIXON BDACHEUX JLNiWA HSEKITA YHUANG XSTARK AKHERADPOUR PKELLIS MFLICEK PCHEN YWEBBER CHARDISON RNELSON JHALLSWORTH-PEPIN KDELEHAUNTY KMARKOVIC CMINX PFENG YKREMITZKI CMITREVA MGLASSCOCK JWYLIE TWHOHLDMANN PTHIRU PNHAN MNPOHL CSSMITH SMHOU SNEFEDOV MDE JONG PJRENFREE MBMARDIS ER & WILSON RK (2008) Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453: 175-183

WESTERFIELD M (1995) *The zebrafish book- A guide for laboratory use of zebrafish (Danio rerio).Ed.3*, Eugene.OR: M. Westerfield.

YAMAGUCHI T, KIDO H & 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

YIALLOUROS I, GROSSE BERKHOFF E & STÖCKER W (2000) The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases. *FEBS Lett* 484: 224-228

## 8. ANHANG

### 8.1 VERÖFFENTLICHUNG 1: PROTEOMICS- UND STRUKTURANALYSEN DER ASTACIN METALLOPROTEASE FAMILIE

BECKER-PAULY C., BARRÉ O., SCHILLING O., AUF DEM KELLER U., OHLER A., BRODER C., SCHÜTTE A., KAPPELHOFF R., STÖCKER W., OVERALL C.M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates.

*Mol Cell Proteomics*. 2011 Jun 21 [Epub ahead of print]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693781>

## 8.2 VERÖFFENTLICHUNG 2: ANALYSE DES PROTEOLYTISCHEN NETZWERKES IN DER HUMANEN HAUT

OHLE A., DEBELA M., WAGNER S., MAGDOLEN V., BECKER-PAULY C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation.

*Biol Chem.* **391**, 455-460.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128684>

### 8.3 VERÖFFENTLICHUNG 3: MORPHOLINO KNOCKDOWN DER TRANSMEMBRAN SERINPROTEASE TMPRSS4

OHLEA. A. AND BECKER-PAULY C. (2011) Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion.

*Biol Chem.* **392**, 653-664.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21657981>

## 8.4 ABKÜRZUNGEN

BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EtOH	Ethanol
hpf	<i>hours post fertilization</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
KLK	<i>kallikrein-related peptidases</i>
LAST	<i>Limulus Astacin</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MAM	<i>meprin A5 protein, receptor tyrosine phosphatase <math>\mu</math></i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MO	Morpholino
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PABA	N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoessäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SOC	<i>salt-optimized broth</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMPRSS	Transmembran Protease Serin
TTSP	Typ II Transmembran Serinproteasen
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-I-D-galactosid

## 8.5 EIN-UND DREI-BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN

Tabelle 7: Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren

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

## 8.6 TABELLE DER FLUOROGENEN PEPTID-SUBSTRATE

Tabelle 8: Fluorogene Peptid-Substrate für die Daten-Validierung

No.	Substrate
1	Mca-Ala-Pro-Ala-Lys-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-NH <sub>2</sub> A - P - A - K - F - F - R - L - K
2	Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH <sub>2</sub> R - P - K - P - V - E - Nva - W - R - K
3	Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH <sub>2</sub> G - K - P - I - L - F - F - R - L - K
4	Mca-Gly-Ser-Pro-Ala-Phe-Leu-Ala-Lys(Dnp)-D-Arg-NH <sub>2</sub> G - S - P - A - F - L - A - K
5	Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH <sub>2</sub> P - L - G - L
6	Mca-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Arg-Arg-NH <sub>2</sub> S - G - V - N - L - D - A - G - F - R - K
7	Mca-Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH <sub>2</sub> D - E - V - D - A - P - K
8	Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Glu-Glu-Ala-Dap(Dnp)-NH <sub>2</sub> P - L - G - L - E - E - A
9	Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH <sub>2</sub> Y - V - A - D - A - P - K
10	Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Ala-Lys(Dnp)-NH <sub>2</sub> Y - V - A - D - P - A - K

## CURRICULUM VITAE

# Curriculum vitae

---

## DANKSAGUNG

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Mainz, den

---

(Anke Ohler)