

**Regulation der Aktivität von Ovastacin, einer Protease
aus den cortikalen Granula der Säugereizelle**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

KONSTANTIN KARMILIN

Geboren am 18.09.1984 in Orsk (Russische Föderation)

Mainz, den 19.09.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2016

„Nicht den Tod sollte man fürchten, sondern dass man nie beginnen wird, zu leben.“

MARCUS AURELIUS

Zusammenfassung

Ovastacin ist eine Astacin-Metalloproteinase, die in den cortikalen Granula der Säugeroozyte lokalisiert ist. Während der Fertilisation, nach der erfolgten Verschmelzung des Spermiumkopfes mit dem Oolemma, wird Ovastacin in den perivitellinen Raum exozytiert. Es greift dabei das Zona pellucida Protein 2 (ZP2) enzymatisch an. Durch die Spaltung von ZP2 an einer konservierten Stelle wird die gesamte Struktur der Zona pellucida verändert. Sie härtet aus, wodurch das Vordringen weiterer Spermien zur Oozyte verhindert wird. Dies wird gegenwärtig als Grundlage für den endgültigen Polyspermieblock angesehen. Die negative Regulation der katalytischen Aktivität des Ovastacins während der Oozytenreifung und somit die Verhinderung der vorzeitigen Aushärtung der Zona pellucida wird durch das Plasmaprotein Fetuin-B gewährleistet. Fetuin-B gehört zu den Typ-3 Cystatinen. Das ausbalancierte Zusammenspiel von Ovastacin und Fetuin-B ist für das Entstehen des neuen Lebens eines der Schlüsselereignisse.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Regulation des Ovastacins, von seiner proteolytischen Aktivierung bis hin zu seiner Inhibition durch Fetuin-B. Es gelang, mit der Serinproteinase Plasmin einen *in vitro* Aktivator für das Pro-Ovastacin zu finden, der auch *in vivo* relevant sein könnte. Ein effizientes Aktivierungsprotokoll wurde erarbeitet. Mit Hilfe eines synthetischen fluorogenen Substrates und zahlreichen biochemischen Methoden erfolgte die weitgehende Charakterisierung des aktiven Ovastacins. Das Molekulargewicht und der Aminoterminus des reifen Ovastacins (ca. 28 kDa, LLSV), sein pH-Aktivitätsoptimum (pH 8,2) und die Zusammensetzung des geeigneten Arbeitspuffers wurden bestimmt. Es wurde gezeigt, dass Fetuin-B und nicht sein Paralogon Fetuin-A als endogener Hemmstoff von Ovastacin fungiert. Für die Inhibition des Ovastacins durch Fetuin-B wurde eine IC_{50} von 18 nM bestimmt. Experimente mit zahlreichen Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen legen nahe, dass Fetuin-B ausschließlich Astacin-Metalloproteinasen hemmt. Fetuin-A erwies sich gegenüber den getesteten Proteasen im Gegensatz dazu als nicht inhibitorisch aktiv. *In silico* Untersuchungen von Fetuin-B mit dem Ziel, die inhibitorisch aktive Einheit des Proteins zu identifizieren, wiesen auf eine besondere Rolle der ersten Haarnadelstruktur innerhalb der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne hervor. Der Austausch dieser Sequenz gegen die entsprechende Region aus der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne änderte jedoch nichts an der Hemmfunktion. Auch der Austausch der Cystatin-ähnlichen Domänen zwischen Fetuin-B und Fetuin-A bestätigte lediglich die Tatsache, dass nur komplettes Fetuin-B ein effizienter Hemmstoff für viele Astacinproteinasen ist.

Abstract

Ovastacin is an astacin metalloproteinase localized in cortical granules within the mammalian oocyte. During fertilization, after the successful invasion of the spermatozoon into the oocyte, ovastacin is released into the perivitelline space. There it cleaves the *zona pellucida* protein 2 (ZP2) enzymatically. By cleavage of ZP2 at a conserved site, the conformation of the *zona pellucida* changes. It hardens to prevent the docking of further sperm to the oocyte. This is presently considered to be the basis for the final block of polyspermy. The negative regulation of the catalytic activity of ovastacin during oocyte maturation and so the prevention of premature hardening of the *zona pellucida* is ensured by the plasma protein fetuin-B. Fetuin-B is type-3 cystatin. The balanced interplay of ovastacin and fetuin-B is one of the key events for the emergence of new life.

The aim of this study was to elucidate the regulation of ovastacin, from its proteolytically activation to its inhibition by fetuin-B. The serine proteinase plasmin was shown to act as an *in vitro* activator of pro-ovastacin, which might be also relevant *in vivo*. An efficient activation protocol was developed. Using of a synthetic fluorogenic substrate and numerous biochemical methods allowed the extensive characterization of the active ovastacin. The molecular weight (28 kDa), the amino terminus of the mature ovastacin (LLSV), its activity pH-optimum (pH 8.2) and the composition of an appropriate working buffer were determined. It was shown that fetuin-B and not its paralogon fetuin-A acts as an endogenous inhibitor of ovastacin. For the inhibition of ovastacin by fetuin-B an IC_{50} of 18 nM was determined. Experiments with several serine-, cysteine-, aspartic- and metalloproteinases suggest that fetuin-B inhibits only astacin metalloproteinases. In contrast, fetuin-A does not show against the tested proteases inhibitory activity. *In silico* analysis of fetuin-B with the aim to identify the inhibitorily active unit of the protein, suggested a special role of the first hairpin-loop structure within the second cystatin-like domain. However, the exchange of this sequence for the corresponding region of the first cystatin-like domain did not alter the inhibitory function. The reshuffling of the cystatin-like domains between fetuin-A and fetuin B confirmed the fact that only complete fetuin-B is an efficient inhibitor for astacin proteinases.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis.....	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Leben	1
1.2 Fertilisation von Säugeroocyten	1
1.2.1 Biologie der Oocyte.....	1
1.2.2. Polyspermieblock, ein Schutzmechanismus für das neu entstehende Leben.....	2
1.2.3. Ovastacin, ein Schlüsselenzym aus cortikalen Granula.....	3
1.2.4. Regulation der <i>Zona pellucida</i> Aushärtung.....	4
1.3. Säuger-Fetuine sind Multifunktionsproteine	5
1.4 Cystatine	6
1.5 Ein Netzwerk von Proteasen und Inhibitoren reguliert die Fertilisation.....	9
1.6 Proteasen.....	10
1.6.1 Cysteinproteasen	11
1.6.2 Serinproteasen	12
1.6.3 Aspartatproteasen	13
1.6.4 Metalloproteasen	14
1.7 Ziele der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Geräte und Chemikalien	19
2.2 DNA-Konstrukte für die heterologe Proteinexpression.....	20
2.2.1 Hitzeschocktransformation.....	21
2.2.2 Kontrolle erfolgreicher Transformation und Transposition.....	22
2.2.3 Übernachtkulturen von <i>E. coli</i> DH10Bac im Flüssigmedium	23
2.2.4 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Bacmid-DNA.....	23
2.2.5 Kontrolle der Bacmid-DNA mittels PCR und Agarosegel-Elektrophorese.....	24
2.3 Baculovirus-Expressionssystem	27
2.4 Insektenzellkultur	27
2.4.1. Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zelllinie.....	28

2.4.2	Transfektion von <i>Sf9</i> -Zellen mit Bacmid-DNA	28
2.4.3	Ernte der Primärviren und ihre Amplifikation.....	29
2.4.4.	Analyse der Virussuspensionen auf ihre Infektiosität	29
2.4.5	Kultivierung der <i>High Five</i> -Zelllinie.....	30
2.5	Proteinreinigung	31
2.5.1	Affinitätschromatographie an einer Strep-Tactin Säule	32
2.5.2	Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA Säule.....	32
2.6	Proteinbiochemie	33
2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels UV-Vis-Spektroskopie.....	33
2.6.2	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen durch Zentrifugation.....	34
2.6.3	Konzentrierung von Proteinproben durch Fällung mit Natrium-Desoxycholat und Trichloressigsäure	34
2.6.4	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.6.5	Färbung der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau	36
2.6.6	Substrat-Zymographie	36
2.6.7	Western-Blot	37
2.6.8	Ponceau-Rot Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran.....	37
2.6.9	Immunologischer Nachweis mittels Chemilumineszenz.....	38
2.7	Enzymkinetische Analysen.....	40
2.7.1	Substrate, Enzyme	40
2.7.2	Reaktionsbedingungen	41
2.7.3	Proteolytische Aktivierung von Pro-Ovastacin-FL-Strep.....	42
2.7.4	Stabilität von aktiviertem Ovastacin-FL-Strep.....	43
2.7.5	pH-Abhängigkeit von aktiviertem Ovastacin-FL-Strep	44
2.7.6	Abhängigkeit der Ovastacinaktivität von Metallionen und Detergenzien	44
2.7.7	Bestimmung der kinetischen Parameter von Ovastacin	44
2.7.8	Prozessierung von Fetuin-B und Fetuin-A durch proteolytische Enzyme.....	45
2.7.9	Inhibitionsassays	45
2.8	Bioinformatische Analyse der Fetuine.....	49
3.	Ergebnisse	51
3.1	Expression und Reinigung rekombinanten Ovastacins.....	51
3.2	Aktivierung von Ovastacin-FL-Strep	51
3.2.1	Optimierung des Aktivierungsprozesses von Pro-Ovastacin mit Plasmin.....	53

3.2.2 Bestimmung des reifen N-Terminus und massenspektrometrische Analyse des durch Plasmin aktivierten Pro-Ovastacins	54
3.2.3 Nachweis proteolytischer Aktivität von Ovastacin mittels Substrat-Zymographie	55
3.2.4 Charakterisierung von aktivem Ovastacin	56
3.2.5 Bestimmung der effektiven Konzentration katalytisch aktiven Ovastacins	58
3.2.6 Kinetische Parameter des Ovastacins	58
3.3 Entdeckung von Fetuin-B als potenten Inhibitor von Astacinproteinasen	58
3.3.1 Einfluss von Fetuin-A auf die Interaktion zwischen Fetuin-B und Astacinen	59
3.3.2 Wirkung von Fetuin-A auf Astacine	61
3.4 Kinetische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Fetuin-A bzw. Fetuin-B und proteolytischen Enzymen	63
3.4.1 Fetuine sind keine Inhibitoren von ADAMs und MMPs	63
3.4.2 Fetuine sind keine Inhibitoren von Cystein- und Aspartatproteinasen	63
3.4.3 Fetuine sind keine Inhibitoren von Serinproteinasen	63
3.5 Prozessierung von Fetuin-A und Fetuin-B	64
3.6 Bioinformatische Analyse von Fetuin-A und Fetuin-B	66
3.7 Herstellung von Fetuin-A, Fetuin-B und seinen mutierten Varianten in Insektenzellen	69
3.7.1 Transposition von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 in Bacmide	70
3.7.2 Transfektion von <i>Sf9</i> -Insektenzellen und Virusamplifikation	71
3.7.3 Expression und Reinigung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1	72
3.8 Funktionalitätsüberprüfung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1	74
3.9 Funktionalitätsüberprüfung von Fetuinchimären ABA, AAB und BAA	75
4. Diskussion	77
4.1 Herstellung von Ovastacin-FL-Strep	77
4.2 Aktivierung von Ovastacin-FL-Strep	78
4.3 Untersuchung der Eigenschaften von aktivem Ovastacin	80
4.3.1 Physikalische Eigenschaften	80
4.3.2 Temperatur- und pH-Optima des aktiven Ovastacins	81
4.3.3 Einfluss von Salzen und Detergenzien auf die Ovastacin-Aktivität	82
4.3.4 K_m -Bestimmung	84
4.4 Inhibition von Ovastacin durch Fetuin-B	84
4.5 Fetuin-B ist ein spezifischer Inhibitor der Astacinproteasen	85

4.6 Einfluss von Fetuin-A auf Astacine	87
4.7 Fetuine und Proteinase anderer Klassen	88
4.8 Bioinformatische Analyse von Fetuin-A und Fetuin-B	89
4.9 Herstellung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1	90
4.10 Analyse der Wirkung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 auf Ovastacin	90
4.11 Analyse der Wirkung von Fetuinchimären auf Ovastacin	91
4.12 Bedeutung der Arbeit für die aktuelle Forschung und Ausblick	91
Literaturverzeichnis	93
Anhang	109
Abkürzungsverzeichnis	109
DNA- und Proteinsequenzen, Plasmidkarten	112
Zusätzliche Daten	117
Hersteller und Produzenten	120
Curriculum Vitae	123
Danksagung	124
Eidesstattliche Erklärung	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> DH10Bac.....	22
Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifikation der Expressionskassette der Bacmid-DNA.....	25
Tabelle 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Bacmid-PCR	25
Tabelle 4: Zusammensetzung der Komponenten für die Agarosegel-Elektrophorese	25
Tabelle 5: Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung von Insektenzellen	31
Tabelle 6: Verwendete Arbeitspuffer für exprimierte Proteine.....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung bei der SDS-PAGE verwendeten Gebrauchslösungen	35
Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	35
Tabelle 9: Zusammensetzung der bei Coomassie Brilliant Blau nach Kang verwendeten Lösungen.....	36
Tabelle 10: Im Western-Blot-Verfahren eingesetzte Reagenzien und Materialien.....	37
Tabelle 11: Zusammensetzung der in Substrat-Zymographie verwendeten Reagenzien	38
Tabelle 12: Beim immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz verwendete Reagenzien.....	39
Tabelle 13: Beim immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz verwendete Antikörper.....	39
Tabelle 14: In der Arbeit verwendete Enzyme und Substrate	40
Tabelle 15: Zusammensetzung von eingesetztem Davies-Puffer bei der Bestimmung des pH-Optimums	44
Tabelle 16: pH-Werte der Reaktionsansätze für die Bestimmung des pH-Optimums von Ovastacin	44
Tabelle 17: Inhibitionskonstanten der Reaktionen zwischen Astacin-Proteinasen und Fetuin-B	61
Tabelle 18 Analyse der Virussuspensionen nach der Amplifikationsstufe fünf.....	72
Tabelle A1: Für die Inhibitionsassays verwendete Puffer.....	119
Tabelle A2: Liste der Hersteller mit Anschriften	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Status der <i>Zona pellucida</i> und der Oocyte in Wildtyp-Mäusen, sowie in Fetuin-B und Ovastacin defizienten Mäusen vor und nach der Befruchtung.....	5
Abbildung 2: Bändermodell der Kristallstruktur von Cystatin C.....	7
Abbildung 3: Domänenaufbau einiger Cystatine	9
Abbildung 4: Verteilung der menschlichen Proteasen nach Clanzugehörigkeit und Wirkungsort	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Teilschritte des Baculovirus-Expressionssystems	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufes während der kinetischen Untersuchungen.....	42
Abbildung 7: Reinigung von Ovastacin-FL-Strep	52
Abbildung 8: Prozessierung von Pro-Ovastacin-FL-Strep durch Trypsin, Plasmin, tPA und MMP-2	53
Abbildung 9: Nachweis der Ovastacin-Aktivität	53
Abbildung 10: Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Aktivierung von Pro-Ovastacin.....	54
Abbildung 11: Präparation von Plasmin aktiviertem Ovastacin für die N-terminale Sequenzierung	55
Abbildung 12: Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung und massenspektrometrischen Analyse der 28 kDa- bzw. 31 kDa-Ovastacinbanden.....	55
Abbildung 13: Casein-Zymographie zur Demonstration der Ovastacin-Aktivität.....	56
Abbildung 14: Bestimmung der Arbeitsbedingungen für Ovastacin	57
Abbildung 15: Bestimmung des pH-Optimums für aktives Ovastacin	57
Abbildung 16: Bestimmung der kinetischen Parameter für Ovastacin	60
Abbildung 17: Interaktion von Fetuin-B mit Astacinproteinasen Meprin β und Ovastacin.....	60
Abbildung 18: Interaktion von Fetuin-B und Ovastacin in Abhängigkeit von Vorinkubationszeit und Anwesenheit von Fetuin-A	62
Abbildung 19: Untersuchung der Wirkung von Fetuin-A auf Ovastacin.....	62
Abbildung 20: Vorübergehende Inhibition von Trypsin durch Fetuin-A und Fetuin-B.....	65
Abbildung 21: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Astacin	65
Abbildung 22: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch BMP1	65
Abbildung 23: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Papain	66

Abbildung 24: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Trypsin bzw. Plasmin	66
Abbildung 25: Schematische Darstellung rekombinant exprimierten Fetuine	67
Abbildung 26: Multiples Sequenz-Alignment der Cystatin-ähnlichen Domänen von Cystatin A, Cystatin C, Fetuin-A, Fetuin-B und KNG	68
Abbildung 27: Menschliches Cystatin C und zweite Cystatin-ähnliche Domäne von murinem Fetuin-B.....	69
Abbildung 28: Erste Haarnadelstruktur der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von murinem Fetuin-B sowie FB_L1L1_4 bzw. FB_HY_L1L1 im Vergleich	70
Abbildung 29: Überprüfung der Transposition von FA_WT und FB_HY_L1L1 in die Bacmide	71
Abbildung 30: Überprüfung der Transposition von FA_WT und FB_HY_L1L1 in die Bacmide	71
Abbildung 31: Reinigung von FB_L1L1_4 mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Säule	73
Abbildung 32: Vergleich aller während der Arbeit rekombinant hergestellten Fetuine.....	74
Abbildung 33: Analyse der Funktionalität von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1	75
Abbildung 34: Durch Domänen- <i>swapping</i> hergestellten Fetuinchimären	76
Abbildung 35: Analyse der Funktionalität von Fetuinchimären	76
Abbildung A1: Aminosäuresequenz von gereinigten Ovastacin-FL-Strep	112
Abbildung A2: Vektorkarte von pFastBack™1 der Firma <i>Life Technologies</i>	112
Abbildung A3: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_WT_4	113
Abbildung A4: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_L1L1_4.....	114
Abbildung A5: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_HY_L1L1	115
Abbildung A6: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FA_WT	116
Abbildung A7: zweite Cystatin-ähnliche Domäne von murinem Fetuin B, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1	117
Abbildung A8: Bestimmung von K_m für Ovastacin unter Berücksichtigung der Substrathemmung	117
Abbildung A9: Expression von Ovastacin-FL-Strep in <i>High Five</i> -Zellen.....	118
Abbildung A10: In der Arbeit verwendete Protein- und DNA-Marker.....	118

1. Einleitung

1.1 Leben

Die Fähigkeit, sich selbst zu reproduzieren, ist die minimale (wichtigste) Eigenschaft lebender Systeme (VARELA ET AL., 1974). Die Reproduktion ist bei mehrzelligen Organismen ein höchstkomplizierter Prozess, gilt es doch, nicht nur den Fortbestand der Population zu sichern, sondern auch die Integrität des jeweiligen Genpools, der eine Art als Fortpflanzungsgemeinschaft definiert. Daher wird die Verschmelzung von Ei- und Samenzelle bei Wirbeltieren von einer Vielzahl artspezifischer molekularer Kontrollsysteme überwacht. Diese Komplexität impliziert zwangsläufig eine Anfälligkeit für Störungen. Laut der WHO bleibt der Kinderwunsch in Entwicklungsländern bei einem von vier Ehepaaren unerfüllt. Nicht wesentlich besser ist die Lage in den westlichen Ländern (MASCARENHAS ET AL., 2012). Die Ursachen für männliche oder weibliche Infertilität sind vielfältig. Sie reichen von Infektionskrankheiten bis hin zu spezifischen Gendefekten. Trotz der intensiven Forschung im Bereich der Entwicklungsbiologie und der Reproduktionsmedizin sind die grundlegenden Mechanismen noch nicht in allen Details verstanden.

1.2 Fertilisation von Säugeroocyten

1.2.1 Biologie der Oocyte

Bei weiblichen Säugetieren wird bereits während der Embryogenese eine bestimmte Anzahl von Oocytenvorläuferzellen (Keimzellen) bereitgestellt. Diese verharren im Dyktiotän-Stadium der Meiose in den Ovarien bis das Individuum während der Pubertät geschlechtsreif wird. Bedingt durch hormonelle Stimuli werden bis zur Menopause periodisch einige Primordialfollikel, ein Zusammenschluss unreifer Oocyten und sie umgebender Granulosazellen, zur Reifung angeregt. Die Eizelle setzt die Meiose fort und umgibt sich mit einer derben extrazellulären Matrix als Schutzhülle. Diese sogenannte *Zona pellucida* besteht aus Glykoproteinen (ZP1, ZP2, ZP3 und ZP4), wobei artenspezifisch - wie etwa bei der Maus *Mus musculus* - nicht alle vier exprimiert werden (BLEIL UND WASSARMAN, 1980; GREEN, 1997; WASSARMAN UND LITSCHER, 2013; AVELLA ET AL., 2014). Gleichzeitig differenzieren sich die umgebenden Granulosazellen (Follikelzellen, Nährzellen) zu den Cumuluszellen. Sie sind in eine Matrix aus Hyaluronsäure eingebettet und ummanteln die Eizelle in mehreren Schichten. Der Reifungsprozess von der dann ca. 100 µm (beim Menschen) großen Oocyte kulminiert mit dem Eisprung. Sie verlässt das Ovarium und migriert in den Eileiter (Ovidukt), wo sie durch ein Spermium befruchtet werden kann (Review OKABE, 2013).

Aber bevor das Spermium mit der Oocyte verschmelzen kann, muss es mit Hilfe von acrosomalen Enzymen die Cumuluszellschicht und die *Zona pellucida* passieren (AVELLA ET AL., 2013; OKABE, 2013; WASSARMAN, 1999). Ist dies geschehen, erfolgt zunächst eine artspezifische Protein-Protein-Erkennung, hierbei spielen der Folsäure-Rezeptor 4 (Juno) der Oocyte und das IZUMO 1-Protein des Spermiums (BIANCHI ET AL., 2014) Schlüsselrollen. Es folgt die Fusion des Oolemmas mit der Spermiummembran, wobei die Einzelheiten dieses Prozesses bis heute nicht vollständig verstanden sind.

1.2.2. Polyspermieblock, ein Schutzmechanismus für das neu entstehende Leben

Unmittelbar nach dem Verschmelzen der Geschlechtszellen erfolgen in der Zygotenmembran Prozesse, die zuerst einen schnellen und dann langsamen Polyspermieblock hervorrufen (CHERR ET AL., 1988). Bei Ersterem wird durch eine Signalkaskade, in die unter anderem die Phospholipase C ζ involviert ist, die Exozytose der sogenannten cortikalen Granula eingeleitet (LIU, 2011). Dabei führt die Veränderung des elektrischen Membranpotentials und die Vergrößerung des perivitellinen Spaltes (Raum zwischen Zellmembran und *Zona pellucida*) zur kurzzeitigen Blockade der Spermienbindung an die Zygote (MIYAZAKI UND ITO, 2006). Nach dem heutigem Stand der Forschung verläuft der schnelle Block bei Säugern ohne Änderungen des elektrischen Potentials (AVELLA ET AL., 2013).

Der zweite und definitive Polyspermieblock wird seit Jahrzehnten intensiv erforscht (BRADEN ET AL., 1954; CHERR ET AL., 1988; MOLLER UND WASSARMAN, 1989; DUCIBELLA ET AL., 1990; HOODBHOY UND TALBOT, 1994). Braden und Mitarbeiter zeigten erstmals in den 60er Jahren, dass die Verhärtung der *Zona pellucida* und der dadurch verursachte Polyspermieblock durch das Exsudat der cortikalen Granula hervorgerufen wird (Review von BARROS UND YANAGIMACHI, 1971). Moller und Wassarman konkretisierten diese Vermutungen mit der Entdeckung einer aus den cortikalen Granula stammenden Protease, welche in der Lage war, murines ZP2 zu spalten (MOLLER UND WASSARMAN, 1989). Letztendlich gelang es der Arbeitsgruppe um Jurrien Dean, die Metalloprotease Ovastacin als die "ZP2-Proteinase", wie das Enzym ursprünglich von Moller und Wassarman bezeichnet worden war, eindeutig zu identifizieren (BURKART ET AL., 2012). Die Identifizierung erfolgte nicht zuletzt auf Grund der charakteristischen Spaltspezifität innerhalb von ZP2 (AL \downarrow DE; Ein-Buchstaben-Code siehe Abkürzungsverzeichnis). Die typische Aminosäurenkombination in P1' und P2' (Nomenklatur nach SCHECHTER UND BERGER, 1967; BERGER UND SCHECHTER, 1970), bestehend aus zwei sauren Aminosäureresten, war zuvor für die Metalloproteasen aus der Familie der Astacine beschrieben worden (BECKER-PAULY ET AL., 2011). Außerdem wurde in dieser Arbeit

(BURKART ET AL., 2012) gezeigt, dass die Spaltung von ZP2 und somit der von der *Zona*-Aushärtung abhängige, langsame Polyspermieblock in Ovastacin defizienten Mäusen ausblieb. Dies äußerte sich unter Anderem dadurch, dass die Embryonen im Zweizellstadium vermehrt angeheftete Spermien aufwiesen, was in Wildtyp-Mäusen nicht der Fall war. Ovastacin defizienten Tiere zeigten definitiv eine verminderte Fertilität (BURKART ET AL., 2012).

1.2.3. Ovastacin, ein Schlüsselenzym aus cortikalen Granula

Die Expression des Ovastacins in den Ovarien und unbefruchteten Oocyten wurde in Maus und Mensch zum ersten Mal 2004 von der Arbeitsgruppe um Carlos Lopez-Otin auf mRNA-Ebene nachgewiesen (QUESADA ET AL., 2004). Das Protein wurde rekombinant in Bakterien hergestellt und als aktive Protease identifiziert. Auf Grund der Sequenzähnlichkeit wurde es der Metzinkin Superfamilie und der Astacin Proteinfamilie zugeordnet, wobei es den so genannten *hatching*-Enzymen am nächsten stand (STÖCKER ET AL., 1995; GOMIS-RÜTH ET AL., 2012; CERDA-COSTA UND GOMIS-RÜTH, 2014). Daher wurde zunächst vermutet, Ovastacin könnte für das Aufbrechen der ausgehärteten *Zona pellucida* vor der Einnistung der Blastozyste im Uterus (Schlüpfvorgang - *hatching*) verantwortlich sein (QUESADA ET AL., 2004). Im Gegensatz dazu postulierte die Arbeitsgruppe um J. C. Herr, Ovastacin sei ein membranständiger Rezeptor des Oolemma und fungiere als Bindungspartner des *sperm lysozyme-like protein* (SLLP1, MANDAL ET AL., 2003; HERRERO ET AL., 2005; ZHENG ET AL., 2015). Daher erhielt es die Bezeichnung SAS1B (*sperm acrosomal SLLP1 binding*) (SACHDEV ET AL., 2012; PIRES ET AL., 2013). Beiden Hypothesen gemeinsam ist die Sicht auf die Lokalisation und der Zeitrahmen der Expression des Ovastacins sowie die Anerkennung seiner Rolle in der Fertilisation, jedoch in unterschiedlichen Funktionen.

Eine alternative Sichtweise schreibt Ovastacin eine Schlüsselrolle bei der Aushärtung der *Zona pellucida* zu (BURKART ET AL., 2012; DIETZEL ET AL., 2013; AVELLA ET AL., 2013/2014; STÖCKER ET AL., 2014; FLOEHR ET AL., 2016). Bevor ein kapazitiertes Spermium in eine reife Oocyte eindringen kann, muss es die Aggregation der Cumuluszellen des Follikels und anschließend die extrazelluläre Matrix der *Zona pellucida* durchdringen. Durch das Verschmelzen der Zellmembranen beider Gameten wird die Exozytose der cortikalen Granula angeregt. Die dadurch ausgeschüttete Protease Ovastacin spaltet das Glykoprotein ZP2. Diese Spaltung von ZP2 verursacht gravierende Veränderungen in der Struktur der *Zona pellucida*, wobei sich ihre physikalischen Eigenschaften ändern und sie für weitere Spermien undurchlässig wird.

1.2.4. Regulation der *Zona pellucida* Aushärtung

Zum Verständnis der oben geschilderten Prozesse und des Folgenden muss berücksichtigt werden, dass bereits während der Maturation der Oocyte eine Subpopulation der cortikalen Granula exozytiert wird, insbesondere in dem Bereich wo die Polkörperchen abgeschnürt werden (LIU ET AL., 2003; LIU, 2011). Würde dadurch aktives Ovastacin freigesetzt, so hätte dies, nach dem oben Gesagten, zwangsläufig die Aushärtung der *Zona pellucida* zur Folge - auch in Abwesenheit von Spermien. Die Eizelle wäre dadurch definitiv unbefruchtbar. Bekanntermaßen widerspricht dies jedoch den Gegebenheiten.

Seit Jahren wurde daher diskutiert, ob Komponenten der Follikelflüssigkeit die vorzeitige Aushärtung der *Zona pellucida* verhindern könnten. In den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde das Serumprotein Fetuin als ein Inhibitor der *Zona pellucida*-Aushärtung identifiziert; in Abwesenheit von Serum konnte dieser Effekt mit gereinigtem Fetuin erzeugt werden (SCHROEDER ET AL., 1990; GONCALVES UND GRAVES, 1997). Zum damaligen Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, dass es zwei verschiedene Fetuine gibt. Das ursprünglich als Fetuin-A identifizierte Protein spielt eine wichtige Rolle als Träger von Calciumphosphat bei der Mineralisierung des Knochens; Fetuin-A defiziente Mäuse hatten keinen Fertilitätsphänotyp (JAHNEN-DECHENT ET AL., 1997). Das zweite Fetuin (Fetuin-B) wurde erst im Rahmen der Sequenzierung des Humangenoms entdeckt (OLIVIER ET AL., 2000). Die von Willi Jahn-Dechent und Mitarbeitern hergestellten Fetuin-B *knockout* Mäuse erwiesen sich als weiblich komplett infertil (DIETZEL ET AL., 2013). Die Ursache dieses frappierenden Phänotyps liegt vermutlich darin, dass Fetuin-B als hochpotenter Hemmstoff der Metalloproteinase Ovastacin wirkt. Es wurde ein Modell entwickelt, wonach das in der Follikelflüssigkeit vorhandene Fetuin-B (FLOEHR ET AL., 2016) die frühzeitige Aushärtung der *Zona pellucida* durch die Inhibition von Ovastacin verhindern kann. Allerdings wird durch die Cortikalreaktion nach Fusion von Spermium und Oocyte schlagartig eine so große Menge an Ovastacin freigesetzt, dass die lokal vorhandene Menge an Fetuin-B nicht mehr ausreicht, die Protease daran zu hindern, die *Zona* zu verhärten (STÖCKER ET AL., 2014) (Abbildung 1).

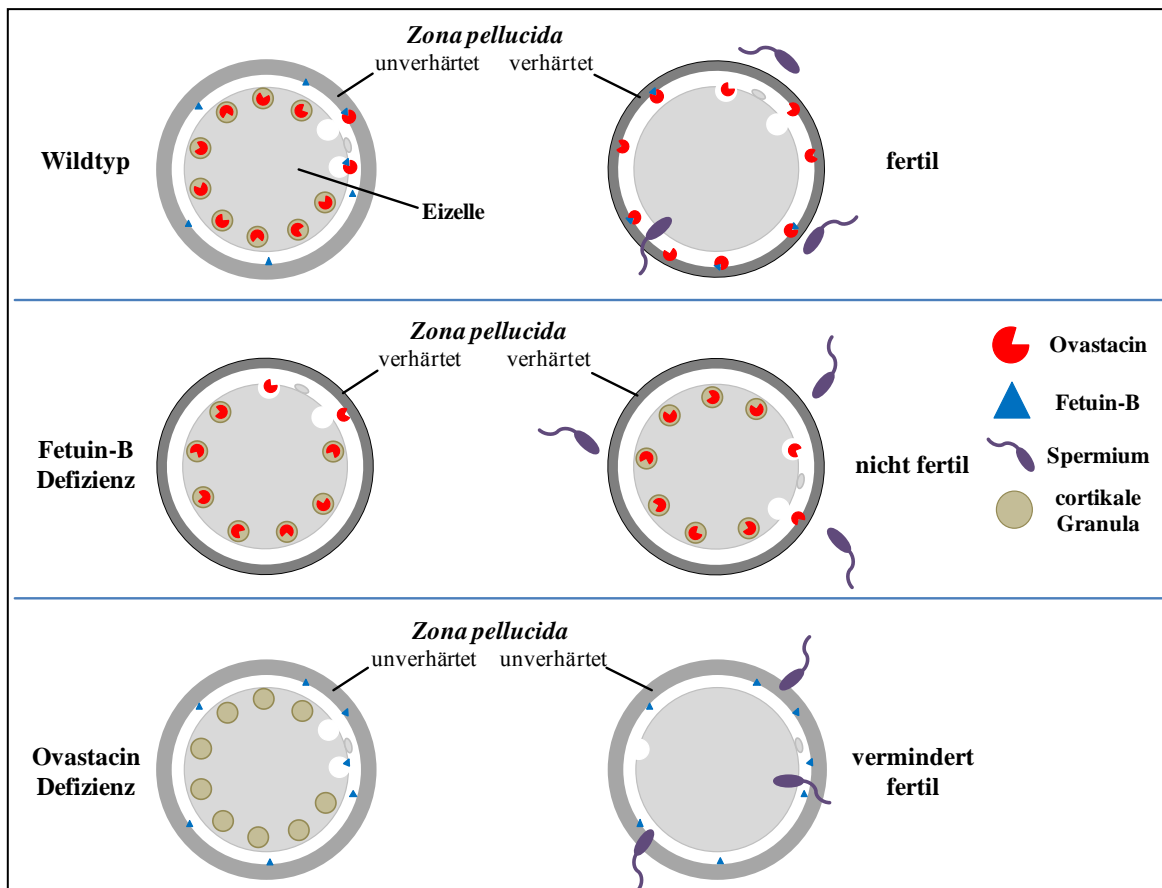


Abbildung 1: Status der *Zona pellucida* und der Oocyte in Wildtyp-Mäusen, sowie in Fetuin-B und Ovastacin defizienten Mäusen vor und nach der Befruchtung

Links ist die Situation in einer reifen ovulierten Oocyte und **rechts** in einer Oocyte nach dem Kontakt mit den Spermien dargestellt. **Oben:** Im Wildtyp-Organismus ist die *Zona pellucida* in der ovulierten Oocyte dank hemmender Wirkung von Fetuin-B unverhärtet und für Spermien passierbar. Nach der Penetration des Oolemmas durch das erste Spermium setzt die Aushärtung der *Zona pellucida* an. Der langsame Polyspermieblock wird aufgebaut und es kommt im Regelfall zu einer normalen Entwicklung der Zygote. **Mitte:** Bei der Fetuin-B Defizienz verlässt die ovulierte Oocyte das Ovarium mit bereits ausgehärteter *Zona pellucida*. Den Spermien ist es unmöglich, diese zu durchdringen, die Befruchtung der Oocyte findet nicht statt. **Unten:** Bei der Ovastacin Defizienz wird die scheinbar normale Oocyte erfolgreich befruchtet. Allerdings kommt es durch das Fehlen des notwendigen Schlüsselenzyms nicht zur Aushärtung der *Zona pellucida*.

1.3. Säuger-Fetue sind Multifunktionsproteine

Die Bedeutung von Fetuin-B bei der Befruchtung ist inzwischen unumstritten. Dabei verbarg sich dieses Protein lange Zeit unentdeckt unter dem allgemeinen Begriff Fetuin. Erst 2000 wurde herausgefunden, dass neben dem ursprünglich als Fetuin bezeichneten Protein (PEDERSEN, 1944), das heute Fetuin-A oder $\alpha 2$ -Hereman-Schmid Glykoprotein benannt wird, noch ein zweiter Vertreter der Säuger-Fetue nämlich Fetuin-B existiert (OLIVIER ET AL., 2000). Beide Paraloga sind sich in ihrem Domänen-Aufbau sowie in ihrer Aminosäuresequenz, u. a. durch die Konservierung von 12 Cysteinresten und die typische Fetuin-signatur DXLETXCHVL sehr ähnlich (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, X - beliebige Aminosäure). Außerdem liegen die kodierenden Gene in unmittelbarer Nachbarschaft auf

demselben Chromosom. Allerdings besitzen die beiden Proteine sehr unterschiedliche Eigenschaften, was nicht zuletzt darauf beruht, dass ihre Aminosäuresequenzen nur ca. 20% Identität aufweisen (OLIVIER ET AL., 2000; LEE ET AL., 2009). So wurde für Fetuin-A inhibitorische Aktivität gegen Serinproteasen berichtet, wenn auch die verschiedenen Autoren zum Teil widersprüchliche Ergebnisse präsentierten (GALEMBECK UND CANN, 1974; ROHRLICH UND RIFKIN, 1981; YAMAMOTO UND SINOHARA, 1993; ASHIDA ET AL., 2000). Umstritten ist ebenfalls die Rolle von Fetuin-A in der Entwicklung einer Insulinresistenz und als Anti-Akute-Phase-Protein bei chronischen Entzündungen (GANGNEUX ET AL., 2003; HEINRICHS-DORFF UND OLEFSKY, 2012; PAL ET AL., 2012). Interessant dagegen ist die in unterschiedlichen Kontexten beschriebene Fähigkeit von Fetuin-A Enzyme in ihrer aktiven Form zu stabilisieren. In erster Linie betrifft dies die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9) (RAY ET AL., 2003; THOMPSON ET AL., 2014), aber auch die Cysteinprotease m-Calpain (MELLGREN UND HUANG, 2007). Die wichtigste Aufgabe von Fetuin-A scheint jedoch die systemische Inhibition der ektopischen Kalzifizierung und die Homöostase der Knochenmineralisation zu sein (JAHNEN-DECHENT ET AL., 1997; SCHÄFER ET AL., 2003; JAHNEN-DECHENT ET AL., 2011; BRYLKA UND JAHNEN-DECHENT, 2013). Im Gegensatz dazu zeigen Fetuin-B defiziente Mäuse keine Anomalitäten in der Mineralisierung ihrer Gewebe (DIETZEL ET AL., 2013) und Fetuin-A defiziente weibliche Mäuse sind normal fertil (FLOEHR ET AL., 2016).

1.4 Cystatine

Die Fetuine sind Mitglieder der Cystatin-Superfamilie, deren meiste Vertreter als reversible kompetitive Inhibitoren von Cysteinproteasen bekannt sind. Die Cystatine werden in drei Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe beinhaltet die kleinen (ca. 11000 Da), aus nur einer Domäne bestehenden cytoplasmatischen Stefine. Sie werden auch als Cystatine A und B bezeichnet. Auf Grund des Expressionsortes fehlen den Stefinen ein Signalpeptid und die Disulfidbrücken, außerdem sind sie nicht glykosyliert.

Die zweite Gruppe umfasst extrazelluläre Proteine mit nur einer Cystatin-ähnlichen Domäne, die Cystatine C, D, E/M, S, SA und SN (13000-14000 Da). Sie besitzen ein Signalpeptid und Disulfidbrücken, einige sind glykosyliert (OCHIENG UND CHAUDHURI, 2010; WALLIN ET AL., 2013). Die Mitglieder der beiden Subfamilien fungieren als Inhibitoren von C1- und C13-Cysteinproteasen z.B. Papain und Legumain (TURK UND BODE, 1991; ALVAREZ-FERNANDEZ ET AL., 1999), wobei ihre Hemmmechanismen auf spezifischen strukturellen Eigenschaften basieren. Am Beispiel des Cystatins C, dessen Röntgen-Kristallstruktur bekannt ist (BODE ET

AL., 1988; KOŁODZIEJCZYK ET AL., 2010), können diese wie folgt beschrieben werden. Das Cystatin C besitzt eine zentrale α -Helix, um welche sich senkrecht dazu fünf antiparallel verlaufende β -Faltblattstränge winden. Vier davon sind durch zwei Haarnadelstrukturen verbunden. Diese Loops besitzen an ihrer Spitze stark konservierte Sequenzabschnitte, im ersten Loop: QXVXG und im zweiten Loop: PW (NANDY ET AL., 2013). Die beiden Strukturen passen zusammen mit dem N-terminal gelegenen ersten β -Faltblattstrang perfekt in die Substratbindungsregion im katalytischen Zentrum der C1-Cysteinproteasen, wodurch deren Inhibition gewährleistet wird (TURK UND BODE, 1991). Ferner wurde gezeigt, dass Cystatin C und Cystatin E/M mit einer völlig anderen Loop-Struktur die C-13 Cysteinprotease Legumain inhibiert. Es handelt sich dabei um den der α -Helix C-terminal angeschlossenen, mit einem Asparaginrest beginnenden Sequenzabschnitt (Abbildung 2). Die beiden inhibitorischen Mechanismen sind unabhängig voneinander und können gleichzeitig stattfinden (ALVAREZ-FERNANDEZ ET AL., 1999).

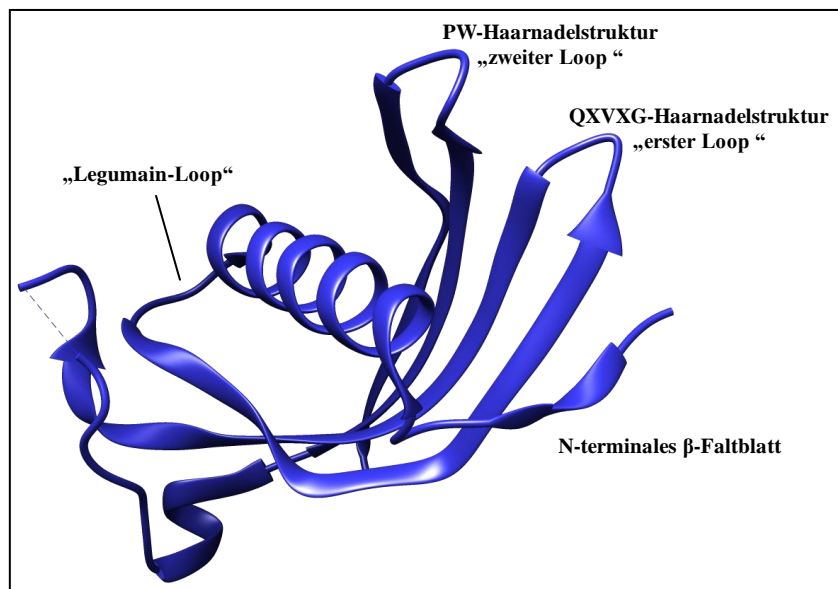


Abbildung 2: Bändermodell der Kristallstruktur von Cystatin C

Verändert nach KOŁODZIEJCZYK ET AL., 2010, PDB ID: 3GAX, Auflösung 1,7 Å. Die als erster und zweiter Loop gekennzeichneten Strukturen bilden zusammen mit dem N-terminalen β -Faltblatt die Basis für die Inhibition der C1-Cysteinproteasen (Papain, Cathepsin B usw). Für die Hemmung von C-13 Cysteinprotease Legumain ist dagegen der sogenannte „Legumain-Loop“ verantwortlich.

Der dritte Subtyp der Cystatine umfasst Proteine, die mindestens zwei Cystatin-ähnliche Domänen besitzen und durch einen weiteren C-terminalen Bereich ergänzt werden. Dazu werden die Fetuine, das Histidin-reiche Glykoprotein (HRG) und die Kininogene gezählt. Diese in der Leber produzierten Plasmaproteine sind höchstwahrscheinlich evolutionär durch Genduplikationen aus dem zweiten Cystatin-Typ entstanden (OCHIENG UND CHAUDHURI, 2010). Viele Typ-3 Cystatine haben die Fähigkeit verloren, Cysteinproteasen zu hemmen (LEE

ET AL., 2009). Eine der Ausnahmen ist das Kininogen, das drei Cystatin-ähnlichen Domänen besitzt. Die erste ist nicht inhibitorisch. Die zweite bewirkt sowohl die Hemmung Papain-ähnlicher als auch Calpain-ähnlicher Cysteinproteasen. Die dritte Cystatin-ähnliche Domäne inhibiert Papain und Cathepsin L, aber nicht Calpain (SALVESEN ET AL., 1986). Interessant ist ebenfalls, dass die Typ-3 Cystatine im Laufe der Evolution eine Reihe von zusätzlichen Fähigkeiten erworben haben. So sind z.B. Kininogen und HRG Regulatoren der Blutgerinnung und der Angiogenese. Außerdem wirken sie auf Grund ihrer Histidin-reichen Regionen antibakteriell (LEE ET AL., 2009).

Der Beschreibung der Eigenschaften von Säuger-Fetuin-A und -Fetuin-B in den Abschnitten 1.2.4-1.3. muss ein interessanter Aspekt hinzugefügt werden. Fetuine besitzen zwei Cystatin-ähnliche Domäne und eine C-terminale Sequenzverlängerung, beide Proteine sind stark glykosyliert und unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrem Molekulargewicht. Außerdem kommen beide in Blutplasma von adulten Mäusen in erheblichen Mengen, Fetuin-B bis zu 150 µg/ml (FLOEHR ET AL., 2016) und Fetuin-A bis zu 200 µg/ml (JAHNEN-DECHENT ET AL., 1997), vor. Aufgrund ihrer physikochemischen Ähnlichkeit ist es schwierig, sie mit Standardmethoden voneinander zu trennen. Das hat zur Folge, dass kommerziell erhältliche Fetuin-A-Präparationen mit Fetuin-B kontaminiert sind und entsprechendes gilt für Antikörper (FLOEHR ET AL., 2016). Dies würde die Befunde erklären, in denen Fetuin-A als Inhibitor von Astacin-Metalloproteasen identifiziert wurde (HEDRICH ET AL., 2010). Ebenfalls bleibt es abzuwarten, ob die Ergebnisse bestätigt werden, die Fetuin-B in Verbindung mit der Aktivierung von MMP-2 (JUNG ET AL., 2015) oder mit der Insulinresistenz bei Fettleber (MEEX ET AL., 2015) bringen. Auch diese Befunde könnten auf der Vermischung und Verwechslung von Fetuinen beruhen. Fetuine sind entwicklungsgeschichtlich vergleichsweise jung und haben sich vermutlich erst bei den Vorläufern der Wirbeltiere entwickelt. Fisch-Fetuin-A kommt in Form zweier verschieden langer Polypeptidketten vor. Beide Varianten unterscheiden sich in ihren Aminosäuresequenzen insbesondere durch repetitive Histidin- und Prolin-reiche Regionen im C-terminalen Bereich von den Säuger-Fetuinen (TSAI ET AL., 2004; LIU ET AL., 2008). Auch bei Fischen existieren in Ähnlichkeit zu Säugern sowohl Fetuin-A (TSAI ET AL., 2004) als auch Fetuin-B (LIU ET AL., 2008; NYNCA ET AL., 2011), wobei die Funktionalität unterschiedlich zu sein scheint. So fungiert das Fisch-Fetuin-A als erster publizierter Inhibitor der Astacinprotease Nephrosin (TSAI ET AL., 2004), während über Fisch-Fetuin-B berichtet wurde, dass es Trypsin und Papain zu hemmen vermag (NYNCA ET AL., 2011). Auch im Schlangenblut wurden Proteine mit zwei Cystatin-ähnlichen Domänen gefunden. Auf Grund ihrer sequenziellen Ähnlichkeit wurden sie ebenfalls in die Gruppe der Fetuine eingeteilt (AOKI ET AL., 2009). Während HLP-

B aus *Gloydius blomhoffi brevicaudus* in Analogie zu Säuger-Fetuin-A die Calciumphosphathomöostase im Schlangenkörper aufrecht erhält (AOKI ET AL., 2009), sind HSF aus *Trimeresurus flavoviridis* (YAMAKAWA UND OMORI-SATOH, 1992) und BJ46a aus *Bothrops jararaca* (VALENTE ET AL., 2001) als Inhibitoren der Schlangengift Metalloproteasen (TAKEDA ET AL., 2012; MARKLAND UND SWENSON, 2013) identifiziert worden. Beide Typen von Schlangen-Fetuin haben die Fähigkeit zur Inhibition von Cysteinproteinasen verloren. Interessanterweise fehlt ihnen auch QXVXG Konsensus-Motiv.

Die Abbildung 3 gibt eine Übersicht über den Domänenaufbau von einigen Cystatinen.

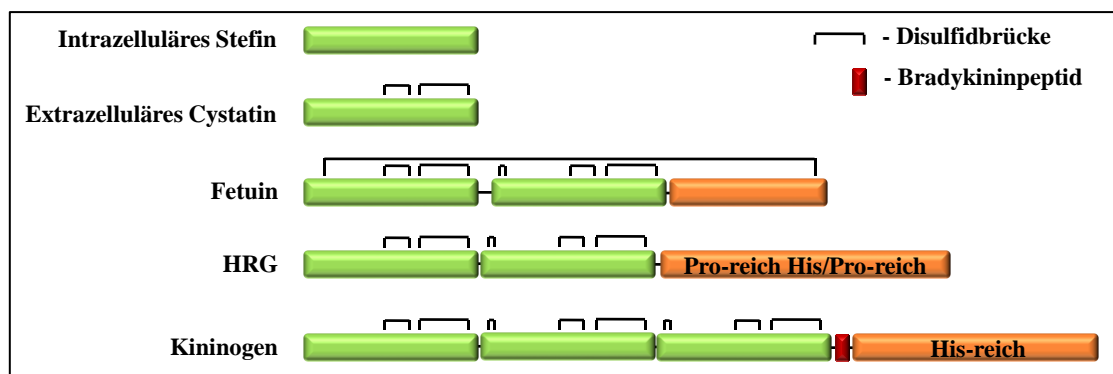


Abbildung 3: Domänenaufbau einiger Cystatine

Die intrazellulären Stefine, die zu Typ-1 Cystatinen gezählt werden, bestehen aus einer Cystatin-ähnlichen Domäne und besitzen keine Disulfidbrücken. Extrazelluläre Cystatine aus Typ-2 bestehen ebenfalls aus einer Domäne, besitzen allerdings Disulfidbrücken. Fetuine, HRG und Kininogene zählen zu Typ-3 Cystatinen. Sie sind aus mindestens zwei Cystatin-ähnlichen Domänen (grün) und einer C-terminalen Verlängerung aufgebaut und weisen zahlreiche Disulfidbrücken auf.

1.5 Ein Netzwerk von Proteasen und Inhibitoren reguliert die Fertilisation

Die Metalloproteinase Ovastacin und ihr Inhibitor Fetuin-B spielen Schlüsselrollen beim Aufbau des langsamen Polyspermieblocks und beim Schutz der befruchteten Oocyte. Hier existiert offenbar ein Netzwerk aus Proteasen und Proteaseantagonisten, das die fragile Balance beim Entstehen neuen Lebens gewährleistet. Die Situation erinnert in vieler Hinsicht an die Blutgerinnungskaskade und die Fibrinolyse (MACFARLANE, 1964; NEURATH, 1989; SCHALLER UND GEBER, 2013; DIETZEL ET AL., 2013; STÖCKER ET AL., 2014). Denn Ovastacin, das wie alle Astacine als Zymogen produziert wird, benötigt einen Aktivator (YIALLOUROS ET AL., 2002; GUEVARA ET AL., 2010). Dieser unterliegt vermutlich wiederum selbst einer Regulation. Außerdem ist es naheliegend, dass im Serum, und somit in beinahe allen Körperflüssigkeiten, abundant vorkommendes Fetuin-B (DENECKE ET AL., 2003) als Inhibitor weiterer Proteasen außer Ovastacin in Frage kommen kann. Aus diesen Gründen werden im Folgenden die Grundkomponenten proteolytischer Regulationssysteme beschrieben. Im Fokus stehen dabei

die Metalloproteinasen der Metzinkin Superfamilie, da das Ovastacin zu dieser Gruppe zählt. Darüber hinaus werden auch etwaige Aktivatoren und die Hemmstoffe aus anderen Proteaseklassen besprochen. Da in Bezug auf die Hemmung von Proteasen durch Fetuine in der Literatur zum Teil widersprüchliche Berichte vorliegen, ist es ein zentrales Ziel dieser Arbeit, potenziell physiologisch relevante Zielenzyme der Fetuine zu identifizieren. Nicht berücksichtigt bleiben Threoninproteasen, wie das intrazelluläre Proteasom, die aufgrund ihrer Tertiärstruktur und ihrer subzellulären Lokalisation vermutlich nicht als Ziel von Inhibitoren des Fetuin-Typs in Frage kommen.

1.6 Proteasen

Anhand ihres Katalysemechanismus und des Aufbaus ihres aktiven Zentrums werden Proteasen in Aspartat-, Cystein-, Asparagin-, Glutamat-, Threonin-, Serin- und Metalloproteasen eingeteilt (HOFFMANN-OSTENHOF, 1974; BOND UND BUTLER, 1987; LOPEZ-OTIN UND MATRISIAN, 2007; RAWLINGS ET AL., 2013; CORNISH-BOWDEN, 2014). Das menschliche Genom kodiert für 569 Proteasen, deren Einteilung in Familien und Superfamilien auf der Basis der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen in Abbildung 4 veranschaulicht wird. Das Genom von Maus und Ratte enthält sogar noch mehr proteasenkodierende Gene, nämlich 644 bzw. 629 (LOPEZ-OTIN UND MATRISIAN, 2007).

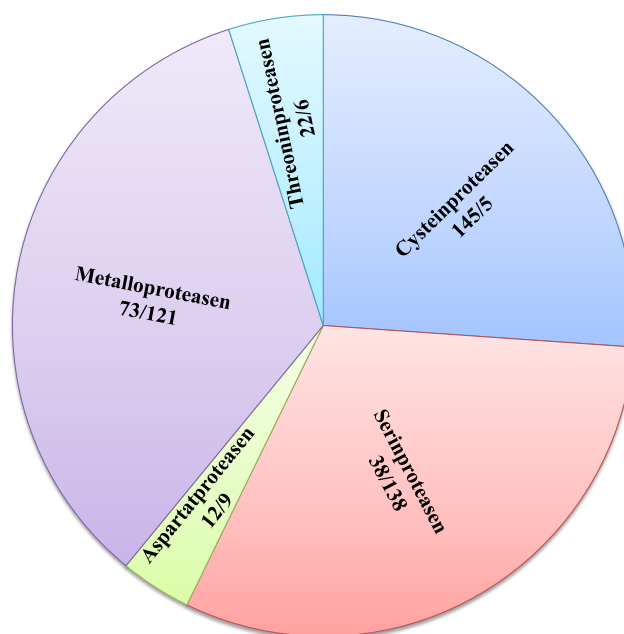


Abbildung 4: Verteilung der menschlichen Proteasen nach Clanzugehörigkeit und Wirkungsort

Verändert nach LOPEZ-OTIN UND MATRISIAN, 2007. Alle beim Mensch identifizierten Proteasen sind in fünf Gruppen eingeteilt: Aspartat-, Threonin-, Cystein-, Serin- und Metalloproteasen. Die Zahlen zeigen jeweils die Anzahl der intra- bzw. extrazellulären Proteasen, die dem jeweiligen Clan zugehören. Die Metalloproteasen, gefolgt von Serin- und Cysteinproteasen, sind bei weitem die dominantesten Vertreter der Stoffklasse Protease in menschlichem Organismus, wobei die Mehrzahl der extrazellulär aktiven Enzyme aus der Gruppe der Metallo- und Serinproteasen kommt.

1.6.1 Cysteinproteasen

Die typischen Vertreter der Cysteinproteasen sind die papainähnlichen Cathepsine und die Calpaine, welche dem CA-Clan (C1 bzw. C2 Familien, Merops-Klassifizierung, <http://merops.sanger.ac.uk>) zugeordnet werden. Sie sind als Endo- und Exopeptidasen aktiv. Die meisten Endopeptidasen sind in Lysosomen zu finden, während Exopeptidasen im Cytosol lokalisiert sind. Allen papainähnlichen Cysteinproteasen ist die katalytisch essenzielle Diade aus einem Cystein- und einem Histidinrest in ihrem aktiven Zentrum gemeinsam. Dabei fungiert die Thiol-Gruppe des Cysteins als das nukleophile Element und der Histidinrest ist Protonenakzeptor. Die katalytische Dyade (Cys-His, Drei-Buchstaben-Code siehe Abkürzungsverzeichnis) kann um weitere Aminosäurereste erweitert sein (BARRETT ET AL., 1998).

Papain ist eine Endopeptidase, die in dem Milchsaft von unreifen Papaya-Früchten als Abwehrsubstanz gegen Fressfeinde, vorkommt. Die Protease wird sehr effizient durch Cystatin C inhibiert (LINDAHL ET AL., 1992). Somit stellt sie ein günstiges Vergleichsobjekt für die Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften von Cystatinen dar. Die Proteasen tierischer Lysosomen wurden nach ihrer Entdeckung unter dem Sammelbegriff "Cathepsine" geführt. Der Begriff leitet sich vom griechischem *καθελειν* für "verdauen" ab. Wie erst später bekannt wurde, fasste der Begriff die Enzyme aus den Gruppen von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Serinproteasen zusammen (BARRETT, 1977). Zu den Cysteinproteasen gehören zum Beispiel Cathepsin B (BARRETT, 1973), ursprünglich aus Lymphknoten und der Milz von Kälbern isoliertes Cathepsin S (TURNSEK ET AL., 1975; LOCNIKAR ET AL., 1981) und Cathepsin K aus Osteoklasten (TEZUKA ET AL., 1994). Cathepsine sind normalerweise in der intrazellulären Protein-Abbau-Maschinerie involviert, können aber auch extrazellulär aktiv sein. Ihr "Überleben" außerhalb der Zelle wird durch schwache eine Bindung an diverse Cystatine ermöglicht (MORT, 1998).

"*Calcium ion-dependent papain-like cysteinprotease*" oder kurz Calpain ist ein Vertreter der C2-Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen. Die Aktivität von Calpain ist von Anwesenheit der Calcium-Ionen (Ca^{2+}) im Medium abhängig. Dies könnte die Befunde erklären, dass Fetuin-A, bekannt durch seine Affinität zu Calciumphosphat-Aggregaten (JAHNEN-DECHENT ET AL., 2011), womöglich die proteolytische Aktivität von m-Calpain zu stabilisieren vermag (MELLGREN UND HUANG, 2007). Außerdem wird Calpain von der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne des Kininogens gehemmt, welches zusammen mit Fetuinen zu dem Typ-3 Cystatinen gehört (SALVESEN ET AL., 1986).

Die letzte Cysteinprotease, die hier erwähnt werden soll, ist Legumain. Es gehört zu der C13-Familie der Cysteinproteasen und ist verwandt mit den Caspasen, die als proteolytische Enzyme im Rahmen der Apoptose fungieren (BOATRIGT UND SALVESEN, 2003). Legumain besitzt eine ausgeprägte Spezifität für einen Asparaginrest in der P₁-Position des Substrats, daher die Alternativbezeichnung *asparaginyl endopeptidase*. Diese Spaltspezifität ist eines der grundlegenden Unterscheidungsmerkmale des Legumains von den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.4) unterscheidet sich der Hemmmechanismus von Cystatin C gegen Legumain und Papain-ähnlichen Cysteinproteasen fundamental (ALVAREZ-FERNANDEZ ET AL., 1999), was die Analyse der Protease bezüglich der Hemmbarkeit durch Fetuin-B interessant macht.

1.6.2 Serinproteasen

Eine der mitgliederreichsten und am besten untersuchten Gruppen proteolytischer Enzyme ist die Familie der Serinproteasen. Ihr Katalysemechanismus erinnert an den der Cysteinproteasen. Der Unterschied besteht darin, dass hier der namensgebende Serinrest statt eines Cysteins als nukleophiles Agens fungiert. In den meisten der Serinproteasen wird die Serinseitenkette durch einen Histidinrest und einen Aspartatrest polarisiert. Dabei bildet Histidin über einen Imidazolstickstoff eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des Serins aus, welches dadurch zum Nucleophil wird. Der zweite Imidazolstickstoff wiederum ist mit dem Aspartatrest H-verbrückt. Zusammen bilden diese Aminosäurereste die katalytische Triade Ser-His-Asp der Serinproteasen (S1-Familie, BARRETT ET AL., 1998).

Für die vorliegende Arbeit sind die Mitglieder des SA-Clans und besonders der S1-Familie von Interesse (Merops-Klassifizierung; <http://merops.sanger.ac.uk>). Sie umfasst ausschließlich Endopeptidasen. Die Mehrheit ist extrazellulär, wenige sind intrazellulär, einige membranassoziiert. Viele S1-Enzyme haben einen Multidomänenaufbau bestehend aus einer meist C-terminal gelegenen katalytischen Einheit und ihr N-terminal angeschlossenen zusätzlichen Domänen (BARRETT ET AL., 1998; HALFON UND CRAIK, 1998).

Die wohl bekannteste S1-Protease ist das Verdauungsenzym Trypsin. Natürliche Proteininhibitoren der S1-Proteasen sind z.B. der Trypsininhibitor aus Sojabohnen, α_1 -Antitrypsin aus dem Blutplasma, der pankreatische Trypsininhibitor, der generelle Endopeptidaseninhibitor α_2 -Makroglobulin (HALFON UND CRAIK, 1998). Außerdem wurde das Typ-3 Cystatin Fetuin-A (YAMAMOTO UND SINOHARA, 1993; GALEMBECK UND CANN, 1974) als potenter Hemmstoff des Trypsins beschrieben. Trypsin wird als Prä-Proenzym in der Bauchspeicheldrüse produziert und in Form des Proenzym Trypsinogen intrazellulär

gespeichert. Die Aktivierung erfolgt nach der Sekretion im Dünndarm durch das Enzym Enteropeptidase. Einmal aktiviert spaltet das Enzym nicht nur Nahrungsproteine, sondern aktiviert weiteres Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proelastase und andere pankreatische Verdauungsenzyme (HALFON UND CRAIK, 1998; GRAF ET AL., 1998).

Serinproteasen sind untereinander und mit anderen Proteinen in verschiedenen kaskadenartigen und verzweigten Netzwerken verknüpft. Beispiele sind das Blutgerinnungssystem und das antagonistische Plasmin-Antiplasmin System (SCHALLER UND GEBER, 2013). Auch im Rahmen der Reproduktion werden derartige proteolytische Netzwerke diskutiert (ZHANG ET AL., 1992; HUARTE ET AL, 1993; PLOPLIS ET AL., 1995; KOUBA ET AL., 2000; COY ET AL., 2012).

Plasmin (PL) ist eine Serinprotease mit tryptischer Spaltspezifität. Seine inaktive Form ist das Multidomänenprotein Plasminogen (PLG). Es wird in der Leber hergestellt und später in die Blutbahn abgegeben, womit seine praktisch allgegenwärtige Lokalisation in der interstitiellen Körperflüssigkeit begründet ist. Das über 90 kDa schwere Protein kann von einer Vielzahl der Serinproteasen aktiviert werden. *In vivo* fungieren als Aktivatoren meistens der Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) und der gewebespezifische Plasminogen-Aktivator (tPA, "t" steht für eng. *tissue* -Gewebe) als Katalysatoren der Plasminaktivität (CASTELLINO, 1998). Die uPA und tPA, ebenfalls tryptische Serinproteasen, zeichnen sich durch extrem limitierte Substratwahl aus. Es gibt nur eine einzige hinreichend belegte Spaltstelle innerhalb von PLG (DING ET AL., 1995; SCHALLER UND GEBER, 2013). Genau wie PLG können die Proformen von Plasminogenaktivatoren durch diverse Serinproteasen aktiviert werden. Allerdings übernimmt meist Plasmin diese Rolle (SCHALLER UND GEBER, 2013). Beispielsweise wird während der Fibrinolyse ein ternärer Komplex aus Fibrin, Pro-tPA und PLG gebildet. Plasminogen kann in diesem Komplex von Pro-tPA (unikale Eigenschaft innerhalb der Serinproteasen) aktiviert werden und seinerseits Pro-tPA zu tPA spalten. Dadurch wird die Verstärkung der fibrinolytischen Reaktion erreicht. Diese Vorgänge werden an mehreren Stellen durch spezifische Inhibitoren wie den α_2 -Plasmininhibitor (α_2 PI) und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) kontrolliert (SCHALLER UND GEBER, 2013; LIJNEN UND COLLEN, 1998).

1.6.3 Aspartatproteasen

Namensgebend für die Aspartatproteasen sind zwei Asparaginsäurereste in ihrem aktiven Zentrum. Alle eukaryotischen Proteasen dieses Typs bestehen aus zwei homologen Domänen, die je einen der beiden Aspartate beisteuern. Diese polarisieren und halten ein Wassermolekül in der Position, das bei der Peptidbindungsspaltung für den nukleophilen Angriff zuständig ist. Dies unterscheidet Aspartatproteasen von Cystein- und Serinproteasen gravierend. Die viralen

Vertreter der Gruppe bestehen aus einer Domäne, die Homodimere bilden müssen, um ihre proteolytische Aktivität zu erlangen (z.B. Retropepsin, HIV-Protease). Diese Tatsache untermauert die Ansicht, dass eukaryotische Aspartatproteasen im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstanden sind. Alle Aspartatproteasen sind Endopeptidasen (BARRETT ET AL., 1998; DAVIES, 1990).

Ein typisches Mitglied der Gruppe ist das lysosomale Cathepsin D, das besonders in der Leber hochkonzentriert vorliegt (bis 0,7 mM) (DEAN UND BARRETT, 1976) und auch extrazellulär aktiv ist (BRIOZZO ET AL., 1988).

Es spaltet eine Vielzahl an Proteinen als „house keeping“ Enzym, ist aber auch in pathologischen Zuständen wichtig (CONNER, 1998). Cathepsin D wird, wie auch andere Aspartatproteasen, durch das Hexapeptid Pepstatin aus *Streptomyces spec.*, inhibiert (AOYAGI ET AL., 1972).

1.6.4 Metalloproteasen

Wie bei den Aspartatproteasen erfolgt der nukleophile Angriff der zu spaltenden Peptidbindung bei den Metalloproteasen nicht direkt durch Aminosäurereste, sondern indirekt durch ein katalytisches Wassermolekül. Für die Polarisierung des Wassers sind oft ein Glutamatrest und ein Zinkion zuständig. Das Metall wird von den Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Aspartat oder Glutamat koordiniert (BARRETT ET AL., 1998).

Für diese Arbeit ist die Superfamilie der **Metzinkine** von besonderer Relevanz, da Ovastacin dieser Superfamilie angehört. Sie sind durch das zinkbindende Motiv HEXXHXXGXXH/D gekennzeichnet und besitzen außerdem einen stark konservierten, Methioninhaltigen *1,4-β-turn* (SXMHY, *Met-turn*) in der Nähe der Zink-bindenden Region (BODE ET AL., 1993; HOOPER, 1994; STÖCKER ET AL., 1995; GOMIS-RÜTH, 2003; CERDA-COSTA UND GOMIS-RÜTH, 2014).

Säugermetzinkine können in vier Hauptfamilien unterteilt werden, die ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs*), MMP (*Matrix MetalloProteinases*) und die Astacine (PFLEIDERER ET AL., 1967; STÖCKER ET AL., 1988). Sie werden als inaktive Proenzyme translatiert, die während oder nach der Sekretion proteolytisch aktiviert werden und der Regulation durch extrazelluläre Inhibitoren und Enhancer unterliegen (RA UND PARKS, 2007; GUEVARA ET AL., 2010).

ADAMs sind immer membrangebunden und zusammengesetzt aus N-terminalem Propeptid, Proteasedomäne, Disintegrindomäne, cysteinreicher Domäne, Transmembrandomäne und cytosolischer Domäne (SEALS UND COURTNEIDGE, 2003; KLEIN UND BISCHOFF, 2011). Die

Disintegrindomäne kann mit Integrinen der Zelloberfläche interagieren und dadurch Signaltransduktion und Zelladhäsion beeinflussen. Interessant ist die Tatsache, dass nur 13 der 21 exprimierten ADAMs eine aktive Proteasedomäne enthalten (EDWARDS ET AL., 2008). Die bekanntesten ADAMs sind ADAM 10 und ADAM 17, auch α -Sekretase und TACE (*Tumor necrosis factor α* , TNF- α , *Converting Enzyme*) bezeichnet (CHANTRY ET AL., 1989; HOWARD ET AL., 1996). Beide sind als „Sheddase“ in der Lage, eine Vielzahl von Proteinen von der Zelloberfläche abzuschneiden, was in der Aktivierung oder Inaktivierung verschiedener Signalwege resultiert. Beide haben Einfluss auf den *notch*-Signalweg und bereiten Proteine für die Spaltung durch intramembranäre Proteasen vor (BLOBEL, 1997).

ADAMTS Enzyme besitzen prinzipiell den gleichen Aufbau wie ADAMs. Sie enthalten jedoch zusätzlich multiple Thrombospondin-ähnliche Repeats und sie sind löslich, da sie keinen Transmembrananker besitzen (TAKEDA, 2009; GERHARDT ET AL., 2007). ADAMTS 2, 3, und 14 sind Procollagen N-Proteinasen, die zusammen mit BMP1 (*Bone Morphogenetic Protein 1*) die Reifung des Procollagens zum Collagen katalysieren (HOJIMA ET AL., 1989; COLIGE ET AL., 1997). ADAMTS 4 und ADAMTS 5 sind auch als Aggrecanasen bekannt (TORTORELLA ET AL., 2001), und ADAMTS13 spaltet den von Willebrand Faktor (WU ET AL., 2006). Knockout Analysen zeigten die Einbindung mehrerer ADAMTS Proteinasen in die Embryonalentwicklung und Organogenese (DUBAIL UND APTE, 2015).

MMPs bestehen typischerweise aus Prodomäne, katalytischer Domäne und einer C-terminalen Hemopexin-ähnlichen Domäne. Die letztere ist für Interaktionen mit Substraten und Inhibitoren verantwortlich (KNÄUPER ET AL., 1997; TSCHESCHE UND PIEPER, 1998; JEFFREY, 1998; MANKA ET AL., 2012). Ursprünglich wurden die MMPs nach ihren Substraten als Kollagenasen, Gelatinasen oder Stromelysine bezeichnet (RA UND PARKS, 2007; STERNLICHT UND WERB, 2009). Die Kollagenasen MMP-1, MMP-8, und MMP-13 spalten tripelhelikales Kollagen an einer konservierten Stelle, sodass Fragmente von drei Vierteln und einem Viertel des Kollagens entstehen, die sich dann entwinden und durch andere Proteasen weiter abgebaut werden. Neben den klassischen Kollagenasen existieren auch die membrangebundenen MMPs wie MT1-MMP (=MMP-14), die ebenfalls tripelhelikales Kollagen abbauen (MORGUNOVA ET AL., 1999). Die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) spalten denaturiertes Kollagen (= Gelatine) und darüber hinaus viele Cytokine und Chemokine. Stromelysine (z.B. MMP-3) hydrolysieren verschiedene andere Proteine der extrazellulären Matrix, aber kein tripelhelikales Kollagen. (VISSE UND NAGASE, 2003; STERNLICHT UND WERB, 2009).

Die **Astacine** der Säugetiere werden in die **BMP1/Tolloid Proteinasen (BTP)**, die Meprine, und Ovastacin untergliedert (GOMIS-RÜTH ET AL., 2012). Die Spaltspezifität der Astacinproteinasen

der Säuger ist einzigartig. Sie hydrolysieren Peptidbindungen, bevorzugt N-terminal von einer oder zwei sauren Aminosäureseitenketten (BECKER-PAULY ET AL., 2011). BMP1 steht für *Bone Morphogenetic Protein-1*, das jedoch grundsätzlich unterschieden werden muss von den TGF- β -ähnlichen BMPs (TGF = *Transforming Growth Factor*) (WOZNEY ET AL., 1988). BTP sind gekennzeichnet durch CUB (*Complement, sea Urchin EGF, BMP1*) und EGF-ähnliche (*Epidermal Growth Factor*) Domänen C-terminal der Proteinase Domäne. Diese Domänen sind für die Substraterkennung und für die Dimerisierung zuständig (BERRY ET AL., 2009). BTPs spalten Antagonisten von Wachstumsfaktoren während der Embryonalentwicklung (PICCOLO ET AL., 1997; SCOTT ET AL., 1999). In adulten Wirbeltieren prozessieren BTP Proteine im Rahmen der Assemblierung der extrazellulären Matrix. Zum Beispiel entfernt BMP1 (= Procollagen C-Proteinase, PCP) die C-terminalen Propeptide fibrillärer Procollagene (HOJIMA ET AL., 1989). Meprine besitzen zusätzliche MAM, TRAF, *intervening*, EGF-ähnliche und Transmembrandomänen C-terminal der Proteinasedomäne. Die MAM Domäne ermöglicht die Bildung Disulfid-verbrückter Dimere wie zum Beispiel in Meprin β . In Meprin α sind solche Dimere zusätzlich assoziiert zu riesigen Homooligomeren im Megadalton-Bereich (BECKER ET AL., 2003; AROLAS ET AL., 2012). Beide Meprinuntereinheiten werden mit einem Membrananker translatiert. Im Gegensatz zu Meprin β verliert die α Untereinheit ihren Membrananker durch Furinspaltung im trans-Golgi und wird dadurch solubilisiert, wenn sie nicht mit Meprin β co-exprimiert wird (TANG UND BOND, 1998). Meprine haben multiple Funktionen als Sheddase auf der Zelloberfläche und als Prokollagenasen in der extrazellulären Matrix verschiedener Epithelien wie der Haut (BRODER UND BECKER-PAULY, 2013; PROX ET AL., 2015). Zur Beschreibung der Funktionen von **Ovastacin**, die bereits in den Abschnitten 1.2.3-1.2.4 erfolgte, kann hinzugefügt werden, dass es eventuell an weiteren Prozessen im Organismus beteiligt ist. Es wurde massenspektrometrisch in Blutplasma, der Leber und in Herzmuskelzellen detektiert (LIU ET AL., 2005; ZGODA ET AL., 2009; YIN ET AL., 2010). Enzyme mit einer funktionellen Ähnlichkeit zum Ovastacin wurden außer bei Säugetieren auch bei Fischen und Amphibien gefunden. Beispielsweise verursacht **Alveolin**, eine Protease aus cortikalen Granula der Fisch-Oocyte, die Aushärtung von Chorions (entspricht der Zona pellucida der Säuger) nach der erfolgten Fertilisation (SHIBATA ET AL., 2012). Das macht das befruchtete Ei mechanisch widerstandsfähiger. Ein weiterer interessanter Vertreter dieser Subgruppe von Astacinen ist Nephrosin. Das Enzym erhielt seinen Namen, weil es aus Kopfnieren, Niere und Milz von Karpfen (*Cyprinus carpio*) isoliert wurde. Es war das erste Astacin, das im lympho-hämatopoetischen System gefunden wurde (HUNG ET AL., 1997). Wenig später sorgte Nephrosin für eine weitere Überraschung, als es im Komplex mit dem so

genannten Nephrosin-Inhibitor gereinigt werden konnte. Es war der erste publizierte Fall eines spezifischen natürlichen Hemmstoffs der Astacine. Der Nephrosin-Inhibitor wurde als ein Fetuin identifiziert (TSAI ET AL., 2004).

In den latenten Proenzymen der MMPs und ADAMs blockiert die Thiol-Gruppe eines konservierten Cysteinrestes des Propeptids das Zinkion im aktiven Zentrum. Dieser sogenannte Cystein-*switch* muss für die Aktivierung geöffnet werden (VAN WART UND BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Dies geschieht durch Furin-ähnliche Enzyme auf dem sekretorischen Weg oder extrazellulär durch andere Serin- oder Metalloproteinasen. Die frei gelösten MMPs sind eingebunden in ein Netzwerk von aktivierenden Proteinase und Gerüstproteinen, die spezifisch für verschiedene MMPs sind (RA UND PARKS, 2007). *In vitro* können ADAMs und MMPs auch durch Cysteinschwefel-angreifende Quecksilber-organische Verbindungen wie p-Amino-phenyl-mercuri-acetat (APMA) aktiviert werden (SELLERS ET AL., 1977). Dies funktioniert jedoch nicht mit ADAMTS Proteinase und Astacinen. In den Letzteren ist, in Analogie zum Cystein-*switch* der MMPs und ADAMs, ein konservierter Aspartatrest im Propeptid für die Blockierung des Zinkions verantwortlich (VAN WART UND BIRKEDAL-HANSEN, 1990; GUEVARA ET AL., 2010). Die meisten Astacine können durch verschiedene Trypsin-ähnliche Serinproteinasen aktiviert werden. Dies erfolgt an einer konservierten Region, etwa neun Aminosäurereste stromaufwärts vom ersten Tryptophanrest der Peptidkette aus gesehen (GUEVARA ET AL., 2010; GOMIS-RÜTH ET AL., 2012). In seltenen Fällen kann die Aktivierung auch durch Autoaktivierung erfolgen (YIALLOUROS ET AL., 2002).

Nach der Aktivierung unterliegen die Metzinkine der Kontrolle durch natürliche Enhancer und Inhibitoren. Die Procollagen C-proteinase (BMP1, PCP) wird durch den spezifischen *Procollagen C- Proteinase Enhancer* (PCPE) etwa 10 bis 20-fach aktiviert, und zwar strikt substratabhängig (ADAR ET AL., 1986; KRONENBERG ET AL., 2009). Der vielseitigste physiologische Hemmstoff von Metzinkinen ist das unspezifisch wirkende Plasmaprotein α_2 -Makroglobulin. Proteolytische Spaltung in der sogenannten Köderregion des Inhibitors bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch die Proteinase wie in einer Falle gefangen wird (SOTTRUP-JENSEN, 1989; MARRERO ET AL., 2012). Allerdings werden voluminöse Proteinase wie die Meprine aufgrund ihrer Sperrigkeit durch α_2 -Macroglobulin nicht gehemmt. Die wichtigsten spezifischen Hemmstoffe der MMPs sind die *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases* (TIMP) (BAKER ET AL., 2002). Selektive Hemmstoffe gegen bestimmte MMPs, ADAMs oder ADAMTS sind jedoch selten (AMOUR ET AL., 2000; NAGASE ET AL., 2006; EDWARDS ET AL., 2008; SCHELTER ET AL., 2011). BTPs werden sehr effektiv gehemmt durch das Protein *Sizzled* des Krallenfrosches *Xenopus*. *Sizzled* entspricht der löslichen

Ektodomäne des WNT-Rezeptors *Frizzled* (PLOPER ET AL., 2011). Überraschenderweise sind die homologen *Sizzled*-ähnlichen Proteine der Säugetiere jedoch nicht inhibitorisch gegen Säuger BTPs (BIJAKOWSKI ET AL., 2012). Die einzigen spezifischen Hemmstoffe gegen Astacinproteasen bei Säugern sind Plasmafetuline (HEDRICH ET AL., 2010; DIETZEL ET AL., 2013; STÖCKER ET AL., 2014).

1.7 Ziele der Arbeit

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der Aktivität von Ovastacin zu untersuchen. Ursprünglich galt es Enzyme zu identifizieren, die als Aktivatoren des Pro-Ovastacins in Frage kamen. Weiterführend sollte die Methodik zur reproduzierbaren Ermittlung der kinetischen Parameter für das Enzym etabliert werden. Dazu war es erforderlich ein geeignetes synthetisches Substrat für die Proteinase zu finden.

Während dieser Zeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Kollegen aus Aachen die Entdeckung des endogenen Inhibitors von Ovastacin – Fetuin-B (DIETZEL ET AL., 2013). Daraus ergab sich die Möglichkeit, die Natur der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor aufzuklären. Außerdem war es von großem Interesse, das Hemmspektrum des Fetuins-B auf andere Proteinase im physiologischen Kontext der Befruchtung und darüber hinaus zu untersuchen. Diese Zielsetzung umfasste potentiell relevante Enzyme aus den Gruppen von Metallo-, Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen. Überdies sollte versucht werden, geleitet durch bioinformatische Sequenzanalyse und Strukturmodellierung, Hypothesen für den Mechanismus der spezifischen Hemmung zu entwickeln. Diese Hypothesen sollten anschließend durch gerichtete Mutagenese und enzymkinetische Analyse der rekombinanten mutierten Fetuin-B Varianten getestet werden.

In einer bereits 2010 erschienenen Publikation (HEDRICH ET AL., 2010) war die Wirkung von Fetuin-A auf Astacinproteasen untersucht worden. Damals war eine Hemmung von Meprin durch Fetuin-A festgestellt worden. Aus diesem Grund sollte in die vorliegende Analyse des Fetuins-B auch rekombinantes Fetuin-A mit einbezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei den Firmen *AppliChem*, *Carl Roth* und *Sigma-Aldrich* bezogen (die vollständigen Firmennamen mit Anschrift sind im Anhang zusammengefasst Tabelle A2). Zum Abwiegen der Chemikalien und anderer Komponenten wurde die Waage XT 6200 C-FR (*Precisa Gravimetrics*) oder eine Feinwaage R200D (*Sartorius*) eingesetzt. Für die Zubereitung der Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, aufbereitet mit einer Milli-Q Reference Anlage (*Merck Millipore*). Die pH-Werte der Lösungen wurden mit dem pH-Meter 765 Calimatic der Firma *Knick* überprüft. Zum Sterilisieren der Lösungen und Gegenständen wurde ein Varioclav H+P (*Thermo*) eingesetzt. Die Konzentrationen von Protein-, Peptid-, Chromophor- und DNA-Lösungen wurden mit Hilfe eines CARY® 300 Bio Spektrophotometers (*Varian*) oder eines NanoDrop NP-10000 (*PeqLab*) bestimmt. Für die Arbeiten mit Reaktionsgefäßen mit den Volumina von 0,5 bis 2 ml wurde die kühlbare Tischzentrifuge *Eppendorf* 5415R mit dem Rotor F45-24-11 verwendet. Die Zentrifugationsgefäße mit den Volumina 15 und 50 ml sowie 5 ml Reaktionsgefäße wurden in einer kühlbaren Zentrifuge 5804 R von *Eppendorf* mit den Rotoren F-34-6-38 oder A-4-44 zentrifugiert. Zum Homogenisieren und Inkubieren der Proben wurden die Sprout Tischzentrifuge (*Biozym*), ein Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries*) und ein Wasserbad (*Julabo*) verwendet. Proben mit den Volumina bis zu 300 ml wurden in der Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B mit dem Rotor SLA 3000 (*DuPont*) zentrifugiert. In der Zellkultur kam die Kühlzentrifuge Rotanta/RP mit dem Rotor 5094 zum Einsatz (beide *Hettich*). Enzymkinetische Untersuchungen wurden am multifunktionalen Spektrallesegerät Varioskan® Flash 3001 mit der Software SkanIt Software 2.4.3.RE (*Thermo*) durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) fanden im Gerät TGradient (*Biometra*) statt. Die elektrophoretische Trennung von DNA-Proben erfolgte in den horizontalen Kammern Mini 440.000 der Firma *Harnischmacher*. Die anschließende Geldokumentation wurde mit Hilfe eines TI 3 Leuchttisches (*Biometra*), eines CCD Videokameramoduls RA 1 (*Kaiser*) und des Bildbearbeitungsprogramms BioDoc Analyse 2,0 DBA U-464 (*Biometra*) durchgeführt. Dasselbe System wurde zur Dokumentation von Protein-Proben verwendet, die in Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch getrennt wurden. Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgte in den Vertikalkammern Mini Protean® 3 Cell in Kombination mit dem Netzgerät PowerPac™ HC, beides von *BioRad*. Das gleiche Netzgerät wurde während des Western-Blot -Verfahrens zur Stromversorgung der horizontalen Blotkammer Pegasus der Firma *Phase* verwendet. Die Dokumentation und Auswertung der Immuno-Chemilumineszenz

erfolgte am multifunktionalen bildgebenden System FUSION Xpress™ von *Vilber Lourmat* (Clarity™ Western ECL Substrat, *BioRad*) oder mit Hilfe von Amersham Hyperfilm ECL von *GE Healthcare* (Roti-Lumin Substrat, *Carl Roth*). Die Arbeiten mit Insektenzellen erfolgten unter einer Sterilbank LaminAir (*Heto-Holten*). Insektenzellkulturen wurden im Friocell (27°C, *MMM Medcenter Einrichtungen*), in einem Inkubator der Firma *Binder* (25°C) sowie im Inkubationsschüttler Multitron (27°C, *Infors*) bebrütet. Die Kultivierung von Bakterien erfolgte bei 37°C im Certomat® H Inkubationsschüttler (*Sartorius*) oder im Incucell Inkubator (*MMM Medcenter Einrichtungen*). Die Hitzeinaktivierung von Baculoviren wurde im Wärmeschrank der Firma *Binder* bei 70°C durchgeführt. Mikroskopiert wurde mit einem fluoreszenzfähigen Gerät DMI 3000B der Firma *Leica*. Pipettierarbeiten wurden mit Pipetten der Firma *Gilson* (Pipetman 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 10-200 µl und 100-1000µl) durchgeführt. Außerdem wurden im Bereich von 1-5 ml die Pipette Labmate von *Abimed* und bei der Arbeit mit Mikrotiterplatten eine Research Plus Mehrkanalpipette 10-100 µl oder Multipette Plus von *Eppendorf* verwendet. Zum Bedienen von serologischen Pipetten wurde eine Pipetus® Zellkulturpipettierhilfe von *Hirschmann Laborgeräte* eingesetzt.

Die regelmäßig verwendeten Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen: *Sarstedt* (Zentrifugationsröhrchen 15 ml und 50 ml; Reaktionsgefäße für PCR, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml; 0,2-10µl, 2-200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen; serologische Pipetten; Zellschaber; Filtrationseinheiten Filtroporus S 0.22 und 0.45 und Petrischalen), *Thermo* (Zellkulturflaschen Nunc™ EasyFlask™ Filt; Mikrotiterplatten; Polypropylen Säulchen für Affinitätschromatographie; Zeba™ Micro Entsalzungssäulchen und alle Medien mit Zusätzen für die Zellkultur Gibco™), *Eppendorf* (5 ml Reaktionsgefäße; Combitips Advanced® für Multipette), *Carl Roth* (Standard Makro (1-5 ml) Pipettenspitzen und MultiFlex® (1-200 µl) Spitzen für Gelproben; Dialyseschlauch mit Ausschlussgröße von 14 kDa) und *Merck Millipore* (Filtrereinheiten Amicon® Ultra 0,5 ml, 4 ml und 15 ml).

Selten verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien werden im Text einzeln erwähnt.

2.2 DNA-Konstrukte für die heterologe Proteinexpression

Im Laufe dieser Arbeit wurden fünf rekombinante Proteine hergestellt. Ihre Herstellung beinhaltete gentechnische Methoden wie: Anfertigung von Expressionsvektoren, Vervielfältigung der rekombinanten DNA in Bakterien, PCR und die Analyse der DNA mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese.

Rekombinante Baculoviren mit dem inserierten murinen Ovastacin (Q6HA09) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. André Hildebrand angefertigt und amplifiziert (HILDEBRAND, 2013;

DIETZEL ET AL., 2013). Die Konstrukte für die Herstellung von rekombinantem murinen Fetuin-B (Q9QXC1, FB_WT_4, 1209 bp) und seinen mutanten Formen (FB_L1L1_4, 1209 bp und FB_HY_L1L1, 1215 bp) sowie für rekombinantes murines Fetuin-A (P29699, FA_WT, 1080 bp) wurden bei der Firma *Life Technologies* in Auftrag gegeben und im Wunschvektor pFastBac1 in lyophilisierter Form geliefert. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm GeneOptimizer auf der Plattform GeneArt™ Gene Synthesis der *Life Technologies* für die Expression in Insektenzellen optimiert. Außerdem wurde die DNA in allen vier Fällen so modifiziert, dass daraus translatierte Proteine an ihrem C-Terminus einen 6 x His-tag enthielten. Vektorkarten und die DNA- sowie Protein-Sequenzen sind dem Anhang (Abbildungen A1-A6) zu entnehmen.

2.2.1 Hitzeschocktransformation

Die lyophilisierte DNA (FB_WT_4, FB_L1L1_4, FB_HY_L1L1 und FA_WT sowie pFASTBac1 ohne Insert - weiter im Text als Mock bezeichnet) wurde in Diethyldicarbonat behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst, sodass die Konzentration 0,2 ng/ml betrug. Superkompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) vom Stamm DH10Bac (*Invitrogen*) wurden schonend auf Eis aufgetaut. Zu je 70 µl Bakteriensuspension wurden 5 µl der jeweiligen DNA (1 ng) gegeben und vorsichtig durchgemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des Ansatzes auf Eis. Für die Transformation wurde das Bakterien-DNA-Gemisch für 45 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Durch diesen kurzen Hitzeschock wurde die Bakterienzelloberfläche für die DNA durchgängig gemacht, woraufhin sie in das Bakterium eingebracht werden konnte (BERGMANS ET AL., 1981). Nach anschließender Inkubation auf Eis für weitere 2 min wurde der Ansatz mit 900 µl SOC-Medium überschichtet, das auf 37°C vorgewärmt war (*Invitrogen* Tabelle 1). Die Bakteriensuspension wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 3-4 h bei 37°C und 180 rpm bebrütet. Nach diesem Inkubationsschritt, der der Vermehrung der Bakterien diente, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dafür wurde den 100 µl der Ausgangssuspension 900 µl SOC-Medium zugegeben, es wurde auf gleiche Weise weiter vorgegangen. Die letzte Verdünnung enthielt nur 10^{-3} Bakterien der Ausgangslösung. Durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 2000 x g wurden die Bakterienzellen anschließend pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und resuspendiert. Die wieder in Lösung aufgenommenen Bakterienzellen wurden auf je eine LB-Agarplatte (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) gleichmäßig verteilt. Die Agarplatten wurden 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Vermeidung des übermäßigen Wachstums von Bakterienkolonien wurden die Platten für weitere 24 h bei 4°C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Medien für die Kultivierung von *E. coli* DH10Bac

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10g NaCl 10g Trypton 5g Hefeextrakt ad 1l Milli-Q-H ₂ O pH7,0
LB-Agar	pro 1 LB-Medium 15g Agar 50µg/ml Kanamycin 10µg/ml Tetracyclin 7µg/ml Gentamycin 100µg/ml X-Gal 40µg/ml IPTG
SOC-Medium (Invitrogen)	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

2.2.2 Kontrolle erfolgreicher Transformation und Transposition

Die Bakterien vom *E. coli* DH10Bac Stamm enthalten neben dem Bacmid, einem aus *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) abgeleiteten Vektor, ein sogenanntes Helferplasmid. Die für die Resistenzen kodierenden Gene sind in diesem System wie folgt verteilt. Das Helferplasmid enthält das Gen für die Tetracyclinresistenz und das Bacmid enthält ein Kanamycinresistenzgen. Wird das in den pFastBac1-Vektor integrierte Zielgen in die DH10Bac-Zellen eingebracht, erhalten die Bakterien über das im Vektor enthaltene Gentamycinresistenzgen eine dritte Resistenz. Nur wenn das Bakterium alle drei Resistenzen aufweist, ist es fähig auf dem Kanamycin, Tetracyclin und Gentamycin haltigen LB-Agar zu überleben. So wird garantiert, dass nur erfolgreich transformierte Bakterien Kolonien bilden können. Die Kontrolle der Transposition - ein Prozess bei dem das in das pFastBac1 inserierte Wunschgen in die Expressionskassette des Bacmids übertragen wird (LUCKOW ET AL., 1993) - erfolgt mittels der sogenannten Blau-Weiß-Selektion. Die letztere beruht auf der Tatsache, dass das Bacmid in seiner Sequenz ein Gen enthält, das für ein LacZ α -Peptid kodiert. Dieses Gen wurde so modifiziert, dass es die Bindungsstellen mini-attTn7 für

ein bakterielles Transposon enthält. Wenn das Leseraster des LacZ-Gens durch eine Transposition unterbrochen wurde, können die Bakterien nach Induktion mit Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG im LB-Agar) nicht mehr Enzym β -Galaktosidase exprimieren (*E. coli* DH10Bac LacZ). Dieses Enzym ist in der Lage dem LB-Agar beigefügtes chromogenes Substrat X-Gal zu spalten, was zu einer, mit der Zeit fortschreitenden, Blaufärbung der gesamten Kolonie führt. Dies tritt im Falle einer erfolgten Transposition nicht ein, und die Kolonien bleiben weiß. Die Transposition wird durch das Enzym Transposase, kodiert von einem Gen im Helferplasmid, ermöglicht. Allerdings ist die Unterscheidung von blauer und weißer Färbung der Kolonien nicht immer sicher, da die Farbintensität in den ersten 48-72 h nicht stark ausgeprägt ist. Aus diesem Grund wurden die ausgewählten Kolonien einem Vereinzelausstrich auf neuen LB-Agarplatten unterzogen. Nach 24 h Inkubation bei 37°C war es schließlich möglich die weißen Kolonien zu identifizieren.

2.2.3 Übernachtskulturen von *E. coli* DH10Bac im Flüssigmedium

Zur Vermehrung von transformierten Bakterien wurden mehrere weiße und zur Kontrolle auch blaue und weiße Mock Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in die Röhrchen mit je 5 ml LB-Medium überführt. Das LB-Medium enthielt als Selektionsmittel 50 μ g/ml Kanamycin, 10 μ g/ml Tetracyclin und 7 μ g/ml Gentamycin. Die beimpften Röhrchen wurden anschließend über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

2.2.4 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Bacmid-DNA

Die Bacmid-DNA wurde mit Hilfe des Nucleo Spin Quick Pure (*Macherey-Nagel*) Plasmid-Kits aus Bakterienzellen isoliert und gereinigt. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers für die Isolation von *low-copy* Plasmiden gearbeitet. Die Elution erfolgte mit 50 μ l auf 70°C vorgewärmtem DEPC-Wasser. Bei der Handhabung von Bacmid-DNA war Vorsicht geboten, da die Bacmide mit 135 kb große und fragile Moleküle darstellen.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte photometrisch. Dabei wurden die jeweiligen Proben mit DEPC-Wasser verdünnt (1/20) und die optische Dichte (OD) der Lösung bei 260, 280 und 320 nm ermittelt (SAMBROOK ET AL., 1989). Die Konzentration der DNA wurde wie folgt errechnet: $C_{DNA} = OD_{260nm} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$ (hier 20).

Der Quotient aus OD_{260nm} und OD_{280nm} gibt Auskunft darüber, wie sauber die DNA-Probe in Hinsicht auf Proteinverunreinigung ist. Der Wert einer reinen DNA-Lösung liegt bei 1,8. Zu beachten ist außerdem OD bei 320 nm (WITTE UND GEPRÄGS, 1974; OWEN, 2000). Sie wird jeweils von den bei OD_{260nm} und OD_{280nm} erhaltenen Werten als ein Korrekturwert abgezogen.

2.2.5 Kontrolle der Bacmid-DNA mittels PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Bei zufriedenstellender Konzentration und Reinheit der Bacmid-DNA blieb zu überprüfen, ob der Einbau des Wunschgens korrekt erfolgt war. Da das Bacmid mit seiner Größe von über 135 kb für die direkte Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese ungeeignet ist, wurde die Expressionskassette des Bacmids mit Hilfe von PCR amplifiziert. Die PCR-Proben wurden später in einem Agarosegel separiert und analysiert. Die PCR stellt eine Methode zur Vervielfältigung der DNA-Abschnitte unter Laborbedingungen dar (SAIKI ET AL., 1985; MULLIS ET AL., 1986).

In dieser Arbeit wurden Bac_rev- und Bac_for-Primer (Auftragungssynthese bei der Firma *Biomers.net* siehe Tabelle 3) benutzt, die bei dem Annealing die mini-*attTn7* Regionen im LacZ α -Gen des Bacmids flankieren. Das verwendete Programm ist in der Tabelle 2 gelistet. Dabei ist zu beachten, dass zur Vermeidung von unspezifischen Primerhybridisierungen die Elongation-Temperatur auf 72°C im Vergleich zur Annealing-Temperatur (57°C) erhöht wurde. Die Reaktionsgemische beinhalteten außer der Bacmid-DNA und den Primern den *OneTaq-Polymerase 2x Master-Mix* der Firma *New England Biolabs*, welcher alle weiteren notwendigen Komponenten enthielt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Nach Ablauf des PCR-Programms wurden die Proben bei 4°C im PCR-Gerät gelagert, bis sie meist am nächsten Tag der Untersuchung mittels Agarosegel-Elektrophorese unterzogen wurden. Dafür wurden zunächst 10 μ l der zu analysierenden DNA-Probe mit 2 μ l 6 x Probenpuffer (PP, für Zusammensetzung siehe Tabelle 4) versetzt. Anschließend wurden die 1,5 %igen Agarosegele vorbereitet, indem 0,75 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer (Tabelle 4) gelöst wurde. Um zu erreichen, dass die Agarose sich vollständig löst, wurde das Gemisch mehrmals im Mikrowellenofen erhitzt. Durch das Verdampfen des Wassers entstandener Gewichtsverlusts, wurde mit Milli-Q-Wasser ausgeglichen. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine Gießvorrichtung gegeben und 3 μ l wässrige Ethidiumbromidlösung [10mg/ml] zugefügt. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in der horizontalen Elektrophoresekammer platziert und mit TAE-Puffer bedeckt. Neben den Proben wurden 100 bp und 1 kb DNA-Standards mit aufs Gel aufgetragen (Markerkarten siehe Anhang Abbildung A10). Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für eine Stunde.

Das Bandenmuster wurde nach dem Gellauf im UV-Licht (254 nm) anhand der Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids visualisiert.

Es wurden die Banden bei 300 bp für leere Bacmide (blau Kolonie), bei 2300 bp für Mock-Bacmide und bei der Größe des Wunschgens plus 2300 bp erwartet.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifikation der Expressionskassette der Bacmid-DNA

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zykluszahl
initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	60	30
Annealing	57	45	30
Elongation	72	420	30
finale Elongation	72	420	1

Tabelle 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Bacmid-PCR

Komponente	Zusammensetzung im Endvolumen 20 µl
8 µl Bacmid-DNA ca. [5 ng/µl]	ca. 40 ng
1 µl Bac_for-Primer	1 µM
1 µl Bac_rev-Primer	1 µM
10 µl <i>OneTaq-Polymerase 2x Master-Mix</i>	20 mM Tris-HCl 22 mM KCl 22 mM NH ₄ Cl 1,8 mM MgCl ₂ 5 % Glycerol 0,05% Tween®20 0,06% IGEPAL®CA-630 0,2 mM dNTPs 25 units/ml OneTaq®DNA-Polymerase pH 8,9
Bac_for-Primer (pUC/M13 forward)	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
Bac_rev-Primer (pUC/M13 reverse)	5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'

Tabelle 4: Zusammensetzung der Komponenten für die Agarosegel-Elektrophorese

Komponente	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris 1 µM EDTA pH 8
6 x Probenpuffer	1 mM EDTA 50 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

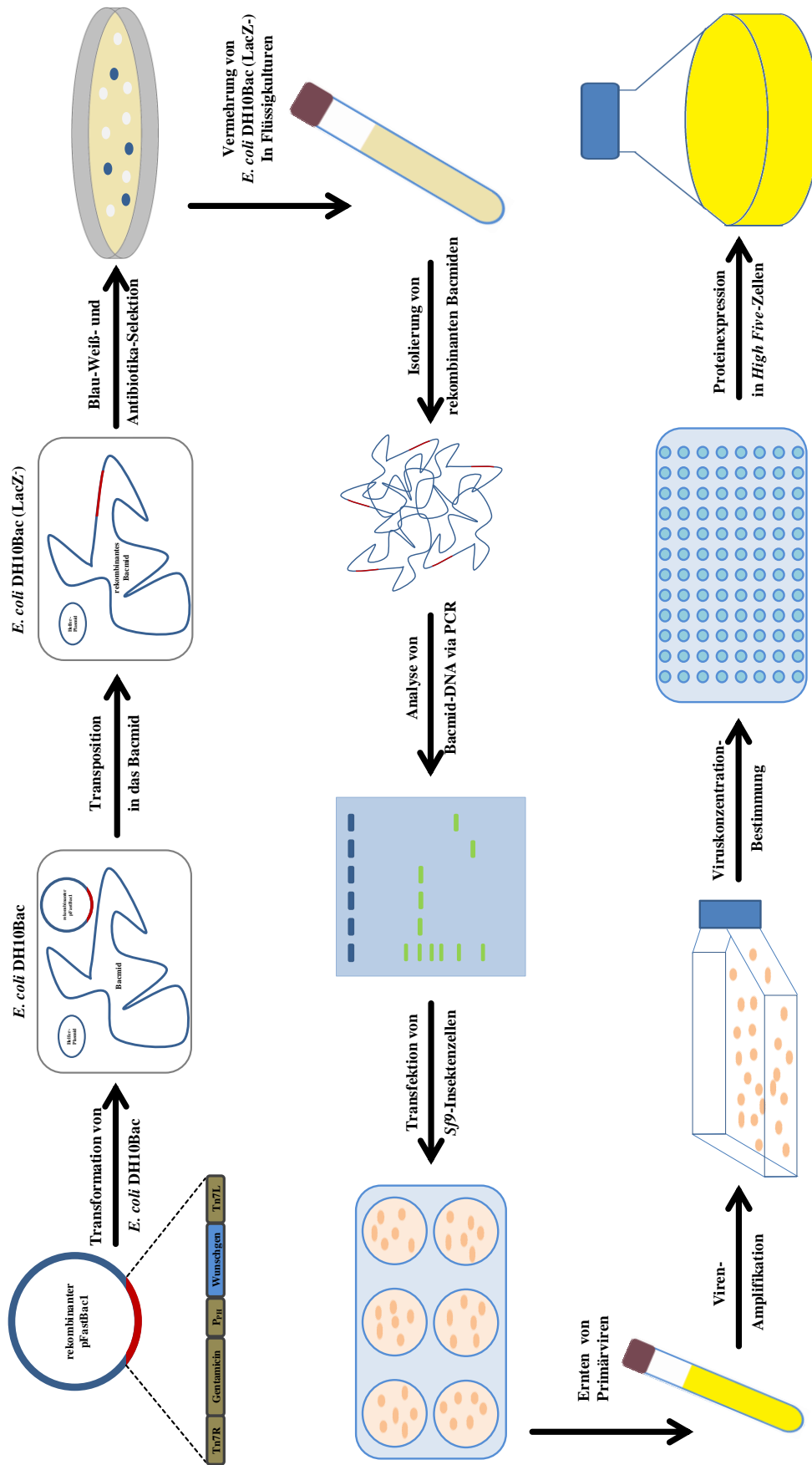


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Teilschritte des Baculovirus-Expressionssystems

Das rekombinante Donor-Vektor pFastBac1 wird in die *E. coli* DH10Bac Hitzeschock transformiert. In den Zellen erfolgt die Transposition des Wunschengenes flankiert von Tn7-Sequenzen in das Bacmid. Nach einer Blau-Weiß- und Antibiotika-Selektion der *E. coli* DH10Bac (LacZ) Bakterien werden sie in Flüssigmedium vermehrt. Es folgen die Isolierung und anschließende Überprüfung der rekombinanten Bacmid-DNA. Die daraufhin folgende Transfektion von Sf9-Insektenzellen führt zur Entstehung von Primärviren, welche in mehreren Schritten Amplifiziert werden. Nach der Qualitätskontrolle der vermehrten Viren findet die Proteineexpression in den *High Five* - Insektenzellen statt.

2.3 Baculovirus-Expressionssystem

Die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen wurde in Anlehnung an das Handbuch *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System* der Firma *Invitrogen* durchgeführt (KING UND POSSEE, 1992; LUCKOW, 1991; O'REILLY ET AL., 1992). Dabei wird das Wunschgen in das Donorplasmid-pFastbac1 (siehe Anhang A2) integriert und unter die Kontrolle des starken Baculovirus-spezifischen Polyhedrin-Promoters gestellt. Die inserierte DNA-Sequenz wird von Tn7-Transposonerkenngungsregionen flankiert. Bei der Transformation des Donor-Vektors in die *E. coli* DH10Bac Zelle wird der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Tn7-Regionen, inklusive Wunschgen und Promotor, in das Bacmid transponiert. Dafür ist ein in *E. coli* DH10Bac enthaltenes Helferplasmid zuständig. Die Kontrolle der Transformation und Transposition erfolgt über eine Blau-Weiß-Selektion und Antibiotikaresistenzen (siehe Abschnitte 2.2.2). Das so hergestellte rekombinante Bacmid kann leicht in die Insektenzellen transfiziert werden (siehe Abschnitt 2.4.2). In den Insektenzellen (in diesem Fall *Sf9* CCLV-RIE 203, *Friedrich-Löffler Institut*) werden die rekombinanten Baculoviren (Stammviren) gebildet. Mit diesen erfolgt anschließend die Infektion weiterer Insektenzellen (*Sf9* oder BTI-TN-5B1-4/*High Five*-Zellen CCLV-RIE 305, *Friedrich-Löffler Institut*). Das AcMNPV, von dem das Bacmid abgeleitet wurde, ist ein natürliches Pathogen der *Noctuidae* (Eulenfalter). Die hier verwendeten *Sf9*- und *High Five*-Zelllinien wurden aus Organismen dieser Familie gewonnen. Die Baculoviren werden in den *Sf9*-Zellen amplifiziert (Abschnitt 2.4.3). Die Proteinexpression findet anschließend in *High Five*-Zellen statt (Abschnitt 2.4.5).

Abbildung 5 fasst alle Arbeitsschritte zusammen.

2.4 Insektenzellkultur

Um die vielseitige Analyse der Metalloprotease Ovastacin und der o.g. Fetuine durchführen zu können, mussten sie in möglichst naturnahem Zustand vorliegen. Aus diesem Grund sollten die zur Expression eingesetzten Zellen korrekte posttranslationale Modifikationen der Proteine, wie die Glykosylierung, ausführen können. Die Verwendung von Säugerzellen erlaubt die Gewinnung von richtig glykosylierten und gefalteten nativen Proteinen (BROOKS, 2006). Die geringen Ausbeuten und eher aufwändige Haltung der Zellen dieser Art machen deren Einsatz jedoch eher für *in cellulosa* Experimente sinnvoll. In dieser Arbeit wurden die Insektenzellen eingesetzt. Die beiden verwendeten Zelllinien *SF9* CCLV-RIE 203 und BTI-TN-5B1-4/*High Five* (weiter nur *Sf9* und *High Five*) wurden vom *Friedrich-Löffler Institut* in Greifswald bezogen. Ihren Ursprung nehmen sie von Organismen der Familie *Noctuidae*. *Sf9*-Zelllinie wurde aus Ovarien des Puppenstadiums von *Spodoptera frugiperana* und *High Five*-Zelllinie aus

Ovarien von adulten *Trichoplusia ni* entwickelt (VAUGHN ET AL., 1977; SAARINEN ET AL., 1999). Die beiden eignen sich besonders gut für den Einsatz im Baculovirus-Expressionssystem (Abschnitt 2.3) und vereinen in sich vorteilhafte Seiten der Bakterien- und Säugerzellen: unkomplizierte Haltung und relativ hohe Effizienz auf einer Seite und posttranslationalen Modifikationen von exprimierten Proteinen auf der anderen.

2.4.1. Kultivierung von Sf9-Zelllinie

Die Sf9-Zellen wurden in erster Linie zur Virusgewinnung und -amplifikation benutzt. Außerdem wurde mit ihrer Hilfe die Qualität der hergestellten Virussuspensionen bestimmt. Ihre Kultivierung erfolgte adhärent in belüfteten Kulturflaschen in Grace's Insektenkulturmedium (*Thermo*), in der Regel mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Antibiotika (Tabelle 5). Die Zellen erreichten binnen 3-4 Tagen eine Konfluenz von 80 %. Daraufhin wurde das alte Medium abgegossen. Die Zellen wurden mit frischem Medium überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen mit einer Umsetzrate von 1:4 verteilt. Die TC25 Kulturflaschen enthielten immer 10 ml Medium, die TC75 20 ml Medium und die TC175 50 ml Medium (gilt auch für *High Five*-Zellen). Die Bruttemperatur betrug 25°C.

2.4.2 Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA

Die Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA fand in 6-Well Mikrotiterplatten statt. Dafür wurden jedem Well $0,9 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium zugefügt. Das Medium enthielt in diesem Fall kein FCS und nur 0,5 % Penicillin/Streptomycin-Mischung. Die Zellen hefteten sich innerhalb einer Stunde bei 25°C am Gefäßboden an.

Während dieser Inkubation wurden die Transfektionsansätze vorbereitet. Dafür wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 2 µg DNA in 200 µl Serum- und Antibiotika-freiem Medium verdünnt. Zu der Lösung wurden 16 µl des X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (*Roche*) möglichst mittig pipettiert und vorsichtig gemischt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Ansätze bei 25°C. Anschließend wurden 1800 µl Serum- und Antibiotika-freies Medium in die Reaktionsgefäße dazu pipettiert, so dass das Gesamtvolumen des Ansatzes 2 ml betrug.

Die nun adhärennten Zellen wurden mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Nach dem Entfernen des Waschmediums wurden die Zellen mit den Transfektionsansätzen vorsichtig überschichtet. Über die folgenden 24 h wurden die Mikrotiterplatten bei 25°C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel, wobei dem Nährmedium jetzt 1 % Antibiotika zur Unterbindung von Infektionen zugesetzt wurde. Die in den Zellen hergestellten Primärviren konnten nach

insgesamt 72 h geerntet werden. Alle Ansätze wurden mehrfach und parallel mit verschiedenen Bacmid-Klonen ausgeführt, außerdem erfolgten die Kontrollen mit Mock-Bacmiden und nicht transfizierten Zellen.

2.4.3 Ernte der Primärviren und ihre Amplifikation

Nach 72 h wurden die Tranfektionsansätze in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 2500 x g zur Abtrennung von Zellresten zentrifugiert und der Überstand wurde in neue Gefäße überführt. Diese Primärviren-Suspension wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Anzahl der Viruspartikel in Primärvirus-Suspension ist erfahrungsgemäß nicht hoch genug, um diese direkt für die Proteinexpression einzusetzen. Aus diesem Grund wurden die Viren in vier Amplifikationszyklen in *Sf9*-Zellen in Serum-freiem Medium vermehrt. Dazu wurden 0,5 ml der Primärviren-Suspension zu 80 % konfluenten *Sf9*-Zellen in einer TC25 Kulturflasche gegeben. Die Ernte der Viren aus Passage zwei erfolgte, wie in allen anderen Fällen, nach 72 h durch Zentrifugation des Kulturüberstandes. Nach Virenpassage drei und fünf erfolgte die Analyse der Infektiosität (Abschnitt 2.4.4). Die fünfte Virensuspension erhielt die Bezeichnung Masterpool und wurde bei der Proteinexpression in *High Five*-Zellen eingesetzt (Abschnitt 2.4.5).

2.4.4. Analyse der Virussuspensionen auf ihre Infektiosität

Die Qualitätskontrolle von hergestellten Viren erfolgte mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode. In die erste Reihe einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden 100 µl der zu untersuchenden Virussuspension gegeben. In die Kavitäten der Reihen 2-12 wurden 90 µl FCS-freies Nährmedium vorgelegt. Aus Reihe eins wurden 10 µl Virussuspension in die Reihe zwei überführt und gut durchmischt. Dadurch wurde in der Reihe zwei eine zehnfache Verdünnung der Ausgangslösung erreicht. Auf gleiche Weise wurde die Verdünnungsreihe bis zur Reihe elf fortgesetzt. Die maximale Virusverdünnung betrug demnach 10^{-10} . Der Reihe zwölf wurde keine Virussuspension zugesetzt, sie diente der Kontrolle. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl einer *Sf9*-Zellsuspension mit der Konzentration 10^4 Zellen pro ml pipettiert.

Nach 72 h Inkubation bei 25°C wurde das infektiöse Medium aus den Ansätzen entfernt. Die Zellen wurden mit 100 µl Dulbecco's Phosphat-Puffer (PBS) (*Sigma-Aldrich*, Calcium und Magnesiumfrei, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 0,2 g/l KCl, 8,0 g/l NaCl, 1,15 g/l Na_2HPO_4 , pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellfixierung mit 100 µl eiskaltem Ethanol (vergällt mit Petrolether, 98 %) für 20 min bei -20°C. Nach dem Entfernen des Ethanols wurden die Zellen mit 100 µl PBS überschichtet und für 10 min rehydriert. Anschließend wurde der PBS-Puffer abgesaugt und durch 50 µl einer Primärantikörperlösung ersetzt. Bei den Antikörpern handelte

es sich um eine 1:200 in PBS verdünnten *Mouse-anti-His-tag* Antikörper Lösung von *Qiagen*. Nach Inkubation (1 h bei Raumtemperatur) wurde 2-mal mit je 100 µl PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Ausschluss von direktem Licht vollzogen. Zunächst wurden die Zellen mit 50 µl einer 1:400 in PBS verdünnten Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG Lösung (*Invitrogen*) als Sekundärantikörper überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT folgten zwei Waschschrte mit PBS. Abschließend wurden die Zellen mit 100 µl DABCO-Puffer überschichtet (36 g Glycerin; 36 ml H₂O; 3 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO), 60 µg 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und 72 ml PBS).

Zur vollen Entwicklung von Fluoreszenzsignalen wurde die Mikrotiterplatte für ein bis zwei Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Erfassung erfolgte anschließend am Fluoreszenzmikroskop unter Einsatz dreier Lichtkanäle: Durchlicht-Kanal, Kanal für grüne Fluoreszenz des Sekundärantikörper bei 488 nm und einem Kanal für blaue, durch den DAPI-Farbstoff verursachte, Fluoreszenz bei 461 nm. Zur Kontrolle der gesamten Zellzahl und Zellmorphologie wurden die Ansätze im Durchlicht- und DAPI-Kanal betrachtet. Ob die Zellen mit Viren infiziert waren, wurde im Alexa 488-Kanal beobachtet.

Die Ergebnisse von mehreren Parallelansätzen wurden gemittelt. Der Kehrwert der maximalen Verdünnung der Virussuspension, bei der noch grünfluoreszierende Zellen zu erkennen waren, wurde als Viruskonzentration in 100 µl Ausgangssuspension definiert. Beispielsweise war die Viruskonzentration 10⁷ in 100 µl oder 10⁸ in 1 ml der untersuchten Suspension, wenn Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 10⁻⁷ noch beobachtet wurde.

2.4.5 Kultivierung der *High Five*-Zelllinie

Die robusten *Sf9*-Zellen wurden erfolgreich für die Virusherstellung verwendet, sie eigneten sich allerdings nur bedingt zum Einsatz in Proteinexpressionen. Zu diesem Zweck wurde die *High Five*-Zelllinie kultiviert, die eine bis zu fünffach höhere Expressionsrate als *Sf9*-Zellen besitzt. Die Haltung der *High Five*-Zellen geschah in Kulturflaschen als einschichtigen Zellrasen oder in Suspension. Die Zellen in Kulturflaschen wurden für Probeexpressionen verwendet oder dienten der Sicherung der Zelllinie. Ihre Kultivierung erfolgte im Allgemeinen wie bei den *Sf9*-Zellen (Abschnitt 2.4.1). Unterschiede bestanden darin, dass die Umsetzrate hier 1:6 betrug, Express Five SFM Serum-freies Kulturmedium mit 1 % Antibiotika und 10 % Glutamin als Zusätze verwendet wurde (Tabelle 5) und die Bruttemperatur bei 27°C lag.

Die Haltung der Zellen in Suspension erfolgte in 100 ml des gleichen Mediums und bei gleicher Temperatur in Spinner-Flaschen unter kontinuierlichem Rühren bei 60 rpm, was das Absetzen der Zellen am Boden der Flasche verhinderte und den Gasaustausch im Medium gewährleistete.

MATERIAL UND METHODEN

Die Passagierung der Zellen erfolgte hier ebenfalls in 3-4 tägigem Rhythmus. Wobei die Zelldichte einen Wert von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten wurde. Das Ansetzen neuer Spinner-Flaschen erfolgte, indem ein Teil der Suspension aus der vorherigen Passage mit dem frischem Medium auf $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt wurde. Die in den Spinner-Flaschen an die Haltung in der Suspension eingewöhnten Zellen wurden für die Proteinexpression ebenfalls mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einem Fernbach-Kolben angesetzt und für drei Tage bei 27°C und 60 rpm bebrütet. Nach dem die Zelldichte einen Wert um $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht hatte, wurden dem Ansatz 20 ml Virussuspension aus dem entsprechenden Masterpool zugegeben. Das gesamte Ansatzvolumen betrug dann 420 ml. Die Kolben wurden für weitere 72 h im Inkubationsschüttler bei 27°C und einer Schüttelfrequenz von 60 rpm gehalten.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung von Insektenzellen

Medium	Zusätze	Zelllinie/ Verwendung
Grace's Insect Medium	10 % (v/v) FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Haltung der <i>Sf9</i> -Zellen
Grace's Insect Medium	50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin	<i>Sf9</i> -Zellen, Transfektion
Grace's Insect Medium	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	<i>Sf9</i> -Zellen, Virusamplifikation
Express Five SFM	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 16,5 mM Glutamin	Haltung der <i>High Five</i> -Zellen

2.5 Proteinreinigung

Der Inhalt von Fernbach-Kolben wurde 20 min bei 1521 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen (DUONG-LY UND GABELLI, 2014). Hier wurde eine Endkonzentration des Ammoniumsulfats von 60 % (entspricht 390 g Salz pro Liter Lösung) gewählt. Das Salz wurde in kleinen Portionen unter ständigem aber langsamem Rühren zu dem zellfreien Kulturüberstand gegeben. Die Zugabe erfolgte über vier Stunden bei 4°C. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gemisch in zwei Schritten (120 min und 60 min) bei 10414 x g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Proteinpellet wurde im entsprechenden Puffer aufgenommen (Tabelle 6). Das Volumen des Aufnahmebuffers betrug ein Zehntel des Ausgangsvolumens. Somit wurde eine Konzentrierung der Proteine erreicht.

Tabelle 6: Verwendete Arbeitspuffer für exprimierte Proteine

Protein	Pufferzusammensetzung
Ovastacin-FL-Strep	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (bei 4°C) weiter im Text als Ovastacin-Dialysepuffer
Fetuin-B_WT, Fetuin-B_L1L1, Fetuin-B_HY_L1L1 und Fetuin-A_WT	100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,8 (bei 4°C) weiter im Text als Fetuin-Dialysepuffer

Das Ammoniumsulfat wurde anschließend durch Dialyse gegen den gewünschten Puffer (10-faches Volumen) mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa bei 4°C unter Rühren entfernt. Der Puffer wurde nach je 45 min gewechselt. Nach dem fünften Pufferaustausch wurde der Ansatz über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde der Inhalt des Dialyseschlauches bei 9000 x g und 4°C 15 min zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu entfernen.

2.5.1 Affinitätschromatographie an einer Strep-Tactin Säule

Das Ovastacin-FL-Strep wurde durch eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (SCHMIDT UND SKERRA, 2007) bei 4°C gereinigt. Die zu reinigende Proteinlösung wurde zwei Mal über Strep-Tactin-Säulenbett (*IBA*), das zuvor mit dem Ovastacin-Dialysepuffer equilibriert wurde, mit der Pipette aufgetragen. Anschließend wurde mit dem selben Puffer gewaschen bis die OD_{280nm} gegen Null ging. Eluiert wurde mit Ovastacin-Dialysepuffer, welchem vorher 2,5 mM D-Desthiobiotin (*IBA*) zugesetzt wurde. In den Elutionsfraktionen (à 2ml) wurde die OD_{280nm} gemessen (siehe Abschnitt 2.6.1). Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -20°C. Die Säulenmatrix wurde wie vom Hersteller empfohlen regeneriert und bis zur nächsten Anwendung aufbewahrt.

2.5.2 Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA Säule

Für die mit His-tag exprimierten Proteine FB_WT_4, FB_L1L1_4, FB_HY_L1L1 und FA_WT wurde eine Ni-Nitrilotriessigsäure (=NTA)-Affinitätschromatographie (*Qiagen*) benutzt (PETTY, 2001). Als Vorbereitung wurde die Säule mit dem Fetuin-Dialysepuffer equilibriert, der zusätzlich 25 mM Imidazol enthielt. Ebenso wurde die zu reinigende Proteinlösung auf 25 mM Imidazol eingestellt. Die beiden Schritte wurden zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen an die Säulenmatrix vorgenommen. Es folgte eine zweimalige Beladung der Säule mit der Proteinlösung. Daraufhin wurde mit 50 mM Imidazol gewaschen und die OD_{280nm} in den 2ml Fraktionen kontrolliert. Die Elution der Proteine erfolgte mit 200 mM Imidazol (im Fetuin-Dialysepuffer). Wegen der Eigenabsorption des Imidazols war die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen nicht möglich. Daher wurden alle Elutionsfraktionen vereint und gegen Fetuin-Dialysepuffer umgepuffert (zur

Umpufferung siehe Abschnitte 2.5 und 2.6.2). Die Proteinlösung wurde nach Konzentrationsbestimmung im Photometer in 2 ml Fraktionen portioniert und bei -20 °C gelagert. Die Säulenmatrix wurde wie vom Hersteller empfohlen regeneriert und bis zur nächsten Anwendung aufbewahrt.

2.6 Proteinbiochemie

2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels UV-Vis-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von UV-Vis-Spektroskopie. Es wurde Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie der Cystine, bei 274 nm, 280 nm und 250-300 nm bestimmt. Die Überlagerung der gelisteten Absorptionsmaxima der jeweiligen Chromophore resultiert in einem Absorptionsmaximum für globuläres Protein bei 280 nm und einem charakteristischen Proteinabsorptionsspektrum. Die Proben wurden in einer Mikroküvette mit Probenvolumen von 80 oder 120 µl bzw. als 1,5 µl Tropfen bei Benutzung des NanoDrop Spektrophotometers (*PeqLab*) gemessen. Das Spektrum im Bereich zwischen 240 nm und 350 nm wurde aufgenommen. Die Werte bei 280 nm und 340 nm wurden notiert. Parallel erfolgte der Abgleich mit jeweiligem Puffer in dem die Probe gelöst wurde. Wegen der Benutzung von Küvetten mit kleinem Probenvolumen war es oft zu einer so genannten Drift des Spektrums gekommen. Die Korrektur des Wertes bei 280 nm erfolgte durch Subtrahieren von diesem des Wertes bei 340 nm (OWEN, 2000). Dies geschah bei Benutzung des CARY® 300 Bio Spektrophotometers manuell und im NanoDrop Spektrophotometer (*PeqLab*) automatisch.

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte unter Anwendung der Lambert-Beer-Gleichung:

$$OD_{280} = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{280} \cdot c \cdot d \rightarrow c = \frac{OD_{280}}{\varepsilon_{280} \cdot d}$$

Die Symbole in der Formel bedeuten: OD_{280} - optische Dichte der Lösung bei 280 nm (nach der Korrektur), I_0 - Lichtintensität vor dem Auftreffen auf die Probe, I - Lichtintensität nach dem Verlassen der Probe, ε_{280} - molarer Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins, c - Konzentration der Lösung und d - die Schichtdicke der vom Licht durchquerten Probe.

Der molare Extinktionskoeffizient (PACE ET AL., 1995) der verwendeten Proteine wurden entweder den Herstellerangaben entnommen oder der theoretische Wert mit Hilfe des auf dem von *ExpASy-Server: SIB Bioinformatics Resource Portal* bereitgestellten Programm *ProtParam* errechnet (www.expasy.org/protparam/).

2.6.2 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Millipore™ Amicon® Ultra Filtrationseinheiten. Dazu wurde die zu konzentrierende Lösung in Filtrationseinheiten mit der Ausschlussgröße von 30 kDa, die zuvor mit dem passenden Puffer gewaschen wurde, pipettiert. Es wurde bei maximal 4000 x g zentrifugiert, bis die Probe auf das gewünschte Volumen eingengt war. Der Filterdurchfluss wurde nach photometrischer Kontrolle verworfen und der Filterüberstand weiter verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Zum Pufferwechsel von Proteinlösungen mit Volumina von 0,5 ml bis 5 ml wurden ebenfalls Millipore™ Amicon® Ultra Filtrationseinheiten verwendet. Im Mikroliterbereich kamen Zeba™ Micro Entsalzungssäulchen zum Einsatz. Die Umpufferung mit Filtrationseinheiten wurde prinzipiell auf gleiche Weise wie die Konzentrierung der Proteinlösungen durchgeführt. Der Unterschied bestand darin, dass die konzentrierte Lösung mit gewünschtem Puffer verdünnt und wieder konzentriert wurde. Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt, bis der Puffer vollständig ausgetauscht war. Bei Benutzung von Entsalzungssäulchen wurden diese mit entsprechendem Volumen an gewünschtem Puffer beladen und 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde auf das Säulenbett die Probe pipettiert. Dabei erfolgte in der Säulenmatrix Pufferaustausch und die Probe konnte mittels erneuter Zentrifugation eluiert werden. Pufferaustausch von Proben mit Volumina über 5 ml erfolgte über die Dialyse im Dialyseschlauch wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C.

2.6.3 Konzentrierung von Proteinproben durch Fällung mit Natrium–Desoxycholat und Trichloressigsäure

Stark verdünnte Proteinproben wurden vor der Verwendung in SDS-PAGE (Abschnitt.2.6.4) mit Hilfe von 0,02 % Natrium–Desoxycholat (DOC) und 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Dafür wurde die Probe in einem Volumenverhältnis von 1/100 mit 2 % DOC-Lösung vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde dem Gemisch 100 % TCA-Lösung in einem Verhältnis von 1/10 des Ausgangsvolumens zugesetzt. Nach dem gründlichen Durchmischen der Lösungen wurde der Ansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C. Nach der Entfernung des Zentrifugationsüberstandes wurde das Pellet mit eiskaltem Ethanol (98 %) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet, bis kein Ethanolgeruch mehr wahrnehmbar war. Danach wurde das Proteinpellet in der gewünschten Menge Probenpuffer gelöst und konnte bei SDS-PAGE eingesetzt werden.

2.6.4 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Zusammensetzung der Proteinproben wurde mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, LAEMMLI ET AL., 1970) analysiert. Die Proben wurden für 5 min bei 98°C mit SDS denaturiert und mit Dithioerythrytol (DTT) reduziert (Probenpuffer siehe Tabelle 7). Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel- und Trenngelbereich. Das Sammelgel diente der Akkumulierung der Proben (bei 80 V) zur ihrer schärferen Auftrennung im Trenngel (bei 120 V). Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der Lauffront die untere Gelkante passiert hatte (Zusammensetzung der Gele: Tabelle 8).

Tabelle 7: Zusammensetzung bei der SDS-PAGE verwendeten Gebrauchslösungen

Lösung	Zusammensetzung
3-fach konzentrierter Probenpuffer =3x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl, pH 6,8 25 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (w/v) SDS, 120 mM DTT
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin 0,02 % (w/v) SDS, pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
TEMED (Tetramethyl-ethylen-diamin) Gebrauchslösung	10 % (v/v) im H ₂ O
APS (Ammoniumpersulfat) Gebrauchslösung	10 % (w/v) im H ₂ O

Tabelle 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Die angegebenen Mengen wurden zur Herstellung von zwei Polyacrylamidgelen verwendet.

Komponente	Trenngel 7,5 %	Trenngel 12 %	Trenngel 14 %	Sammelgel 3,8 %
Trenngel- /Sammelgelpuffer	2 ml	2 ml	2 ml	1 ml
H ₂ O	3,64 ml	2,68 ml	2,15 ml	2,44 ml
Rotiphorese®Gel 30 von Carl Roth (30% Acrylamid, 0,8% Bis-Acrylamid)	2 ml	3,2 ml	3,73 ml	506 µl
TEMED Gebrauchslösung	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl
APS Gebrauchslösung	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl

2.6.5 Färbung der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteinbanden im Polyacrylamidgel mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 visualisiert. Es wurde die hintergrundfreie Färbung nach KANG ET AL. angewendet (KANG ET AL., 2002; Zusammensetzung siehe Tabelle 9), bei der nur die Proteine und nicht die Gelmatrix gefärbt werden. Diese relativ sensitive Methode erlaubt unter guten Bedingungen Erkennung von Banden mit Proteingehalt von 1 ng. Bei Gelläufen wurden stets Eichproteine parallel aufgetragen (Anhang A10), mit deren Hilfe das Molekulargewicht einzelner Proteinbanden bestimmt werden konnte.

Tabelle 9: Zusammensetzung der bei Coomassie Brilliant Blau nach Kang verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
Färbelösung	0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250
	5 % (w/v) Aluminiumsulfat-Hydrat
	2 % (v/v) o-Phosphorsäure
	10 % (v/v) Ethanol
Entfärber	2 % (v/v) o-Phosphorsäure
	10 % (v/v) Ethanol

2.6.6 Substrat-Zymographie

Substrat-Zymographie wurde verwendet, um die Aktivität der Proteasen in Polyacrylamidgelen nachzuweisen (KUNDAPUR, 2013). Da Enzyme ihre Aktivität nur bei intakter dreidimensionaler Konformation entfalten, wurde diese Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen und ohne Hitzebehandlung von Proben durchgeführt. Die 7,5 % Trenngele wurden wie in der Tabelle 8 gezeigt angesetzt. Allerdings enthielten sie 0,1 % (w/v) Casein, das im gesamten Trenngel gleichmäßig verteilt war. Dem Trenngel wurde ein Sammelgelbereich ohne Casein vorgeschaltet (Tabelle 8). Die Proben wurden im Gegensatz zur SDS-PAGE in einem Puffer aufgenommen, der in Anlehnung an Troeberg und Nagase 2004 hergestellt wurde (TROEBERG UND NAGASE, 2004; Tabelle 11). Das in Proben- und Laufpuffer enthaltene SDS verlieh den Proteinen eine negative Ladung. Dadurch wanderten sie in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix zur Anode und wurden in Abhängigkeit von ihrer Größe und Struktur getrennt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 80 V, bis der Lauffront aus dem Gel austrat. Nachfolgend wurden die Gele drei Mal für á 20 min in einem Triton X-100 enthaltenden Waschpuffer inkubiert. Dieser Schritt diente dem Entfernen des SDS aus den Gelen. Anschließend wurden die Gele für mindestens 48 h in einem Renaturierungspuffer bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Reaktivierung der Enzyme und zum Abbau des lokal

verfügbaren Caseins. Die dadurch entstehenden Lysehöfe wurden nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R 250 als transparente Banden im ansonsten blau gefärbten Gel sichtbar.

2.6.7 Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen nach SDS-PAGE wurde ein Antikörper-basierter Nachweis mittels Chemilumineszenz angewandt (Abschnitt 2.6.9). Als vorbereitender Schritt dafür diente Western-Blot-Verfahren, bei dem mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennte Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran im sogenannten *Semi-Dry* Transfer (KYHSE-ANDERSEN, 1984) übertragen wurden (Tabelle 10). Der Transfer wurde bei konstanter Spannung von 20 Volt für eine Stunde durchgeführt. Dabei wanderten die Proteine, die durch SDS-Anlagerung eine negative Ladung besaßen, im elektrischen Feld aus dem Gel auf die Membran.

2.6.8 Ponceau-Rot Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran

In einigen Fällen wurden die auf PVDF-Membran transferierten Proteine mit Hilfe von Ponceau-Rot Färbung visualisiert. Diese reversible Färbung ermöglicht eine einfache und schnelle Überprüfung der Proteinmenge auf der Membran oder die Identifizierung, z.B. für Sequenzierung benötigten Proteinbanden (GALLAGHER ET AL., 2008). Hier wurde eine Färbelösung mit 2 % (w/v) Ponceau S, 30 % (w/v) TCA und 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure verwendet. Mit dieser wurde die Membran überschichtet und für 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen Ponceau-Rot-Lösung konnte die Membran mit dem Wasser entfärbt werden, bis die Proteinbanden klar sichtbar waren. Anschließend wurde die Membran rückstandslos entfärbt.

Tabelle 10: Im Western-Blot-Verfahren eingesetzte Reagenzien und Materialien

Reagenzien und Materialien	Zusammensetzung und Charakteristika
Whatman-Papier von <i>Schleicher & Schuell</i>	3 mm Chromatographie-Papier
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, pH 8
Anodenpuffer	300 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) Ethanol, pH 10,4
PVDF-Membran von <i>Merck Millipore</i>	Porengröße: 0,45 µm, 6,5 cm x 9,0 cm

Tabelle 11: Zusammensetzung der in Substrat-Zymographie verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Zusammensetzung
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin 0,02 % (w/v) SDS, pH 8,3
2 x Probenpuffer	84 mM Ammediol-HCl pH 8,37 2 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) NaN ₃ 40 % (w/v) Glycin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Renaturierungspuffer	50 mM Tris/ HCl pH 7,5 200 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ 0,02 % (w/v) NaN ₃ , 0,07 % (w/v) ZnCl ₂
Waschpuffer	Renaturierungspuffer + 2,5 % (w/v) Triton X-100
Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250 50 % (v/v) Ethanol, 20 % (v/v) Essigsäure
Entfärber	30 % (v/v) Ethanol 1 % (v/v) Essigsäure

2.6.9 Immunologischer Nachweis mittels Chemilumineszenz

Der Nachweis von Proteinen auf der PVDF-Membran wurde durch spezifische Antikörper (AK) gewährleistet (Tabelle 13). Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min in TBS-T gewaschen und dann für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Blockierungspuffer inkubiert (Tabelle 12). Durch die Blockierung mit 10 % Magermilchpulver-Lösung (MMPL) bei Verwendung polyklonaler AK oder 3 % Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) bei Verwendung monoklonaler AK wurden die proteinfreien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran besetzt.

Nach dem Blockieren und Waschen der Membran mit TBS-T und TBS-Puffer (à 10 min) folgte eine einstündige Inkubation mit dem Primär-AK. Die nicht gebundenen primären AK wurden zuerst mit TBS-T und dann zwei Mal mit TBS (je 10 min) abgewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundär-AK für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneuter Waschprozedur wurde die Membran mittels Chemilumineszenz entwickelt. Durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wird das Substrat Rotilumin (*Roth*) unter Emission vom Licht umgesetzt, das mit Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, *GE Healthcare*) detektiert wird. Alternativ kam das multifunktionale bildgebende System FUSION Xpress™ von *Vilber Lourmat* in Verbindung mit dem Clarity™ Western ECL Substrat von *BioRad* zum Einsatz.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 12: Beim immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz verwendete Reagenzien

Reagenzien	Zusammensetzung
TBS	10 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5
TBS-T	0,05 % (w/v) Tween 20, 0,2 % (w/v) Triton X-100 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5
Blockierungspuffer für monoklonale AK	3 % BSA in TBS
Blockierungspuffer für polyklonale AK	10 % MMPL in TBS
Puffer für monoklonale primären AK	1 % BSA in TBS
Puffer für polyklonale primären AK	7,5 % MMPL in TBS
Puffer für sekundäre AK	7,5 % MMPL in TBS

Tabelle 13: Beim immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Antigen
<i>Mouse-anti-Strep-tag</i> (Primär-AK, <i>Qiagen</i>)	1:2000 in 1 % BSA in TBS	WSHPQFEK
<i>Mouse-anti-His-tag</i> (Primär-AK, <i>Qiagen</i>)	1:2000 in 1 % BSA in TBS	HHHHH
<i>Rabbit-anti-full-length-Pro-Ovastacin</i> (Primär-AK, <i>Pineda</i>)	1:20000 in 7,5 % MMPL in TBS	gesamte Sequenz von Ovastacin-FL-Strep
<i>Rabbit-anti-Ovastacin-Propeptid</i> (Primär-AK, <i>Pineda</i>)	1:15000 in 7,5 % MMPL in TBS	CSTSVPEGFTPEGSPVFQDK
<i>Rabbit-anti-Fetuin-A</i> (Primär-AK, DIETZEL ET AL., 2013)	1:4000 in 7,5 % MMPL in TBS	gesamte Sequenz von Fetuin-A
<i>Rabbit-anti-Fetuin-B</i> (Primär-AK, DIETZEL ET AL., 2013)	1:4000 in 7,5 % MMPL in TBS	gesamte Sequenz von Fetuin-B
<i>Goat-anti-mouse-IgG-Meerrettich-</i> Peroxidase-gekoppelt (Sekundär-AK, <i>Dianova</i>)	1:7500 in 7,5 % MMPL in TBS	Maus IgG Fc-Region
<i>Goat-anti-rabbit-IgG-Meerrettich-</i> Peroxidase-gekoppelt (Sekundär-AK, <i>Dianova</i>)	1:7500 in 7,5 % MMPL in TBS	Kaninchen IgG Fc-Region

2.7 Enzymkinetische Analysen

2.7.1 Substrate, Enzyme

Tabelle 14: In der Arbeit verwendete Enzyme und Substrate

Die hochgestellten Buchstaben verweisen auf den Hersteller: a-*Merck*; b- *Sigma-Aldrich*; c- *Hematologic Technologies*; d- *Abcam*; e- *Serva*; f- *Enzo*; g- *R&D*; h- Geschenk von Prof. Ghislain Opendakker; i- Geschenk von Dr. Catherine Moali; j- eigene Herstellung; k-*Bachem*; l- *Biosyntan*.

Die hochgestellten Zahlen verweisen auf den Ursprungsorganismus: 1- Rind (*Bos taurus*); 2- Schwein (*Sus scrofa*), 3- Maus (*Mus musculus*), 4- Mensch (*Homo sapiens sapiens*), 5- Papaya (*Carica papaya*), 6- Flusskrebs *Astacus astacus*, 7- Zebrafisch (*Danio rerio*).

Abkürzungen bedeuten - Ac: Acetyl, AMC: 7-Amino-4-methylcoumarin, Boc: t-butyl-oxycarbonyl, DabcyI: N,N'-diamino-phenyl-azo-4-benzoic-acid, Dap: L-2,3-diaminopropionyl, Dap(Dnp): L-2,3-diaminopropionyl-N3-2,4-dinitrophenyl, Dnp: 2,4-dinitrophenyl, Dns: N,N'-dimethylamino-naphtalene-1-sulfonic acid, EDANS: 5-((2-aminomethyl)amino)naphtalene-1-sulfonic acid, Mca: 7-methoxycoumarin-4-yl-acetyl, Nle: Norleucin, Z: Benzoyloxycarbonyl.

Enzym	Substrat	Excitation / Emission [nm]	Totalumsatz
Chymotrypsin ^{e 1}	H-AAF-AMC ^k	380/460	Chymotrypsin ^{e 1}
Trypsin ^{a, b 1,2}	Boc-FSR-AMC ^k	380/460	Trypsin ^{a, b 1,2}
Plasmin ^{c 3,4}			
tPA (tissue plasminogen activator) ^{d 3}			
Papain ^{b 5}			
Cathepsin B ^{f 4}			
Cathepsin K ^{f 4}			
Cathepsin S ^{f 4}			
Legumain ^{g 4}	Z-AAN-AMC ^k	380/460	Legumain ^{g 4}
Cathepsin D ^{f 4}	Mca-GKPILFFRLK(Dnp)-dR-NH ₂ ^f	328/405	Proteinase K ^b
MMP-2 (Matrixmetalloproteinase) ^{f 3}	Dnp-PLGLWA-dR-NH ₂ ^f	280/350	Proteinase K ^b
MMP-8 ^{g 3}			
MMP-9 ^{h 4}			
MMP-13 ^{g 4}	Mca-PLGL-Dap(Dnp)-AR-NH ₂ ^g	320/405	Proteinase K ^b
ADAM 10 (A Disintegrin And Metalloproteinase) ^{g 3}	Mca-PLAQAV-Dpa(Dnp)-RSSSR-NH ₂ ^g	320/405	Proteinase K ^b
BMP1 (bone morphogenetic protein) ^{i 4}	Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(DabcyI)-NH ₂ ^l	350/520	Proteinase K ^b
Ovastacin ^{j 3}			
TLL2 (tolloid-like protein) ^{j 4}			
Mepin α ^{j 4}			
Mepin β ^{j 4}			
Astacin ^{j 6}	Dns-PKRAPWV ^l Mca-GSPAFLA-K(Dnp)-dR-NH ₂ ^k	280/350 320/405	Proteinase K ^b
Nephrosin ^{j 7}	Mca-PLAQAV-Dpa(Dnp)-RSSSR-NH ₂ ^g	320/405	Proteinase K ^b

Als Substrate wurden in den meisten Fällen kurze Oligopeptide benutzt, die zwei Fluorophore enthielten, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen sich spektral überlappten, so dass es zum Phänomen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) kommen konnte (FÖRSTER, 1948). Dabei fungiert einer der Fluorophore als Akzeptor der vom Donorfluorophor transferierten Energie, vorausgesetzt der Abstand zwischen den Beiden beträgt weniger als 10 nm. Wird dieser Abstand auf Grund der Spaltung der sie verbindenden Peptidkette vergrößert, findet kein FRET mehr statt. In diesem Fall fluoresziert Donorfluorophor nach Anregung bei seiner Emissionswellenlänge und seine Fluoreszenz kann detektiert werden. Darüber kann die Enzymaktivität indirekt studiert werden. Erstmals wurde die Nutzung solcher Substrate im Jahr 1990 publiziert (STÖCKER ET AL., 1990; MATAYOSHI ET AL., 1990). Außerdem wurden einige sogenannte *quenched fluorescent substrates* verwendet. Diese unterscheiden sich von den FRET-Substraten dadurch, dass der Akzeptor nicht fluoresziert. Bei den hier verwendeten „Quenchern“ handelte es sich um Aminocoumarinderivate (GODDART UND REYMOND, 2004). In der Tabelle 14 sind alle hier untersuchten Proteasen und die entsprechenden Substrate mit den Angaben über die Vertreiber zusammengefasst.

2.7.2 Reaktionsbedingungen

Alle Versuche wurden bei 37°C durchgeführt. Die benutzten Pufferlösungen wurden über ein Filter mit Porengröße von 0,45 µm filtriert. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug stets 100 µl. Die Inkubationsschritte mit Enzymen, Inhibitoren und anderen Reagenzien fanden in 500 µl Reaktionsgefäßen im thermostatisierten Wasserbad statt. Es wurde angestrebt, möglichst im selben Puffersystem zu arbeiten. Die Ansätze wurden aus den Reaktionsgefäßen in vortemperierte schwarzen FluoroNunc 96-Well Mikrotiterplatten überführt und die Reaktionen durch Zugabe vortemperiertem Substraten gestartet. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentration von Dimethylsulfoxid (DMSO, Lösungsmittel, in dem die Substratstammlösungen vorlagen) im Endansatz nicht über 5 % hinausging. Die Aktivität der Proteasen wurde anhand der Fluoreszenzzunahme im Reaktionsansatz im Spektrofluorimeter Varioskan® Flash 3001 mit der Software SkanIt Software 2.4.3.RE registriert. Nach der eigentlichen Messung wurde stets der Totalumsatz (Tabelle 14, Abbildung 6) der Substrate zur Bestimmung der maximalmöglichen Fluoreszenzausbeute herbeigeführt. Die meisten Ansätze wurden mindestens zweifach gemessen. Die Substratumsatzrate des jeweiligen Enzyms wurde wie folgt berechnet:

$$v = \frac{[S] \cdot m}{\Delta F}$$

Dabei ist v die Substratumsatzrate in [M/s], $[S]$ die Substratkonzentration in [M], m die Steigung der Fluoreszenzzunahme in den ersten 360s des Reaktionsverlaufes in [dF₀₋₃₆₀/s], ΔF die Differenz zwischen den Fluoreszenzwerten nach dem Totalumsatz (F_{\max}) und zu Beginn der Messung (F_0). Es wurde dabei darauf geachtet, dass der für die Bestimmung der Substratumsatzrate m verwendete Abschnitt der Umsatzkurve möglichst linear ist. Die F_{\max} wurde an einem Abschnitt des Kurvenverlaufs nach dem Totalumsatz mit gegen Null strebender Steigung abgelesen (Abbildung 6).

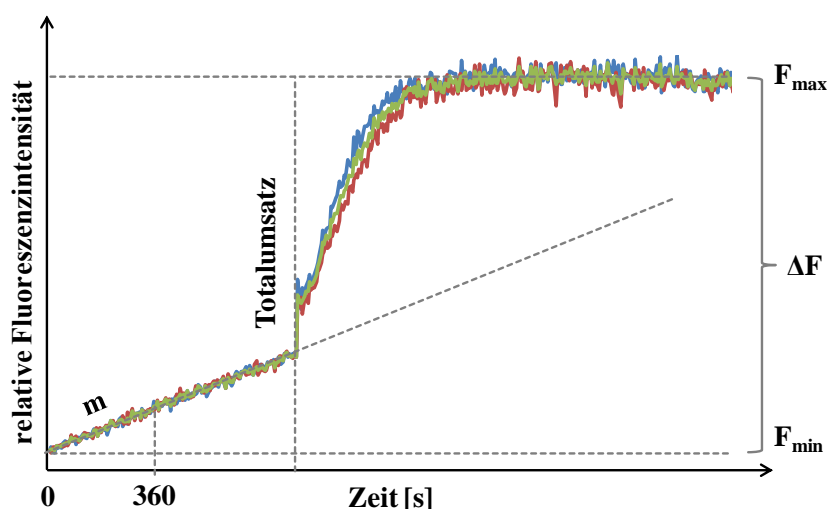


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufes während der kinetischen Untersuchungen
 Proteolytische Spaltung von fluorengen Substraten durch die zu untersuchende Enzyme verursacht Fluoreszenzzunahme im Reaktionsansatz (blaue und rote Kurven, grüne Kurve stellt den Mittelwert der beiden dar). Die Steigung der Fluoreszenzzunahme m während der ersten 360 s des Reaktionsverlaufes, relativer Fluoreszenzwert zu Beginn der Reaktion F_0 und nach dem erfolgten Totalumsatz des Substrates F_{\max} sowie ihre Differenz ΔF werden ermittelt. Bei bekannter Substratkonzentration $[S]$ wird die Substratumsatzrate v errechnet $v=[S] \cdot m/\Delta F$.

2.7.3 Proteolytische Aktivierung von Pro-Ovastacin-FL-Strep

40 μ l (Endkonzentration 3,3 μ M) Pro-Ovastacin-FL-Strep wurde mit verschiedenen Trypsin-ähnlichen Serinproteinasen (Trypsin, Plasmin, tissue Plasminogen Activator (tPA), neutrophile Elastase) oder mit muriner Gelatinase A (MMP-2) bei 37°C in verschiedenen molaren Mischungsverhältnissen und unterschiedlich lange inkubiert. Im Anschluss wurde den Ansätzen der irreversible Serinproteaseninhibitor Pefabloc (20-35 mM) (Sigma, Taufkirchen) zugefügt. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Messung der Enzymaktivität (Abschnitt 2.7.2), ggf. auch durch Substratzymographie und aminoterminaler Sequenzierung durch Edman-Abbau oder Massenspektrometrie (*ChromaTech*) analysiert. Dafür wurde Ovastacin-FL-Strep (165 μ l; 5,5 μ M) im molaren Verhältnis von 10:1 mit Plasmin (1 μ l; 90 μ M) 30 min lang bei 37 °C aktiviert und anschließend mit DOC-TCA präzipitiert. Die

Proben wurden in zwei separaten Gelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine aus einem Gel wurden anschließend mittels Western-Blot auf PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde in zwei Hälften mit dem gleichen Probenauftragschema geteilt. Eine Hälfte wurde durch Immunochemilumineszenz entwickelt, die andere mit Ponceau-Rot gefärbt. Nach dem Vergleich beider Hälften wurde aus der Ponceau-Rot gefärbten Membran die Proteinbande des Ovastacin-FL-Strep ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung versandt. Das andere Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau nach KANG ET AL. (2004) gefärbt. Daraus wurden ebenfalls die entsprechenden Ovastacinbanden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Untersuchung abgegeben.

Um die Aktivität von Ovastacin in der Casein-Substrat-Zymographie zu demonstrieren, wurde das Enzym (5,5 μM) in einem molaren Verhältnis von 20:1 für 30 min bei 37°C mit humanem Plasmin inkubiert (siehe auch Abschnitt 2.6.6, Substratzymographie). Eine der Proben wurde mit 0,9 μM Fetuin-B versetzt und zusätzliche 10 min inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit Probenpuffer vermischt und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert (Abschnitte 2.6.7 – 2.6.9).

Aktivierung von Pro-Ovastacin unmittelbar vor der Analyse

Im Rahmen der kinetischen Untersuchungen von Ovastacin wurde für die Aktivierung des Enzyms mit Plasmin ein standardisiertes Protokoll verwendet. Pro Messansatz wurden 15 μl Ovastacin-FL-Strep (2 μM oder 6,6 μM) in einem molaren Verhältnis von 10:1 mit 1 μl Plasmin in einem Reaktionsgefäß 30 min lang bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde 1 μl bzw. 3 μl Pefabloc mit der Konzentration von 100 mM dazu pipettiert und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde in die Kavität der Mikrotiterplatte überführt und mit Puffer, Inhibitoren, Substrat oder anderen Reaktionskomponenten auf 100 μl aufgestockt. Die Endkonzentration des Ovastacins lag je nach Versuch bei 300 nM oder bei 1 μM , die des Plasmins entsprechend bei 30 nM oder 100 nM und des Inhibitors Pefabloc bei 1 mM bzw. 3 mM. Substrat Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂ wurde zur besseren Durchmischung in einem Volumen von 40 μl oder 50 μl dem Ansatz hinzugefügt

2.7.4 Stabilität von aktiviertem Ovastacin-FL-Strep

Das Enzym wurde auf drei Reaktionsgefäße verteilt, und bei 37°C, 4°C und -20°C 6 Tage gelagert. Anschließend wurden die Ansätze wie in 2.7.3 beschrieben aktiviert und die Enzymaktivität (Endkonzentration 1 μM) gemessen. In anderem Ansatz wurde nach der Aktivierung bei 37°C inkubiert und unmittelbar nach Aktivierung, nach 10 min, 60 min und

120 min die Aktivität bestimmt (Substratkonzentration: 10 μM). Ergänzend wurden die Proben mittels Western-Blot analysiert.

2.7.5 pH-Abhängigkeit von aktiviertem Ovastacin-FL-Strep

Zur Ermittlung des pH-Optimums wurden je 40 μl aktiviertes Ovastacin mit 50 μl Davies-Puffern (DAVIES, 1959, Tabelle 15) mit unterschiedlichen pH-Werten im pH-Bereich zwischen 2,6 bis 9,6 equilibriert (Tabelle 16). Die Enzymaktivitätsmessungen wurden durch Zugabe von 10 μl Substrat gestartet. Die Enzymkonzentration im Endansatz betrug 1 μM und die des Substrats 7,7 μM .

Tabelle 15: Zusammensetzung von eingesetztem Davies-Puffer bei der Bestimmung des pH-Optimums

Davies-Puffer pH 4,5 durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf pH-Werte von 2-12 eingestellt
25 mM Zitronensäure 25 mM KH_2PO_3 25 mM Tris-HCl 25 mM KCl 12,5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

Tabelle 16: pH-Werte der Reaktionsansätze für die Bestimmung des pH-Optimums von Ovastacin

pH-Wert von eingesetztem Davies-Puffer in 50 μl	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH-Wert im Reaktionsansatz 100 μl	2,6	3,5	4,4	5,3	6,2	7	7,6	8,2	8,8	9,1	9,5

2.7.6 Abhängigkeit der Ovastacinaktivität von Metallionen und Detergenzien

Die katalytischen Eigenschaften des aktivierten Ovastacins-FL-Strep (50 nM, 100 nM, 300 nM) wurden in Gegenwart von 1 μM ZnCl_2 , 5 mM CaCl_2 und 0,01 % Brij-35 analysiert. Des Weiteren wurde in einer Messung mit 312 nM aktivem Ovastacin die Calciumkonzentration zwischen 1 μM und 100 mM variiert. Die Ca^{2+} -Ionen wurden dem Puffer in Form von CaCl_2 zugesetzt. Die Enzymaktivitätsmessung erfolgte mit 16,5 μM Substrat.

2.7.7 Bestimmung der kinetischen Parameter von Ovastacin

Zur Ermittlung der Michaeliskonstante (K_m) (MICHAELIS UND MENTEN, 1913) für Ovastacin gegenüber dem Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)- NH_2 Substrat wurden die Substratumsatzraten in Anwesenheit unterschiedlicher Substratkonzentrationen ermittelt. Es

wurden zwei Messreihen mit frisch aktiviertem Ovastacin angesetzt, eine mit 300 nM Enzym und die andere mit 150 nM Enzym unter Zusatz von Calcium, Zink und Brij-35 (siehe 2.7.6). Die Substratkonzentrationen variierten zwischen 1,4 μ M und 0,112 mM.

2.7.8 Prozessierung von Fetuin-B und Fetuin-A durch proteolytische Enzyme

In COS-7-Zellen exprimiertes murines Fetuin-A und Fetuin-B (DIETZEL ET AL., 2013) sowie rekombinantes menschliches Fetuin-B (in HEK293-Zellen von der Firma INVIGATE GmbH hergestellt, Lot: C050413-02) waren ein Geschenk von Prof. Willi Jahnen-Dechent, RWTH Aachen. Außerdem stellte ich selbst verschiedene Varianten der murinen Fetuine in Insektenzellen her (siehe 8.9.10), welche die Bezeichnungen FB_WT_4, FB_L1L1_4, FB_HY_L1L1 und FA_WT erhielten. Funktionstests wurden mit 300 nM Ovastacin (Endkonzentration, aktiviert wie in 2.7.3) mit je 1 μ M, 1,3 μ M, 500 nM und 250 nM Fetuin-A, Fetuin-B, FA_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 (alle in Ovastacin-Dialysepuffer) in An- oder Abwesenheit von 1 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂ und 0,01 % Brij-35 durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug 27 μ M.

Je 6 μ M der Fetuine wurden mit verschiedenen Metalloproteinasen, Serinproteinasen und Cysteinproteinasen bei 37 °C inkubiert. Für jedes Enzym wurden spezifische Pufferbedingungen eingestellt (siehe Anhang Tabelle A1). In 8 μ l Ansätzen wurden jeweils 3 μ M Fetuin-A oder Fetuin-B (in ADAM 10-Assaypuffer) mit 25 nM aktiviertem Ovastacin, Astacin, Meprin α , Meprin β , BMP1 (Fetuin-A auch in BMP1-Assay-Puffer), Papain (hier nur 1,5 μ M Fetuin-A bzw. -B) bei 37°C für bis zu 24 h inkubiert.

Im Fall der Serinproteinasen Trypsin (33 nM) und Plasmin (166 nM) betragen die Endkonzentrationen an Fetuin-A und Fetuin-B jeweils 330 nM (in PBS) und die Inkubation erfolgte 60 min bei 37°C. Die Auswertung erfolgte in allen Fällen durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immunochemiluminiszenz-Nachweis.

2.7.9 Inhibitionsassays

Für Inhibitionstests wurden mehrere Parallelansätze bei konstanter Substrat- und Enzymkonzentration und variierender Inhibitormenge analysiert. Nach Vorinkubation (meist 10 min) von Inhibitor und Enzym wurde die Reaktion durch die Zugabe von Substrat gestartet. Die Quotienten aus inhibierter und nicht inhibierter Enzymaktivität wurden gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Inhibitionskonstanten K_i wurden mit Hilfe von GraFit 4 (*Erithacus Software*) errechnet (BIETH, 1984). War dies – etwa aufgrund mangelnder Substratsensitivität - nicht möglich so wurde IC₅₀ berechnet (CHENG UND PRUSOFF, 1973).

Dieser Wert zeigt die Konzentration von Inhibitor, bei der Protease-Aktivität zur Hälfte gehemmt wurde. Der Wert ist abhängig von der eingesetzten Protease-Konzentration.

Ovastacin-FL-Strep - wurde wie in 2.7.3 aktiviert und mit einer Endkonzentration zwischen 100 – 540 nM in An- oder Abwesenheit von 1 μM ZnCl_2 , 5 mM CaCl_2 und 0,01 % Brij-35 eingesetzt. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit 20-33 μM Substrat und 0,4 nM bis 2 μM Fetuin-A und/oder Fetuin-B, sowie mit 0,1 -10 μM bovinem Serumalbumin (BSA) als Kontrolle in BMP1-Assaypuffer, PBS oder Ovastacin-Dialysepuffer.

TLL2 und BMP1 - Die katalytische Domäne von menschlichem *Tolloid-like-2 Protein* (TLL2) codierende Plasmid wurde freundlicherweise von *Novartis Institute for Biomedical Research* bereitgestellt. Die rekombinante Expression wurde in der Arbeitsgruppe Stöcker nach dem Protokoll von MAC SWEENEY ET AL. (2008) in Bakterien (*Escherichia coli*) durchgeführt. Die Reinigung des Proteins aus bakteriellen Einschlusskörpern erfolgte nach Reyda et al. (REYDA ET AL., 1999). Nach der Rückfaltung wurde die Proteinase durch Gelfiltration über eine Sephacryl S100 HR Säule (*GE Healthcare*) gereinigt. Humanes *full-length* BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*) war ein Geschenk von Dr. Catherine Moali (IBP-CNRS, Lyon, Frankreich) (BLANC ET AL., 2007). 180-250 nM TLL2 bzw. 10 nM BMP1 wurden mit 3 μM bis 0,005 nM murinem Fetuin-A oder Fetuin-B aus *COS*-Zellen in BMP1-Puffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 0,04 % Octyl- β -D-Glucopyranosid, pH 7,4) 10 min bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit dem Substrat Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂ (20 μM für TLL2 und 24 μM für BMP1) gestartet.

Meprin α und Meprin β - Humanes Meprin α (KÖHLER ET AL., 2000; BECKER-PAULY ET AL., 2007; FRIDRICH ET AL., 2016) und humanes Meprin β (BECKER ET AL., 2003; FRIDRICH ET AL., 2016) wurden in einem molaren Verhältnis von 70:1 mit Rindertrypsin aktiviert (FRIDRICH ET AL., 2016) und auf eine Konzentration von 2,5 nM mit 50 mM HEPES, pH 7,5 verdünnt. 10 μl dieser Lösung wurde in einem Reaktionsgefäß mit 15 μl Fetuin-B (in BMP1-Assaypuffer) unterschiedlicher Konzentration vermischt und 10 min inkubiert. Die Endkonzentration von Fetuin-A und Fetuin-B variierte zwischen 1 μM und 0,22 nM in acht (Fetuin-A) bis zehn Ansätzen (Fetuin-B). Die Endkonzentration an Enzymen betrug 0,25 μM und des Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂ Substrats 11, 21 oder 32 μM . Die Substratumsatzrate einzelner Ansätze wurde bestimmt und K_i -Werte wurden errechnet. Die Wechselwirkung zwischen Fetuin-A und Meprin β wurde in Abhängigkeit der Konzentration an Ca^{2+} -Ionen untersucht, wobei die CaCl_2 Konzentration zwischen 1 μM und 100 mM (acht Messansätze) lag.

Astacin - Fetuin-B (0,2 nM - 0,9 μ M in BMP1-Assaypuffer) wurde in insgesamt zwölf Ansätzen mit 1 nM aktivem Astacin aus dem Flusskrebs *Astacus astacus* (50 mM HEPES, pH 8, STÖCKER UND ZWILLING, 1995) vermischt und 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,4 mM Dns-PKRAPWV Substrat gestartet. Nach Bestimmung der Substratumsatzraten wurde der K_i -Wert berechnet. Für die Interaktion von Fetuin-A (0,25 nM bis 2 μ M in neun Messansätzen) mit 10 nM Astacin wurde alternativ das Substrat Mca-GSPAFLA-K(Dnp)-dR-NH₂ (14 μ M) eingesetzt.

Nephrosin - Die Astacinprotease Nephrosin aus dem Zebrafisch *Danio rerio* wurde mir von Herrn Dipl. Biol. Mario Olf zur Verfügung gestellt. Er hatte das Enzym rekombinant in *High Five*-Insektenzellen exprimiert und gereinigt. Die Substratumsatzrate von 10 nM Enzym (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) wurde in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen an Fetuin-A (1 μ M, 100 nM und 10 nM jeweils in 15 μ l ADAM 10 -Assaypuffer und Fetuin-B (6,9 nM - 0,02 nM in acht Messansätzen, in 45 μ l ADAM 10 -Assaypuffer) ermittelt. Die Konzentration von Mca-PLAQAV-Dpa(Dnp)-RSSSR-NH₂ Substrat lag bei 10 μ M in der Messung mit Fetuin-A und 12 μ M mit Fetuin-B. Aus den Substratumsatzraten wurde der IC₅₀-Wert errechnet.

ADAM 10 – Der Einfluss von Fetuin-A und Fetuin-B (beide im ADAM 10-Assaypuffer: 25 mM Tris-HCl, 2,5 μ M ZnCl₂, 0,005 % Brij-35, pH 9) auf 38 nM ADAM 10 wurde mit Einsatz von 20 μ M Mca-PLAQAV-Dpa(Dnp)-RSSSR-NH₂ Substrat getestet. Dabei wurden jeweils 1 μ M Fetuin-A oder Fetuin-B für 10 min bzw. 30 min mit Proteinase vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Substratumsatzrate.

Matrixmetalloproteasen (MMP) - MMP-2, MMP-8, MMP-9 (STARCKX ET AL., 2003) und MMP-13 wurden mit 2 mM APMA (Amino-Phenyl-Mercuri-Acetat) 2 h bei 37°C aktiviert.

Die kinetischen Untersuchungen von 20 nM MMP-2, 25 nM MMP-8 und 20 nM MMP-9 mit Fetuinen erfolgten in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂ und 0,05 % Brij-35, pH 7,4. Vor Zugabe des Substrats Dnp-PLGLWA-dR-NH₂ (8 μ M) wurden die Enzyme 10 min mit den Fetuinen vorinkubiert. MMP-9 wurde zusätzlich in Gegenwart und Abwesenheit von 7,5 mM CaCl₂ analysiert. MMP-13 (3,9 nM) wurde in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ und 0,05 % Brij-35, pH 7,5 mit Fetuin-A und Fetuin-B (FA_WT und FB_WT_4, in Fetuin-Dialysepuffer vorliegend) 2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,1 μ M und 20 nM 10 min vorinkubiert. Die Umsatzrate wurde mit dem Substrat Mca-PLGL-Dap(Dnp)-AR-NH₂ (20 μ M) bestimmt.

Cathepsin D - 20 μ l Cathepsin D (50 mM NaOAc, pH 4) wurde mit 10 μ l Fetuin-A bzw. Fetuin-B (umgepuffert in 50 mM NaOAc, pH 6) 10 min vorinkubiert. Die Endkonzentration an

Enzym im Messansatz betrug 40 nM, die der Fetuine variierte zwischen 10 nM und 1 μ M (in je sieben Ansätzen). Die Konzentration des Substrats Mca-GKPILFFRLK(Dnp)-dR-NH₂ betrug 30 μ M.

Papain lag in 50 mM Hepes, pH 7,5 vor. 15 μ l der Enzymlösung wurden mit 15 μ l Fetuin-A bzw. Fetuin-B (im BMP1 -Assaypuffer) 10 min vorinkubiert. Die Reaktionen wurden mit der Zugabe von 50 μ M Boc-SFR-AMC Substrates gestartet. Die Endkonzentration an Enzym betrug 150 nM. Von Fetuin-A kamen 150 nM und von Fetuin-B 150 nM und 300 nM zu Einsatz. Außerdem wurde ein Kontrollansatz mit 140 μ M Cysteinproteaseninhibitor E64 gemessen.

Cathepsin B (140 nM) wurde mit Fetuin-A bzw. Fetuin-B in insgesamt sieben Ansätzen mit (in 50 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 6) 10 min vorinkubiert. Die Konzentrationen der Fetuine lagen in den Enzymaktivitätsmessungen zwischen 10 nM und 1 μ M. Als Substrat diente Boc-SFR-AMC (50 μ M).

Cathepsin K wurde als Proenzym erworben und vor der Analyse unter sauren Bedingungen aktiviert. Dafür wurden 5 μ l Procathepsin K (8,5 μ M) mit 1 μ l Aktivierungspuffer (32,5 mM NaOAc, pH 3,5) vermischt und 40 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde dann mit dem Assaypuffer (50 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und 5 mM DTT, pH 5,5) auf Konzentration von 1 μ M Enzym eingestellt. Je 20 μ l des aktiven Enzyms wurden mit 20 μ l Fetuin-A bzw. Fetuin-B (FA_WT und FB_WT_4, umgepuffert in Cathepsin K-Assaypuffer) 10 min inkubiert. Die Konzentrationen an Fetuin-A bzw. Fetuin-B variierten in je vier Messansätzen zwischen 1 μ M und 100 nM. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 2,8 mM des Cysteinproteinaseinhibitors E64 mitgeführt. Die Endkonzentration des Enzyms betrug 200 nM. Als Substrat diente das Boc-SFR-AMC (320 μ M).

Cathepsin S (50 nM in 40 μ l Cathepsin S-Assaypuffer, 100 mM Mes, 1 mM EDTA, 50 mM L-Cystein, 10 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 30 % Glycerin, pH 4,5) wurde mit 50 nM bis 1 μ M und (fünf Messpunkte) Fetuin-A oder Fetuin-B in Cathepsin K-Assaypuffer 10 min vorinkubiert und mit dem Substrat Boc-SFR-AMC Substrat (320 μ M) analysiert.

Legumain - Das Enzym Legumain wurde mit dem Aktivierungspuffer (50 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 4) auf die Konzentration von 100 μ g/ μ l gebracht und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Assaypuffer (50 mM Mes, 250 mM NaCl, pH 5) 1:100 verdünnt. 50 μ l der Enzymlösung (Endkonzentration 10 nM) wurden mit Fetuin-A bzw. Fetuin-B (umgepuffert in 50 mM Mes, 250 mM NaCl, pH 5) mit den Konzentrationen 400 nM, 200 nM und 40 nM 10 min vorinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen mit der Zugabe von 100 μ M Z-AAN-AMC gestartet.

Chymotrypsin - Fetuin-A und Fetuin-B wurden zur Analyse ihrer Wechselwirkung mit Chymotrypsin in 38 mM Tris-HCl, 53 mM CaCl₂, pH 7,8 umgepuffert. Das Enzym wurde in demselben Puffer frisch angesetzt. Für die Messung der Enzymaktivität wurde 100 µM H-AAF-AMC Substrat verwendet. Chymotrypsin wurde mit Fetuin-A bzw. Fetuin-B für 30 min oder 10 min vorinkubiert. Die Messungen wurden anschließend gleichzeitig gestartet. Die Endkonzentration an Enzym betrug 19 nM und der Fetuine 1 µM oder 0,1 µM.

Plasmin, tPA, Trypsin - Die Aktivität von tryptischen Serinproteasen tPA (50 nM), Plasmin (50 nM) und Trypsin (5 nM) wurde in 50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5 für 30 min mit Fetuin-A (5 µl, Endkonzentration 250 nM) und Fetuin-B (5 µl, Endkonzentration 300 nM) vorinkubiert. Anschließend wurde die Aktivität mit dem Substrat Boc-FSR-MCA (20 µM) gemessen. Trypsin wurde außerdem mit 100 µM Substrat und 1 µM bzw. 100 nM Fetuin-A und B 30 min und alternativ 10 min vorinkubiert.

Als gesonderter Versuch wurde Inhibitionsassay mit drei verschiedenen Fetuinchimären, die durch das so genannte Domänen-*swapping* aus Fetuin-A und Fetuin-B (ABA, AAB und BAA, Abbildung 34) hergestellt wurden, durchgeführt. Die Proteine waren ein Geschenk von Prof. Willi Jahnen-Dechent, RWTH Aachen und wurden rekombinant in *COS-7* Zellen exprimiert. Die Wirkung wurde gegen 5 nM Meprin α , 5 nM Meprin β und 239 nM Ovastacin (in Anwesenheit von 1 µM ZnCl₂, 5 mM CaCl₂ und 0,01 % Brij-35) getestet. Angesetzt wurden je 1 µM oder 0,5 µM und 1 µM (Ovastacin-Versuch) Fetuin. Als Kontrollen dienten Wildtyp Fetuin-A und Fetuin-B in den gleichen Mengen.

2.8 Bioinformatische Analyse der Fetuine

Die Sequenzen für Fetuin-A, Fetuin-B, KNG, Cystatin A und Cystatin C folgender Spezies: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, und *Gallus gallus* wurden in der Datenbank UNIPROT (<http://www.uniprot.org>; UNIPROT CONSORTIUM, 2015) recherchiert. Mit Hilfe des Programms SeaView4 (GOUY ET AL., 2010) wurden Sequenzalignments der Cystatin-ähnlichen Domänen mit Hilfe des implementierten Programms MUSCLE (EDGAR, 2004) errechnet.

Dreidimensionale Modelle der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 wurden durch Homologiemodellierung mit dem Programm Modeller 9.16 (WEBB UND SALI, 2014) ermittelt. Als Vorlage diente das menschliche Cystatin C (PDB ID - 3GAX). Die Modelle wurden auf ihre Integrität über Webserver PDBsum (LASKOWSKI ET AL., 1997) überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung rekombinanten Ovastacins

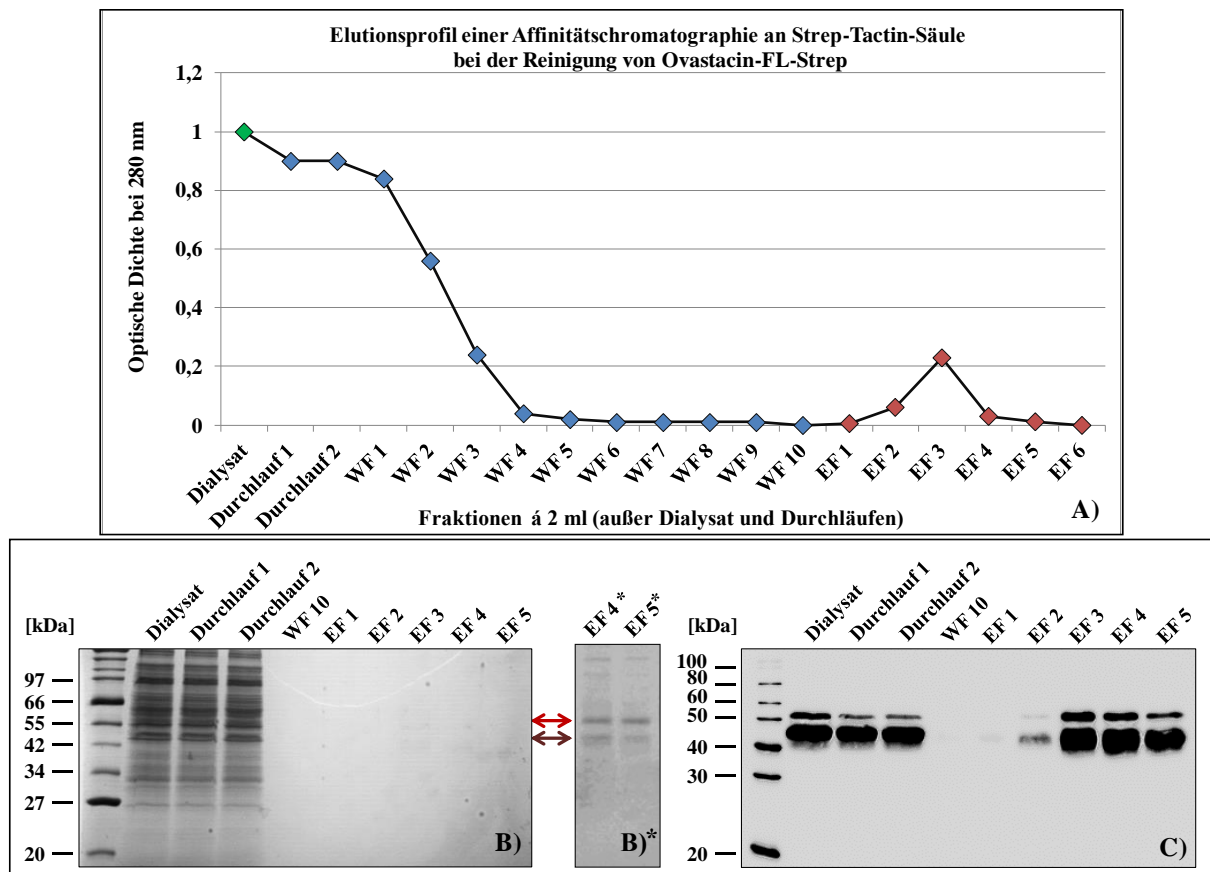
Voraussetzung für das Erreichen der gesteckten Ziele war eine verlässliche Quelle für das Enzym Ovastacin. Es galt, die schon etablierte Expression in Insektenzellen zu optimieren. Ausbeute und Reinheit des Enzyms mussten verbessert werden. In meiner Diplomarbeit (KARMILIN, 2012) hatte ich bereits festgestellt, dass die maximale Ausbeute des rekombinanten Proteins nach 72 h Expressionsdauer in *High Five* Zellen zu erreichen war. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Ovastacin Expression und Reinigung. Nach der abschließenden Affinitätschromatografie über eine Strep-Tactin-Säule wurde in der Regel ca. 0,6 mg Protein aus 840 ml konditioniertem Kulturmedium gewonnen. Diese Menge war über 4-5 Elutionsfraktionen (à 2 ml) ungleichmäßig verteilt. Ovastacin-FL-Strep besitzt die Eigenschaft, sich nur bedingt durch Coomassie-Brilliant-Blue anfärben zu lassen, was in der Abbildung 7 **B** deutlich wird. Nach der entsprechenden Bildbearbeitung (Kontrast und Helligkeit) kommen zwei für Ovastacin typische Proteinbanden zum Vorschein (7 **B***). Die obere liegt bei ungefähr 55 kDa, die untere bei 46 kDa.

3.2 Aktivierung von Ovastacin-FL-Strep

Die Astacine werden als inaktive Zymogene hergestellt. Zur Erlangung ihrer enzymatischen Aktivität muss das hemmend wirkende Propeptid entfernt werden (YIALLOUROS ET AL., 2002; GUEVARA ET AL., 2010). Aufgrund des konservierten Argininrestes an der potenziellen Aktivierungsposition SPFR*LLSV (Aminosäurereste im Ein-Buchstaben-Code, siehe Anhang) wurde vermutet, es könnte sich bei dem aktivierenden proteolytischen Enzym um eine trypsin-ähnliche Serinproteinase handeln. Daher wurden Versuche unternommen, physiologisch relevante Enzyme zu testen, die Peptidbindungen C-terminal von Arginin hydrolysieren. Ovastacin-FL-Strep wurde zu diesem Zweck mit Trypsin, tPA (*tissue plasminogen activator*), Plasmin, neutrophiler Elastase und MMP-2 inkubiert. Die Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase A) wurde hier ebenfalls in Erwägung gezogen, weil sie zwischen Arginin und Leucin schneiden kann und im physiologischen Kontext der Eizelle im Ovar und im Ovidukt vorkommt. Allerdings blieben die Aktivierungsversuche mit neutrophiler Elastase (hier nicht gezeigt), MMP-2 und tPA erfolglos. Die Behandlung von Ovastacin-FL-Strep mit Trypsin oder Plasmin führte zur konzentrations- und zeitabhängigen Prozessierung des Proteins. Den gleichen Effekt brachte tPA in Kombination mit Plasminogen (PLG), der Proform des Plasmins (Abbildung 8).

ERGEBNISSE

Ob die Prozessierung tatsächlich aktivierend wirkt, wurde mittels Enzymaktivitätsmessung mit dem FRET-Substrat Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VG*DDPY-K(Dabcyl)-NH₂ nachgewiesen. Dieses Substrat wird von Ovastacin zwischen dem Glycinrest und dem ersten von zwei benachbarten Aspartatresten gespalten. Dies ist eine typische Schnittstelle für Astacinproteinasen, die sich dadurch von den meisten anderen proteolytischen Enzymen unterscheiden (BECKER-PAULY ET AL., 2011). Abbildung 9 zeigt das positive Ergebnis nach Behandlung mit Plasmin und der Kombination aus tPA und Plasminogen. Diese Fakten lassen darauf schließen, dass tryptische Serinproteinasen als endogene Pro-Ovastacin-Aktivatoren in Frage kommen. Da die Aktivierung mit Plasmin am effektivsten war, wurde dieses Enzym für die Herstellung aktiven Ovastacins routinemäßig eingesetzt.



ERGEBNISSE

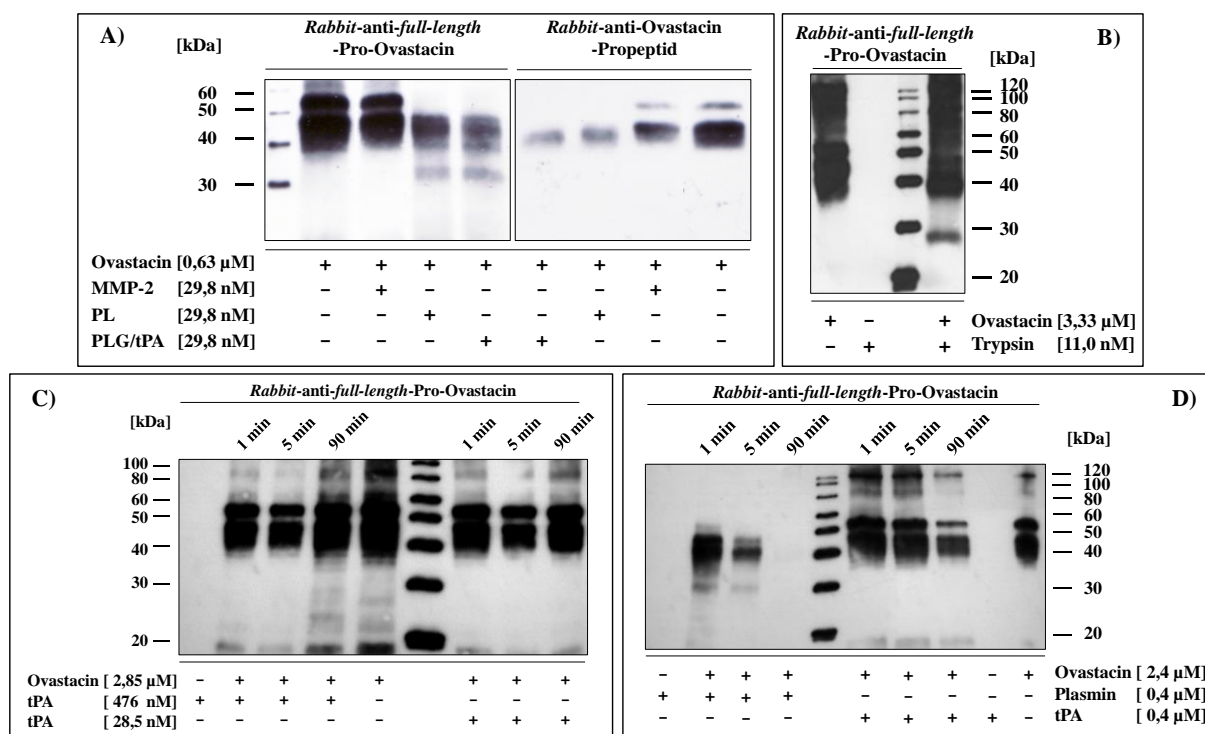


Abbildung 8: Prozessierung von Pro-Ovastacin-FL-Strep durch Trypsin, Plasmin, tPA und MMP-2 (Western-Blots nach 12% PAGE)

A) Ovastacin wird durch Plasmin und PLG/tPA, nicht jedoch durch MMP-2 prozessiert. Rekombinantes Pro-Ovastacin-FL-Strep wurde 30 min bei 37°C mit MMP-2, Plasmin (PL) und Plasminogen/tPA-Gemisch (21:1, ca. 0,4 μg aufgetragen) inkubiert. **B)** Prozessierung von Pro-Ovastacin durch Trypsin. Pro-Ovastacin-FL-Strep wurde 30 min bei 37°C mit Trypsin in molarem Verhältnis von ca. 300:1 inkubiert (aufgetragen sind ca. 2,4 μg). **C)** Inkubation von Ovastacin-FL-Strep mit tPA über eine Zeitspanne bis zu 90 min bewirkt keine Prozessierung von Ovastacin. tPA wurde in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:6 bzw. 1:100 eingesetzt. Auf das Gel wurden ca. 1,8 μg Ovastacin aufgetragen. **D)** Pro-Ovastacin-FL-Strep (1,5 μg) wird durch Plasmin aber nicht durch tPA prozessiert. Verhältnis zwischen tPA bzw. Plasmin und Ovastacin betrug 1:6.

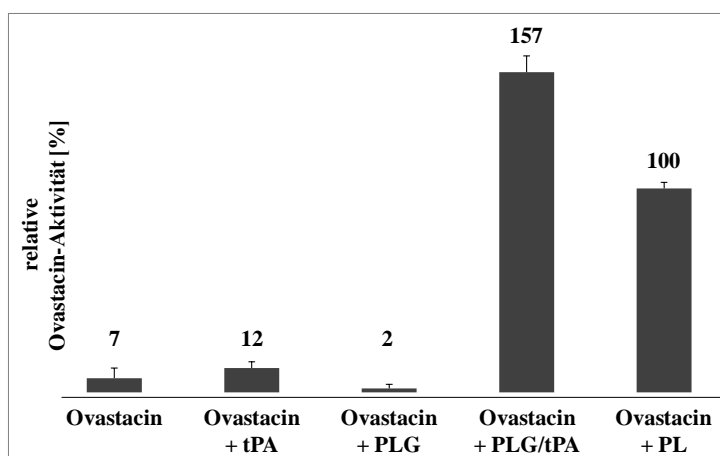


Abbildung 9: Nachweis der Ovastacin-Aktivität

Das rekombinante Ovastacin-FL-Strep [600 nM] wurde mit Plasmin, tPA, PLG (Plasminogen) und einem Gemisch aus tPA und PLG 30 min bei 37°C vorinkubiert. Die Substratumsatzrate von mit Plasmin aktiviertem Ovastacin (4,6 nM/s) wurde als 100 % festgelegt.

3.2.1 Optimierung des Aktivierungsprozesses von Pro-Ovastacin mit Plasmin

Nachdem festgestellt wurde, dass Plasmin als ein potenter Ovastacin-Aktivator wirkt, wurde eine Versuchsreihe zur Bestimmung optimaler Bedingungen für den Aktivierungsprozess durchgeführt. Sowohl menschliches als auch murines Plasmin eignen sich gleichermaßen gut

für die Aktivierung von Pro-Ovastacin-FL-Strep (nicht gezeigt). Die Mehrheit der Versuche wurde anschließend mit humanem Plasmin durchgeführt.

Hinsichtlich der Inkubationszeit und des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen Ovastacin und Plasmin stellte ich fest, dass die Aktivität des Ovastacins mit Verlängerung der Inkubationsperiode bis auf 30 min bei 37°C stets zunahm. Wurde die Prozessierung nach Ablauf dieser Zeit nicht durch Zugabe von des irreversiblen Inhibitors Pefabloc gestoppt, nahm die Aktivität des Ovastacins wieder ab. Dies konnte auch für Ansätze mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen zwischen Aktivator und Zielprotein beobachtet werden. Die besten Ergebnisse wurden für ein Mischungsverhältnis erreicht, bei dem auf zehn Moleküle Pro-Ovastacin-FL-Strep ein Molekül Plasmin kam (Abbildung 10).

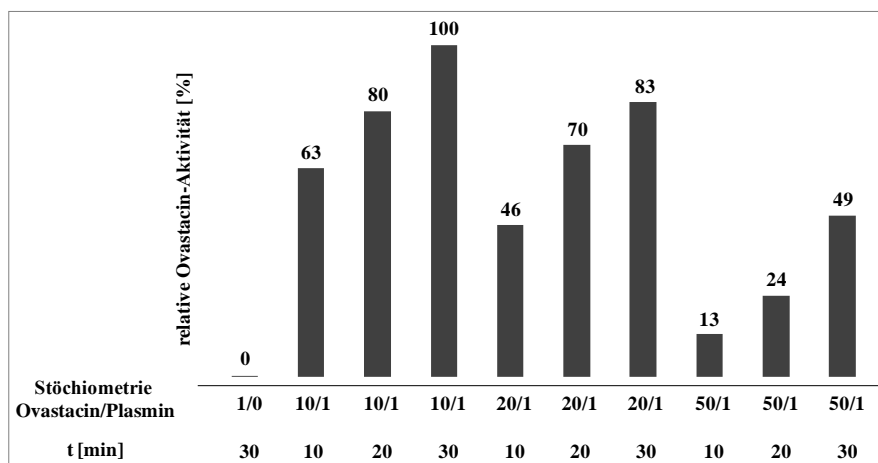


Abbildung 10: Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Aktivierung von Pro-Ovastacin
 Mit steigender Konzentration an Plasmin und Dauer der Inkubation wird höhere Aktivität des Ovastacins erreicht. Bei dem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Pro-Ovastacin und Plasmin von 10:1 und Inkubationszeit von 30 min ist diese am höchsten (100 %).

3.2.2 Bestimmung des reifen N-Terminus und massenspektrometrische Analyse des durch Plasmin aktivierten Pro-Ovastacins

Die endgültige Bestätigung dessen, dass Plasmin als Aktivator für Pro-Ovastacin fungiert, wurde durch die Bestimmung des reifen N-Terminus des Ovastacins erreicht. Dafür wurde das Pro-Ovastacin-FL-Strep mit Plasmin (10:1) inkubiert, unmittelbar danach wurde die Probe SDS-PAGE und Western-Blot unterzogen. Die Proteinbande bei 28 kDa, die als reifes aktives Ovastacin in Frage kam, wurde N-terminal durch Edman-Abbau sequenziert (Abbildung 11). Als Ergebnis wurde ein Leu-Leu-Ser-Val Aminosäure-Quartett festgestellt. Um auszuschließen, dass es sich um Fremdprotein handelt, wurde diese Proteinbande, sowie eine bei 31 kDa (Abbildung 11), massenspektrometrisch analysiert und eindeutig als Ovastacin identifiziert (Abbildung 12). Der gefundene N-Terminus befindet sich an der vorhergesagten

ERGEBNISSE

Grenze der katalytischen Domäne (GUEVARA ET AL., 2010), C-terminal eines Argininrestes im Propeptid (Abbildung 12).

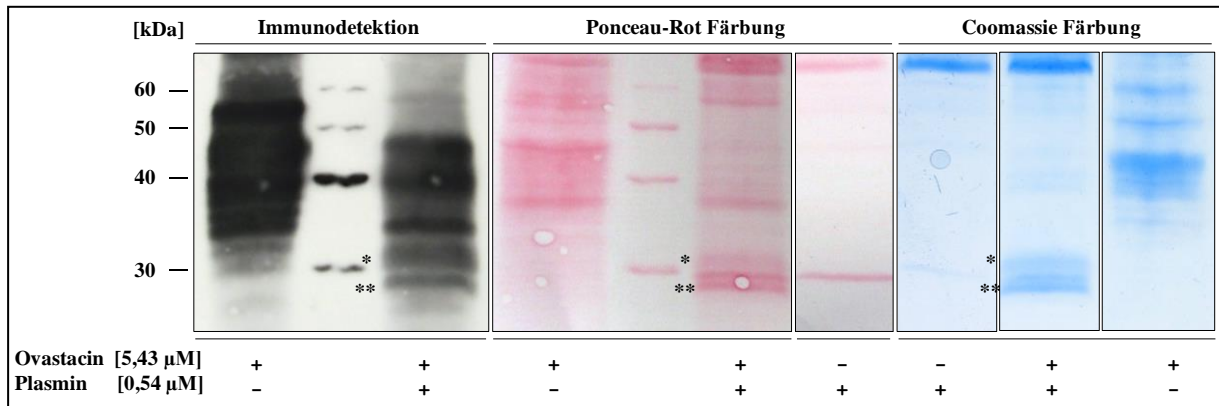


Abbildung 11: Präparation von Plasmin aktiviertem Ovastacin für die N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse

Von links: Western-Blot, nach 12 % PAGE; 18 µg Ovastacin pro Spur. Detektion mit *Rabbit-anti-full-length-Pro-Ovastacin* AK. Mit einem Sternchen ist die 31 kDa-Bande markiert, mit zwei Sternchen die 28 kDa-Bande. Der zweite Teil der gleichen PVDF-Membran wurde mit Ponceau-Rot zur Visualisierung der Proteinbanden behandelt. Rechts davon ist die Bahn mit der Plasmin-Kontrolle dargestellt. Die mit zwei Sternchen markierte 28 kDa-Bande wurde ausgeschnitten und unter der Bezeichnung OvaPL28 zur N-terminal sequenziert. Coomassie gefärbtes 12 % PAG mit aufgetrennter Plasmin-Kontrolle, Plasmin aktiviertem Ovastacin und unbehandeltem Ovastacin (je 23,8 µg Ovastacin). Proteinbanden OvaPL31_MALDI-TOF (*) und OvaPL28_MALDI-TOF (**) wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt.

```

APSASRCSGVCSTSVPEGFTPEGSPVFQDKDIPAINQGLISEETPES
SFLVEGDIIRPSPFR↓ LLSVTNNKWPKGVGGFVEIPFLLSRKYDELS
RRVIMDAFAEFERFTCIRFVAYHGQRDFVSIILPMAGCFSGVGRSGGM
QVSLAPTCLRKGRGIVLHELMHVLGFWHEHSRADRDRIYIQVNWNEI
LPGFEINFIKSRSTNMLVPYDYSSVMHYGRFAFSWRGQPTIIPLWTS
SVHIGQRWNLSTSDITRVCRLYNCSRSVPDSHGRGFEAQSDGSSLTP
ASISRLQRLLEALSEESGSSAPSGSRTGGQS IAGLGNSQQGWEHPPQ
STFSVGALARPPQMLADASKSGPGAGADSLSLEQFQLAQAPTVPLAL
FPEARDKPAPIQDAFERLAPLPGGCAPGSHIREVPRDRSWSHPQFEK

```

Abbildung 12: Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung und massenspektrometrischen Analyse der 28 kDa- bzw. 31 kDa-Ovastacinbanden

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Ovastacin-FL-Strep. Mit dem Pfeil ist die Plasmin-Spaltstelle an der Grenze zwischen Propeptid und katalytischer Domäne (fett gekennzeichnet). Rot markierte Aminosäuren **LLSV** wurden durch Edman-Abbau sequenziert. Sie stellen den N-Terminus der 28 kDa-Bande dar. Unterstrichene Peptide wurden in OvaPL28_MALDI-TOF-Proteinbande und orange markierte Peptide in OvaPL31_MALDI-TOF-Proteinbande massenspektrometrisch identifiziert. Kursiv dargestellt ist der Strep-tag mit dem Linker am C-Terminus.

3.2.3 Nachweis proteolytischer Aktivität von Ovastacin mittels Substrat-Zymographie

Um die enzymatische Aktivität von Ovastacin einer konkreten Proteinbande zuzuordnen, wurde eine Substrat-Zymographie durchgeführt. Neben mehreren durch Plasmin-Aktivität verursachten Lysehöfen im Casein-Zymographie-Gel, war es möglich mindestens einen Lysehof zu identifizieren, der auf die Ovastacin-Aktivität zurück zu führen war. Er befand sich nahe der

ERGEBNISSE

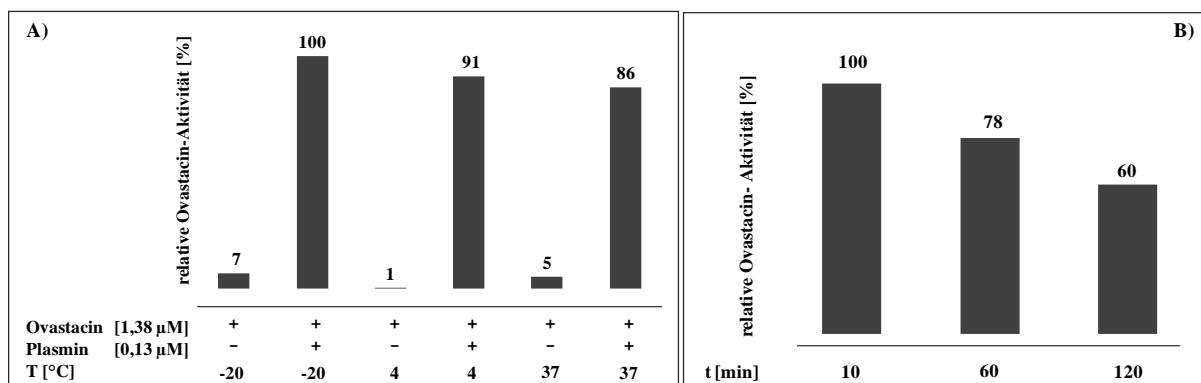


Abbildung 14: Bestimmung der Arbeitsbedingungen für Ovastacin

A) Ovastacin-FL-Strep wurde 6 Tage bei drei verschiedenen Temperaturen gelagert und anschließend mit Plasmin aktiviert. Eine geringe Aktivitätsabnahme bei den Proben, die über Gefrierpunkt gelagert wurden, wurde beobachtet. Als 100 % (2,9 nM/s) wurde die Substratumsatzrate der bei -20°C gelagerter Probe gesetzt.

B) Ovastacin (1 µM) wurde mit Plasmin aktiviert und bei 37°C gelagert. Nach 10, 60 und 120 min wurde eine Enzymaktivitätsmessung durchgeführt. Als 100 % (8,5 nM/s) wurde die Ovastacin-Aktivität nach 10 min gesetzt. Diese nahm mit der Dauer der Lagerung rapide ab, nach 120 min betrug sie nur noch 60 %.

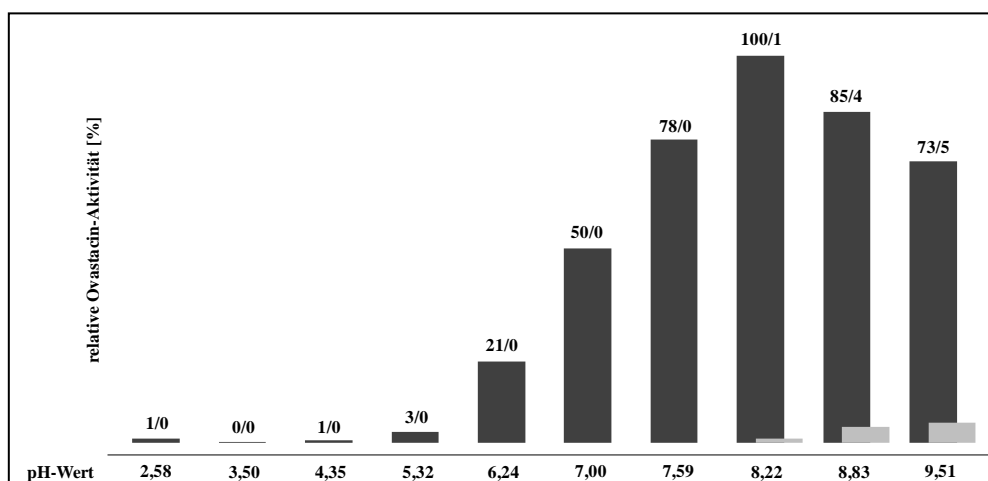


Abbildung 15: Bestimmung des pH-Optimums für aktives Ovastacin

Substratumsatzrate von aktiviertem Ovastacin (1 µM) bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Proteinase ist im sauren Bereich inaktiv, ca. ab pH 5 ist zunehmende Aktivität zu beobachten. Maximum ist bei pH 8,2 erreicht (ca. 2,9 nM/s). Nach dem Erreichen des Optimums ist ein Rückgang der Aktivität zu verzeichnen. Gleichzeitig ist eine Autoaktivierung der parallel untersuchten Pro-Ovastacin-Proben zu beobachten (graue Balken, Prozentangaben nach Schrägstrich). Unterschiedliche pH-Werte bei den Messungen wurden durch den Einsatz von Davies-Puffern (DAVIES, 1959) erreicht.

Außerdem wurde die positive Wirkung von Ca²⁺-Ionen und des nichtionischen Detergens Brij-35 auf die Aktivität von Ovastacin demonstriert. Die maximale Steigerung der Enzym-Aktivität wurde in Anwesenheit von 25 mM CaCl₂ verzeichnet (+42 %). Die Überschreitung dieser Konzentration führte wiederum zu einer Abnahme der Aktivität bis zum ursprünglichen Niveau. Zugabe der Kombination von 1 µM ZnCl₂, 5 mM CaCl₂ und 0,01 % Brij-35 zu den Messansätzen führte zu noch größerer Aktivitätssteigerung bis auf 421 %, verglichen mit der Probe ohne Zusätze (die Ergebnisse hierfür sind in der Abbildung 19 im Abschnitt 3.3.2

demonstriert). Dies ermöglichte die Reduzierung der Ovastacin-Konzentration bei den kinetischen Messungen bis auf 50 nM, gegenüber den vorher notwendigen 300 nM.

3.2.5 Bestimmung der effektiven Konzentration katalytisch aktiven Ovastacins

Die Frage nach der effektiven Ovastacin-Konzentration im Experiment war im Rahmen dieser Arbeit ein grundlegender, kritischer Aspekt. Einige kinetische Parameter sind ohne diese Information nicht korrekt zu bestimmen. Wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, nimmt nach der Aktivierung des Enzyms die Aktivität ab. Nur unter bestimmten Pufferbedingungen ist sie für die Dauer des Experiments ausreichend stabil.

Um es hier vorweg zu nehmen, es erwies sich als sehr hilfreich, dass die Bindung des Ovastacins an das Plasmaprotein Fetuin-B so fest war, dass unter den gewählten Konzentrationsbedingungen dieser Umstand für die Titration der effektiven Enzymkonzentration ausgenutzt werden konnte. Dies war enorm hilfreich, denn durch die Behandlung mit Plasmin wurde nicht die gesamte Menge an Proovastacin in die aktive Form konvertiert.

3.2.6 Kinetische Parameter des Ovastacins

Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_m für die von Ovastacin katalysierte Spaltung des Substrats Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂ stellte sich heraus, dass ab Substratkonzentrationen oberhalb von 60 μM Substrathemmung einsetzte ($K_{\text{si}} = 26 \pm 4,5 \mu\text{M}$, siehe Abbildung A8 im Anhang). Die Auswertung der Umsatzraten unterhalb 60 μM ergaben eine Michaeliskonstante von $34 \pm 2,2 \mu\text{M}$ (Abbildung 16). Die Umsatzrate betrug $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/E_0 = 2,6 \text{ s}^{-1}$ und die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_m = 7,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da alle sonstigen kinetischen Untersuchungen des Ovastacins mit den Substratkonzentrationen unter 40 μM durchgeführt wurden, war keine Beeinträchtigung der Inhibitionsstudien mit Plasmafetuinin durch die beobachtete Substrathemmung zu erwarten.

3.3 Entdeckung von Fetuin-B als potenten Inhibitor von Astacinproteinasen

Eine der Schlüsselbeobachtungen dieser Arbeit war die Entdeckung der inhibitorischen Wirkung von Fetuin-B gegen Ovastacin. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass Fetuin-A diese Wirkung nicht ausübt (DIETZEL ET AL., 2013). Beide Befunde wurden verifiziert und die Untersuchung der hemmenden Eigenschaften von Fetuin-B wurde auf weitere Mitglieder der Astacin-Familie ausgeweitet. Außer gegen Ovastacin wirkte Fetuin-B auch als leistungsfähiger Inhibitor gegen Meprin α , Meprin β , Astacin und Nephrosin. Desweiteren wurde gezeigt, dass auch menschliches Fetuin-B diese inhibitorische Wirkung gegenüber Ovastacin besitzt (hier

nicht gezeigt, alle anderen Experimente wurden mit murinem Fetuin-B durchgeführt). Zwei Vertreter der Astacinfamilie - BMP1 und TLL2 - wurden interessanterweise nicht inhibiert. Das homologe Plasmaprotein Fetuin-A war gegen keine der getesteten Astacinproteinasen inhibitorisch aktiv. In Falle von Astacin und Nephrosin wurde die Aktivität der Enzyme durch Fetuin-A überhaupt nicht beeinflusst. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Enzyme Ovastacin, TLL2, BMP1, Meprin α und Meprin β in Anwesenheit von Fetuin-A eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweisen. Wie aus Abbildung 17 **B** ersichtlich, ist dieser Anstieg der Aktivität abhängig von der Konzentration des Fetuin-A. In der halblogarithmischen Darstellung hat diese Aktivierungskurve einen Wendepunkt im nanomolaren Bereich, was auf eine spezifische Bindung des Fetuin-A am Enzym hindeutet.

Die Inhibitionskonstanten K_i für die Wechselwirkung von Fetuin-B und Astacinen liegen im nanomolaren Bereich, was die hohe Affinität des Inhibitors unterstreicht. In Falle von Ovastacin und Nephrosin war es nicht möglich, K_i zu ermitteln, weil die verfügbaren Substrate es nicht erlaubten, die Enzymaktivität im subnanomolaren Bereich zu messen. Daher konnten für beide Enzyme lediglich die IC_{50} -Werte bestimmt werden, also die Inhibitor Konzentration, die 50 % Inhibition bewirkt (Tabelle 17). IC_{50} -Werte reflektieren letztlich die Konzentration des Enzyms (BAICI ET AL., 2013). Abbildung 17 zeigt die Inhibition von Meprin β und Ovastacin bei Fetuin-B und aktivitätssteigernden Effekt von Fetuin-A auf Ovastacin.

3.3.1 Einfluss von Fetuin-A auf die Interaktion zwischen Fetuin-B und Astacinen

Beeinflussen sich Fetuin-A und Fetuin-B wechselseitig bei ihrer Interaktion mit Astacinproteinasen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden beide Fetuine mit Ovastacin vorinkubiert und die Änderungen in Enzymaktivität beobachtet. Es stellte sich heraus, dass Fetuin-B als Hemmstoff völlig unabhängig von der Anwesenheit von Fetuin-A fungiert (Abbildung 18 **A**). Dabei spielte es keine Rolle, ob Ovastacin zuerst mit Fetuin-A oder mit Fetuin-B vorinkubiert wurde. Die aktivitätssteigernde Wirkung von Fetuin-A war allerdings nur bei Abwesenheit von Fetuin-B zu beobachten. Gleiche Ergebnisse konnten für Meprin β erzeugt werden (nicht gezeigt). Die Vorinkubationsdauer mit der Proteinase erscheint für die Entwicklung der hemmenden Wirkung durch Fetuin-B ebenfalls nicht limitierend zu sein (Abbildung 18 **B**). Das Gleichgewicht stellt sich vermutlich sehr schnell ein.

ERGEBNISSE

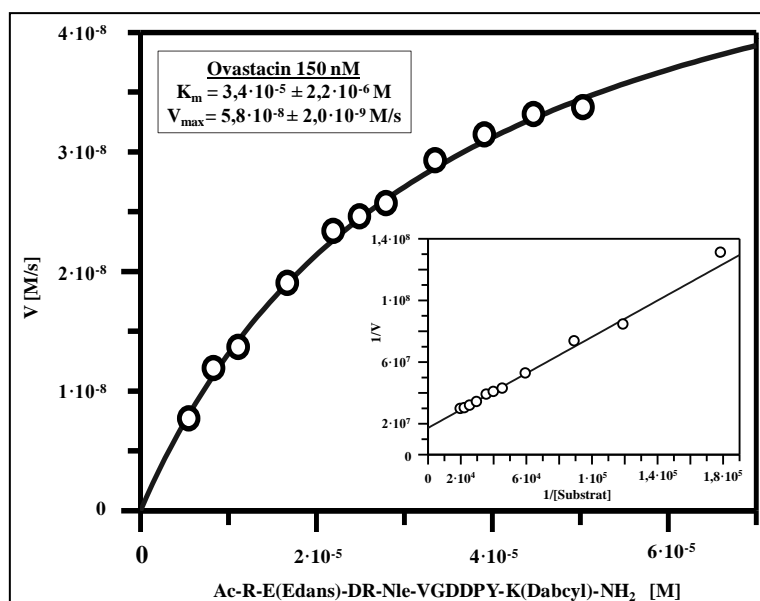


Abbildung 16: Bestimmung der kinetischen Parameter für Ovastacin

Es wurde die enzymatische Aktivität von 150 nM Ovastacin mit unterschiedlichen Mengen des fluorogenen Substrats Ac-R-E(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(DabcyI)-NH₂ ermittelt. Wird die tatsächliche Menge an aktivem Ovastacin mit 15% der eingesetzten Pro-Ovastacin-Konzentration angenommen (siehe Abschnitt 4.4), so beträgt die effektive Konzentration ca. 22 nM. Die erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung von K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m mit dem Programm GraFit 4 (Erithacus Software) verwendet. Die Reaktionen fanden bei 37°C, mit dem Zusatz von 1 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂ und 0,01 % Brij-35 statt.

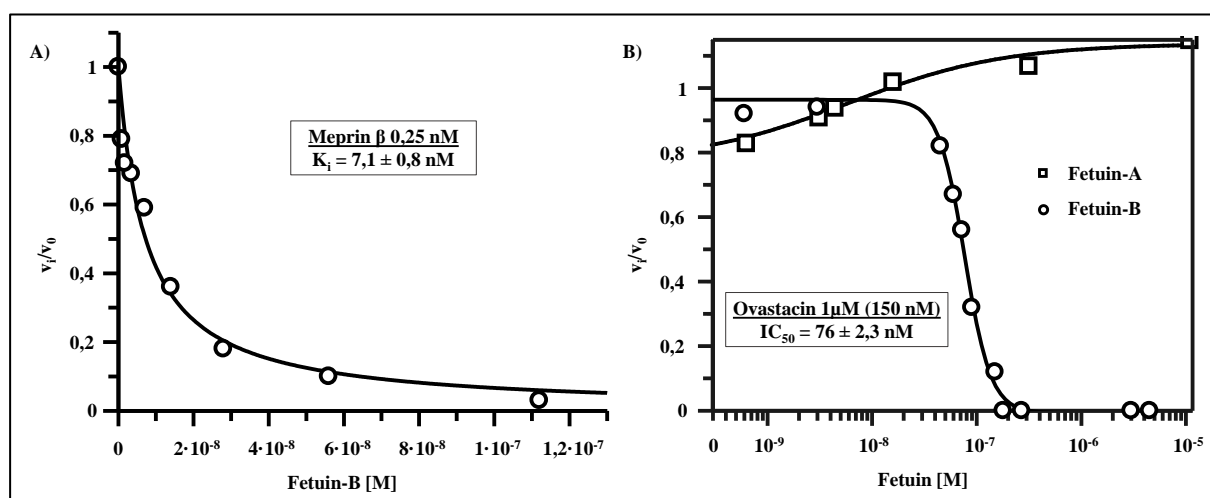


Abbildung 17: Interaktion von Fetuin-B mit Astacinproteinasen Meprin β und Ovastacin

Fetuin-B wurde als potenter Hemmstoff von Astacinproteinasen entdeckt; sein Paralogon Fetuin-A besitzt keine inhibitorischen Eigenschaften gegenüber diesen Enzymen. **A)** Inhibition von Meprin β durch Fetuin-B; Auftragung nach Bieth (1984). **B)** Halblogarithmische Auftragung der Inhibition von 1 μ M (150 nM)* Ovastacin durch Fetuin-B und der Aktivierung des Ovastacins durch Fetuin-A (DIETZEL ET AL., 2013). Die Substratumsatzraten der Enzyme wurden mit 20 μ M (Meprin β) und 32 μ M (Ovastacin) Ac-R-E(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(DabcyI)-NH₂ Substrat gemessen. v_i - Substratumsatzrate der inhibierten Reaktion, v_0 - Substratumsatzrate der nichtinhibierten Reaktion. *Die Konzentration an aktivem Ovastacin ergibt sich aus der Tatsache, dass unter den gewählten Konzentrationsbedingungen eine Titration des Enzyms durch den Inhibitor erfolgt (Abschnitt 4.4).

Tabelle 17: Inhibitionskonstanten der Reaktionen zwischen Astacin-Proteinasen und Fetuin-B

Enzymaktivitätsmessungen fanden in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen an Inhibitor, bei konstanten 37°C mit fluorogenen Substraten statt. Die Quotienten zwischen Substratumsatzraten inhibierter und nicht inhibierter Reaktionen wurden gegen entsprechende InhibitorKonzentration aufgetragen. K_i wurden nach Bieth (1984) bestimmt. Der IC_{50} -Wert ist abhängig von der eingesetzten Enzymmenge. *Die Konzentration an aktivem Ovastacin ergibt sich aus der Tatsache, dass unter den gewählten Konzentrationsbedingungen eine Titration des Enzyms durch den Inhibitor erfolgt (siehe Abschnitt 4.4). Es unterscheidet sich von dem in der Abbildung 17 vorgestellten Ergebnis. Dort wurde eine höhere Ovastacinkonzentration eingesetzt. Keine Inhibition ist mit kI abgekürzt.

Proteinase	K_i [nM] / IC_{50} [nM]	[Fetuin-B]	[Enzym]	[Substrat]
Meprin α	K_i $33 \pm 2,4$	3,5 nM – 0,1 μ M	0,25 nM	20 μ M
Meprin β	K_i $7,1 \pm 0,8$	0,9 nM – 0,1 μ M	0,25 nM	20 μ M
Astacin	K_i $16 \pm 1,5$	0,2 nM – 0,9 μ M	1 nM	0,4 mM
Ovastacin	IC_{50} $18 \pm 1,2$	0,4 nM – 1,2 μ M	320 nM (36 nM)*	21 μ M
Nephrosin	IC_{50} $0,6 \pm 0,1$	0,02 nM – 1 μ M	10 nM	12 μ M
TLL2	kI	0,2 nM – 2,0 μ M	180 nM	20 μ M
BMP1	kI	0,2 nM – 2,0 μ M	10 nM	20 μ M

3.3.2 Wirkung von Fetuin-A auf Astacine

Die aktivitätssteigernde Wirkung von Fetuin-A auf Astacine war überraschend und wurde in einer Reihe von Experimenten genauer geprüft. Es wurde angenommen, dass Fetuin-A als Calciumphosphatcarrier im Plasma mit seiner polaren Oberfläche Ionen binden könnte, die auf das Enzym Einfluss nehmen würden. Aus diesem Grund wurde die Aktivität von Ovastacin in Anwesenheit des Plasmaproteins Albumin, das ebenfalls als Carrierprotein fungiert, getestet. Bis zu einer Konzentration von 1 μ M steigerte BSA tatsächlich die Aktivität der Proteinase (Abbildung 19 A). Daraufhin wurde Calcium als möglicher aktiver Faktor angesehen. Wie bereits im Abschnitt 3.2.4 beschrieben wurde, wirkte Calcium allein oder in Kombination mit Zinkionen und Brij-35 aktivitätssteigernd (Abbildung 19 B). Dabei muss angemerkt werden, dass die inhibierende Wirkung von Fetuin-B dadurch unbeeinflusst blieb, und die aktivierende Wirkung von Fetuin-A dadurch überdeckt wurde (Abbildung 19 C). Ähnliche Befunde erhielt ich auch mit Meprin β (nicht gezeigt).

ERGEBNISSE

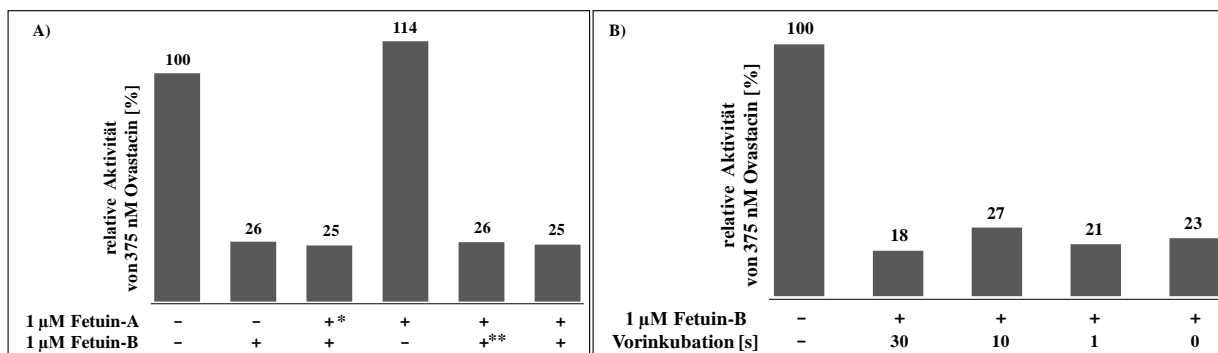


Abbildung 18: Interaktion von Fetuin-B und Ovastacin in Abhängigkeit von Vorinkubationszeit und Anwesenheit von Fetuin-A

A) Aktivität des Ovastacins mit oder ohne Vorinkubation mit Fetuin-A und/oder Fetuin-B. Wenn das Enzym zuerst mit Fetuin-A und nach 5 min (*) mit Fetuin-B, oder in umgekehrten Reihenfolge (**), oder mit beiden Fetuinen gleichzeitig inkubiert wurde, wurde nur die hemmende Wirkung von Fetuin-B beobachtet. Als Fetuin-A bzw. Fetuin-B wurden FA_WT und FB_WT_4 verwendet. **B)** So weit es technisch möglich war, wurde gezeigt, dass die inhibitorische Wirkung von Fetuin-B auf Ovastacin unabhängig von Vorinkubationszeit ist. Als Fetuin-B wurde FB_L1L_4 eingesetzt.

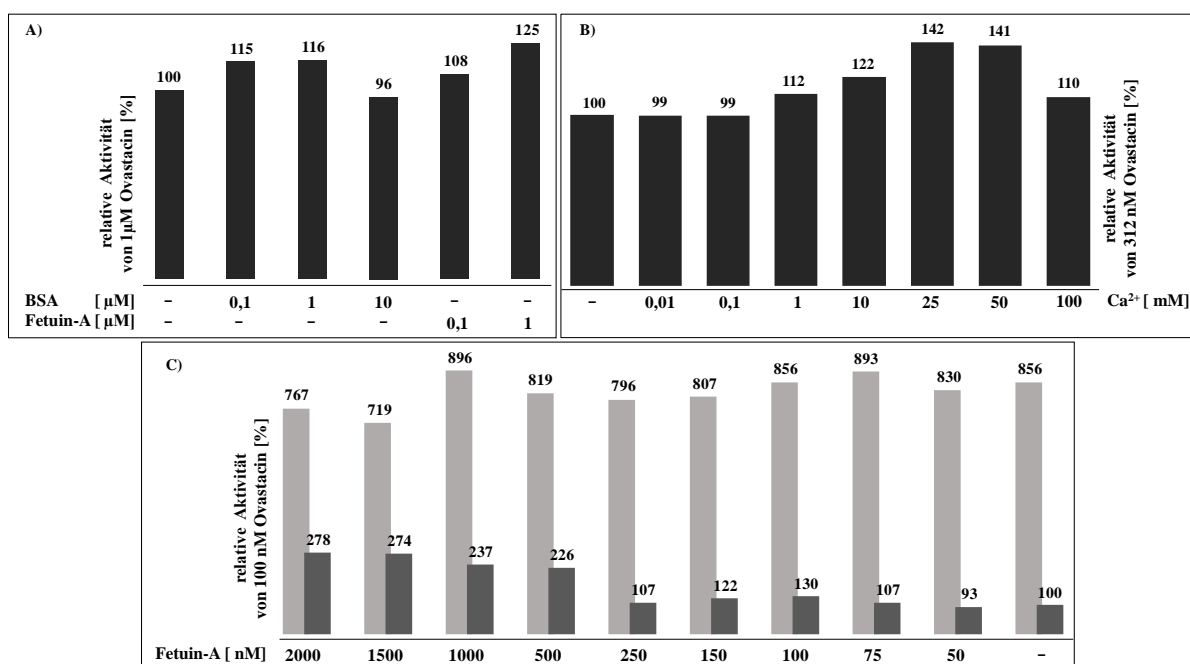


Abbildung 19: Untersuchung der Wirkung von Fetuin-A auf Ovastacin

A) Neben Fetuin-A steigert auch das Plasmaprotein BSA die enzymatische Aktivität von Ovastacin. **B)** Calcium-Ionen steigern die Ovastacin-Aktivität (bis zu 142 % bei 25 mM). **C)** Zwar steigert die Zugabe von Fetuin-A die Aktivität von Ovastacin (bis 278 % bei 2 μ M, dunkelgrau Balken), es wird aber um ein Vielfaches (um 800 %, hellgraue Balken) in Anwesenheit von 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂ und 0,01% Brij-35 überdeckt und übertroffen. Als 100 % wurde die Ovastacin-Aktivität in Abwesenheit von Zusatzfaktoren gesetzt. In **C)** wurde FA_WT statt Fetuin-A aus DIETZEL ET AL., 2013 verwendet.

3.4 Kinetische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Fetuin-A bzw. Fetuin-B und proteolytischen Enzymen

3.4.1 Fetuine sind keine Inhibitoren von ADAMs und MMPs

Astacine, ADAM und MMP zählen zur gleichen Proteinsuperfamilie (Metzinkine) und teilen als nahverwandte Proteinasen einige gemeinsame Charakteristika. Allerdings wurde in Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass ADAMs und MMPs nicht durch Fetuin-B inhibiert werden. Getestet wurden ADAM10, MMP-2, MMP-8, MMP-9 und MMP-13. Weder Fetuin-A noch Fetuin-B zeigten irgendeinen Einfluss auf ADAM10, MMP-2 und MMP-13. Lediglich die Aktivität von MMP-9 wurde durch hohe (mikromolare) Konzentrationen von Fetuin-A schwach beeinflusst, gleiches wurde für MMP-8 und beide Fetuine beobachtet (bei beiden ca. 70-80 % Restaktivität). Durch Zugabe von millimolaren Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen konnte der Effekt im Fall von MMP-9 rückgängig gemacht werden, nicht jedoch bei MMP-8. Hierbei könnte es sich allerdings um Artefakte und keine Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen handeln.

3.4.2 Fetuine sind keine Inhibitoren von Cystein- und Aspartatproteinasen

Da die Fetuine zur der Cystatinsuperfamilie gehören, die zahlreiche Inhibitoren für Cysteinproteinasen beinhaltet, wurden Fetuin-A bzw. Fetuin-B mit mehreren Vertretern dieser Proteinasenklasse getestet. Eingesetzt wurden Papain aus dem Milchsaft der Papayapflanze, die lysosomalen Enzyme Cathepsin B, Cathepsin K, Cathepsin S sowie das cytosolische Legumain. Die Aktivität keiner dieser Proteinasen wurde durch Anwesenheit von Fetuin-A oder Fetuin-B gehemmt. Es wurde sogar eine Steigerung der Substratumsatzrate von Cathepsin B, Cathepsin K und zum Teil von Papain in Abhängigkeit von Konzentration der eingesetzten Fetuine beobachtet.

Die lysosomale Aspartatproteinasen Cathepsin D wurde ebenfalls nicht durch Fetuin-A oder Fetuin-B beeinflusst.

3.4.3 Fetuine sind keine Inhibitoren von Serinproteinasen

In der Literatur wurde Fetuin mehrfach als Inhibitor von Serinproteinasen beschrieben. Dies bezog sich meistens auf Fetuin-A, da das zweite Paralog Fetuin-B erst bei der Sequenzierung des Humangenoms entdeckt wurde (OLIVIER ET AL., 2000). Die Veröffentlichungen zu diesem Thema sind zum Teil recht widersprüchlich (GALEMBECK UND CANN, 1974; ROHRLICH UND RIFKIN, 1981; YAMAMOTO UND SINOHARA, 1993; NAWRATIL ET AL., 1996; ASHIDA ET AL., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Fetuin-A und Fetuin-B mit verschiedenen Serinproteinasen wie Chymotrypsin, Trypsin, Plasmin und tPA getestet. Es wurde keine

Inhibition von Chymotrypsin sowie tPA festgestellt. Im Fall von Trypsin und Plasmin wurde allerdings eine temporäre Enzymhemmung mit beiden Fetuinen beobachtet, was sich mit den Beobachtungen von GALEMBECK UND CANN (1974) deckt. Dieser inhibitorische Effekt verschwand jedoch bei längerer Inkubation (Abbildung 20), sodass beide Fetuine eher als Substrate statt als Inhibitoren dieser Enzyme angesehen werden müssen. Diese Vermutung wurde durch die im Abschnitt 3.5 präsentierten Ergebnisse in ihrer Gültigkeit bestätigt.

3.5 Prozessierung von Fetuin-A und Fetuin-B

So ähnlich Fetuin-A und Fetuin-B auf dem ersten Blick erscheinen, so unterschiedlich sind ihre funktionellen Eigenschaften. Fetuin-B agiert als spezifischer Hemmstoff für Astacinproteinasen, während Fetuin-A eher aktivitätssteigernd wirkt und im Rahmen der Calciumphosphat-Hämöostase eine wichtige Carrierrolle innehat. Durch Inkubation der beiden Fetuine mit Astacinproteinasen und die anschließende Untersuchung im Western-Blot wurde deutlich, dass Ovastacin, Meprine und Flusskrebs Astacin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nur das Fetuin-A fragmentieren, nicht jedoch das Fetuin-B. Dies ist in Abbildung 21 exemplarisch für Astacin gezeigt. Schon nach 2 min der Koinkubation entstanden Fetuin-A Fragmente. Nach 24 Stunden war die Fetuin-A Bande (ca. 58 kDa) verschwunden und nur noch eine Abbaubande bei ca. 40 kDa zu sehen. Das inhibitorische Fetuin-B blieb dagegen unversehrt.

Auch BMP1 ist unfähig Fetuin-B zu prozessieren (Abbildung 22). Mit Fetuin-A trat nach 24 h Koinkubation die erste Prozessierungsbande (ca. 50 kDa) auf.

Die Cysteinproteinase Papain prozessierte mit fortschreitender Koinkubationszeit Fetuin-A deutlich, so dass nach 24 h eine Proteinbande mit Molekulargewicht knapp unter 50 kDa entstanden war (Abbildung 23 A). Fetuin-B ist dagegen resistent. In Abbildung 23 B ist zu sehen, dass nach 2 min bereits eine Prozessierung von Fetuin-B auftritt. Die fast identische Bandenverteilung bei den Ansätzen nach 1 h deutet darauf, dass es sich hier um Artefakte handelt. Dieser Befund wird in späteren Abschnitten näher diskutiert.

Trypsin degradiert Fetuin-A beinahe vollständig nach nur 60 min (Abbildung 24 A). Im Falle von Plasmin ist dieser Prozess langsamer. Auch Fetuin-B wird durch Plasmin effizient degradiert. Abbildung 24 B Plasmin führt zum Entstehen von drei intensiven Proteinbanden im Bereich von 40 - 30 kDa, welche mit *Rabbit*-anti-Fetuin-B AK zu detektieren sind. Dabei verliert die Hauptbande des Fetuins-B (ca. 66 kDa) an Intensität und zwei weitere Banden bei 60 bzw. 50 kDa verschwinden fast gänzlich. Etwas anders verläuft die Prozessierung von Fetuin-B durch Trypsin. Hier entstehen zwischen 40 und 30 kDa zwei Banden mit geringerer

ERGEBNISSE

Intensität als im Fall von Plasmin. Die Fetuin-Hauptbande wird auch hier geringfügig schmaler. Gleichzeitig entstehen temporär zwei Banden bei 60 bzw. 50 kDa, die mit fortschreitender Inkubation wieder verschwinden.

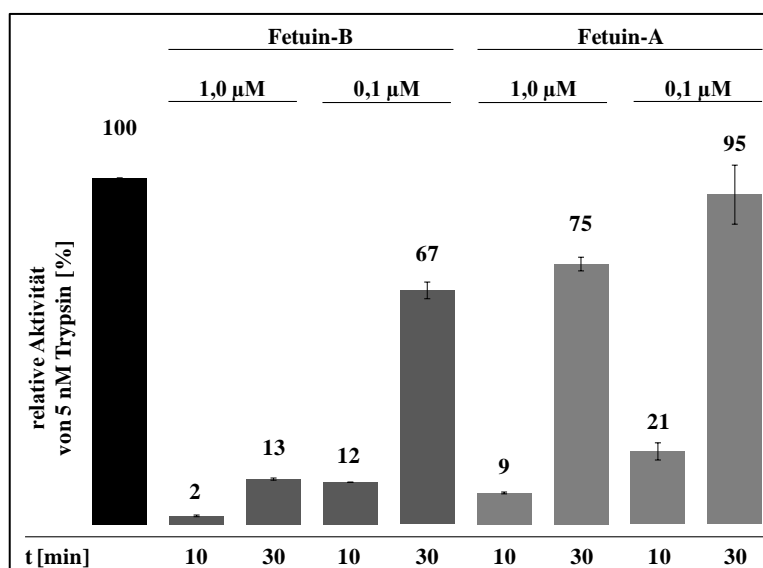


Abbildung 20: Vorübergehende Inhibition von Trypsin durch Fetuin-A und Fetuin-B

Trypsin wurde für 10 min bzw. 30 min mit 1 μM oder 0,1 μM Fetuin-A oder Fetuin-B bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität der Proben bestimmt. Als 100 % wurde die Aktivität von unbehandeltem Trypsin ausgewählt. Zu beobachten ist zeitabhängige Zunahme der Substratumsatzrate von mit Fetuinen versetzten Trypsin-Proben.

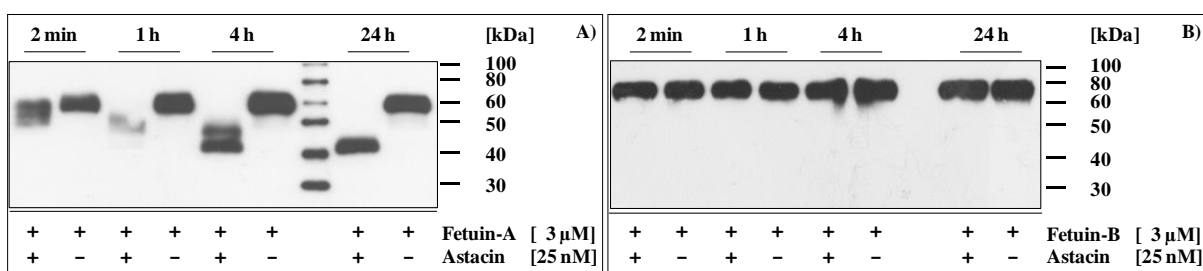


Abbildung 21: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Astacin

Fetuin-A bzw. Fetuin-B wurde mit Astacin in einem molaren Verhältnis von 120:1 für die Dauer bis 24 h bei 37°C koinkubiert. Anschließend wurde das Proteingemisch mit heißem Probenpuffer versetzt und in einem 12 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot-Verfahrens, wurden sie mit Hilfe von *Rabbit-anti-Fetuin-A* bzw. *Rabbit-anti-Fetuin-B* AK detektiert. Pro Bahn wurden ca. 1,3 μg Fetuin-A bzw. ca. 1,5 μg Fetuin-B aufgetragen. **A)** Fetuin-A wurde durch Astacin in zeitabhängigem Muster prozessiert. **B)** Astacin war nicht fähig Fetuin-B zu prozessieren.

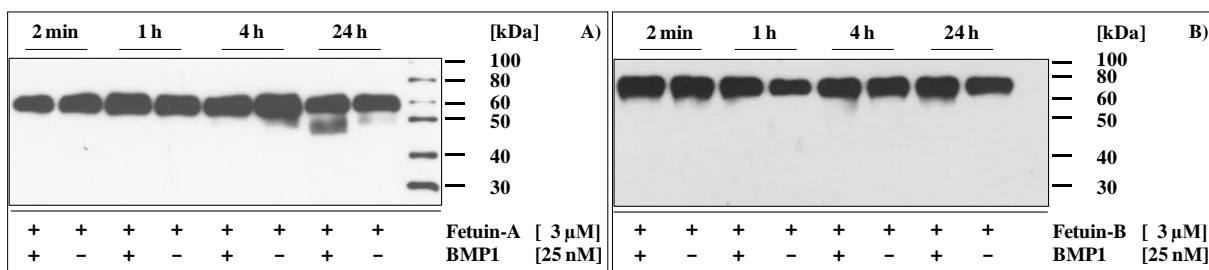


Abbildung 22: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch BMP1

A) Fetuin-A wurde durch BMP1 nach 24 h Koinkubation geringfügig prozessiert. **B)** BMP1 war nicht fähig Fetuin-B zu prozessieren. Western-Blot wurde mit Hilfe von *Rabbit-anti-Fetuin-A* bzw. *Rabbit-anti-Fetuin-B* AK detektiert (12 % PAGE). Pro Bahn wurden ca. 1,3 μg Fetuin-A bzw. ca. 1,5 μg Fetuin-B aufgetragen.

ERGEBNISSE

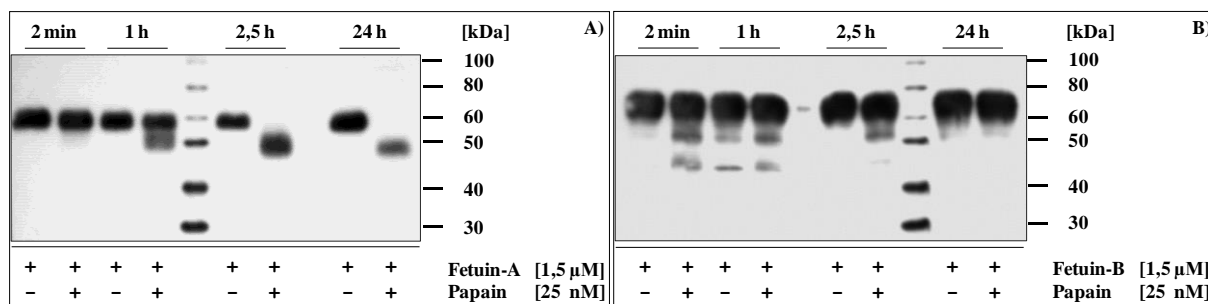


Abbildung 23: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Papain

Fetuin-A bzw. Fetuin-B wurde mit Papain in einem molaren Verhältnis von 60:1 für die Dauer bis 24 h bei 37°C koinkubiert. Das Proteingemisch wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit heißem Probenpuffer versetzt und in einem 12 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot-Verfahrens, wurden sie mit Hilfe von *Rabbit-anti-Fetuin-A* bzw. *Rabbit-anti-Fetuin-B* AK detektiert. Pro Bahn wurden ca. 0,6 µg Fetuin-A bzw. ca. 0,75 µg Fetuin-B aufgetragen. **A)** Fetuin-A wurde durch Papain in zeitabhängigem Muster prozessiert. **B)** Die Prozessierung von Fetuin-B war weniger deutlich.

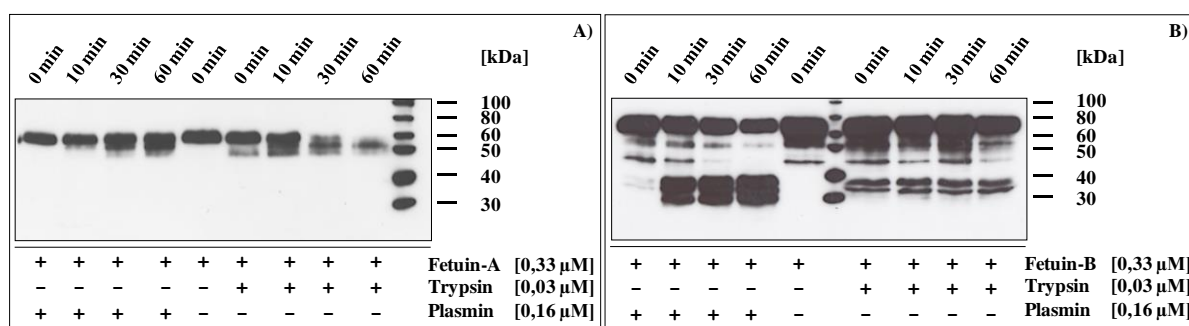


Abbildung 24: Prozessierung von Fetuin-A bzw. Fetuin-B durch Trypsin bzw. Plasmin

Fetuin-A bzw. Fetuin-B wurde mit Trypsin bzw. Plasmin in einem molaren Verhältnis von 11:1 bzw. 2:1 für die Dauer bis 60 min bei 37°C koinkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Proteingemisch mit heißem Probenpuffer versetzt und in einem 12 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western-Blot-Verfahrens, wurden sie mit Hilfe von *Rabbit-anti-Fetuin-A* bzw. *Rabbit-anti-Fetuin-B* AK detektiert. Pro Bahn wurden ca. 0,25 µg Fetuin-A bzw. ca. 0,33 µg Fetuin-B aufgetragen. **A)** Fetuin-A wurde durch Plasmin und noch deutlicher von Trypsin in zeitabhängigem Muster prozessiert. **B)** Die Prozessierung von Fetuin-B fand ebenfalls statt.

3.6 Bioinformatische Analyse von Fetuin-A und Fetuin-B

Aus dem multiplen Sequenz-Alignment (Abbildung 26) der Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuin-A, Fetuin-B (FB_L1L1_4, FB_HY_L1L1, eine Übersicht über die Aufbau von mutierten Fetuinen ist der Abbildung 25 zu entnehmen), KNG, Cystatin A und Cystatin C aus *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Gallus gallus* werden strukturelle Gemeinsamkeiten ersichtlich. Für die verfolgte Fragestellung - Aufklärung der hemmenden Wirkung von Fetuin-B - war unter anderem der Bereich der ersten Haarnadelstruktur (siehe Abbildung 27 und 28) interessant. Dieser ist zusammen mit dem zweiten *hairpin loop* und dem Aminoterminus involviert in die Interaktion mit dem aktiven Zentrum von Cysteinproteinasen der Papainfamilie. Der konservierte Sequenzabschnitt Q-X-V-X-G des ersten *hairpin loops* ist im Cystatin A, im Cystatin C, in der zweiten und dritten Cystatin-ähnlichen Domäne von KNG und in der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B (nicht FB_L1L1_4,

FB_HY_L1L1) aller Spezies vorhanden. Beide Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuin-A und die erste Cystatin-ähnlichen Domäne von KNG besitzen diese Konservierung nicht. Die Situation im ersten *hairpin* Motiv der ersten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B ist nicht eindeutig. Zwar gibt es in dieser Position in keiner Spezies das Motiv Q-X-V-X-G, aber etwas C-terminal verschoben existiert das Motiv Q-X-X-X-G (bei Maus und Huhn). Beim Menschen ist nur der Glycinrest an dieser Stelle konserviert.

Das Homologiemodell der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B zeigt große Übereinstimmungen mit dem menschlichen Cystatin C. Die Bereiche der ersten Haarnadelstruktur beider Proteine decken sich zwar nicht zu 100 %, aber die konservierten Aminosäure Gln, Val und Gly liegen in etwa gleichen Positionen (Abbildung 27). Werden die Modelle der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 verglichen (Anhang Abbildung A7), fallen die deutlichen Unterschiede in Bereich der ersten Haarnadelstruktur auf (Abbildung 28). Bei beiden mutierten Proteinen ist der Loop verlängert, besonders deutlich ist es beim FB_HY_L1L1 zu erkennen. Außerdem ist Gln C-terminal verschoben.

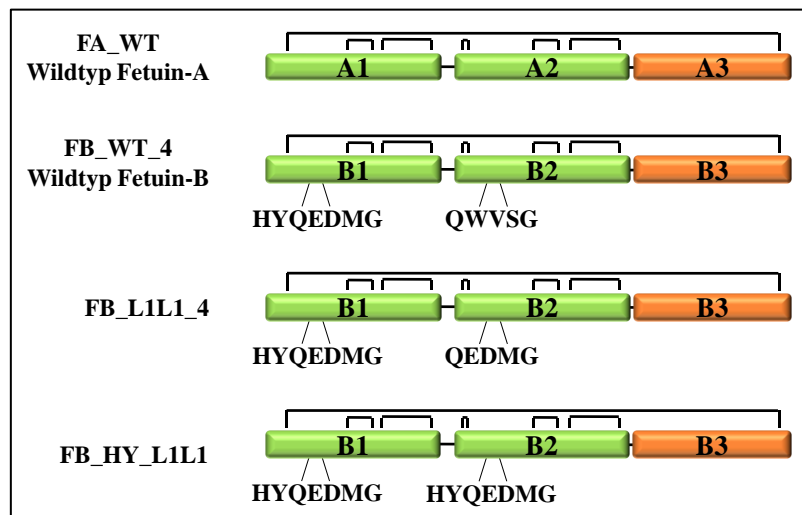


Abbildung 25: Schematische Darstellung rekombinant exprimierten Fetuine

Als FA_WT wurde Wildtyp Fetuin-A und als FB_WT_4 Wildtyp Fetuin-B bezeichnet. FB_L1L1_4 stellt eine Fetuin-B – Variante dar, bei der die Aminosäuren QWVSG erster Haarnadelstruktur der zweiten Domäne durch QEDMG aus erster Haarnadelstruktur der ersten Domäne ersetzt wurden. FB_HY_L1L1 stellt eine Fetuin-B – Variante dar, bei der die Aminosäuren QWVSG erster Haarnadelstruktur der zweiten Domäne durch HYQEDMG aus erster Haarnadelstruktur der ersten Domäne ersetzt wurden.

ERGEBNISSE



Abbildung 26: Multiples Sequenz-Alignment der Cystatin-ähnlichen Domänen von Cystatin A, Cystatin C, Fetuin-A, Fetuin-B und KNG

Die Proteinsequenzen wurden der Datenbank "The Universal Protein Resource" (<http://www.uniprot.org/>) entnommen. Alignment wurde mit dem Programm SeaView4 (MUSCLE-Algorithmus) angefertigt. Mit einem schwarzen Rahmen markiert ist die erste Haarnadelstruktur (vgl. Abbildung 27). Die Abkürzungen bedeuten: Musmu - *Mus musculus*, Homsa - *Homo sapiens*, Galga - *Gallus gallus*. Weiter sind die UniProt Protein ID und Aminosäuren-Positionen der jeweiligen Cystatin-ähnlichen Domäne angegeben: MusmuCystA (|P56567|), HomsaCystA (|P01040|), GalgaCystA (|F1NHG8|), MusmuCystC (|P21460|21-140), HomsaCystC (|P01034|27-146), GalgaCystC (|P01038|24-139), MusmuFB1 (|Q9QXC1|28-141), HomsaFB1 (|Q9UGM5|25-138), GalgaFB1 (|F1NHT5|24-137), MusmuFB2 (|Q9QXC1|152-264), HomsaFB2 (|Q9UGM5|149-255), GalgaFB2 (|F1NHT5|148-259), MusmuFA1 (|P29699|19-133), HomsaFA1 (|P02765|27-133), GalgaFA1 (|E1BZE1|21-130), MusmuFA2 (|P29699|144-250), HomsaFA2 (|P02765|144-255), GalgaFA2 (|E1BZE1|141-250), MusmuKNG1 (|O08677|28-131), HomsaKNG1 (|P01042|28-132), GalgaKNG1 (|E1BX43|28-132), MusmuKNG2 (|O08677|150-253), HomsaKNG2 (|P01042|151-254), GalgaKNG2 (|E1BX43|151-253), MusmuKNG3 (|O08677|272-375), HomsaKNG3 (|P01042|273-376), GalgaKNG3 (|E1BX43|272-375).

3.7 Herstellung von Fetuin-A, Fetuin-B und seinen mutierten Varianten in Insektenzellen

Um die Rolle der Haarnadelstrukturen für die inhibitorisch Funktion zu testen, führte ich Punktmutationen ein. Die Herstellung der für die Expression in Insektenzellen optimierten DNA-Konstrukte von rekombinantem murinen Fetuin-A (P29699, FA_WT, 1080 bp), Fetuin-B (Q9QXC1, FB_WT_4, 1209 bp) und seinen mutanten Formen (FB_L1L1_4, 1209 bp und FB_HY_L1L1, 1215 bp) wurde auf Auftrag von der Firma *Life Technologies* ausgeführt. Sie wurden in den Wunschvektor pFastBac1 inkloniert und in lyophilisierter Form geliefert. Vektorkarten und die DNA- und Protein-Sequenzen sind dem Anhang A3-A6 zu entnehmen.

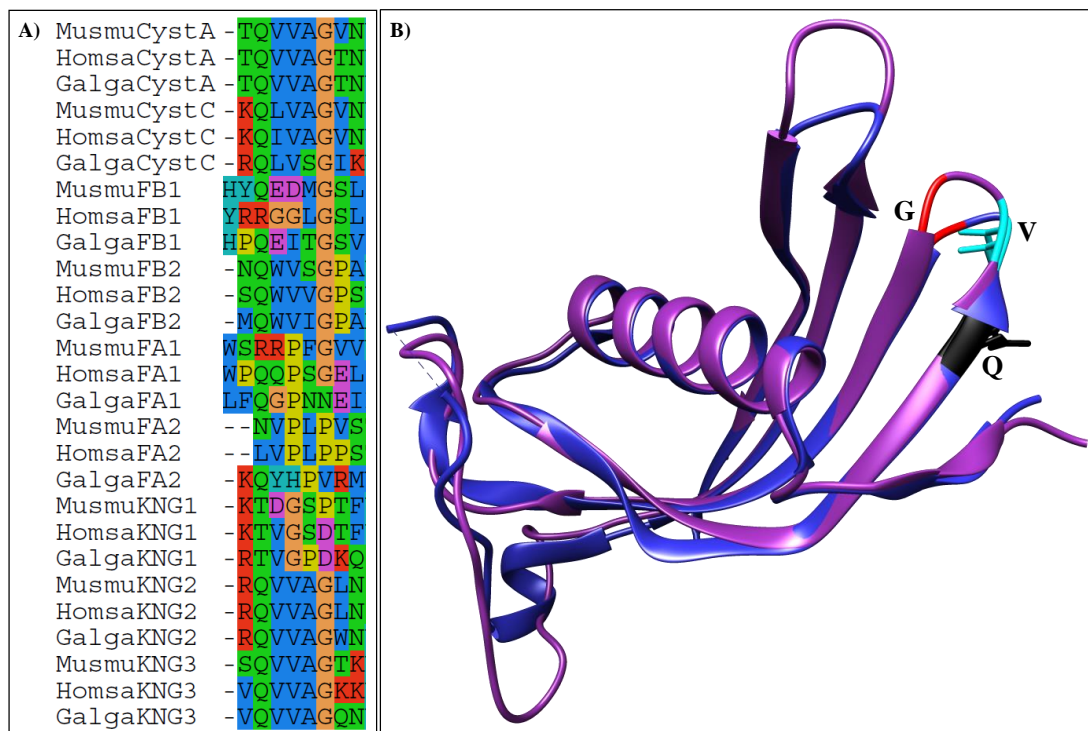


Abbildung 27: Menschliches Cystatin C und zweite Cystatin-ähnliche Domäne von murinem Fetuin-B

A) Ausschnitt aus dem multiplen Sequenz-Alignment von Cystatin A, Cystatin C und der Cystatin-ähnlichen Domänen von Fetuin-A, Fetuin-B sowie KNG. Die Proteine stammen aus *Mus musculus* (Musmu), *Homo sapiens* (Homsa) und *Gallus gallus* (Galga). Das Alignment wurde mit dem Programm SeaView4 unter Verwendung des Muscle-Algorithmus angefertigt. Der Ausschnitt zeigt den Bereich der ersten Haarnadelstruktur. **B)** Überlagerte Darstellung von menschlichem Cystatin C (blau, PDB ID: 3GAX) und dem Modell der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne des murinen Fetuins-B (violett). Das Modell wurde auf Vorlage des menschlichen Cystatins C (3GAX) mit Hilfe des Programms Modeller 9.16 erstellt und über den Webserver PDBsum überprüft. In rot ist Glycin (G), in cyan ist Valin (V) und in schwarz Glutamin (Q) der ersten Haarnadelstruktur gezeigt. Die Visualisierung erfolgte mit Chimera 1.8.1.

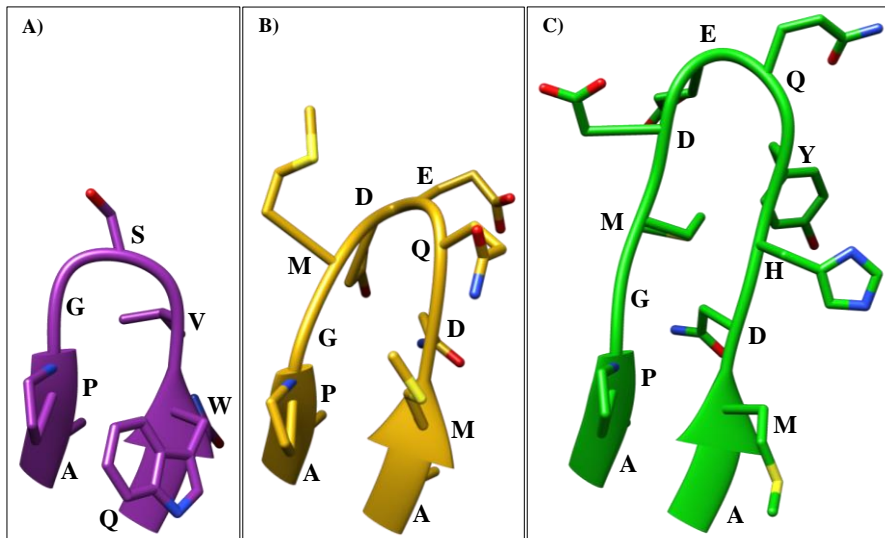


Abbildung 28: Erste Haarnadelstruktur der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von murinem Fetuin-B sowie FB_L1L1_4 bzw. FB_HY_L1L1 im Vergleich

A) Bereich der ersten Haarnadelstruktur der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von Fetuin-B, von FB_L1L1_4 B) und FB_HY_L1L1 C). Die Aminosäurereste, den *hairpin loop* bilden sind gezeigt und im Ein-Buchstaben Code angegeben. Die Modelle wurden auf der Basis der 3D-Struktur des menschlichen Cystatins C (3GAX) mit dem Programm Modeller 9.16 erstellt und über Webserver PDBsum überprüft. Die Visualisierung erfolgte mit Chimera 1.8.1. Die überlagerte Darstellung der vollständigen Modelle ist dem Anhang A7 zu entnehmen.

3.7.1 Transposition von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 in Bacmide

Die erfolgreiche Transposition des Wunschgens aus pFastbac1 in die Bacmide stellt eine Voraussetzung für die Herstellung von rekombinanten Proteinen mit Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen dar. Die leere Expressionskassette von Bacmid umfasst 300 bp. Das PCR-Produkt aus leerer Expressionskassette des Bacmids mit der integrierten leeren Expressionskassette des pFastbac1 sollte dementsprechend bei 2300 bp liegen. Beides wurde durch Kontrollansätze bestätigt (Abbildungen 29 und 30). Hier ist anzumerken, dass die in der Abbildung 29 B mitgeführte Kontrolle "Bacmid leer" nicht funktionierte. Dafür wird bei dem Klon FA_WT (6) eine DNA-Bande bei 300 bp beobachtet. Auch der Klon FA_WT (3) zeigte nicht das gewünschte Ergebnis. Die Klone Nummer 1, 2, 4, 5, 7 und 8 bildeten ein PCR-Produkt auf der erwarteten Höhe von 3380 bp (Wunschgen 1080 bp + pFastbac 2300 bp). Auf demselben Gel (Abbildung 29 B) wurde der Klon FB_HY_L1L1 (1) aufgetragen. Dieser sollte eine Größe von 3415 bp (2300 bp + 1215 bp) besitzen. Im Gel liegt die entsprechende Bande tatsächlich oberhalb von FA_WT-DNA-Banden. Dies wird dadurch bestätigt, dass FA_WT (1) etwas unterhalb der FB_HY_L1L1-DNA-Banden liegt (Abbildung 29 A). Aus acht Proben dieses rekombinanten Bacmids hatte nur Klon Nummer 4 nicht das gewünschte Ergebnis gezeigt. Klone 1-3 und 5-8 besitzen in etwa die erwartete Größe, was auf eine gelungene Transposition beider Gene in das Bacmid schließen lässt.

ERGEBNISSE

Ebenfalls erfolgreich war die Transposition von FB_WT_4 und FB_L1L1_4. Beide Konstrukte besitzen eine Größe von 1209 bp. Dementsprechend sollten die PCR-Produkte von rekombinanten Bacmiden 3409 bp groß sein. Dies zeigt die Abbildung 30. Alle Klone von FB_L1L1_4 waren positiv. Bei dem FB_WT_4-Konstrukt waren es Klone 1-4 und 7-12. Klon 5 zeigte eine in der Intensivität sehr geschwächte Bande, Klon 6 hat gänzlich nicht funktioniert. Die beiden Kontrollen Mock und "Bacmid leer" haben ebenfalls erwartete Größen von 2300 bp bzw. 300 bp.

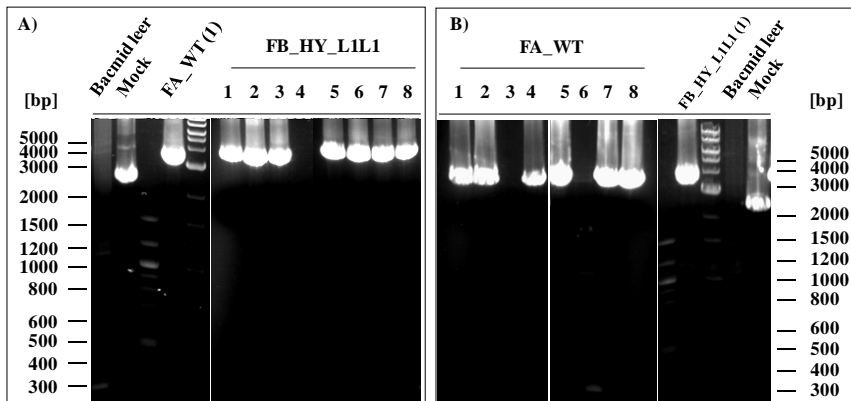


Abbildung 29: Überprüfung der Transposition von FA_WT und FB_HY_L1L1 in die Bacmide

Die Produkte der Bacmid-PCR wurden in einem 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Bande für FB_HY_L1L1 umfasst 3415 bp A), die für FA_WT 3380 bp. Es wurden je 10 µl des PCR-Ansatzes verwendet.

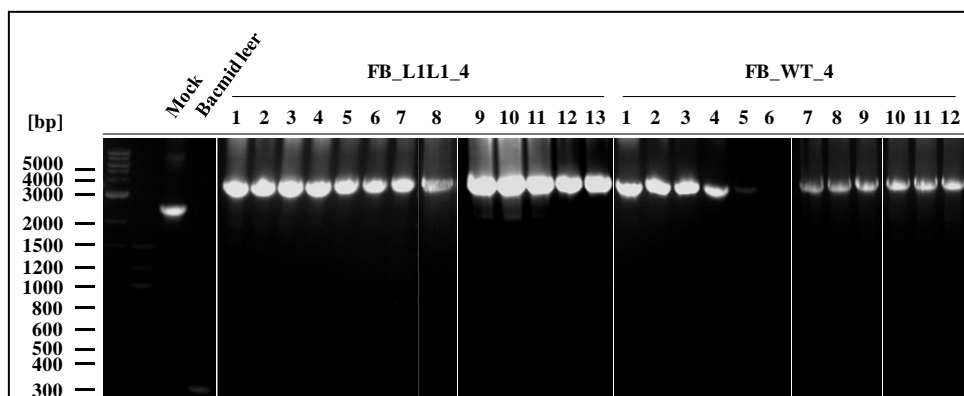


Abbildung 30: Überprüfung der Transposition von FA_WT und FB_HY_L1L1 in die Bacmide

Die Produkte der Bacmid-PCR wurden in einem 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden für FB_HY_4 und FB_WT_4 sollen eine Größe von 3409 bp aufweisen. Es wurden je 10 µl des PCR-Ansatzes verwendet.

3.7.2 Transfektion von *Sf9*-Insektzellen und Virusamplifikation

Folgende Bacmidkonstrukte wurden für die Transfektion von *Sf9*-Insektzellen ausgewählt:

FA_WT	Klon 7 (99 ng/µl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,64$)
	Klon 8 (111 ng/µl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,66$)
FB_WT_4	Klon 2 (89 ng/µl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,71$)
	Klon 4 (94 ng/µl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,7$)
	Klon 8 (111 ng/µl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,6$)

ERGEBNISSE

FB_L1L1_4	Klon 8 (73 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,62$) Klon 9 (73 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,7$) Klon 12 (69 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,71$)
FB_HY_L1L1	Klon 6 (99 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,69$) Klon 8 (106 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,64$).

Als Kontrolle wurden Mock-Bacmide (450 ng/μl, $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,66$) verwendet.

Über den Erfolg der Transfektion wurde anhand der Zellmorphologie entschieden. Die transfizierten Insektenzellen veränderten ihre Form im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen. Sie wurden größer und erschienen aufgequollen, außerdem enthielten sie mehr Einschlüsse und "leuchteten" nicht im Durchlicht-Kanal des Mikroskops (nicht gezeigt). Danach zu beurteilen waren alle Transfektionsansätze erfolgreich. Die Primärviren wurden geerntet und amplifiziert.

Die quantitative Auswertung des Transfektion- und Amplifikations-Erfolges erfolgte erstmals nach der Viruspassage drei. Sie wurde mittels Endpunkt-Verdünnung mit Visualisierung via Immunofluoreszenz durchgeführt. Die besten Ergebnisse lieferten für das Konstrukt FA_WT Klon 8 (nachweisbare Virulenz bei der Verdünnung 10^{-7}), für das Konstrukt FB_WT_4 Klon 4 (nachweisbare Virulenz bei der Verdünnung 10^{-2}), bei Konstrukt FB_L1L1_4 Klon 12 (nachweisbare Virulenz bei der Verdünnung 10^{-4}) und bei Konstrukt FB_HY_L1L1 Klon 8 (nachweisbare Virulenz bei der Verdünnung 10^{-5}). Diese Viren wurden weiter amplifiziert. Die Ergebnisse der Auswertung nach der Passage fünf sind der Tabelle 18 zu entnehmen. Bei allen Negativkontrollen und Mockkontrollen wurde keine Fluoreszenz beobachtet.

Tabelle 18 Analyse der Virussuspensionen nach der Amplifikationsstufe fünf

Die quantitative Analyse der Virussuspensionen nach der Amplifizierung wurde durch Endpunkt-Verdünnung mit Visualisierung via Immunofluoreszenz erreicht. Als primärer Antikörper wurde *Mouse-anti-His-tag* mit der Verdünnung 1:400 verwendet. Alle Virussuspensionen lagen im zellfreien konditionierten Grace's Insect Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin und ohne FCS.

Konstrukt	nachweisbare Fluoreszenz bei Verdünnung	Viruspartikel in 1 ml Suspension
FA_WT Klon 8	10^{-10}	10^{11}
FB_WT_ Klon 4	10^{-6}	10^7
FB_L1L1_4 Klon 12	10^{-6}	10^7
FB_HY_L1L1 Klon 8	10^{-10}	10^{11}

3.7.3 Expression und Reinigung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1

Die erfolgreich hergestellten und amplifizierten rekombinanten Baculoviren wurden zur Infektion der *High Five*-Insektenzellen verwendet. Die Expressionsdauer betrug 72 h. Nach

ERGEBNISSE

Ablauf dieser Zeit wurde das konditionierte Medium durch Zentrifugation von Zellen und Zellresten befreit. Eine Ammoniumsulfatfällung mit 60 % Sättigung diente der Konzentrierung der Proteine vor der Affinitätschromatographie auf einer Ni-NTA-Säule. Abbildung 31 zeigt den Reinigungsfortschritt exemplarisch für FB_L1L1_4 nach SDS_PAGE und Western-Blot. Die Elutionsfraktionen enthalten eine klare und intensive Proteinbande. Ihre Größe von ca. 55 kDa übertrifft das berechnete Molekulargewicht für das rekombinante Protein mit ca. 41,8 kDa. Gleichzeitig weist das als Kontrolle mit aufgetragene Fetuin-B (DIETZEL ET AL., 2013) eine Proteinbande mit ca. 66 kDa auf. Das eluierte Protein wird mit dem *Mouse*-anti-His-tag AK detektiert, was auf seine Identität als FB_L1L1_4 hindeutet. Ebenfalls zu beobachten ist, dass Säulendurchlauf und Waschfraktionen die gleiche Bande beinhalten – ein Hinweis auf die überschrittene Säulenkapazität. Sukzessive affinitätschromatographische Reinigungen erbrachten aus insgesamt 840 ml konditioniertem Medium 34 mg FB_WT_4, 28 mg FB_L1L1_4, 10 mg FB_HY_L1L1 und 8 mg FA_WT.

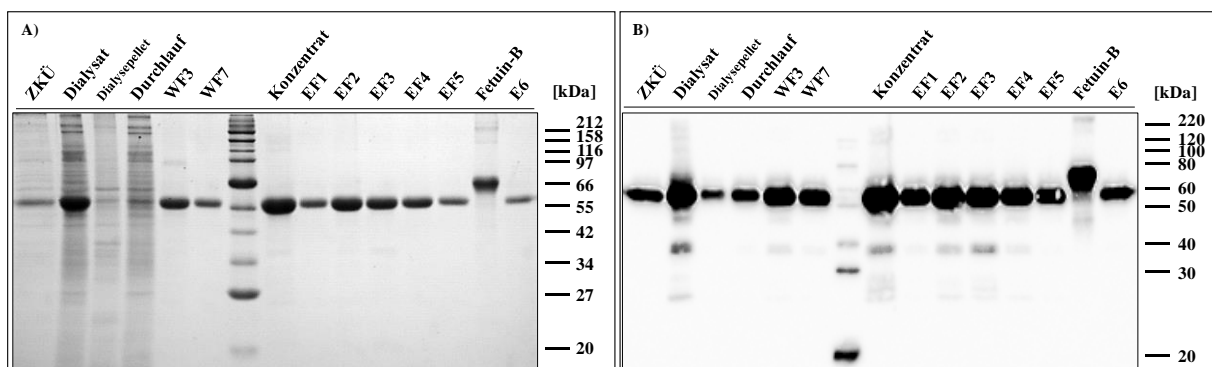


Abbildung 31: Reinigung von FB_L1L1_4 mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Säule

Die hier aufgetragenen Proben wurden mit DOC-TCA ausgefällt und danach im heißen Probenpuffer aufgenommen. Dabei wurden sie 1:1,7 konzentriert. Ihre Auftrennung erfolgte in einem 12 % Polyacrylamid-Gel. A) Coomassie gefärbtes Gel. B) Western-Blot, zur Detektion der Proteine wurde der *Mouse*-anti-His-tag AK eingesetzt. ZKÜ - Zellkulturüberstand von Ammoniumsulfatfällung (nicht mit DOC-TCA gefällt). WF - Waschfraktion, EF - Elutionsfraktion, Konzentrat – Probe von allen EF nach Dialyse und Konzentrierung, Fetuin-B – Kontrolle mit Fetuin-B nach DIETZEL ET AL. (2013).

In der Abbildung 32 sind alle exprimierten Fetuine im Vergleich dargestellt. Trotz der relativ hohen Auftragsmenge von ca. 3 µg Protein pro Geltasche erscheinen die Proben homogen. Im Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel (Abbildung 32 A) weisen FB_WT_4 und FB_L1L1_4 eine einzige intensive Bande bei ca. 55 kDa auf. Die FB_HY_L1L1-Probe zeigt neben dieser Bande eine zusätzliche schwache Bande auf der Höhe von ca. 34 kDa. Die FA_WT-Probe wurde während Aufarbeitung offenbar FB_HY_L1L1 verunreinigt. Dies ist mit der Coomassie-Färbung nicht detektierbar; die Probe zeigt zwar zwei distinkte Banden unterhalb und 3-4 oberhalb der Hauptbande (ca. 50 kDa), nicht aber auf der Höhe von 55 kDa. Die Verunreinigung wurde erst mit *Mouse*-anti-His-tag AK (Abbildung 32 B) und *Rabbit*-anti-Fetuin-B AK

ERGEBNISSE

(Abbildung 32 C, links) als schmale Bande sichtbar. Außerdem detektiert *Mouse*-anti-His-tag AK bei FA_WT-Probe eine schwache Bande im Bereich von ca. 100 kDa und eine noch schwächere Bande im Bereich von ca. 30 kDa. Mit *Rabbit*-Anti-Fetuin-A AK kann in dieser Probe ebenfalls die 100 kDa Bande und zwei Banden zwischen 50 kDa und 40 kDa detektiert werden. Proben von FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 weisen allesamt bei der Detektion mit *Mouse*-anti-His-tag AK und *Rabbit*-anti-Fetuin-B AK eine intensive Hauptbande (ca. 55 kDa) und vier schwache Banden unterhalb dieser auf. Im Vergleich zu den Kontrollen besitzen die während dieser Arbeit hergestellten Fetuine niedrigere Molekulargewichte aber einen vergleichbaren Reinheitsgrad.

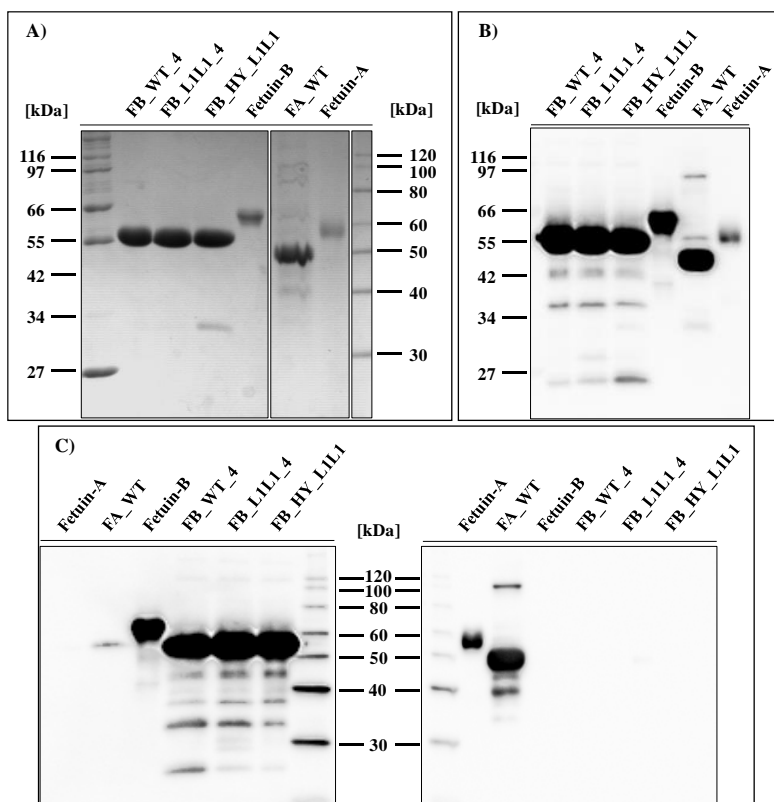


Abbildung 32: Vergleich aller während der Arbeit rekombinant hergestellten Fetuine

Pro Geltasche wurde ca. 3µg Protein geladen. Probentrennung erfolgte in 12 % Polyacrylamid-Gel.

A) Coomassie gefärbtes Gel.

B) Western-Blot, Detektion mit *Mouse*-anti-His-tag AK C) Western-Blot, links - Detektion mit *Rabbit*-anti-Fetuin-B AK, rechts - Detektion mit *Rabbit*-anti-Fetuin-A AK. FA_WT-Probe wurde während der Gellaufvorbereitung mit kleinsten Menge an FB_HY_L1L1 verunreinigt (C links). Fetuin-B bzw. Fetuin-A – Kontrollen mit Fetuin-B bzw. Fetuin-A nach DIETZEL ET AL. (2013).

3.8 Funktionalitätsüberprüfung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1

Die Überprüfung ihrer Funktionalität wurde mit den Proteinasen Ovastacin, Astacin und Meprin β durchgeführt. Hier sind lediglich die Ergebnisse mit Ovastacin aufgeführt.

FA_WT und FB_WT_4 zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (Fetuin-A und Fetuin-B nach DIETZEL ET AL., 2013) die gleichen Eigenschaften: FB_WT_4 wirkte inhibitorisch auf Ovastacin, FA_WT wirkte aktivitätssteigernd. Die mutierten Varianten von Fetuin-B FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 inhibierten Ovastacin mit der gleichen Effektivität wie das Wildtyp-Fetuin-B (Abbildung 33). Die hemmende Wirkung der Fetuin-B Varianten wurde

ERGEBNISSE

durch den Einsatz von 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, und 0,01 % Brij-35 nicht beeinflusst. Der Effekt von FA_WT wurde, wie es bereits in 3.3.2 beschrieben wurde, überlagert.

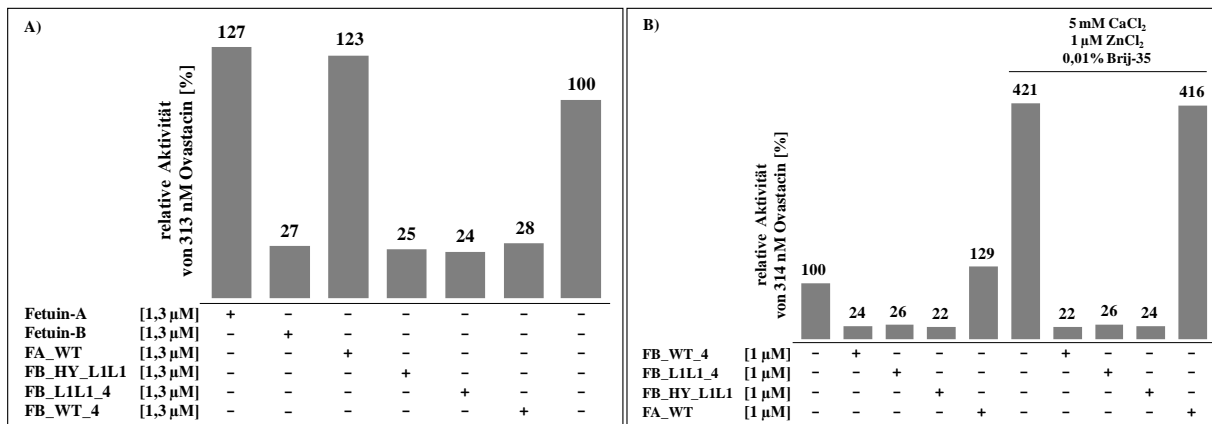


Abbildung 33: Analyse der Funktionalität von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1

A) 313 nM aktives Ovastacin wurde mit je 1,3 μM von Fetuin-A, Fetuin-B, FA_WT, FB_HY_L1L1, FB_L1L1_4 und FB_WT_4 vorinkubiert. Anschließend wurde die Substratumsatzrate des Ovastacins bestimmt.

B) 314 nM aktives Ovastacin wurde mit je 1 μM von FB_WT_4, FB_L1L1_4, FB_HY_L1L1 und FA_WT in An- oder Abwesenheit von 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, und 0,01 % Brij-35 vorinkubiert. Anschließend wurde die Substratumsatzrate des Ovastacins bestimmt. Als 100 % wurde jeweils die Aktivität von Ovastacin ohne Zusätze gewählt. Fetuin-B Varianten wirkten inhibitorisch, Fetuin-A Varianten wirkten Aktivitätssteigernd. Ähnliche Ergebnisse wurden für Astacin und Meprin β beobachtet.

3.9 Funktionalitätsüberprüfung von Fetuinchimären ABA, AAB und BAA

Die Frage nach der aktiven inhibitorischen Einheit im Fetuin-B konnte durch die Mutageneseversuche der ersten Haarnadelstruktur innerhalb der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne nicht geklärt werden. Daraufhin wurden in der Arbeitsgruppe von Willi Jahn-Dechent Proteinchimären aus Fetuin-A und Fetuin-B hergestellt (Abbildung 34), mit dem Ziel die „hemmende“ Domäne zu identifizieren. Die Analyse wurde mit Meprin α, Meprin β und Ovastacin durchgeführt. In allen drei Fällen wurde eine Abnahme der enzymatischen Aktivität der Proteinasen bis auf ca. 60% der Restaktivität beobachtet. Die Aussage darüber, welche der eingesetzten Fetuin-B – Domänen die Hemmwirkung verursacht, konnte allerdings nicht getroffen werden. Jede der Chimären wirkte unterschiedlich auf jeweilige Enzyme. Während Variante BAA Ovastacin am schwächsten beeinflusste, war sie die zweiteffektivste gegen Meprin α und Meprin β. Variante ABA hemmte Ovastacin am stärksten, im Falle von Meprin α wirkte sie gleich wie die Variante BAA und im Falle von Meprin β wirkte sie am schwächsten. Variante AAB reduzierte die Aktivität von Meprin β am stärksten, während Meprin α am schwächsten beeinflusst wurde und auf Ovastacin hatte sie moderate Wirkung. Außerdem wurde im Experiment mit Ovastacin eine Abnahme der oben erwähnten Wirkung bei der

ERGEBNISSE

Reduzierung der Konzentration von Fetuinchimeren festgestellt. Abbildung 35 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für Ovastacin.

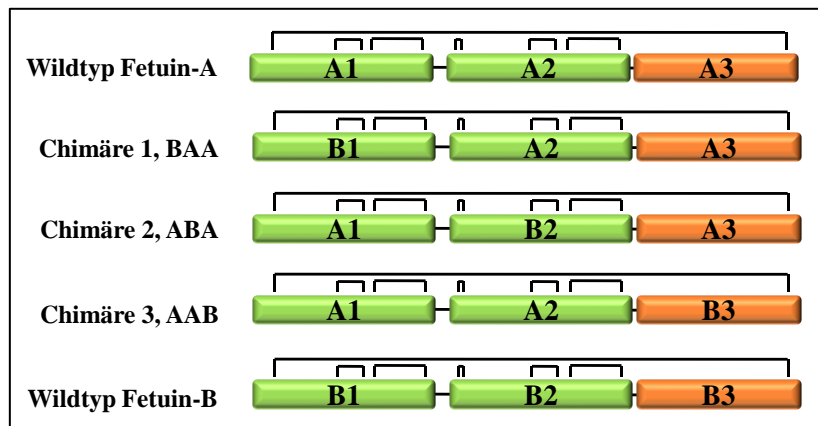


Abbildung 34: Durch Domänen-swapping hergestellten Fetuinchimären

Gezeigt ist der schematische Domänenaufbau von: Wildtyp Fetuin-A; Chimäre BAA bei der die erste Domäne aus Fetuin-B und zweite sowie dritte aus Fetuin-A stammen; Chimäre ABA bei der die zweite Domäne aus Fetuin-B und erste sowie dritte aus Fetuin-A stammen; Chimäre AAB bei der die dritte Domäne aus Fetuin-B und erste sowie zweite aus Fetuin-A stammen und Wildtyp Fetuin-B. Die Chimären sind ein Geschenk von Willi Jahnen-Dechent.

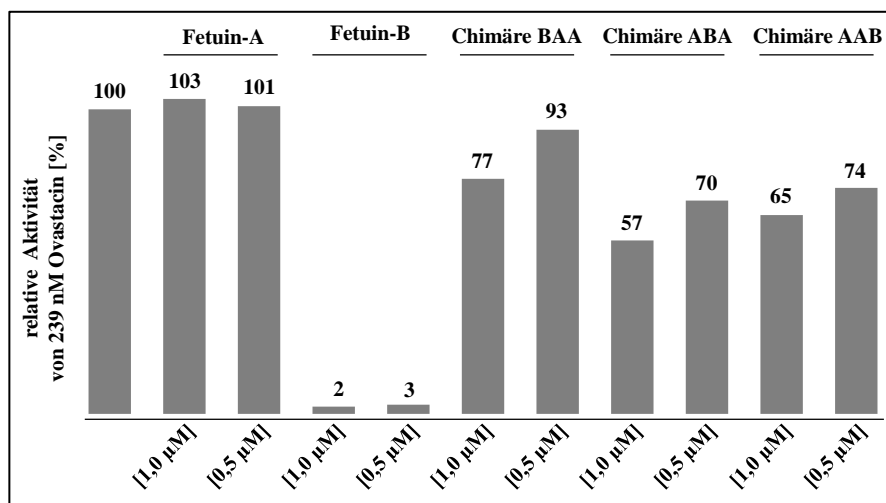


Abbildung 35: Analyse der Funktionalität von Fetuinchimären

239 nM aktives Ovastacin wurde mit je 1 µM bzw. 0,5 µM von Wildtyp Fetuin-A und Fetuin-B, Fetuinchimären BAA, ABA sowie AAB in Anwesenheit von 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, und 0,01 % Brij-35 vorinkubiert. Anschließend wurde die Substratumsatzrate des Ovastacins bestimmt. Als 100 % wurde die Aktivität von Ovastacin ohne Zusätze gewählt. Fetuin-B und Fetuin-A zeigte hemmende bzw. aktivitätssteigernde Wirkung. Zusatz von Fetuinchimären reduzierte ebenfalls die Ovastacinaktivität, allerdings viel schwächer als Wildtyp Fetuin-B. Ähnliche Ergebnisse wurden für Mepriin α und Mepriin β beobachtet.

4. Diskussion

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist die Regulation der enzymatischen Aktivität der Astacin-Metalloproteinase Ovastacin aus den cortikalen Granula der Säuger-Oozyte. Als Regulatoren wurden ein potenzieller endogener Aktivator, die Serinprotease Plasmin, und ein potenter endogener Inhibitor, das Plasmaprotein Fetuin-B identifiziert.

4.1 Herstellung von Ovastacin-FL-Strep

In vitro Experimente bieten Wissenschaftlern die Möglichkeit, Arbeitshypothesen in einem relativ einfachen und überschaubaren System zu überprüfen. Damit die Ergebnisse solcher Experimente möglichst frei von Artefakten und plausibel bleiben, muss der Auswahl der Arbeitsmaterialien und dem Experimentaufbau besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Eine der wichtigsten Komponenten für die Durchführung der im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit notwendigen Versuche war rekombinant hergestelltes Ovastacin-FL-Strep. Dieses Enzym wird in der Arbeitsgruppe bereits seit einigen Jahren erforscht. Die Methodik zur Expression und Reinigung des Proteins wurde ständig angepasst und verbessert. Zum Zeitpunkt der aktuellen Arbeit konnten in jeder Hinsicht reproduzierbare Untersuchungen der Enzymaktivität der Protease stattfinden. Trotzdem muss die Qualität der Protein-Präparationen stets überprüft werden.

Die Abbildung 7 **B**, **C** zeigt die typische Heterogenität der gereinigten Ovastacin-FL-Strep Proteinpräparation. Nach der SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen sind stets mindestens zwei deutliche Protein-Banden bei ca. 46 kDa und ca. 55 kDa zu sehen. Beide Banden wurden mit spezifischen AK detektiert und konnten mittels massenspektrometrischer Analyse eindeutig als Ovastacin identifiziert werden (HILDEBRAND, 2013). Das Auftreten von mindestens zwei Ovastacin-Isoformen wird auch in der Literatur erwähnt (BURKART ET AL., 2012; SACHDEV ET AL., 2012). Die Differenz der Molekülmassen beider Ovastacin-Varianten beruht vermutlich nicht auf einer inhomogenen Glykosylierung, denn dies hätte wahrscheinlich diffuse, verschmierte Banden zur Folge. Wahrscheinlicher ist, dass die 46 kDa-Bande C-terminal proteolytisch prozessiert worden ist. Dafür spricht, dass diese Bande durch den *Mouse-anti-Strep-tag* AK nicht detektierbar war (Diplomarbeit KARMILIN, 2012; Abbildung A9 im Anhang). Der *Strep-tag* ist C-terminal am Protein angeheftet. Außerdem wurde der C-terminale Bereich (die fünf letzten Aminosäurereste und der *Strep-tag*) dieser Protein-Variante bei massenspektrometrischen Analysen nicht gefunden (HILDEBRAND, 2013).

Hier stellt sich die Frage, wie das Protein ohne *Strep-tag* über die *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie überhaupt gereinigt werden kann? Eine mögliche Antwort lieferte

André Hildebrand in seiner Doktorarbeit (HILDEBRAND, 2013). Er vermutete eine Oligomerisierung des Proteins, wodurch die C-terminal prozessierte Ovastacin-Variante bei der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie mitgeschleppt werden könnte. Im Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen werden die unterschiedlichen Varianten wieder getrennt. Die Natur dieser Oligomerisierung ist noch nicht verstanden. Dabei könnte die entscheidende Rolle der C-terminalen Domäne des Proteins zukommen. Dieser Bereich weist keine Homologie zu den bekannten Proteinen auf (QUESADA ET AL., 2004) und könnte durchaus in der physiologischen Umgebung Bindungsstellen für Substrate, Kofaktoren und andere Moleküle bieten. Diese Überlegung wird auch durch Befunde der Arbeitsgruppe um John C. Herr unterstützt. Diese Forscher sehen das Ovastacin als einen membranständigen Rezeptor auf dem Oolemma für SLLP1 (*sperm lysozyme-like protein*) (SACHDEV ET AL., 2012; PIRES ET AL., 2013). Allerdings schlägt die AG Herr vor, dass die Membranverankerung durch die zentrale Zink-bindende alpha-Helix des Ovastacins bewerkstelligt wird, was jedoch die Entfaltung des Proteins voraussetzt. Dem liegt höchstwahrscheinlich eine Fehlinterpretation des erstellten Hydropathieplots zugrunde (PIRES ET AL., 2013). Ovastacin könnte dabei tatsächlich mit seiner C-terminalen Domäne mit Membranproteinen des Oolemmas interagieren. Das „Wie“ ist jedoch noch ungeklärt. Außerdem ist es nicht ausgeschlossen, dass beim Mitschleppen der C-terminal prozessierten Ovastacin-Variante über die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie weitere Proteine beteiligt sind. Dafür spricht das Erscheinungsbild der Ovastacin-Proben im Polyacrylamid-Gel nach der Coomassie-Färbung (Abbildung 7). Neben den zwei bereits diskutierten Protein-Banden sind hier mehrere weitere zu sehen. Diese Banden werden durch die spezifischen Antikörper nicht detektiert.

Durch Heterogenität der Ovastacinproben ist es nur bedingt möglich, den tatsächlichen Ovastacingehalt in dem Gemisch zu bestimmen. Die mitgeführten Proteine könnten zudem Einfluss auf die Funktion des Ovastacins ausüben. Bis jetzt ist unklar, mit welchem Anteil die Proteasemoleküle in oligomerisierter Form für Aktivatoren, Substrate oder Inhibitoren zugänglich bleiben. Unter diesem Aspekt werden die im Weiteren aufgeführten Ergebnisse kritisch betrachtet und diskutiert.

4.2 Aktivierung von Ovastacin-FL-Strep

Das hergestellte Ovastacin-FL-Strep ist eine inaktive Proform des Enzyms. Zum Erlangen der enzymatischen Aktivität bedarf es der Abspaltung des inhibierend wirkenden Propeptids. Der Aktivierungsmechanismus verschiedener Astacinproteasen wurde bereits beschrieben. Die Abspaltung des Propeptids erfolgt durch limitierte Proteolyse oft an einer tryptischen Spaltstelle

(YIALLOUROS ET AL., 2002; BECKER ET AL., 2003; OHLER ET AL., 2010; GUEVARA ET AL., 2010). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass Trypsin Proovastacin aktivieren kann (Abbildung 8, auch in HILDEBRAND, 2013). Es existiert eine Vielzahl tryptischer Serinproteinasen außerhalb des Verdauungstraktes, die als potenzielle endogene Aktivatoren fungieren könnten.

Aus mehreren Gründen wurde der gewebspezifische Plasminogen Aktivator oder kurz tPA als ein möglicher Kandidat in Betracht gezogen. Zum einen ist tPA eine tryptische Serinproteinase, die in zahlreichen Publikationen in Verbindung mit Fertilisation und Reproduktion gesetzt wird (HUARTE ET AL., 1993; CARMELIET ET AL., 1994; MONDEJAR ET AL., 2012). Zum anderen existieren Einträge in der Datenbank Merops mit den für tPA optimalen proteolytischen Schnittstellen in synthetischen Substraten - SFSR (HARRIS ET AL., 2000) und PFR (KUMARASEN ET AL., 2007) (<https://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=S01.232>). Diese Schnittstellen zeigen große Ähnlichkeit mit der Sequenz SPFR, an der vermutlich der Aktivierungsschnitt im Proovastacin erfolgt (Abbildungen 12 und A1 im Anhang). tPA zeichnet sich durch extrem limitierte Substratspezifität aus (DING ET AL., 1995; SCHALLER UND GEBER, 2013). Meine Versuche zeigten letztlich, dass tPA nicht dazu in der Lage war Proovastacin *in vitro* zu aktivieren.

tPA ist allerdings ein Mitglied des aus vielen hintereinandergeschalteten Komponenten bestehenden Plasmin-Antiplasmin-Systems der Fibrinolyse. Die namensgebende tryptische Serinproteinase Plasmin dieses Systems wird ebenfalls in Verbindung mit der Befruchtung gebracht; so sind z.B. Plasmin-defiziente Mäuse subfertil (ZHANG ET AL., 1992; HUARTE ET AL., 1993; PLOPLIS ET AL., 1995; KOUBA ET AL., 2000; COY ET AL., 2012). Ich konnte zeigen, dass Plasmin tatsächlich Pro-Ovastacin *in vitro* in einer Konzentrations- und Zeit-abhängigen Weise aktivieren kann. Ob Plasmin in der Tat ein endogener Pro-Ovastacin-Aktivator ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Zur Zeit wird intensiv erforscht, zu welchem Zeitpunkt und an welchem Ort die Aktivierung erfolgt. Es ist noch unbekannt, ob dies bereits in cortikalen Granula vor der Exozytose oder erst im perivitellinen Raum erfolgt. Die enzymatische Ausstattung der cortikalen Granula umfasst jedenfalls auch weitere tryptische Serinproteinasen wie die Trypsin 10, Trypsinogen 7 und Prrs1 (PENG ET AL., 2012).

Der Fakt der effektiven Pro-Ovastacin-Aktivierung durch Plasmin *in vitro* bleibt jedoch unumstritten. Dies ist bislang die effektivste Methode zur Herstellung aktiven Ovastacins. Nach Behandlung mit Plasmin ist Ovastacin in der Lage, das FRET-Substrat (Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂) und Casein (in einer Substrat-Zymographie) umzusetzen. Durch die Behandlung mit Plasmin verändert sich das elektrophoretische Bandenmuster des

Ovastacins deutlich. Es entstehen mehrere Banden im Bereich um 30 kDa. Nach aminoterminaler Sequenzierung durch Edman-Abbau weist die 28 kDa-Bande die erwarteten Leu-Leu-Ser-Val Sequenz an ihrem N-Terminus auf. Die Größe der neuentstehenden Banden korreliert mit Literaturwerten. Bereits in der Publikation von MOLLER UND WASSARMAN (1989) ist die Rede von einer "ZP2-Proteinase". Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass es sich hierbei um Ovastacin handelt. Ein Indiz ist das Molekulargewicht zwischen 21-34 kDa. Außerdem zeigte Ovastacin welches in *E. coli* exprimiert wurde und katalytisch aktiv war ein sehr ähnliches Bandenmuster in der SDS-PAGE (QUESADA ET AL., 2004; SACHDEV ET AL., 2012). Das molare Verhältnis von zehn Molekülen Ovastacin zu einem Molekül Plasmin, welches experimentell als bestmögliches bestimmt wurde, erscheint dabei ebenfalls adäquat. Die Konzentration und absolute Menge an Ovastacin, welches während der Fertilisation aus den kortikalen Granula exozytiert wird, ist zwar unbekannt. Es ist aber bekannt, dass während der Fibrinolyse eine lokale Überkonzentration von tPA und Plasminogen - der inaktiven Vorstufe des Plasmins- in der Fibrin-Matrix erreicht wird (SCHALLER UND GEBER, 2013). Ähnliches ist in der Glykoprotein-Matrix der *Zona pellucida* vorstellbar. Ich führte ein Experiment durch, in dem Plasminogen zusammen mit tPA der Proovastacin-Lösung zugesetzt wurde. Es zeigte sich (Abbildung 9), dass dieses Gemisch aus Plasminogen und Plasminogenaktivator, bei gleicher Einsatzmenge sogar bessere Aktivierungsergebnisse lieferte als Plasmin alleine. Dies unterstützt die Annahme, dass dieses System auch *in vivo* als positiver Regulator für Proovastacin fungieren könnte.

Die Suche nach einem Aktivator wurde nicht auf nur tryptische Serinproteasen beschränkt. A. Hildebrand formulierte in seiner Doktorarbeit (HILDEBRAND, 2013) die Hypothese, dass MMP-2, welche im Acrosom des Spermiums vorzufinden ist (FERRER ET AL., 2012), ebenfalls als solches fungieren kann. Außerdem wurde die Serinprotease Neutrophile Elastase in Betracht gezogen. Dieses Enzym mit chymotryptischer Spezifität könnte das Propeptid von Ovastacin an derselben Stelle wie MMP-2, vier Aminosäurereste weiter C-terminal von der Plasmin-Schnittstelle (R↓_{PL}LLSV↓_{MMP-2}T), angreifen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Hypothesen experimentell nicht bestätigt. Beide Enzyme zeigten keine aktivierende Wirkung auf Pro-Ovastacin.

4.3 Untersuchung der Eigenschaften von aktivem Ovastacin

4.3.1 Physikalische Eigenschaften

Sofern die Zuordnung der Aktivität von Ovastacin der OvaPL28-Bande korrekt ist, können seine physikalischen Eigenschaften wie folgt beschrieben werden. Wie bereits erwähnt liegt

das Molekulargewicht der aktiven Ovastacin-Variante bei 28 kDa. Das Protein scheint nicht glykosyliert zu sein, da die vermuteten Glykosylierungstellen in Bereich des Propeptids und der C-terminalen Domäne liegen (QUESADA ET AL., 2014). In dieser Arbeit wurden keine Versuche unternommen die Zucker zu entfernen. Die "nackte" katalytische Domäne von Ovastacin besitzt ein Molekulargewicht von 23 kDa (UniProt: Q6HA09: Leu₈₆-Val₂₈₅). Also sollte das aktive Ovastacin mit 28 kDa rein rechnerisch maximal um 50 Aminosäurereste C-terminal länger sein als die eigentliche katalytische Domäne. Die C-terminale Domäne enthält vor allem in ihrem vorderen Bereich mehrere Arginin-Reste, wo Plasmin spalten könnte. Durch massenspektrometrische Analyse der 28 kDa-Bande (Abbildung 12) konnte als letzte Aminosäure Arg₂₄₀ identifiziert werden. Arg₂₄₀ liegt allerdings innerhalb der katalytischen Domäne, unmittelbar davor befindet sich eine für die Katalyse der Astacine wichtige Struktur, nämlich der sogenannte *Met-1,4- β -turn*. So ist zu vermuten, dass die Massenspektrometrie nicht alle tryptisch erzeugten Fragmente detektieren konnte. Relativ wenig Information bezüglich der Molekulargewichtszuordnung liefert die ansonsten erfolgreiche Substrat-Zymographie (Abbildung 13). Der auf die Ovastacin-Aktivität zurückzuführende Lysehof befindet sich im Gel unterhalb der sogenannten *light chain* des Plasmins (26 kDa). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das aktive Ovastacin mit der Aminosäure Leu₈₆ beginnt, eine vollständige katalytische Domäne aufweist und seine C-terminale Domäne relativ nahe an der katalytischen Domäne abgeschnitten wurde.

4.3.2 Temperatur- und pH-Optima des aktiven Ovastacins

Die Enzymaktivitätsmessungen mit Ovastacin wurden immer bei 37°C durchgeführt. Die Wahl dieser Temperatur wurde mit dem Ursprung der Protease aus einem homoiothermen Säugetier begründet. Es wurde dabei festgestellt, dass die aktive Protease nur eine relativ kurze Lebensdauer unter diesen Bedingungen aufweist. Innerhalb von zwei Stunden nach der Aktivierung war die Substratumsatzrate des Enzyms in der Regel auf ca. 60% gesunken. Die Aktivierung erfolgte stets mit der Serinprotease Plasmin. Nach 10 minütiger Aktivierungszeit wird dem Ansatz der irreversible Serinproteaseinhibitor 4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid, AEBSF (Handelsname: Pefabloc) zugefügt. Der vielfache Konzentrationsüberschuss an Pefabloc sollte die unumkehrbare Hemmung der Plasmin-Aktivität gewährleisten. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein Teil des Plasmins trotz der Anwesenheit von Pefabloc aktiv bleibt. Dies könnte dazu führen, dass Ovastacin weiter prozessiert/degradiert wird und dadurch Teil seiner Aktivität verliert. Ebenfalls nicht auszuschließen ist die mögliche Autolyse des Ovastacins. Die beiden Glutamat-Reste in den

Positionen 319 und 320 würden potenzielle Angriffspunkte bieten. Auch die Formation inaktiver Oligomere könnte sich negativ auf die Substratumsatzrate auswirken. Die Analyse der Sequenz des aktiven Ovastacins (Leu₈₆ - Arg₃₃₀, ca. 28 kDa) mit dem Web-Tool ProtParam von ExPasy ergab eine *in vitro* Halbwertszeit des Proteins von 5,5 h, und es wurde auf dieser Basis als instabil eingestuft. Darüber hinaus wurde in einem Parallelversuch gezeigt, dass die Lagerungstemperatur des Proovastacins auf seine spätere Aktivierung keinen großen Einfluss nimmt. Diese Fakten widersprechen der *in vivo* Situation nicht. So ist anzunehmen, dass inaktives Zymogen während der Oocytenreifung und Ovulation in cortikalen Granula ohne Funktionalitätsverlust gelagert wird. Nach der Exozytose könnte es von Plasmin im perivitellinen Raum aktiviert werden und für einige Minuten bis Stunden enzymatisch aktiv sein. Nach dem Einsetzen des langsamen Polyspermieblocks ist das für Ovastacin einzig bekannte Substrat - ZP2 - aufgebraucht und das Enzym wird nicht mehr benötigt.

Der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität von Ovastacin wurde ebenfalls untersucht. Der pH-Wert in der Eileiterflüssigkeit, in der Ovastacin unter physiologischen Bedingungen enzymatisch aktiv sein sollte, liegt im Bereich 7,3-8,2 vor (DAVID ET AL., 1968). Dies deckt sich mit dem pH-Optimum von 8,2 für aktives Ovastacin, welches *in vitro* bestimmt wurde (Abbildung 15). Das entspricht den für Astacin publizierten Daten und ist insgesamt typisch für Zink-Proteinasen der Metzinkin-Superfamilie (STÖCKER ET AL., 1991; STÖCKER ET AL., 1995). Des Weiteren wurde in diesem Versuch gezeigt, dass Pro-Ovastacin bei niedrigen pH-Werten nicht autoaktiviert wird, wie ursprünglich beschrieben worden war (HILDEBRAND 2013). Die Aktivität der Zink-abhängigen Metalloproteinase ist unter sauren Bedingungen schwer vorstellbar, da diese durch Protonierung der Zink-bindenden Histidinreste ihr katalytisch essenzielles Metallion verlieren.

Dagegen wurde ein Aktivitätsanstieg des Pro-Ovastacins im Bereich von pH über 8,2 beobachtet. Das gleiche Ergebnis war bereits von HILDEBRAND (2013) beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein spezifischer Effekt des Substrats sein, dessen chemische Eigenschaften und damit seine Löslichkeit und seine Bindungseigenschaften ebenfalls pH-abhängig sein können.

4.3.3 Einfluss von Salzen und Detergenzien auf die Ovastacin-Aktivität

Wie in den oberen Abschnitten bereits erwähnt, gibt es Indizien für eine Oligomerisierung des Ovastacins. Dies, zusammen mit der nicht optimalen Homogenität der Ovastacin-Präparationen, erschwerte die Funktionsanalyse. Mit dem verwendeten Aktivierungsprotokoll konnten schätzungsweise nur ein Zehntel (wird unten noch näher diskutiert) des

Gesamtproteins in die enzymatisch aktive Form überführt werden. Trotz aller Bemühungen war es bis jetzt nicht möglich die Qualität der Präparationen entscheidend zu verbessern. Deswegen wurden andere Wege zur Erhöhung der Ovastacin-Aktivität gesucht.

Die Verschiebung des pH-Wertes in Richtung Optimum (pH 8,2) betrieb ich bereits in meiner Diplomarbeit (KARMILIN, 2012). Damals konnte ich zeigen, dass bei pH 8 die untere Ovastacin-Bande bei ca. 46 kDa in ihrer Intensität zunimmt. Dies wurde jedoch zunächst als Verminderung der Proteinstabilität gedeutet und der pH-Wert des Arbeitspuffers wurde bei 7,4 belassen. Die Erhöhung der Ionenstärke des Puffers durch die zunehmende NaCl-Konzentration (hier nicht gezeigt) ergab ebenfalls keinen Fortschritt.

In Analogie zu den Arbeitspuffern, welche bei kinetischen Untersuchungen von Matrix Metalloproteinasen (MMP) verwendet werden, setzte ich der Ovastacin-Lösung $ZnCl_2$, $CaCl_2$ und das nichtionische Tensid Brij-35 zu. Diese Zusätze steigerten die Aktivität des Ovastacin um ein Vielfaches. Dabei war Zn^{2+} nicht die effektivste Komponente. Sehr stark dagegen beeinflusste Ca^{2+} die Kinetik des Ovastacins. In Anwesenheit der Calcium-Ionen im Puffer (bis 50 mM) wurde eine Aktivitätssteigerung bis auf 140% erreicht, ähnliche Ergebnisse wurden für Meprin β erzielt. Die Regulation der Aktivität von Meprin β durch bivalente Metallionen wurde bereits in ARNOLD ET AL. (2015) demonstriert. Der dort beschriebene Effekt von Calcium war allerdings negativ. Bei einer Konzentration von ca. 11 mM entwickelte das Enzym nur noch 50% seiner Aktivität. Die Autoren verwendeten aber ein Substrat mit einer Anhäufung von Carboxylgruppen, die eventuell mit Calciumionen interferieren könnten. Dieser Umstand ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Im Falle des Ovastacins brachte die Kombination von Calciumchlorid mit Brij-35 einen noch stärkeren positiven Effekt. Die Erklärung dafür könnte in der Natur der Interaktion zwischen Detergenzien und Proteinen liegen. Es ist bekannt, dass die Detergenzien hydrophobe Regionen an der Proteinoberfläche abdecken können, was Proteinen eine größere Löslichkeit in wässriger Umgebung verleiht (HAIRI, 2001). Es ist gut vorstellbar, dass die Behandlung der Ovastacin-Lösung mit Brij-35 auf diese Weise dessen Oligomerisierung entgegenwirkt. Dadurch sollten mehr katalytisch aktive Einheiten am Substratumsatz teilnehmen können. Allerdings wurden $ZnCl_2$, $CaCl_2$ und Brij-35 immer erst nach der Aktivierung zum Ansatz gegeben, d.h. nach der Inaktivierung von Plasmin durch Pefabloc. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum die Aktivierung des Proovastacins bislang nicht in vollem Umfang erreicht werden konnte.

Die Effekte von Calcium und Brij-35 auf Ovastacin werden im Zusammenhang mit der Wechselwirkung von Astacinen und Fetuin-A in späteren Abschnitten nochmals aufgegriffen. Festzuhalten bleibt, dass die Aktivitätssteigerung von Ovastacin durch Calcium und Brij-35 die

Reduzierung der Ovastacin-Konzentration auf 50 nM gegenüber 300 nM ohne Zusätze ermöglichte.

4.3.4 K_m -Bestimmung

Die kinetischen Untersuchungen von Ovastacin wurden mit einem fluorogenen synthetischen Substrat durchgeführt. In seiner Peptidsequenz (Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂) ist eine Abfolge von zwei sauren Aminosäureresten (DD) enthalten. Somit ist dieses Substrat theoretisch ein hervorragendes Instrument zur Analyse der enzymatischen Aktivität mehrerer Astacinproteasen (BECKER-PAULY ET AL., 2011). Im Zuge dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass es tatsächlich von Ovastacin gespalten wurde. Bei der Ermittlung des K_m -Wertes stellte ich allerdings fest, dass dieses FRET-Substrat bei Konzentrationen über 60 μ M auf Ovastacin inhibierend wirkt (Siehe Anhang A8). Da bei den Routineuntersuchungen zur Hemmung durch Inhibitoren die Substratkonzentration nie höher als 40 μ M angesetzt wurde, konnte dieses Peptid trotzdem als gut geeignetes Substrat benutzt werden. Vernachlässigt man für das Michaelis-Menten Diagramm alle Messpunkte oberhalb 60 μ M Substrat-Konzentration, so lassen sich die verbliebenen Datenpunkte durch das Programm GraFit4 nahezu perfekt an die Michaelis-Menten-Hyperbel fitten. Die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante K_m lag bei 34 μ M. Dies würde bedeuten, dass die halbmaximale Substratumsatzgeschwindigkeit des Enzyms bei 34 μ M Substrat erreicht wäre. Anzumerken ist, dass, bedingt durch Substrathemmung, die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit von $V_{max} = 58$ nM/s, wie sie hier ermittelt wurde, nie erreicht wird. Unter den Annahmen, dass V_{max} theoretisch erreichbar wäre und die Konzentration des aktiven Enzyms in der Reaktion ca. 15 % der eingesetzten Pro-Ovastacin-Menge beträgt (ca. 22 nM, siehe Abschnitt 4.4), können die Anzahl der Produktmoleküle, die während der Reaktion pro Zeiteinheit entstehen sollten ($k_{cat} = V_{max}/E_0$) und die Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_m) errechnet werden. Beim Vergleich dieser Parameter k_{cat} mit $2,6$ s⁻¹ und k_{cat}/K_m mit $7,6 * 10^4$ M⁻¹s⁻¹ mit diejenigen, die für Astacin bestimmt worden waren (STÖCKER ET AL., 1990), wurde klar, dass es sich bei Ac-RE(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(Dabcyl)-NH₂ nicht um ein optimales, aber zur Zeit das effektivste Substrat für die kinetischen Analysen der Ovastacin-Aktivität handelt.

4.4 Inhibition von Ovastacin durch Fetuin-B

Bis zur Entdeckung des Nephrosininhibitors (TSAI ET AL., 2004) waren keine natürlichen Hemmstoffe für Astacinproteasen, zu denen auch Ovastacin zählt, bekannt. Der Nephrosininhibitor wurde als Mitglied der Typ-3 Cystatine identifiziert, was die Aufmerksamkeit auf andere Vertreter dieser Protein-Gruppe lenkte. Daraufhin wurde Säuger-

Fetuin als potenzieller Hemmstoff der Säuger-Astacinproteinasen in unserer Arbeitsgruppe getestet. Das Ergebnis war, dass menschliches Fetuin-A als Inhibitor der menschlichen Meprine fungiert (HEDRICH ET AL., 2010). Allerdings standen zu diesem Zeitpunkt noch keine reinen Präparationen von Fetuin-A und Fetuin-B zur Verfügung. Die vermeintliche Hemmung durch Fetuin-A war vermutlich auf Beimengungen von Fetuin-B in der damals verwendeten kommerziellen Fetuin-A Präparation zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde eindeutig festgestellt, dass Fetuin-B und nicht Fetuin-A ein potenter endogener Inhibitor des Ovastacins und der beiden Meprintypen ist (siehe Abbildung 1, 17 und Tabelle 17) (DIETZEL ET AL., 2013; STÖCKER ET AL., 2014; FLOEHR ET AL., 2016).

Hier wurden weitere Fakten geschaffen, welche die physiologische Relevanz der darin aufgestellten Hypothese unterstützen. So konnte ich nachweisen, dass auch menschliches Fetuin-B rekombinantes murines Ovastacin zu inhibieren vermag. Dadurch wurden die Zweifel darüber, dass die Inhibition von Astacinen nur durch murines Fetuin-B möglich ist, aus dem Weg geräumt. Die detaillierten kinetischen Untersuchungen beweisen die Unabhängigkeit der Wechselwirkung zwischen Ovastacin und Fetuin-B von der Anwesenheit des Fetuin-A (Abbildung 18 A). Die beiden Fetuine konkurrieren demnach nicht um das aktive Zentrum der Protease. Die Natur der Inhibition des Ovastacins durch Fetuin-B trägt einen kompetitiven Charakter. Seine Wirkung erfolgt fast momentan (Abbildung 18 B) und die Bindung der beiden Partner ist relativ fest (IC_{50} in nanomolarem Bereich, Tabelle 17).

Es war nicht möglich die Inhibitionskonstante K_i dieser Interaktion zu bestimmen. Dafür ist es erforderlich mit einer Enzymkonzentration zu arbeiten, die bei ungefähr einem Zehntel der Inhibitionskonstanten liegt. Bei einem K_i im einstelligen nanomolaren Bereich bedeutet dies, dass die Enzymkonzentration subnanomolar sein muss. Dies war im vorliegenden Fall jedoch nicht möglich, da das verfügbare synthetische Substrat zu unsensitiv war. Um ein signifikant hohes, auswertbares Fluoreszenzsignal zu erhalten, musste deshalb die Menge an Enzym im Ansatz relativ hoch sein. Deswegen gleicht der Verlauf des Graphen der Inhibitionskinetik mit Fetuin-B einer Titrationskurve (Abbildung 17 B), anhand derer die Konzentration des Enzyms bestimmt werden kann. In diesem Fall (Abbildung 17 B) liegt IC_{50} bei 76 nM, was bedeutet, dass 150 nM aktives Enzym vorhanden sind. Da ca. 1 μ M Pro-Ovastacin eingesetzt wurde, lag der Aktivierungserfolg in diesem konkreten Fall demnach bei ca. 15 %.

4.5 Fetuin-B ist ein spezifischer Inhibitor der Astacinproteasen

Die Typ-1 und Typ-2 Cystatine wurden ursprünglich als Inhibitoren Papain-ähnlicher Cysteinproteasen beschrieben (TURK UND BODE, 1991). Vor Kurzem wurde gezeigt, dass

Typ-2 Cystatine als „doppelköpfige“ Inhibitoren wirken können. Sie können gleichzeitig Papain-ähnliche Cysteinproteinasen und mit einer zweiten, unabhängigen reaktiven Bindungsstelle Cysteinproteinasen des Legumain Typs hemmen (ALVAREZ-FERNANDEZ ET AL., 1999). Unter den Typ-3 Cystatinen war das Kininogen der erste Vertreter mit Proteinase-inhibierender Wirkung (OHKUBO ET AL., 1984; SALVESEN ET AL., 1986). Interessanterweise waren von den drei Cystatin-ähnlichen Domänen des Kininogens nur die zweite und dritte Domäne inhibitorisch aktiv (SALVESEN ET AL., 1986). Beide hemmten Papain-ähnliche Proteinasen, die zweite zusätzlich auch Calpain. Sehr interessant war in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die isolierten Cystatindomänen in der Summe die gleichen Aktivitäten besaßen wie das komplette Kininogen. Damit war der Beweis erbracht, dass ein freier N-Terminus der Cystatindomänen für die inhibitorische Funktion nicht essenziell war.

Die Entdeckung der Fetuine als Hemmstoffe für Metalloproteinasen der Astacinfamilie warf eine Reihe von Fragen auf. Welche Proteinasen werden durch Fetuine gehemmt? Welche Bereiche (Domänen) des Fetuine sind dabei involviert und welcher Mechanismus liegt dieser Wirkung zugrunde.

Außer Cysteinproteasen wurden in dieser Arbeit Serin-, Aspartat- und neben Astacinen weitere Metalloproteinasen getestet. Das Ergebnis war etwas überraschend: nur Astacinproteasen wurden durch Fetuin-B gehemmt. Fetuin-A hatte keine Hemmwirkung auf irgendeines der untersuchten Enzyme (dies wird weiter unten separat betrachtet).

Interessant ist, dass die inhibierten Astacinproteasen sowohl aus Säugetieren (Meprine, Ovastacin) als auch aus Fischen (Nephrosin) und Wirbellosen (Astacin) stammen. Ebenso heterogen wie die Herkunft sind Lokalisation und Aufgabengebiete dieser Enzyme. Relativ wahrscheinlich ist, dass Meprine in ihrer natürlichen Umgebung in Kontakt mit Fetuin-B treten. Sie als äußerst aktive Proteasen mit der Beteiligung an verschiedenen Prozessen inklusive Entstehung vieler Krankheiten (BRODER UND BECKER-PAULY, 2013) benötigen ohne Zweifel negative Regulation. In Falle des Nephrosins fungiert der Nephrosininhibitor als Analogon von Fetuin-B. Die Datenbankrecherche nach Fetuin-B-ähnlichen Proteinen im Flusskrebs war bislang erfolglos. Vermutlich ist die Hemmung der Flusskrebsproteinase Astacin durch Säuger-Fetuin-B auf die prinzipielle Ähnlichkeit der aktiven Zentren von Astacin-Metalloproteinasen zurückzuführen. Eine Ausnahme stellen hier die Proteinasen der BMP1/Tolloid-Subfamilie dar, die von Fetuin-B als einzige bislang bekannte Astacine von Fetuin-B nicht inhibiert werden. Der Aufbau ihrer katalytischen Einheit unterscheidet sich nämlich von den anderen Astacinen durch zwei zusätzliche Cysteinreste die eine einzigartige vicinale Disulfidbrücke direkt über den katalytischen Spalt ausbilden (BODE ET AL., 1992; MAC SWEENEY ET AL., 2008; HUNG ET

AL., 2016). Dadurch wird höchstwahrscheinlich dem globulären Protein-Inhibitor Fetuin-B der Zugang zum katalytischen aktiven Zentrum versperrt.

Um die Frage der physiologischen Relevanz der gezeigten Ergebnisse zu beantworten, werden in der Zukunft vertiefte Untersuchungen jeder einzelnen Protease notwendig sein. Die Tatsache an sich, dass z.B. Astacin oder Meprin β ebenfalls von Fetuin-B inhibiert wird, kann zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus ausgenutzt werden. Anhand der niedrigen K_i -Werten (ca. 7 nM für Meprin β und 16 nM für Astacin) ist davon auszugehen, dass der zwischen Protease und Inhibitor gebildeter Komplex sehr stabil ist. Da die Röntgenkristallstrukturen der beiden Enzyme bekannt sind (GUEVARA ET AL., 2010; AROLAS ET AL., 2012), könnte die Struktur des Komplexes ebenfalls aufgeklärt werden. Ein solcher Versuch wurde mit Astacin und FB_WT_4 unternommen. Die Ergebnisse hierfür liegen noch nicht vor.

4.6 Einfluss von Fetuin-A auf Astacine

Die Aussage, dass Fetuin-A ein Inhibitor der Astacinproteasen ist (HEDRICH ET AL., 2010), muss nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit revidiert werden. Fetuin-A ist allerdings für einige Astacine ein Substrat, das an mehreren Positionen gespalten werden kann. Im Gegensatz zu Fetuin-A wurde Fetuin-B von Astacinen nicht gespalten (Abbildung 21). Hingegen stellte sich heraus, dass das Fetuin-A die Aktivität von Astacinen positiv beeinflussen kann. Der Effekt wurde gegenüber Ovastacin, TLL2, BMP1 sowie beiden Meprintypen, nicht jedoch gegenüber Astacin und Nephrosin beobachtet. Der selbe Effekt wurde auch in der Arbeit von HEDRICH ET AL. (2010) mit einer reinen Präparation von rekombinantem humanen Fetuin-A ebenfalls beobachtet, aber damals auf Grund der Kontroversität der Ergebnisse anders gedeutet. Die aktivierende Wirkung wurde nicht interpretiert und die fehlende Hemmaktivität wurde dem Umstand zugeschrieben, dass das rekombinante Fetuin-A anders als die bisher untersuchten, gereinigten Varianten nicht im Bereich des sogenannten „*connecting peptide*“ proteolytisch gespalten vorlag. Der aktivierende Effekt ist bislang in seiner Ursache noch nicht verstanden. Es wurde z.B. vermutet, dass Fetuin-A, bekannt durch hohe Affinität zum Calciumphosphat (JAHNEN-DECHENT ET AL., 2011), als Donor für Calcium-Ionen fungieren kann. Allerdings werden vorwiegend Calciumphosphatkristallite gebunden und weniger freies Calcium (JAHNEN-DECHENT ET AL., 2011; BRYLKA UND JAHNEN-DECHENT, 2013). Vielleicht kann Fetuin-A bis jetzt unentdeckte Liganden in das System einbringen, die ihrerseits die Aktivität von Astacinen steigern könnten. Immerhin hat auch Serumalbumin eine ähnliche Wirkung auf Ovastacin gezeigt. Genau wie Fetuin-A ist Albumin ein abundantes Plasmaprotein mit polarer Oberfläche. Es besitzt aber auch Bindungsstellen für hydrophobe Moleküle (QUINLAN ET AL.,

2005). In der Literatur finden sich Beispiele für die stabilisierende Wirkung von Fetuin-A auf MMP-2 und MMP-9 sowie auf die Calcium-abhängige Cysteinprotease m-Calpain (RAY ET AL., 2003; THOMPSON ET AL., 2014; MELLGREN UND HUANG, 2007). Abhängig von Versuchszielsetzung und Versuchsdurchführung könnten die Begriffe Stabilisierung der Aktivität, die in den oben genannten Publikationen verwendet wurden, und Aktivitätssteigerung, wie es in dieser Arbeit beschrieben wurde, die gleiche Ursache haben.

4.7 Fetuine und Proteinase anderer Klassen

Wie bereits beschrieben, wurden die untersuchte Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen außer den Astacinen weder von Fetuin-A noch von Fetuin-B deutlich inhibiert. Die eindeutigsten Ergebnisse wurden mit Aspartat- und Cysteinproteasen erzielt. Bei Cysteinproteasen wurde zum Teil sogar Aktivitäts-steigernde Wirkung beider Fetuin-spezies beobachtet. Dies erscheint besonders interessant im Hinblick auf evolutionäre Entwicklung von Fetuinen aus gemeinsamen Vorläufern mit Typ-2 Cystatinen (OCHIENG UND CHAUDHURI, 2010). Die Typ-2 Cystatine und Kininogen, welches wie Fetuine zu den Typ-3 Cystatinen zählt, sind bekanntermaßen Inhibitoren von Cysteinproteasen.

Die Untersuchung der mit den Astacinen in der Superfamilie Metzinkine zusammengefassten ADAM und MMP war naheliegend. Immerhin besitzen die aktiven Zentren der Metzinkine eine stark konservierte Grundstruktur. Andererseits sind die spezifischen natürlichen Inhibitoren der ADAM und MMP, die TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), unwirksam gegen Astacine. ADAM 10, MMP-2 und MMP-13 wurden durch Fetuin-B aber auch Fetuin-A in ihrer Aktivität nicht beeinflusst. MMP-8 und MMP-9 reagierten auf die Anwesenheit von millimolaren Konzentrationen an Fetuin-A mit einem geringen Aktivitätsverlust. Teilweise konnte diese Wirkung durch Ca^{2+} -Zusatz aufgehoben werden. So scheint es, dass Fetuin-B in Säugern gruppenspezifisch auf Astacine und zwar selektiv gegen Ovastacin und Meprine wirkt. Über die Interaktion von Fetuinen und Serinproteasen gibt es widersprüchliche Literaturdaten. Bereits vor mehr als 40 Jahren wurde die hemmende Wirkung von Fetuin-A auf Trypsin beschrieben (GALEMBECK UND CANN, 1974; ROHRLICH UND RIFKIN, 1981; YAMAMOTO UND SINOHARA, 1993; ASHIDA ET AL., 2000). Die Wiederholung dieser Interaktionsstudien im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass es ohne Vorinkubation unter den Versuchsbedingungen zu einer scheinbaren initialen Hemmung der Serinproteinase Trypsin durch Fetuin-A kam. Wurde das Enzym jedoch 30 min vor Zugabe des fluorogenen Substrats mit Fetuin-A inkubiert, so war keine Hemmung festzustellen. Offenbar ist Fetuin-A ein sehr gutes Substrat für Trypsin und wird daher gegenüber dem fluorogenen synthetischen Substrat bevorzugt. Demnach handelt es

sich bei der temporären Inhibition um eine Substratkompetition. In der ursprünglichen Arbeit von Galembeck und Cann (1974) wurden die Experimente bei Temperaturen zwischen 5°C und 25°C durchgeführt und die Beobachtungszeit betrug 20 min. Bei den enzymatischen Tests, die zur Entdeckung des „*Countertypins*“ durch YAMAMOTO UND SINOHARA (1993) führten, lag die Temperatur zwar konstant bei 37°C, aber die Beobachtungszeit war mit 15 min offenbar ebenfalls zu kurz um die temporäre Hemmung zu erkennen. *Countertypin* aus dem Plasma der Maus war identisch mit Fetuin-A und hatte keine Hemmaktivität gegen Chymotrypsin, pankreatische Elastase, neutrophile Elastase, Thrombin, Plasmin, Plasmakallikrein, pankreatisches Kallikrein, Faktor Xa oder Papain, sondern ausschließlich gegen Trypsin. Dies widerspricht den Beobachtungen von ROHRLICH UND RIFKIN (1981), die für menschliches Fetuin-A aus embryonalen Lungenzellen eine Hemmung von Plasmin beschrieben. Eine sehr gründliche Analyse proteolytischer Schnittstellen im menschlichen Fetuin-A wurde von NAWRATIL ET AL. (1996) publiziert. Sie identifizierten eine hyperfragile konservierte Region im sogenannten *connecting peptide*, das von verschiedenen Serinproteinasen und auch anderen proteolytischen Enzymen geschnitten wird. Ein Chymotrypsin-ähnliches Enzym sorgt für die Heraustrennung des *connecting peptides*. Die Position dieses Sequenzabschnittes und die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Fragmente des Fetuins-A der Maus stimmen sehr gut überein (Abbildung 24).

4.8 Bioinformatische Analyse von Fetuin-A und Fetuin-B

Fetuin-A und Fetuin-B sind mit großer Wahrscheinlichkeit evolutionär aus den Typ-2 Cystatin-ähnlichen Vorläuferproteinen durch Genduplikation entstanden. Jedes dieser Proteine besteht aus zwei Cystatin-ähnlichen Domänen und einer C-terminalen Verlängerung. Einige Strukturen, wie Disulfidbrücken und die Fetuinsignatur DXLETXCHVL, sind beiden Proteinen gemeinsam, die Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind jedoch groß. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Besonderheiten der Eigenschaften von Fetuin-B und Fetuin-A in ihrer Sequenz widerspiegeln. Bei der bioinformatischen Analyse wurden nur die Cystatin-ähnlichen Domänen berücksichtigt, weil in der Diplom und Doktorarbeit von Katharina Meyer (HEDRICH ET AL., 2010; MEYER, 2016) das Fischfetuin aus *Cyprinus carpio* als Zweidomänenprotein exprimiert worden war und allem Anschein nach seine volle Hemmaktivität entfaltetete. Daher wurde vermutet, dass die Cystatin-ähnlichen Domänen für die Inhibition der Astacinproteinasen verantwortlich waren. Besondere Aufmerksamkeit wurde den sogenannten Haarnadelstrukturen der Cystatin-ähnlichen Domänen gewidmet. Der Vergleich dieser Domänen aus Fetuin-A, Fetuin-B, Kininogen, Cystatin A, Cystatin C von

Mensch, Maus und Huhn ergab, dass alle Domänen mit nachgewiesenen inhibitorischen Eigenschaften (unabhängig von Zielproteasen) ein konserviertes Q-X-V-X-G Motiv im Scheitelbereich der ersten Haarnadelstruktur aufwiesen. Auch die zweite Cystatindomäne des Fetuins-B weist dieses Motiv auf, nicht jedoch die erste Domäne und keine der beiden Domänen im Fetuin-A. Es schien daher möglich, dass im Zuge der evolutionären Entwicklung der Cystatine von Typ-1 über Typ-2 zum Typ-3 das Motiv Q-X-V-X-G als funktionstragende Struktur konserviert blieb. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden der Bereich der ersten Haarnadelstruktur der zweiten Cystain-ähnlichen Domäne von Fetuin-B gegen den gleichen Bereich aus der ersten Domäne ausgetauscht. Dadurch wurde das konservierte Q-X-V-X-G Motiv eliminiert (FB_L1L1_4 und/oder FB_HY_L1L1). Die vergleichende Modellierung des Wildtyp Fetuins-B (FB_WT_4) und FB_L1L1_4 bzw. FB_HY_L1L1 ließ erwarten, dass durch diese Substitution der erste Haarnadel-Loop bei FB_HY_L1L1 erheblich verlängert würde und sein Scheitelbereich durch die Aminosäurereste von Asp und Glu einen sauren Charakter erhalten sollte (Abbildung 28).

4.9 Herstellung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1

Die Herstellung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 in Insektenzellen erwies sich als sehr erfolgreich. Die Proteinausbeute und die Reinheit waren in allen vier Fällen mehr als zufriedenstellend. Besonders gut fiel sie bei FB_WT_4 mit ca. 34 mg aus 840 ml konditioniertem Medium aus. Die produzierten Proteine besitzen gegenüber rein rechnerisch (Expasy, www.expasy.org/protparam/) ermittelten Werten um je ca. 15 kDa erhöhte Molekularmassen, was auf die erwartete Glycosylierung hindeutet. Im Vergleich zu den Präparationen, die in *COS-7* Zellen (DIETZEL ET AL., 2013) exprimiert wurden, zeigen sie jedoch um ca. 10 kDa geringere Molekulargewichte. Dies ist mit den unterschiedlichen Glycosylierungseigenschaften der exprimierenden Zelltypen zu begründen.

4.10 Analyse der Wirkung von FA_WT, FB_WT_4, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1 auf Ovastacin

Wildtyp-Varianten von Fetuin-A (FA_WT) und Fetuin-B (FB_WT_4) zeigten die gleiche Wirkung auf Astacinproteasen wie die Präparationen aus *COS-7* Zellen. Offenbar spielt das Expressionssystem keine Rolle. Die Art der Glycosylierung spielt in der Interaktion von Astacinproteasen und Fetuinen höchstwahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Es ist davon auszugehen, dass die korrekte Proteinfaltung vorrangig ist.

Die beiden modifizierten Fetuin-B Varianten inhibierten Astacinproteinasen mit der gleichen Intensität wie das Wildtyp-Protein. Damit wäre die Hypothese bezüglich der Bedeutung der ersten Haarnadelstruktur der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne widerlegt.

Die Vermutung, dass die Aminosäurereste Asp und Glu an der Spitze der modifizierten Haarnadelstruktur eigentlich eine perfekte Spaltstelle für Astacine (z.B. Ovastacin und Meprine) darstellen könnten, wurde in der Analyse der Inkubationsansätze im SDS-Gel nicht bestätigt. Vielleicht ist die Haarnadelkonfiguration sterisch bedingt stabil gegen Proteolyse durch Astacine. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass die erste Cystatin-ähnliche Domäne des menschlichen Fetuin-B keine sauren Aminosäurereste im Bereich der ersten Haarnadelstruktur aufweist. Trotzdem zeigt menschliches Fetuin-B die gleiche Hemmaktivität gegen Astacinproteinasen wie Maus-Fetuin-B.

4.11 Analyse der Wirkung von Fetuinchimären auf Ovastacin

Parallel zu den Versuchen mit modifizierten Fetuin-B-Varianten wurden in der Arbeitsgruppe von Willi Jahnen-Dechent Proteinchimären aus Fetuin-A und Fetuin-B hergestellt (Abbildung 34). Diese wurden von mir in den Inhibitionsassays mit Ovastacin und beiden Meprinen eingesetzt. Die daraus resultierenden Ergebnisse (Abbildung 35) ermöglichten die erhoffte Identifizierung der inhibitorisch wirksamen Domäne von Fetuin-B allerdings nicht.

Vermutlich wird hier erst die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Komplexes aus Fetuin-B und einer Astacinproteinasen Aufschluss bringen. Es gelang inzwischen in Kooperation mit der AG Gomis-Rüth in Barcelona Kristalle aus dem in Insektenzellen hergestellten Maus-Fetuin-B und Flusskrebsastacin herzustellen.

4.12 Bedeutung der Arbeit für die aktuelle Forschung und Ausblick

Die hier vorgestellten Forschungsergebnisse flossen zum Teil in die Arbeit von Dietzel und Kollegen (DIETZEL ET AL., 2013) mit ein. Die darin gezeigte Funktion des Fetuin-B als endogener Regulator des Ovastacins ist essentiell für die erfolgreiche Fertilisation einer Säugeroozyte. Die aktuelle Vorstellung über das komplizierte Zusammenspiel von Ovastacin und Fetuin-B während des Befruchtungsvorgangs wurde in einem Review dargelegt (STÖCKER ET AL., 2014). Noch sind nicht alle Fragen beantwortet worden. Die Rolle des Ovastacins bei der Aushärtung von *Zona pellucida* ist unbestritten, allerdings ist noch nicht endgültig geklärt, ob der Schutz vor Polyspermie essentiell ist. Vielleicht hat die Robustheit der verhärteten Zona eine wichtigere Bedeutung als der Polyspermieblock. Die Rolle des Ovastacins könnte derjenigen des Alveolins beim Medaka-Fisch vergleichbar sein. Alveolin verursachte die Aushärtung von Chorions der Fischeocyte und verleiht dem sich entwickelnden Embryo

DISKUSSION

mechanischen Schutz (SHIBATA ET AL., 2012). Die endgültige Aufklärung dieser Frage ist mit den *in vitro* Experimenten nicht möglich. Hier müssen bereits laufende Befruchtungsversuche mit Mäusen Aufschluss geben.

Literaturverzeichnis

- Adar R., Kessler E. und Goldberg B. (1986). Evidence for a protein that enhances the activity of type I procollagen C-proteinase, *Coll Relat Res.* 6 (3): 267-277.
- Alvarez-Fernandez M., Barrett A. J., Gerhartz B., Dando P. M., Ni J. und Abrahamson M. (1999). Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site, *J Biol Chem.* 274 (27): 19195-19203.
- Amour A., Knight C. G., Webster A., Slocombe P. M., Stephens P. E., Knäuper V., Docherty A. J. und Murphy G. (2000). The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3, *FEBS Lett.* 473 (3): 275-279.
- Aoki N., Deshimaru M., Kihara K. und Terada S. (2009). Snake fetuin: isolation and structural analysis of new fetuin family proteins from the sera of venomous snakes, *Toxicon.* 54 (4): 481-490.
- Aoyagi T., Morishima H., Nishizawa R., Kunimoto S. und Takeuchi T. (1972). Biological activity of pepstatins, pepstanone A and partial peptides on pepsin, cathepsin D and renin, *J Antibiot (Tokyo)* 25 (12): 689-694.
- Arnold P., Schmidt F., Prox J., Zunke F., Pietrzik C., Lucius R. und Becker-Pauly C. (2015). Calcium negatively regulates meprin β activity and attenuates substrate cleavage, *FASEB J.* 29 (8): 3549-3557.
- Arolas J. L., Broder C., Jefferson T., Guevara T., Sterchi E. E., Bode W., Stöcker W., Becker-Pauly C. und Gomis-Rüth F. X. (2012). Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (40): 16131-16136.
- Ashida H., Yamamoto K. und Kumagai H. (2000). Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase, *Biosci Biotechnol Biochem.* 64 (10): 2266-2268.
- Avella M. A., Baibakov B. und Dean J. (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans, *J Cell Biol.* 205 (6): 801-809.
- Avella M. A., Xiong B. und Dean J. (2013). The molecular basis of gamete recognition in mice and humans, *Mol Hum Reprod.* 19 (5): 279-289.
- Baici A., Novinec M. und Lenarcic B. (2013). Kinetics of the Interaction of Peptidases with Substrates and Modifiers, Kapitel - 2. In: *Proteases: Structure and Function*, Brix K. und Stöcker W. (Hrsg), Wien: Springer-Verlag.
- Baker A. H., Edwards D. R. und Murphy G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, *J Cell Sci.* 115 (19): 3719-3727.
- Barrett A. J. (1973). Human cathepsin B1. Purification and some properties of the enzyme, *Biochem J.* 131 (4): 809-822.
- Barrett A. J. (1977). Introduction to the history and classification of tissue proteinases. In: *Proteinases in mammalian cells and tissue*, Barrett A. J. (Hrsg), Amsterdam: Elsevier/ North Holland.

- Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (1998). Kapitel – 185, 186, 1, 2, 270, 271, 334. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1. Auflage, London: Academic Press.
- Barros C. und Yanagimachi R. (1971). Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material, *Nature* 233 (5317):268-269.
- Becker C., Kruse M. N., Slotty K. A., Köhler D., Harris J. R., Rösmann S., Sterchi E. E. und Stöcker W. (2003). Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin, *Biol. Chem.* 384 (5): 825–831.
- Becker-Pauly C., Barré O., Schilling O., Auf dem Keller U., Ohler A., Broder C., Schütte A., Kappelhoff R., Stöcker W. und Overall C. M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime site specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates, *Mol Cell Proteomics* 10 (9): M111.009233.
- Becker-Pauly C., Höwel M., Walker T., Vlad A., Aufenvenne K., Oji V., Lottaz D., Sterchi E. E., Debela M., Magdolen V., Traupe H. und 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 (5): 1115-1125.
- Berger A. und Schechter I. (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 257 (813): 249-264.
- Bergmans H. E., van Die I. M. und Hoekstra W. P. M. (1981). Transformation in *Escherichia coli*: Stages in the Process *J. Bacteriol.* 146 (2): 564-570.
- Berry R., Jowitt T. A., Ferrand J., Roessle M., Grossmann J. G., Canty-Laird E. G., Kammerer R. A., Kadler K. E. und Baldock C. (2009). Role of dimerization and substrate exclusion in the regulation of bone morphogenetic protein-1 and mammalian tolloid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106 (21): 8561–8566.
- Bhairi S. M. (2001). Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems, Copyright updated by Calbiochem-Novabiochem Corporation. Doc No. CB0068-401
- Bianchi E., Doe B., Goulding D. und Wright G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization, *Nature* 508 (7497), 483–487.
- Bieth J. G. (1984). In vivo significance of kinetic constants of protein proteinase inhibitors, *Biochem Med.* 32 (3): 387-397.
- Bijakowski C., Vadon-Le Goff S., Delolme F., Bourhis J. M., Lécorché P., Ruggiero F., Becker-Pauly C., Yiallourous I., Stöcker W., Dive V., Hulmes D. J. und Moali C. (2012). Sizzled is unique among secreted frizzled-related proteins for its ability to specifically inhibit bone morphogenetic protein-1 (BMP-1)/tolloid-like proteinases, *J Biol Chem.* 287 (40): 33581-33593.
- Blanc G., Font B., Eichenberger D., Moreau C., Ricard-Blum S., Hulmes D.J. und 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 (23): 16924-16933.

- Bleil J. D. und Wassarman P. M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida, *Dev Biol.* 76 (1): 185-202.
- Blobel C. P. (1997). Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch, *Cell.* 90 (4): 589-592.
- Boatright K. M. und Salvesen G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation, *Curr Opin Cell Biol.* 15 (6): 725-731.
- Bode W., Engh R., Musil D., Thiele U., Huber R., Karshikov A., Brzin J., Kos J. und Turk V. (1988). The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases, *EMBO J.* 7 (8): 2593-2599.
- Bode W., Gomis-Rüth F. X., Huber R., Zwilling R. und Stöcker W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases, *Nature.* 358 (6382): 164-167.
- Bode W., Gomis-Rüth F.X. und 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 (1-2): 134-140.
- Bond J. S. und Butler P. E. (1987). Intracellular proteases, *Annu Rev Biochem.* 56: 333-364.
- Braden A. W., Austin C. R. und David H. A. (1954). The reaction of zona pellucida to sperm penetration, *Aust J Biol Sci.* 7 (3): 391-409.
- Briozzo P., Morisset M., Capony F., Rougeot C. und Rochefort H. (1988). In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells, *Cancer Res.* 48 (13): 3688-3692.
- Broder C. und Becker-Pauly C. (2013). The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis, *Biochem J.* 450 (2):253-264.
- Brooks S. A. (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins, *Expert Rev Proteomics* 3 (3): 345-359.
- Brylka L. und Jahnen-Dechent W. (2013). The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization, *Calcif Tissue Int.* 93 (4): 355-364.
- Burkart A. D., Xiong B., Baibakov B., Jiménez-Movilla M. und Dean J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy, *J Cell Biol.* 197 (1): 37-44.
- Carmeliet P., Schoonjans L., Kieckens L., Ream B., Degen J., Bronson R., De Vos R., van den Oord J. J., Collen D. und Mulligan R. C. (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice, *Nature.* 368 (6470): 419-424.
- Castellino F. J. (1998). Kapitel – 59. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Cerdà-Costa N. und Gomis-Rüth F. X. (2014). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains, *Protein Sci.* 23 (2): 123-144.

- Chantry A., Gregson N. A. und Glynn P. (1989). A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization, *J Biol Chem.* 264 (36): 21603-21607.
- Cheng Y. und Prusoff W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol.* 22 (23): 3099-3108.
- Cherr G. N., Drobnis E. Z. und Katz D. F. (1988). Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg, *J Exp Zool.* 246 (1): 81-93.
- Choi N., Hahm J., Maeng P. J. und Kim S. (2005). Comparative study of enzyme activity and stability of bovine and human plasmins in electrophoretic reagents, beta-mercaptoethanol, DTT, SDS, Triton X-100, and urea. *J Biochem Mol Biol.* 38 (2): 177-181.
- Colige A., Li S. W., Sieron A. L., Nusgens B. V., Prockop D. J. und Lapière C. M. (1997). cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (6): 2374-2379.
- Conner G. E. (1998). Kapitel – 277. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Cornish-Bowden A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics, *Perspectives in Science* 1: 74–87.
- Coy P., Jiménez-Movilla M., García-Vázquez F. A., Mondéjar I., Grullón L. und Romar R. (2012). Oocytes use the plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa, *Hum Reprod.* 27 (7): 1985-1993.
- David A., Brackett B. G., Garcia C-R. und Mastroianni Jr. L. (1968). Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the fallopian tube, *J. Reprod. Fertil.* 19 (2): 285-289.
- Davies D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases, *Annu Rev Biophys Chem.* 19: 189-215.
- Davies M. T. (1959). A universal buffer solution for use in ultra-violet spectrophotometry, *Analyst* 84: 248-251.
- Dean R. T und Barrett A. J. (1976). Lysosomes, *Essays Biochem.* 12: 1-40.
- Denecke B., Gräber S., Schäfer C., Heiss A., Wöltje M. und Jahnen-Dechent W. (2003). Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A, *Biochem J.* 376 (1): 135-145.
- Dietzel E., Wessling J., Floehr J., Schäfer C., Ensslen S., Denecke B., Rösing B., Neulen J., Veitinger T., Spehr M., Tropartz T., Tolba R., RennéT., Egert A., Schorle S., Gottenbusch Y., Hildebrand A., Yiallourous I., Stöcker W., Weiskirchen R. und Jahnen-Dechent W. (2013). Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein Is Essential for Fertilization, *Dev. Cell* 25: 106-112.
- Ding L., Coombs G. S., Strandberg L., Navre M., Corey D. R. und Madison E. L. (1995). Origins of the specificity of tissue-type plasminogen activator, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (17): 7627-7631.
- Dubail J. und Apte S. S. (2015). Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics, *Matrix Biol.* 44-46: 24-37.

- Ducibella T., Kurasawa S., Rangarajan S., Kopf G. S. und Schultz R. M. (1990). Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida, *Dev Biol.* 137 (1): 46-55.
- Duong-Ly K. C. und Gabelli S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation, *Methods Enzymol.* 541: 85-94.
- Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32 (5): 1792-1797.
- Edwards D. R., Handsley M. M. und Pennington C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases, *Mol Aspects Med.* 29 (5): 258-289.
- Ferrer M., Rodriguez H., Zara L., Yu Y., Xu W. und Oko R. (2012). MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization, *Cell Tissue Res* 349 (3): 881-895.
- Floehr J., Dietzel E., Neulen J., Rösing B., Weissenborn U. und Jahnen-Dechent W. (2016). Association of high fetuin-B concentrations in serum with fertilization rate in IVF: a cross-sectional pilot study, *Hum Reprod.* 31 (3): 630-637.
- Förster T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Phys.* 6 (2): 55-75.
- Fridrich S., Karmilin K. und Stöcker W. (2016). Handling Metalloproteinases, *Curr Protoc Protein Sci.* Unit 16.20
- Galembeck F. und Cann J. R. (1974). Fetuin as a trypsin inhibitor, *Arch Biochem Biophys.* 164 (1): 326-331.
- Gallagher S., Winston S. E., Fuller S. A. und Hurrell J. G. (2008). Immunoblotting and immunodetection, *Curr Protoc Mol Biol.* Unit 10.8.
- Gangneux C., Daveau M., Hiron M., Derambure C., Papaconstantinou J. und Salier J. P. (2003). The inflammation-induced down-regulation of plasma Fetuin-A (alpha2HS-Glycoprotein) in liver results from the loss of interaction between long C/EBP isoforms at two neighbouring binding sites, *Nucleic Acids Res.* 31 (20): 5957-5970.
- Gerhardt S., Hassall G., Hawtin P., McCall E., Flavell L., Minshull C., Hargreaves D., Ting A., Pauptit R. A., Parker A. E. und Abbott W. M. (2007). Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains, *J Mol Biol.* 373 (4): 891-902.
- Goddard J. P. und Reymond J. L. (2004). Recent advances in enzyme assays, *Trends Biotechnol.* 22 (7): 363-370.
- Gomis-Rüth F. X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases, *Mol Biotechnol.* 24 (2): 157-202.
- Gomis-Rüth F. X., Trillo-Muyo S. und Stöcker W. (2012). Functional and structural insights into astacin metalloproteinases, *Biol. Chem.* 393 (10): 1027-1041.
- Goncalves P. B. und Graves C. (1997). Fetuin: a tool to study the block to polyspermy. Fetuina: um instrumento para estudar o bloqueio da polispermia, *Cienc. Rural* 27 (1): 127-131.

- Gouy M., Guindon S. und Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building, *Mol Biol Evol.* 27 (2): 221-224.
- Graf L., Szilagyi L. und Venekei I. (1998). Kapitel – 8. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Green D. P. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida, *Rev Reprod.* 2 (3): 147-156.
- Guevara, T., Yiallourous I., Kappelhoff R., Bissdorf S., Stöcker, W. und Gomis-Rüth, F. X. (2010). Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase. *J. Biol. Chem.* 285 (18): 13958–13965.
- Halfon S. und Craik C. S. (1998). Kapitel – 3. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Harris J. L., Backes B. J., Leonetti F., Mahrus S., Ellman J. A. und Craik C. S. (2000). Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (14): 7754-7759.
- Hedrich J., Lottaz D., Meyer K., Yiallourous I., Jahnen-Dechent W., Stöcker W. und Becker-Pauly C. (2010). Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases, *Biochemistry.* 49 (39): 8599-8607.
- Heinrichsdorff J. und Olefsky J. M. (2012). Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation, *Nat Med.* 18 (8): 1182-1183.
- Herrero M. B., Mandal A., Digilio L. C., Coonrod S. A., Maier B. und Herr J. C. (2005). Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization, *Dev Biol.* 284 (1): 126-142.
- Hildebrand A. (2013) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung des Ovastacins *in vivo* und *in vitro*. Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hoffmann-Osternof O. (1974). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Enzyme Nomenclature, Recommendations, 1972. Announcement, *Eur. J. Biochem.* 45: 1-3.
- Hojima Y., McKenzie J. A., van der Rest M. und Prockop D. J. (1989). Type I procollagen N-proteinase from chick embryo tendons. Purification of a new 500-kDa form of the enzyme and identification of the catalytically active polypeptides, *J Biol Chem.* 264 (19): 11336-1145.
- Hoodbhoy T. und Talbot P. (1994). Mammalian cortical granules: contents, fate, and function, *Mol Reprod Dev.* 39 (4): 439-448.
- Hooper N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases, *FEBS Lett.* 354 (1): 1-6.
- Howard L., Lu X., Mitchell S., Griffiths S. und Glynn P. (1996). Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types, *Biochem J.* 317 (1): 45-50.
- Huarte J., Vassalli J. D., Belin D. und Sakkas D. (1993). Involvement of the plasminogen activator/plasmin proteolytic cascade in fertilization, *Dev Biol.* 157 (2): 539-546.

- Hung C. H., Huang H. R., Huang C. J., Huang F. L und Chang G. D. (1997). Purification and cloning of carp nephrosin, a secreted zinc endopeptidase of the astacin family, *J Biol Chem.* 272 (21): 13772-13778.
- Hung C.W., Koudelka T., Anastasi C., Becker A., Moali C. und Tholey A. (2016). Characterization of post-translational modifications in full-length human BMP-1 confirms the presence of a rare vicinal disulfide linkage in the catalytic domain and highlights novel features of the EGF domain, *J Proteomics.* 138: 136-45.
- Jahren-Dechent W., Heiss A., Schäfer C. und Ketteler M. (2011). Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism, *Circ Res.* 108 (12): 1494-1509.
- Jahren-Dechent W., Schinke T., Trindl A., Müller-Esterl W., Sablitzky F., Kaiser S. und Blessing M. (1997). Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene, *J Biol Chem.* 272 (50): 31496-31503.
- Jeffrey J. J. (1998). Kapitel – 391. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Jung S. H., Won K. J., Lee K. P., Kim H. J., Seo E. H., Lee H. M., Park E. S., Lee S. H. und Kim B. (2015). The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction, *Clin Sci.* 129 (1): 27-38.
- Kang D., Gho Y. S., Suh M. und Kang C. (2002). Highly sensitive and fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Bull. Korean. Chem. Soc.* 23: 1511–1512.
- Karmilin, K. (2012). Konsequenzen der Multidomänenstruktur des Ovastacins für seine Funktion und Expression. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- King, L. A. und Possee, R. D. (1992). The Baculovirus Expression System: A laboratory Guide, London: Chapman and Hall.
- Klein T. und Bischoff R. (2011). Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure, *J Proteome Res.* 10 (1): 17-33.
- Knäuper V., Cowell S., Smith B., López-Otin C., O'Shea M., Morris H., Zardi L. und Murphy G. (1997). The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction, *J Biol Chem.* 272 (12): 7608-7616.
- Köhler D., Kruse M., Stöcker W. und Sterchi E. E. (2000). Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro, *FEBS Lett.* 465 (1): 2-7.
- Kolodziejczyk R., Michalska K., Hernandez-Santoyo A., Wahlbom M., Grubb A. und Jaskolski M. (2010). Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation, *FEBS J.* 277 (7):1726-1737.
- Kouba A. J., Alvarez I. M. und Buhi W. C. (2000). Identification and localization of plasminogen activator inhibitor-1 within the porcine oviduct, *Biol Reprod.* 62 (3): 501-510.

- Kronenberg D., Vadon-Le Goff S., Bourhis J. M., Font B., Eichenberger D., Hulmes D. J. und Moali C. (2009). Strong cooperativity and loose geometry between CUB domains are the basis for procollagen c-proteinase enhancer activity, *J Biol Chem.* 284 (48): 33437-33446.
- Kumaresan P. R., Natarajan A., Song A., Wang X., Liu R., DeNardo G., DeNardo S. und Lam K. S. (2007). Development of tissue plasminogen activator specific "on demand cleavable" (odc) linkers for radioimmunotherapy by screening one-bead-one-compound combinatorial peptide libraries, *Bioconjug Chem.* 18 (1): 175-182.
- Kundapur R. R. (2013). Zymography: Enzymes in Action, *Science International* 1 (4): 70-75.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 10 (3-4): 203–209.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259): 680–685.
- Laskowski R. A., Hutchinson E. G., Michie A. D., Wallace A. C., Jones M. L., und Thornton J. M. (1997). PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures, *Trends Biochem Sci.* 22 (12): 488-490.
- Lee C., Bongcam-Rudloff E., Sollner C., Jahnke-Dechent W. und Claesson-Welsh L. (2009). Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein, *Front Biosci* 14: 2911-2922.
- Lijnen H. R. und Collen D. (1998). Kapitel – 58. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Lindahl P., Abrahamson M. und Björk I. (1992). Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin, *Biochem J.* 281 (1): 49-55.
- Liu J. X., Zhai Y. H., Geng F. S. , Xia J. H. und Gui J. F. (2008). Molecular characterization and expression pattern of fetuin-B in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), *Biochem Genet.* 46 (9-10): 620-633.
- Liu M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules, *Reprod Biol Endocrinol.* 9:149.
- Liu M., Sims D., Calarco P. und Talbot P. (2003). Biochemical heterogeneity, migration, and pre-fertilization release of mouse oocyte cortical granules, *Reprod Biol Endocrinol.* 1: 77.
- Liu T., Qian W. J., Gritsenko M. A., Camp D. G. 2nd, Monroe M. E., Moore R. J und Smith R. D. (2005). Human Plasma N-Glycoproteome Analysis by Immunoaffinity Subtraction, Hydrazide Chemistry, and Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 4 (6): 2070–2080.
- Locnikar P., Popovic T., Lah T., Kregar I., Kopitar M. und Turk V. (1981). The bovine cysteine proteinases, cathepsin B, H and S. In: Proteinases and their inhibitors. Structure, function and applied aspects, Turk V. und Vitale L. (Hrsg), Ljubljana and Oxford: Mladinska and Pergamon Press.
- López-Otín C. und Matrisian L. M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression, *Nat Rev Cancer.* 7 (10): 800-808.

- Luckow V. A. (1991). Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: Recombinant DNA Technology and Applications, Prokop A., Bajhah R. K. und Ho C. S. (Hrsg.), New York: . McGraw-Hill.
- Luckow V. A., Lee S. C., Barry G. F. und Olins P. O. (1993). Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*, *J. Virol*, 67 (8): 4566-4579.
- Mac Sweeney A., Gil-Parrado S., Vinzenz D., Bernardi A., Hein A., Bodendorf U., Erbel P., Logel C. und Gerhartz B. (2008). Structural basis for the substrate specificity of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteases, *J Mol Biol*. 384 (1): 228-239.
- Macfarlane R. G. (1964), An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier, *Nature*. 202: 498-499.
- Mandal A., Klotz K. L., Shetty J., Jayes F. L., Wolkowicz M. J., Bolling L. C., Coonrod S. A., Black M. B., Diekman A. B., Haystead T. A., Flickinger C.J. und Herr J. C. (2003). SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa, *Biol Reprod*. 68 (5): 1525-1537.
- Manka S. W., Carafoli F., Visse R., Bihan D., Raynal N., Farndale R. W., Murphy G., Enghild J. J., Hohenester E. und Nagase H. (2012). Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1, *Proc Natl Acad Sci USA*. 109 (31): 12461-1246.
- Markland F. S Jr. und Swenson S. (2013). Snake venom metalloproteinases, *Toxicon*. 62: 3-18.
- Marrero A., Duquerroy S., Trapani S., Goulas T., Guevara T., Andersen G. R., Navaza J., Sottrup-Jensen L. und Gomis-Rüth F. X. (2012). The crystal structure of human α 2-macroglobulin reveals a unique molecular cage, *Angew Chem Int Ed Engl*. 51 (14): 3340-3344.
- Mascarenhas M. N., Flaxman S. R., Boerma T., Vanderpoel S. und Stevens G.A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys, *PLoS Med*. 9(12).
- Matayoshi E. D., Wang G. T., Krafft G.A. und Erickson J. (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer, *Science*. 247 (4945): 954-958.
- Meex R. C., Hoy A. J., Morris A., Brown R. D., Lo J. C., Burke M., Goode R. J., Kingwell B. A., Kraakman M. J., Febbraio M. A., Greve J. W., Rensen S. S., Molloy M. P., Lancaster G. I., Bruce C. R. und Watt M. J. (2015). Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism, *Cell Metab*. 22 (6): 1078-1089.
- Mellgren R. L. und Huang X. (2008). Fetuin A stabilizes m-calpain and facilitates plasma membrane repair, *J Biol Chem*. 282 (49): 35868-35877.
- Meyer K. M. (2016). Interaktion von Astacin-Metalloproteasen mit dem Plasmaprotein Fetuin-A aus *Cyprinus carpio*. Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Michaelis L. und Menten M. M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochemische Zeitschrift* 49, 333–369. In: Johnson K.A und Goody R.S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry* 50 (39): 8264-8269.
- Miyazaki S. und Ito M. (2006). Calcium signals for egg activation in mammals, *J Pharmacol Sci*. 100 (5): 545-52.

- Moller C. C und Wassarman P. M. (1989). Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs, *Dev Biol.* 132 (1): 103-112.
- Mondéjar I., Grullón L. A., García-Vázquez F. A., Romar R. und Coy P. (2012). Fertilization outcome could be regulated by binding of oviductal plasminogen to oocytes and by releasing of plasminogen activators during interplay between gametes, *Fertil Steril.* 97 (2): 453-461.
- Morgunova E., Tuuttila A., Bergmann U., Isupov M., Lindqvist Y., Schneider G. und Tryggvason K. (1999). Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed, *Science.* 284 (5420): 1667-1670.
- Mort J. S. (1998). Kapitel – 209. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1.Auflage, London: Academic Press.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 (1): 263-73.
- Nagase H., Visse R. und Murphy G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovasc Res.* 69 (3): 562-573.
- Nandy S. K., Bhuyan R. und Seal A. (2012). Modelling family 2 cystatins and their interaction with papain, *J Biomol Struct Dyn.* 31 (6): 649-664.
- Nawratil P., Lenzen S., Kellermann J., Haupt H., Schinke T., Müller-Esterl W. und Jahnen-Dechent W. (1996). Limited proteolysis of human alpha2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide, *J Biol Chem.* 271 (49): 31735-31741.
- Neurath H. (1989). Proteolytic processing and physiological regulation, *Trends Biochem Sci.* 14 (7): 268-271.
- Nynca J., Słowińska M., Dietrich M. A., Bilińska B., Kotula-Balak M. und Ciereszko A. (2011). Isolation and identification of fetuin-B-like protein from rainbow trout seminal plasma and its localization in the reproductive system, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 158 (1): 106-116.
- Ochieng J. und Chaudhuri G. (2010). Cystatin superfamily, *J Health Care Poor Underserved.* 21 (1 Suppl): 51-70.
- Ohkubo I., Kurachi K., Takasawa T., Shiokawa H. und Sasaki M. (1984). Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen, *Biochemistry.* 23 (24): 5691-5697.
- Ohler A., Debela M., Wagner S., Magdolen V. und 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 (4): 455–460.
- Okabe M. (2013). The biology of mammalian fertilization, *Development.* 140 (22): 4471-4479.
- Olivier E., Soury E., Ruminy P., Husson A., Parmentier F., Daveau M. und Salier J.P. (2000). Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals, *Biochem J.* 350 (2): 589-597.

- O'Reilly D. R., Miller L. K. und Luckow V. A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York: W. H. Freeman and Company.
- Owen T. (2000). *Grundlagen der modernen UV-Vis-Spektroskopie. Ein Leitfaden*, Copyright Agilent Technologies, Publikationsnummer 5980-1397DE
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (11): 2411–2423.
- Pal D., Dasgupta S., Kundu R., Maitra S., Das G., Mukhopadhyay S., Ray S., Majumdar S. S. und Bhattacharya S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance, *Nat Med.* 18 (8): 1279-1285.
- Pedersen K. O. (1944). Fetuin, a new globulin isolated from serum, *Nature* 154: 575.
- Peng Q., Yang H., Xue S., Shi L., Yu Q. und Kuang Y. (2012). Secretome profile of mouse oocytes after activation using mass spectrum, *J Assist Reprod Genet.* 29 (8): 765-771.
- Petty J. K. (2001). Metal-Chelate Affinity Chromatography, *Curr Protoc Neurosci.* Unit 5.10.
- Pfleiderer G., Zwilng R., Sonneborn H. H., (1967). On the evolution of endopeptidases, 3.A protease of molecular weight 11,000 and a trypsin-like fraction from *Astacus fluviatilis* fabr, *Hoppe Seylers. Z. Physiol Chem.* 348 (10): 1319-1331.
- Piccolo S., Agius E., Lu B., Goodman S., Dale L. und De Robertis E. M. (1997). Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity, *Cell.* 91 (3): 407-416.
- Pires E. S., Hlavin C., Macnamara E., Ishola-Gbenla K., Doerwaldt C., Chamberlain C., Klotz K., Herr A.K., Khole A., Chertihin O., Curnow E., Feldman S. H., Mandal A., Shetty J., Flickinger C. und Herr J. C. (2013). SAS1B protein [ovastacin] shows temporal and spatial restriction to oocytes in several eutherian orders and initiates translation at the primary to secondary follicle transition, *Dev Dyn.* 242 (12): 1405-1426.
- Ploper D., Lee H. X. und De Robertis E. M. (2011). Dorsal-ventral patterning: Crescent is a dorsally secreted Frizzled-related protein that competitively inhibits Tolloid proteases, *Dev Biol.* 352 (2): 317-328.
- Ploplis V. A., Carmeliet P., Vazirzadeh S., Van Vlaenderen I., Moons L., Plow E. F. und Collen D. (1995). Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice, *Circulation.* 92 (9): 2585-2593.
- Prox J., Arnold P. und Becker-Pauly C. (2015). Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease, *Matrix Biol.* 44-46: 7-13.
- Quesada V., Sanchez L. M., Alvarez J. und 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 (25): 26627–26634.
- Quinlan G. J., Martin G. S. und Evans T. W. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology.* 41 (6): 1211-1219.
- Ra H. J. und Parks W. C. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity, *Matrix Biol.* 26 (8): 587-596.

- Rawlings N. D., Waller M., Barrett A. J. und Bateman A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue): D503-509.
- Ray S., Lukyanov P. und Ochieng J. (2003). Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities, *Biochim Biophys Acta.* 1652 (2): 91-102.
- Reyda S., Jacob E., Zwilling R. und Stöcker W. (1999). cDNA cloning, bacterial expression, in vitro renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin, *Biochem J.* 344 (3): 851-857.
- Rohrlich S.T. und Rifkin D. B. (1981). Isolation of the major serine protease inhibitor from the 5-day serum-free conditioned medium of human embryonic lung cells and demonstration that it is fetuin, *J Cell Physiol.* 109 (1): 1-15.
- Saarinen M. A., Troutner K. A., Gladden S. G., Mitchell-Logean C. M. und Murhammer D. W. (1999). Recombinant Protein Synthesis in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 Insect Cell Aggregates, *Biotechnol Bioeng.* 63 (5): 612-617.
- Sachdev M., Mandal A., Mulders S., Digilio L. C., Panneerdoss S., Suryavathi V., Pires E., Klotz K. L., Hermens L., Herrero M. B., Flickinger C.J., van Duin M. und Herr J. C. (2012). Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization, *Dev Biol.* 363 (1): 40-51.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. und Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230 (4732): 1350–1354.
- Salvesen G., Parkes C., Abrahamson M., Grubb A. und Barrett A. J. (1986). Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases, *Biochem J.* 234 (2): 429-434.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. Auflage, Plainview und New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer C., Heiss A., Schwarz A., Westenfeld R., Ketteler M., Floege J., Müller-Esterl W., Schinke T. und Jähnen-Dechent W. (2003). The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, *J Clin Invest.* 112 (3): 357-366.
- Schaller J. und Gerber S. S. (2011). The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects, *Cell Mol Life Sci.* 68 (5): 785-801.
- Schechter I. und Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (2): 157–162.
- Schelter F., Grandl M., Seubert B., Schaten S., Hauser S., Gerg M., Boccaccio C., Comoglio P. und Krüger A. (2011). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10, *Clin Exp Metastasis.* 28 (8): 793-802.
- Schmidt T.G. und Skerra A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins, *Nat Protoc.* 2 (6): 1528-1535.

- Schroeder A. C., Schultz R. M., Kopf G. S., Taylor F. R., Becker R. B. und Eppig J. J. (1990). Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum, *Biol Reprod.* 43 (5): 891-897.
- Scott I. C., Blitz I. L., Pappano W. N., Imamura Y., Clark T. G., Steiglit B. M., Thomas C. L., Maas S. A., Takahara K., Cho K. W. und Greenspan D. S. (1999). Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis, *Dev Biol.* 213 (2): 283-300.
- Seals D. F. und Courtneidge S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* 17 (1): 7-30.
- Sellers A., Cartwright E, Murphy G. und Reynolds J. J. (1977). Evidence that latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes, *Biochem J.* 163 (2): 303-307.
- Shibata Y., Iwamatsu T., Suzuki N., Young G., Naruse K., Nagahama Y. und Yoshikuni M. (2012). An oocyte-specific astacin family protease, alveolin, is released from cortical granules to trigger egg envelope hardening during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*), *Dev Biol.* 372 (2): 239-248.
- Sottrup-Jensen L. (1989). Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation, *J Biol Chem.* 264 (20): 11539-11542.
- Starckx S., Van den Steen P. E., Verbeek R., van Noort J. M. und Opdenakker G. (2003). A novel rationale for inhibition of gelatinase B in multiple sclerosis: MMP-9 destroys alpha B-crystallin and generates a promiscuous T cell epitope, *J. Neuroimmunol.* 141 (1-2): 47-57.
- Sternlicht M. D. und Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 463-516.
- Stöcker W. und Zwilling R. (1995). Astacin, *Methods Enzymol.* 248: 305-325.
- Stöcker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Rüth F. X., McKay D. B. und 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 (5): 823-840.
- Stöcker W., Karmilin K., Hildebrand A., Westphal H., Yiallourous I., Weiskirchen R., Dietzel E., Floehr J. und Jahnen-Dechent W. (2014). Mammalian gamete fusion depends on the inhibition of ovastacin by fetuin-B, *Biol Chem.* 395 (10): 1195-1199.
- Stöcker W., Ng M. und Auld D. S. (1990). Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of Astacus protease, *Biochemistry.* 29 (45): 10418-10425.
- Stöcker W., Sauer B. und Zwilling, R. (1991). Kinetics of nitroanilide cleavage by Astacin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 385-392.
- Stöcker W., Wolz R., Zwilling R., Strydom D. J. und Auld D. S. (1988). Astacus protease, a zinc metalloenzyme. *Biochemistry.* 27, 5026-5032.
- Takeda S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases, *Semin Cell Dev Biol.* 20 (2): 146-152.

- Takeda S., Takeya H. und Iwanaga S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins, *Biochim Biophys Acta*. 1824 (1): 164-176.
- Tang J. und Bond J. S. (1998). Maturation of secreted meprin alpha during biosynthesis: role of the furin site and identification of the COOH-terminal amino acids of the mouse kidney metalloprotease subunit. *Arch Biochem Biophys*. 349 (1): 192-200.
- Tezuka K., Tezuka Y., Maejima A., Sato T., Nemoto K., Kamioka H., Hakeda Y. und Kumegawa M. (1994). Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts, *J Biol Chem*. 269 (2): 1106-1109.
- Thompson P. D., Sakwe A., Koumangoye R., Yarbrough W. G., Ochieng J. und Marshall D. R. (2014). Alpha-2 Heremans Schmid Glycoprotein (AHS2) modulates signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma cell line SQ20B, *Exp Cell Res*. 321 (2): 123-132.
- Tortorella M. D., Malfait A. M., Deccico C. und Arner E. (2001). *Osteoarthritis Cartilage*. 9 (6): 539-552.
- Troeberg L. und Nagase N. (2004). Zymography of metalloproteinases, *Curr Protoc Protein Sci*. Unit 21.15.
- Tsai P. L., Chen C. H., Huang C. J., Chou C. M. und Chang G. D. (2004). Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase, *J Biol Chem*. 279 (12): 11146-11155.
- Tschesche H. und Pieper M. (1998). Kapitel – 390. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. F. (Hrsg) 1. Auflage, London: Academic Press.
- Turk V. und Bode W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases, *FEBS Lett*. 285 (2): 213-219.
- Turnsek T., Kregar I. und Lebez D. (1975). Acid sulphhydryl protease from calf lymph nodes, *Biochim Biophys Acta*. 403 (2): 514-520.
- UniProt Consortium (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 43 D204-D212.
- Valente R.H., Dragulev B., Perales J., Fox J. W. und Domont G. B. (2001). BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action, *Eur J Biochem*. 268(10): 3042-3052.
- Van Wart H. E. und Birkedal-Hansen H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc Natl Acad Sci USA*. 87 (14): 5578-5582.
- Varela F.G., Maturana H. R. und Uribe R. (1974). Autopoiesis: the organization of living systems, its characterization and a model, *Curr Mod Biol*. 5 (4): 187-196.
- Vaughn J. L., Goodwin R. H., Tompkins G. J. und McCawley P. (1977). The Establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), *In Vitro* 13 (4): 213-217.
- Visse R. und Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ Res*. 92 (8): 827-839.

- Wallin H., Abrahamson M. und Ekström U. (2013). Cystatin C properties crucial for uptake and inhibition of intracellular target enzymes, *J Biol Chem.* 288 (23): 17019-17029.
- Wassarman P. M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion, *Cell* 96 (2): 175–183.
- Wassarman P. M. und Litscher E. S. (2013). Biogenesis of the mouse egg's extracellular coat, the zona pellucida, *Curr Top Dev Biol.* 102: 243-266.
- Webb B. und Sali A. (2014). Protein structure modeling with MODELLER, *Methods Mol Biol.* 1137: 1-15.
- Witte S. und Geprägs S. (1974). Die Anwendung der intravitalen Ultraviolett-Mikrospektrophotometrie an der terminalen Strombahn, *Res. exp. Med.* 163: 311-324.
- Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M. und Wang E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities, *Science.* 242 (4885): 1528-1534.
- Wu J. J., Fujikawa K., McMullen B. A. und Chung D. W. (2006). Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (49): 18470-18474.
- Yamakawa Y. und Omori-Satoh T. (1992). Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain, *J Biochem.* 112 (5): 583-589.
- Yamamoto K. und Sinohara H. (1993). Isolation and characterization of mouse countertrypsin, a new trypsin inhibitor belonging to the mammalian fetuin family, *J Biol Chem.* 268 (24): 17750-17753.
- Yiallouros I., Grosse Berkhoff E. und Stöcker W. (2000). The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases, *FEBS Lett.* 484 (3): 224-228.
- Yiallouros I., Kappelhoff R., Schilling O., Wegmann F., Helms M. W., Auge A., Brachtendorf G., Berkhoff E.G., Beermann B., Hinz H. J., König S., Peter-Katalinic J. und Stöcker W. (2002). Activation mechanism of pro-astacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing, *J Mol Biol.* 324 (2): 237-246.
- Yin X., Cuello F., Mayr U., Hao Z., Hornshaw M., Ehler E., Avkiran M. und Mayr M. (2010). Proteomics analysis of the cardiac myofibrillar subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution, *Mol. Cell Proteomics* 9 (3): 497–509.
- Zgoda V. G., Moshkovskii S. A., Ponomarenko E. A., Andreewski T. V., Kopylov A. T., Tikhonova O. V., Melnik S. A., Lisitsa A. V. und Archakov A. I. (2009). Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS, *Proteomics* 9 (16): 4102–4105.
- Zhang X., Rutledge J., Khamsi F. und Armstrong D. T. (1992). Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction, *Mol Reprod Dev.* 32 (1): 28-32.
- Zheng H., Mandal A., Shumilin I. A., Chordia M. D., Panneerdoss S., Herr J. C. und Minor W. (2015). Sperm Lysozyme-Like Protein 1 (SLLP1), an intra-acrosomal oolemmal-binding sperm protein, reveals filamentous organization in protein crystal form, *Andrology.* 3 (4): 756-771.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A2PI - α_2 -plasmininhibitor

AcMNPV - *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*

ADAM - *A Disintegrin And Metalloproteinase*

ADAMTS - *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs*

AK - Antikörper

APMA - 4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat oder *p-Amino-phenyl-mercuri-acetat*

APS - Ammoniumpersulfat

BMP1 - *Bone Morphogenetic Protein 1*

BSA - Rinderserumalbumin oder bovines Serumalbumin

BTP - BMP1/Tolloid Proteinasen

CHC - *cleaved heavy chain*

CUB - *complement subcomponents Clr/Cls, uegf, and bone morphogenic protein 1*

DABCO - 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DEPC - Diethyldicarbonat

DMSO - Dimethylsulfoxid

DOC - Natrium-Desoxycholat

DTT - 1,4-Dithiothreitol

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

EGF - *Epidermal Growth Factor*

FCS - fötales Kälberserum

FRET - Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

HC - *heavy chain*

HRG – Histidin-reiches Glycoprotein

IPTG - Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid

KNG - Kininogen

LC - *light chain*

MAM - *mepirin, A5 protein, tyrosine phosphatase μ*

MMP - Matrix Metalloproteasen

MMPL - Magermilchpulver-Lösung

MP - *microplasmin*

NTA - Nitrilotriessigsäure
OD – optische Dichte
PAI-1 - Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS - Phosphat-Puffer
PCP - Procollagen C-Proteinase
PCPE - Procollagen C- Proteinase Enhancer
PL - Plasmin
PLG - Plasminogen
PP – Probenpuffer
PVDF - Polyvinylidendifluorid
RT – Raumtemperatur
SAS1B - *sperm acrosomal SLLP1 binding*)
SDS-PAGE - Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLLP1 - *spermlysozym-like protein*
TACE - *Tumor necrosis factor α , TNF- α , Converting Enzyme*
TCA - Trichloressigsäure
TEMED (Tetramethyl-ethylen-diamin) Gebrauchslösung
TGF - *Transforming Growth Factor*
TIMP - *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*
TLL - *Tolloid-like Protein*
TNF- α -Tumornekrosefaktor-Alpha
tPA - gewebespezifischer Plasminogen-Aktivator oder *tissue plasminogen activator*
TRAF - *tumor necrosis factor-receptor associated factor*
uPA - Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
ZP - *Zona pellucida* Protein

Ein- und Drei-Buchstaben Code der Aminosäuren

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

DNA- und Proteinsequenzen, Plasmidkarten

10	20	30	40	50	60
APSASRCSGV	CSTSVPEGFT	PEGSPVFQDK	DIPAINQGLI	SEETPESSFL	VEGDIIRPSP
70	80	90	100	110	120
FRLLSVTNNK	WPKGVGGFVE	IPFLLSRKYD	ELSRRVIMDA	FAEFERFTCI	RFVAYHGQRD
130	140	150	160	170	180
FVSILPMAGC	FSGVGRSGGM	QVVSLAPTCL	RKGRGIVLHE	LMHVLGFWHE	HSRADRDRI
190	200	210	220	230	240
QVNWNEILPG	FEINFIKRSR	TNMLVPYDYS	SVMHYGRFAF	SWRGQPTIIP	LWTSSVHIGQ
250	260	270	280	290	300
RWNLSTSDIT	RVCRLYNCSR	SVPDSHGRGF	EAQSDGSSLT	PASISRLQRL	LEALSEESGS
310	320	330	340	350	360
SAPSGSRTGG	QSIAGLGNSQ	QGWHEPPQST	FSVGALARPP	QMLADASKSG	PGAGADSLSL
370	380	390	400	410	420
EQFQLAQAPT	VPLALFPEAR	DKPAPIQDAF	ERLAPLPGGC	APGSHIREVP	RDRSWSHPQF
EK					

Abbildung A1: Aminosäuresequenz von gereinigten Ovastacin-FL-Strep Propeptid, katalytische Domäne, C-Terminale-Domäne, Sterp-tag. Molekulargewicht berechnet mit *ProtParam* (www.expasy.org/protparam/) 46,2 kDa. Das Signalpeptid wird nach dem Ausschleusen aus der Zelle abgebaut.

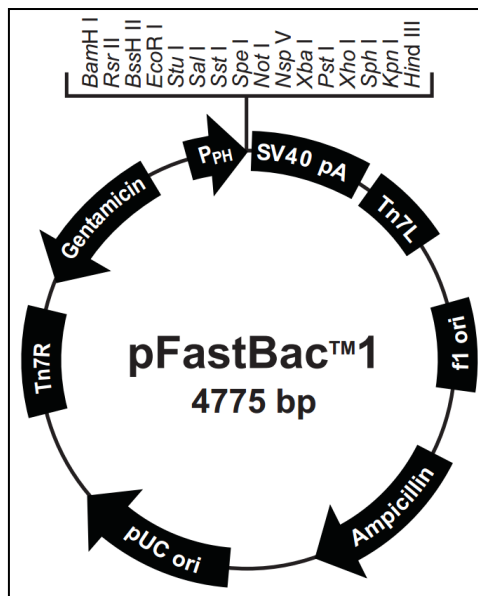


Abbildung A2: Vektorkarte von pFastBac™1 der Firma Life Technologies

Der Vektor enthält folgende Komponente: **f1 ori** - Replikationsstartpunkt 2-457 bp, **Ampicillin**resistenzgen 5889-1449 bp, **Tn7R** - rechte Transposonerkennungsregion 2511-2735 bp, **Gentamicin**resistenzgen 2802-3335 bp, **PPH** - Polyhedrin-Promoter 3904-4032 bp, multiple Klonierungsstelle mit aufgelisteten Restriktionsschnittstellen 4037-4142 bp und **Tn7L** - linke Transposonerkennungsregion 4429-4594 bp. Insgesamt besteht der pFastBac1-Vektor aus 4775 bp.

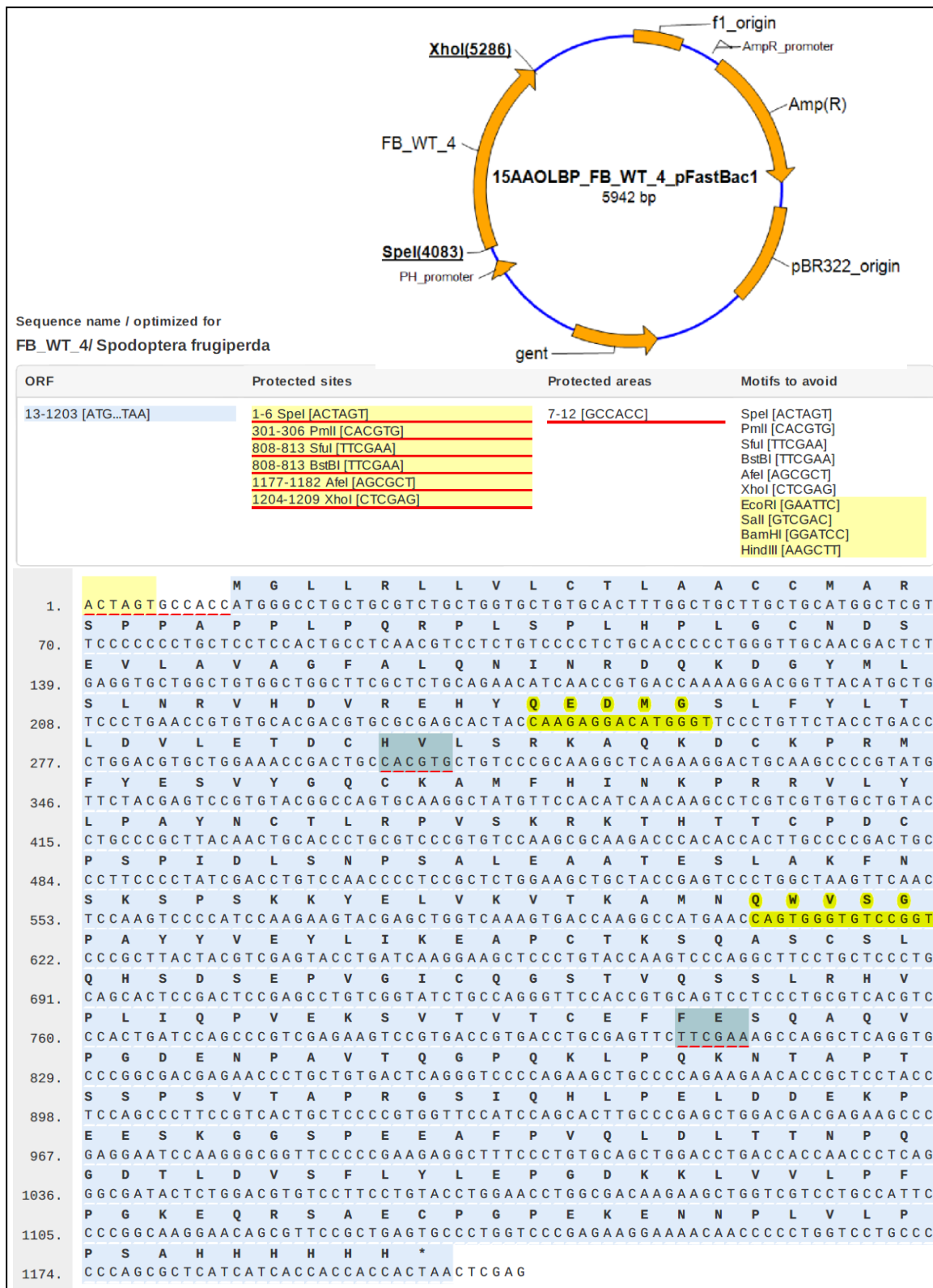


Abbildung A3: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_WT_4

Wunschgen FB_WT_4 wurde auf Auftrag von der Firma *Life Technologies* in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pFastBac1 einkloniert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen sind SpeI und XhoI. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm GeneOptimizer auf der Plattform GeneArt™ Gene Synthesis der *Life Technologies* für die Expression in *Spodoptera frugiperda* optimiert. Die Nukleotide 7-12 bilden die sogenannte Kozak-Sequenz. Gelb hinterlegte Bereiche in der Sequenz markieren die ersten Haarnadelstrukturen der jeweiligen Cystatin-ähnlichen Domäne. C-terminal ist dem Protein ein 6 x His-tag angefügt.

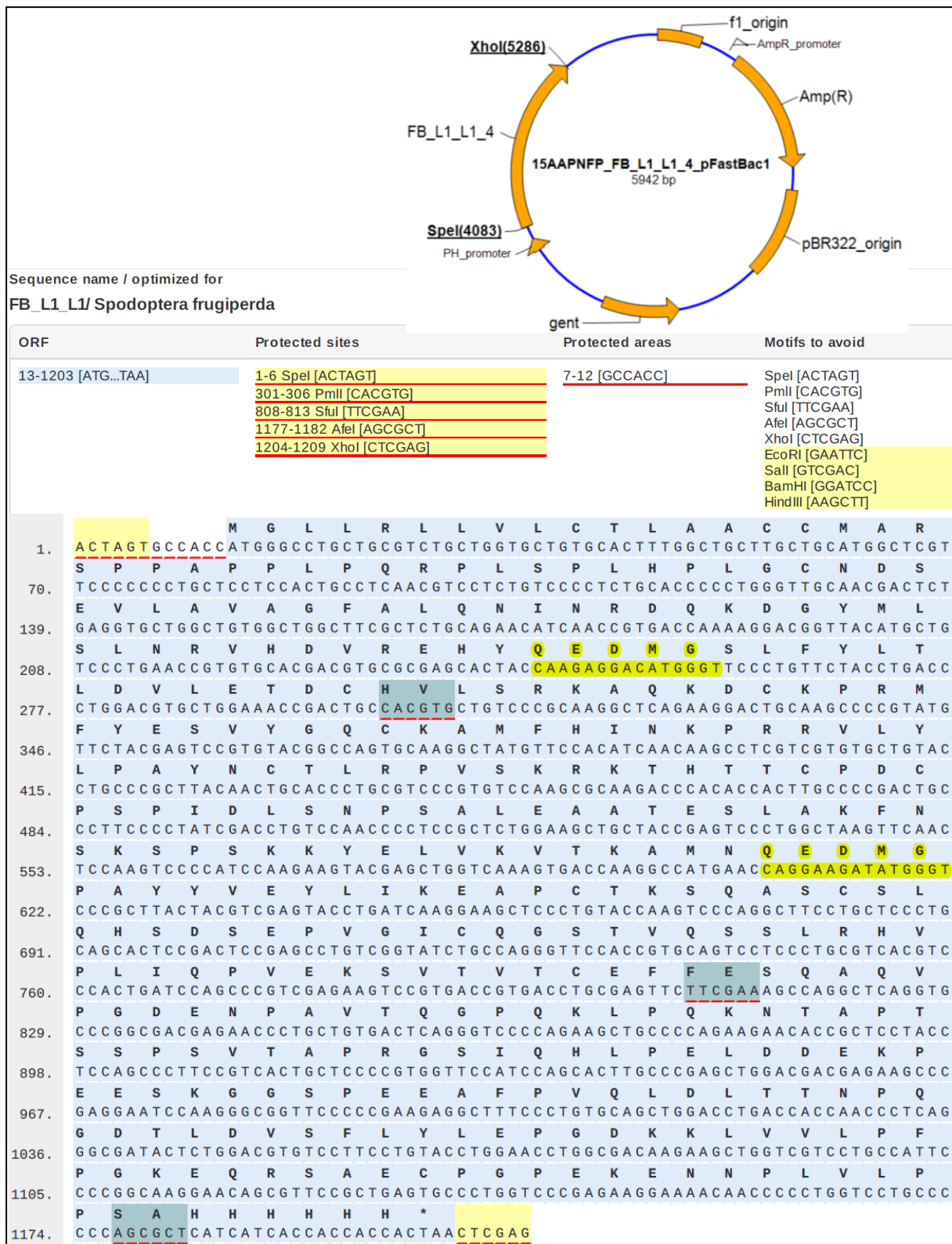


Abbildung A4: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_L1L1_4

Wunschgen FB_L1L1_4 wurde auf Auftrag von der Firma *Life Technologies* in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pFastBac1 einkloniert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen sind SpeI und XhoI. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm GeneOptimizer auf der Plattform GeneArt™ Gene Synthesis der *Life Technologies* für die Expression in *Spodoptera frugiperda* optimiert. Die Nukleotide 7-12 bilden die sogenannte Kozak-Sequenz. Gelb hinterlegte Bereiche in der Sequenz markieren die ersten Haarnadelstrukturen der jeweiligen Cystatin-ähnlichen Domäne. C-terminal ist dem Protein ein 6 x His-tag angefügt.

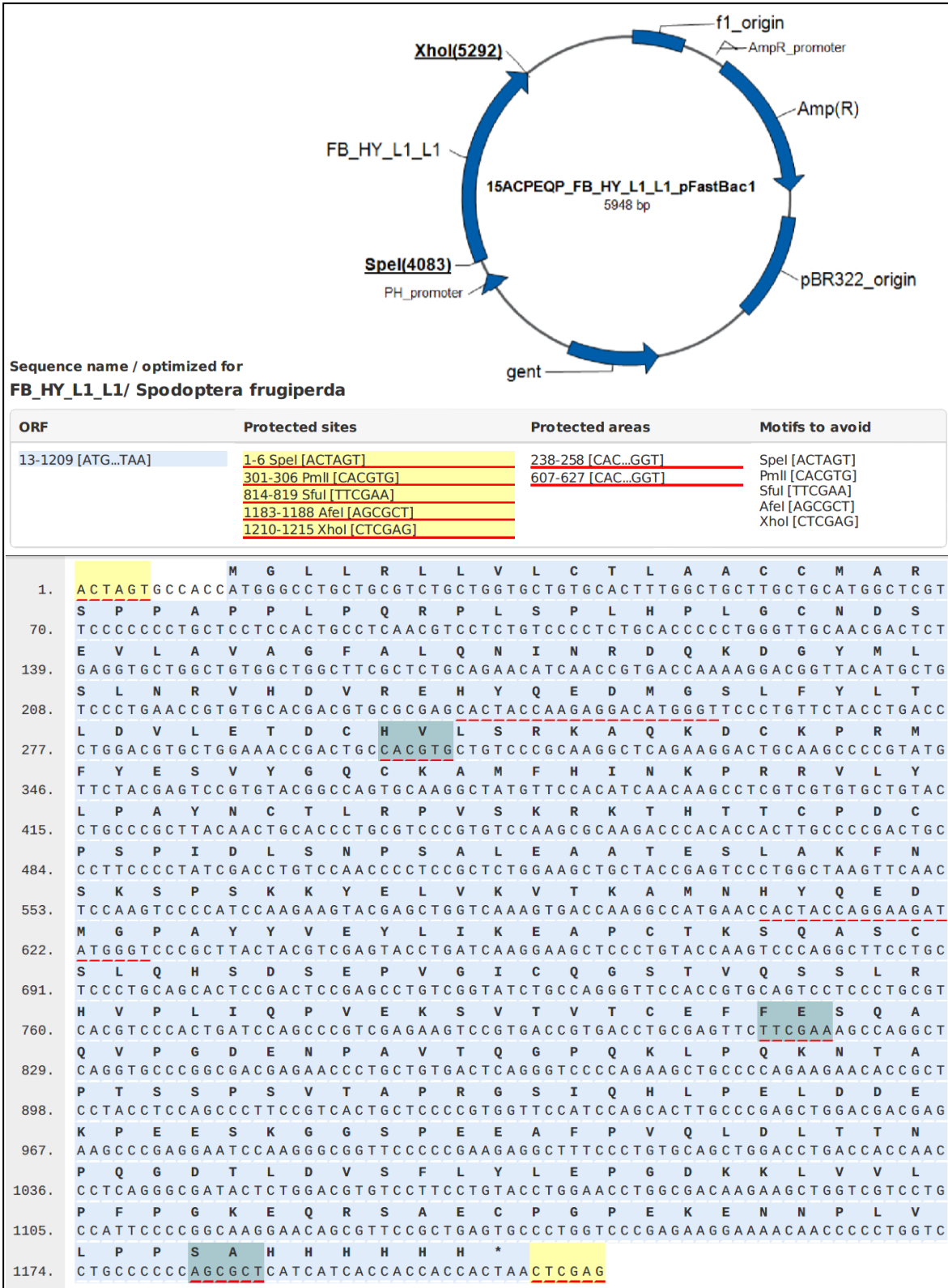


Abbildung A5: Plasmidkarte und Nucleotid- bzw. Aminosäure -Sequenz von FB_HY_L1L1
 Wunschen FB_HY_L1L1 wurde auf Auftrag von der Firma *Life Technologies* in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pFastBac1 einkloniert. Die flankierenden Restriktionsschnittstellen sind SpeI und XhoI. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm GeneOptimizer auf der Plattform GeneArt™ Gene Synthesis der *Life Technologies* für die Expression in *Spodoptera frugiperda* optimiert. Die Nukleotide 7-12 bilden die sogenannte Kozak-Sequenz. Die Nukleotide 238-258 und 607-627 bilden Bereiche der ersten Haarnadelstrukturen der jeweiligen Cystatin-ähnlichen Domäne. C-terminal ist dem Protein ein 6 x His-tag angefügt.

Zusätzliche Daten

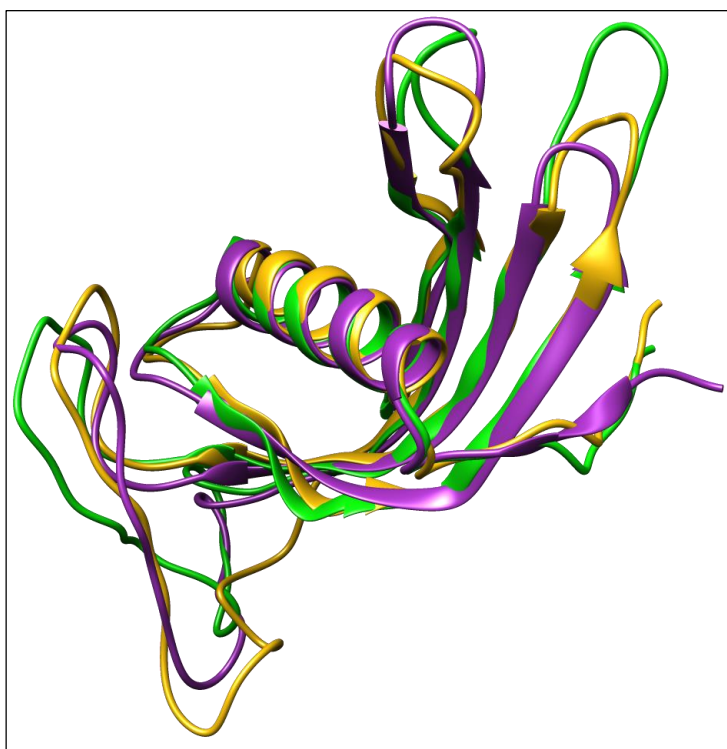


Abbildung A7: zweite Cystatin-ähnliche Domäne von murinem Fetuin B, FB_L1L1_4 und FB_HY_L1L1
 Überlagerte Darstellung vom Modell der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von murinem Fetuin B (violett) und der zweiten Cystatin-ähnlichen Domäne von FB_L1L1_4 (gelb) bzw. FB_HY_L1L1 (grün). Die Modelle wurden auf Vorlage den menschlichen Cystatin C (3GAX) mit Hilfe von Programm Modeller 9.16 erstellt und über den Webserver PDBsum überprüft. Die Visualisierung erfolgte mit Chimera 1.8.1.

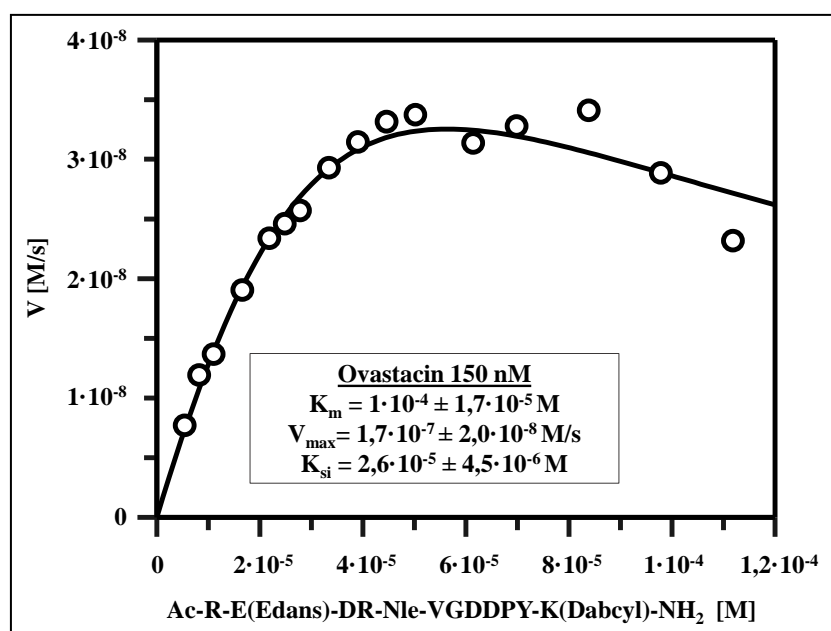


Abbildung A8: Bestimmung von K_m für Ovastacin unter Berücksichtigung der Substrathemmung
 Es wurde die enzymatische Aktivität von 150 nM Ovastacin mit unterschiedlichen Mengen des fluorogenen Substrats Ac-R-E(Edans)-DR-Nle-VGDDPY-K(DabcyI)-NH₂ ermittelt. Erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung von K_m -Wert nach BAICIET AL. (2013, Formel Nr. 2.17) mit Hilfe von Programm GraFit 4 verwendet. Zur An Die Reaktionen fanden bei 37°C, mit dem Zusatz von 1 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂ und 0,01 % Brij-35 statt.

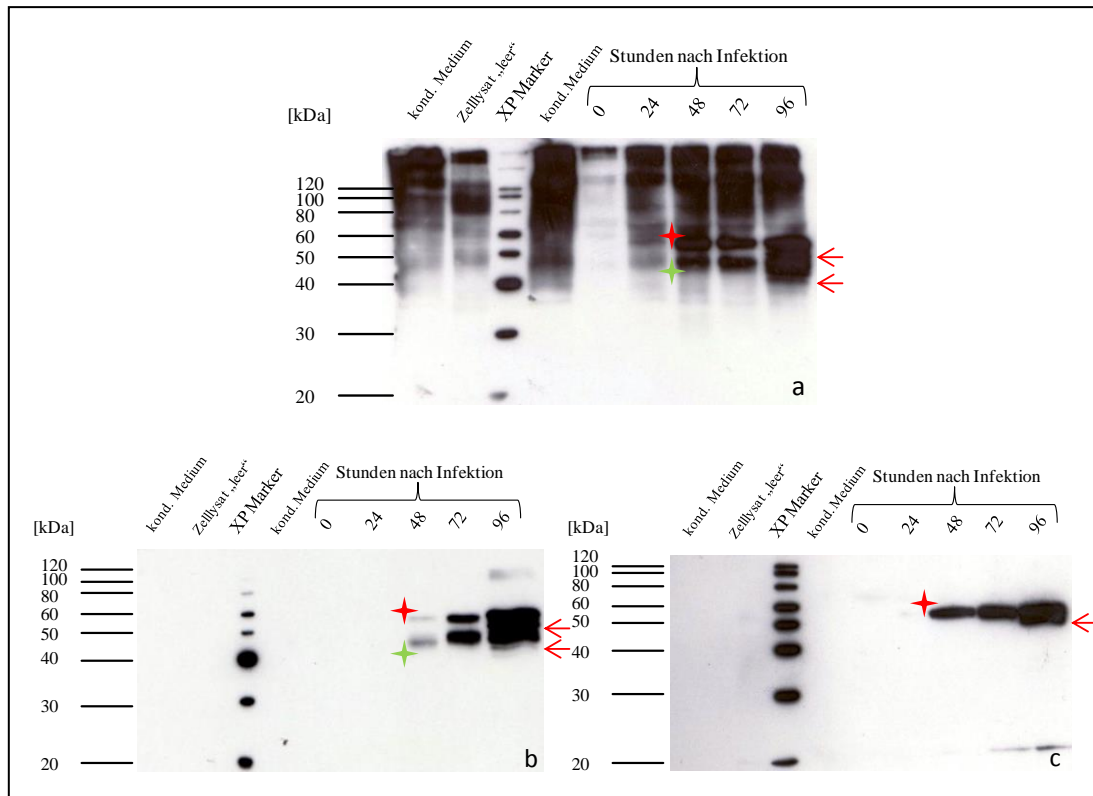


Abbildung A9: Expression von Ovastacin-FL-Strep in High Five-Zellen

(Entsprechende Experimente und die Abbildung wurden während der Diplomarbeit gemacht, KARMILIN, 2012) Western-Blot mit Immunodetektion. Nach Auftrennen der Proteine in einem 12% SDS-Acrylamidgel wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Detektion wurden in **a.** der *Rabbit-anti-full length-Pro-Ovastacin* Antikörper, in **b.** der *Rabbit-anti-Ovastacin-Propeptid* Antikörper und in **c.** *Mouse-anti-Strep-tag* Antikörper verwendet. Unter konditioniertes Medium (kond. Medium) ist das Medium aus einer Kulturflasche mit nichtinfizierten *High Five*-Zellen nach drei Tagen Kultivierung zu verstehen. In der zweiten Bahn ist das Zellysyt von nichtinfizierten Zellen aufgetragen (Zellysyt "leer"). In den letzten fünf Bahnen sind die Proben des Zellmediums nach der Infektion mit Ovastacin-FL-Strep aufgetragen. Mit Zahlen ist der Zeitpunkt der Probenentnahme in Stunden gezeigt. Mit den roten und grünen Sternen sind die 58 bzw. 48 kDa-Bande des Pro-Ovastacins gekennzeichnet. Mit den roten Pfeilen sind die Banden gekennzeichnet, die erst ab 96 h nach der Infektion auftreten.

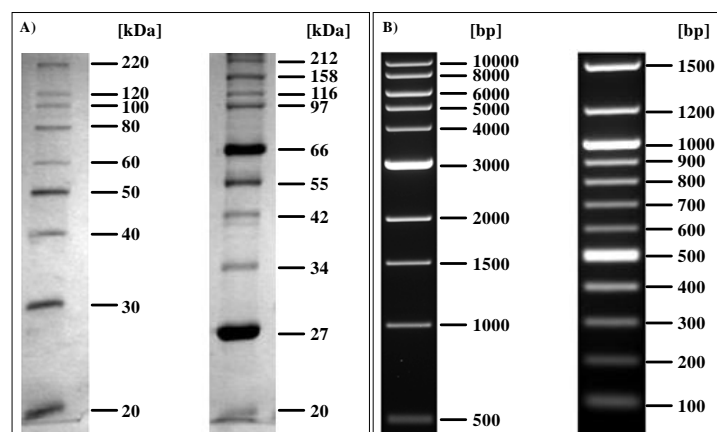


Abbildung A10: In der Arbeit verwendete Protein- und DNA-Marker

A) Links: XP - MagicMark™ XP Western Protein Standard von *Invitrogen* (LC5602). Visualisiert via Chemoluminiszenz. Rechts: Protein Marker, Broad Range von *NEB* (#P7702). Visualisiert mit Coomassie Brilliant Blau G 250. Beide Marker wurden in einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

B) Links: 1 kb DNA Ladder von *NEB* (#N3232).. Visualisiert mit Ethidiumbromid. Aufgetrennt in 0,8 % Agarose-Gel. Rechts: 100 bp DNA Ladder von *NEB* (#N3231). Visualisiert mit Ethidiumbromid. Aufgetrennt in 1,3 % Agarose-Gel. Beide Abbildungen stammen aus den Datenblättern des Herstellers.

Tabelle A1: Für die Inhibitionsassays verwendete Puffer

Proteinase	Puffer
ADAM 10	25 mM Tris-HCl, 2,5 μ M ZnCl ₂ , 0,005 % Brij-35, pH 9
Astacin	50 mM Hepes, pH 8
Cathepsin B	50 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 6
Cathepsin D	50 mM NaOAc, pH 4
Cathepsin K	50 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und 5 mM DTT, pH 5,5
Cathepsin S	100 mM Mes, 1 mM EDTA, 50 mM L-Cystein, 10 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 30 % Glycerin, pH 4,5
Chymotrypsin	38 mM Tris-HCl, 53 mM CaCl ₂ , pH 7,8
Legumain	50 mM Mes, 250 mM NaCl, pH 5
Meprin α , Meprin β	50 mM Hepes, pH 7,5
MMP-13	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ 0,05 % Brij-35, pH 7,5
MMP-2, MMP-8, MMP-9	50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 μ M ZnCl ₂ 0,05 % Brij-35, pH 7,4.
Nephrosin	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8
Ovastacin-FL-Strep	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
Papain	50 mM Hepes, pH 7,5
TLL2, BMP1	50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ 0,04 % Octyl- β -D-Glucopyranosid, pH 7,4
Trypsin, Plasmin, tPA	50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5

Hersteller und Produzenten

Tabelle A2: Liste der Hersteller mit Anschriften

Hersteller	Anschrift
Abcam Ltd	332 Cambridge Science Park UK-CB4 0FW Cambridge
Abimed GmbH	Raiffeisenstraße 3 D-40764 Langenfeld
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Föhrenstr. 12 D-78532 Tuttlingen
AppliChem GmbH	Ottoweg 4 D-64291 Darmstadt
Bachem AG	Hauptstrasse 144 CH-4416 Bubendorf
Binder GmbH	Im Mittleren Ösch 5 D-78532 Tuttlingen
Biomers.net GmbH	Söflinger Straße 100 D-89077 Ulm
Biometra GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 30 D-37079 Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH	Heidemannstraße 164 D-80939 München
Biosyntan GmbH	Robert-Rössle-Straße 10 D-13125 Berlin
Biozym Scientific GmbH	Steinbrinksweg 27 D-31840 Hessisch Oldendorf
Carl Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstraße 1-5 D-76231 Karlsruhe
ChromaTec GmbH	Walther-Rathenau-Straße 49a D-17489 Greifswald
Dianova GmbH	Warburgstr. 45 D-20354 Hamburg
DuPont de Nemours GmbH	Hugenottenallee 175 D-63263 Neu-Isenburg
Enzo Life Sciences GmbH	Basler Straße 57a D-79540 Lörrach
Erithacus Software Ltd	Wilmington House, High Street, East Grinstead, West Sussex RH19 3AU, UK
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg
Friedrich-Löffler Institut	Suedufer 10 D-17493 Greifswald
GE Healthcare GmbH	Beethovenstr. 239 D-42655 Solingen
Gilson, Inc.	3000 Parmenter Street US-53562-0027 Middleton
Harnischmacher bsb11 - biotech service blu	Erzbergstraße 49 D-34117 Kassel
Hematologic Technologies, Inc	57 River Road, Unit 1021 Essex Junction US-05452 Vermont

Heto-Holten A/S	Gydevang 17 - 19 DN-3450 Allerød
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Hauptstraße 7-15 D-74246 Eberstadt
IBA GmbH	Rudolf-Wissel-Str. 28 D-37079 Göttingen
Infors AG	Rittergasse 27 CH-4103 Bottmingen
Invitrogen GmbH	Emmy-Noether Straße 10 D-76131 Karlsruhe
Julabo GmbH	Gerhard-Juchheim-Straße 1 D-77960 Seelbach
Kaiser Fototechnik GmbH & Co.KG	Im Krötenteich 2 D-74722 Buchen
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG	Beuckestr. 22 D-14163 Berlin
Leica Camera AG	Am Leitz-Park 5 D-35578 Wetzlar
Life Technologies GmbH	Frankfurter Str. 129B D-64293 Darmstadt
Macherey–Nagel GmbH & Co. KG	Valenciener Str. 11 D-25335 Düren
Merck KGaA	Frankfurter Straße 250 D-64293 Darmstadt
Merck Millipore	Am Kronberger Hang 5 D-65824 Schwalbach
MMM Medcenter Einrichtungen GmbH	Semmelweisstraße 6 D-82152 Planegg/München
New England Biolabs GmbH	Brüninstr. 50 D-65926 Frankfurt am Main
Novartis Institute for Biomedical Research	Maulbeerstrasse 66 CH-4058 Basel
Peqlab Biotechnologie GmbH (VWR International GmbH)	Carl–Thiersch–Str. 2B D-91052 Erlangen
PHASE Gesell. für Phorese, Analytik und Separation mbH	Blücherstraße 2 D-23564 Lübeck
Pineda Antikörper-Service	Leunaer Str. 7 D-12681 Berlin
Precisa Gravimetrics AG	Moosmattstrasse 32 CH-8953 Dietikon
Prof. Catherine Moali	Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, 7 Passage du Vercors, Fr-69367 Lyon
Prof. Ghislain Opendakker, M.D., Ph.D.	KU Leuven Immunobiology Minderbroedersstraat 10 B-3000 Leuven
Prof. Dr. Willi Jahnen-Dechent	Universitätsklinikum Aachen Pauwelsstraße 30 D-52074 Aachen
Promega GmbH	Schildkrötstr. 15 D-68199 Mannheim

Qiagen GmbH	Qiagen Str. 1 D-40724 Hilden
RnD Systems GmbH	Borsigstr. 7a D-65205 Wiesbaden
Roche Deutschland Holding GmbH	Emil-Barell-Str. 1 D-79639 Grenzach-Wyhlen
Sarstedt AG & Co.	Sarstedtstraße 1 D-51588 Nümbrecht
Sartorius AG	Weender Landstraße 94-108 D-37075 Göttingen
Schleicher & Schuell BioScience GmbH	Hahnstraße 3 D-37586 Dassel
Serva Electrophoresis GmbH	Carl-Benz-Str. 7 D-69115 Heidelberg
Scientific Industries, Inc	80 Orville Drive, Suite 102 US- 11716 Bohemia, New York
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstr. 2 D-89555 Steinheim
Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG	Saarbrückener Straße 248 D-38116 Braunschweig
Varian Medical Systems Deutschland GmbH	Alsfelder Str. 6 D-64289 Darmstadt
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Wielandstraße 2 D-88436 Eberhardzell
VWR International GmbH	Hilpertstraße 20a D-64295 Darmstadt

Curriculum Vitae

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht oder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 19.09.2016

.....

(Konstantin Karmilin)