

Aus dem Biochemischen Institut  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Regulation der proteolytischen Aktivität  
der Metalloproteasen  
Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$   
im Kontext pathologischer Konditionen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Felix Jäckle**  
aus Nürnberg

Kiel 2016

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Philipp Rosenstiel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.09.2018
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	31.05.2018

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1    Verwendetes Material.....	21
2.1.1    Laborgeräte .....	21
2.1.2    Labor- und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3    Chemikalien, Reagenzien und Proteine .....	25
2.1.4    Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	28
2.1.5    Primäre Antikörper.....	32
2.1.6    Sekundäre Antikörper.....	33
2.1.7    Kits.....	33
2.1.8    Plasmide.....	34
2.1.9    Marker .....	34
2.1.10    Zelllinien und Bakterienstämme .....	35
2.1.11    Computersoftware .....	36
2.2    Verwendete Methoden .....	37
2.2.1    Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.1.1    Zellkultivierung .....	37
2.2.1.2    Passagieren von Zellen.....	38
2.2.1.3    Bestimmung der Zellzahl.....	38
2.2.1.4    Transiente Transfektion von Zellen.....	39
2.2.1.5    Applikation rekombinanter Proteine in den Zellüberstand.....	39
2.2.1.6    Zellernte und Lyse.....	39
2.2.1.7    Trypanblaufärbung.....	40
2.2.1.8    Immunfluoreszenz-Analyse .....	40
2.2.1.9    Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen .....	41

---

2.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	42
2.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
2.2.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
2.2.2.3	Coomassie-Färbung.....	45
2.2.2.4	Western Blot ( <i>semidry</i> ).....	45
2.2.2.5	Indirekte Immundetektion von Proteinen.....	46
2.2.2.6	Bestimmung der proteolytischen Aktivität rekombinanter Meprine .....	48
2.2.2.7	Bestimmung der proteolytischen Aktivität von membrangebundenem Meprin $\beta$ .....	49
2.2.2.8	Bestimmung proteolytischer Spaltstellen durch Massenspektrometrie .....	50
2.2.2.9	Expression und Reinigung von rekombinantem Promeprin $\alpha$ und Promeprin $\beta$ .....	51
2.2.2.10	Generierung von konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen und rekombinanter Matriptase 2 .....	51
2.2.2.11	Maturierung von rekombinantem Promeprin $\beta$ mit konditioniertem Medium und rekombinanter Matriptase 2.....	52
2.2.2.12	Maturierung von rekombinantem humanem Prokollagen I mit Meprin $\alpha$ ....	52
2.2.2.13	Proteolytische Prozessierung von Kollagen VI mit Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	52
2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	53
2.2.3.1	Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> XL1-Blue .....	53
2.2.3.2	Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmiden durch Midi-Präparation.....	53
2.2.3.3	Bestimmung der DNA Konzentration .....	54
2.2.4	Statistische Analyseverfahren .....	55

---

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
3.1 Regulation der proteolytischen Aktivität des membrangebundenen Meprin $\beta$ .....	56
3.1.1 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch lösliches Trypsin aktiviert.....	56
3.1.2 Rekombinantes Promeprin $\beta$ wird durch Matriptase 2 (TMPRSS 6) aktiviert.....	59
3.1.3 Rekombinantes Promeprin $\alpha$ wird nicht durch rekombinante Matriptase 2 aktiviert.....	62
3.1.4 Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Spaltstellen in Promeprin $\beta$ .....	63
3.1.5 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch rekombinante lösliche Matriptase 2 aktiviert.....	68
3.1.6 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird durch membrangebundene Matriptase 2 aktiviert .....	71
3.1.7 Kolokalisation von Meprin $\beta$ und Matriptase 2 auf der COS-7 Zelloberfläche .....	75
3.1.8 TMPRSS 4 ist kein Aktivator des membrangebundenen Promeprin $\beta$ .....	79
3.2 Kollagen als Substrat von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	83
3.2.1 Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ maturieren von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I .....	83
3.2.2 Regulation der Kollagen I Maturierung durch spezifische Inhibition von endogenem Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	86
3.2.3 Aktivierung von membranständigem Promeprin $\beta$ durch Matriptase 2 resultiert in gesteigerter Prokollagen I Maturierung .....	99
3.2.4 Humanes Kollagen VI ist kein Substrat von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ ..	101

---

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>119</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>128</b>
7.1.1 Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Spaltstellen in Promeprin $\beta$ .....	128
7.1.2 Syntheseberichte eingesetzter Peptide .....	128
7.1.3 Publizierter Fachartikel .....	139
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>152</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>154</b>

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Laborgeräte .....	21
Tabelle 2:	Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Proteine .....	25
Tabelle 4:	Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien .....	28
Tabelle 5:	Verwendete primäre Antikörper .....	32
Tabelle 6:	Verwendete sekundäre Antikörper .....	33
Tabelle 7:	Verwendete Kits .....	33
Tabelle 8:	Verwendete Plasmide.....	34
Tabelle 9:	Verwendete Marker .....	34
Tabelle 10:	Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme .....	35
Tabelle 11:	Verwendete Computersoftware .....	36
Tabelle 12:	Rezept für zwei Polyacrylamidgele (0,75 mm) .....	44
Tabelle 13:	Primärstrukturen der fluorogenen Peptide.....	48
Tabelle 14:	Primärstrukturen der verwendeten Peptide P1-P4 aus D-Aminosäuren.....	92
Tabelle 15:	Mit <i>TAILS</i> identifizierte Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ Spaltstellen in der $\alpha$ 1-Proteinkette von Kollagen VI .....	101



---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Domänenmodell von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	15
Abbildung 2:	Die Promeprin $\beta$ Struktur zeigt eine membran-nahe Lokalisation der Propeptid Spaltstelle .....	19
Abbildung 3:	Prinzip des Bicinchoninsäure-Assays.....	42
Abbildung 4:	Strukturformel von Natriumdodecylsulfat.....	43
Abbildung 5:	Aufbau der Western Blot Kammer.....	46
Abbildung 6:	Prinzip der indirekten Immundetektion von Proteinen .....	47
Abbildung 7:	Bestimmung der Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ Aktivität mittels fluorogener Peptide .....	49
Abbildung 8:	Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch pankreatisches Trypsin aktiviert .....	58
Abbildung 9:	Lösliche Matriptase 2 maturiert rekombinantes lösliches Promeprin $\beta$ .....	61
Abbildung 10:	Rekombinante lösliche Matriptase 2 aktiviert rekombinantes lösliches Promeprin $\beta$ .....	61
Abbildung 11:	Rekombinante Matriptase 2 ist kein Aktivator von rekombinantem Promeprin $\alpha$ .....	62
Abbildung 12:	Für massenspektrometrische Analysen verwendete Polyacrylamidgele zur Identifizierung der Matriptase 2 Spaltstelle in Promeprin $\beta$ .....	65
Abbildung 13:	Matriptase 2 spaltet Promeprin $\beta$ proteolytisch an Position Arg 61/Asn 62.....	67
Abbildung 14:	Die membranständige, nicht aber die lösliche Matriptase 2 ist Aktivator des membrangebundenen Promeprin $\beta$ .....	70
Abbildung 15:	Western Blot zur Maturierung von Promeprin $\beta$ durch membrangebundene Matriptase 2 .....	73
Abbildung 16:	Ko-Transfektion von Meprin $\beta$ und Matriptase 2 resultiert in einer erhöhten Meprin $\beta$ Zelloberflächenaktivität .....	74

---

Abbildung 17: Meprin $\beta$ und Matriptase 2 sind auf der Oberfläche von COS-7 Zellen kolokalisiert .....	77
Abbildung 18: Nachweis von biotinyliertem Meprin $\beta$ und Matriptase 2 in der Streptavidin gebundenen Fraktion .....	78
Abbildung 19: TMPRSS 4 ist kein Aktivator des membrangebundenen Promeprin $\beta$ .....	80
Abbildung 20: Meprin $\beta$ / TMPRSS 4 Ko-Transfektion resultiert nicht in einer erhöhten Meprin $\beta$ Zelloberflächenaktivität .....	82
Abbildung 21: Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ maturieren von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I .....	85
Abbildung 22: Nachweis von endogenem Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ im Lysat humaner dermaler Fibroblasten .....	86
Abbildung 23: Nachweis von endogenem Meprin $\alpha$ mit monoklonalen Antikörper ....	87
Abbildung 24: Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ im Lysat humaner dermaler Fibroblasten .....	89
Abbildung 25: Strukturformel des Hydroxamat-Inhibitors Aktinonin.....	90
Abbildung 26: Aufbau des Phosphinat-Inhibitors .....	91
Abbildung 27: Inkubation kultivierter humaner dermaler Fibroblasten mit hohen Phosphinat-Inhibitor Konzentrationen resultiert im Verlust der Zelladhärenz .....	92
Abbildung 28: Analyse der inhibitorischen Potenz der Peptide P1-P4 auf die proteolytische Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ Aktivität .....	94
Abbildung 29: Regulation der Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ Aktivität reduziert die Prokollagen I Maturierung an der Zelloberfläche .....	95
Abbildung 30: Regulation der Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ Aktivität reduziert nicht die Prokollagen I Maturierung im Überstand .....	96
Abbildung 31: Prolongierte Inkubation von humanen dermalen Fibroblasten mit Inhibitoren .....	97
Abbildung 32: Analyse der Prokollagen I Maturierung im Überstand TGF- $\beta$ 1 stimulierter Fibroblasten.....	98
Abbildung 33: Prokollagen I Maturierung im Überstand Matriptase 2 transfizierter Fibroblasten .....	100

---

Abbildung 34: Proteolytische Prozessierung von humanen Kollagen VI mit rekombinantem Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	103
Abbildung 35: Einfluss von Kollagen VI auf die proteolytische Aktivität von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ .....	105
Abbildung 36: Proteolytische Prozessierung von humanen Kollagen VI mit pankreatischen Trypsin .....	106
Abbildung 37: Validierung der Spaltstelle von Matriptase 2 in Promepin $\beta$ durch LC-MSMS Spektrometrie .....	128

# 1. Einleitung

Proteasen sind Enzyme, die hydrolytisch Peptidbindungen in Proteinen spalten. Dieser Prozess wird als Proteolyse bezeichnet. Die Begriffe Peptidasen, Proteinasen oder proteolytische Enzyme werden synonym zu Proteasen verwendet. Das menschliche Genom kodiert für 588 Proteasen, die anhand der funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum und des verwendeten katalytischen Mechanismus in fünf Hauptklassen eingeteilt werden (Puente et al. 2003, Quesada et al. 2009). Metallo- und Serinproteasen sind die häufigsten Entitäten, gefolgt von Cysteinproteasen. Kleinere Klassen umfassen Aspartat- und Threoninproteasen. Die übergeordneten Hauptklassen können anhand der Aminosäuresequenzen im aktiven Zentrum in Familien und auf Grundlage der räumlichen Struktur in Klans untergliedert werden (Rawlings und Barrett 1993). Des Weiteren werden Exo- und Endoproteasen differenziert. Exoproteasen spalten Aminosäuren vom C- oder N-Terminus des Proteins (Beck 1973). Endoproteasen trennen die Peptidbindung innerhalb eines Proteins.

Proteolyse kann die Funktion von Proteinen verändern. Es wird die unspezifische Proteinspaltung, die unter anderem im Proteinkatabolismus relevant ist, von der hochspezifischen und selektiven Trennung von Peptidbindungen differenziert. Letzteres wird als proteolytische Prozessierung oder limitierte Proteolyse bezeichnet. Diese ist für diverse molekulare Prozesse essenziell, beispielsweise bei der Abspaltung von Zellrezeptoren, der Aktivierung oder Inaktivierung von Zytokinen und Hormonen oder der Konvertierung von Vorläufermolekülen der extrazellulären Matrix (Chalaris et al. 2007, Herzog et al. 2009, Broder et al. 2013). Proteasen steuern somit übergeordnete biologische Vorgänge wie Zellteilung, Differenzierung, Zell-Matrix-Interaktion, Signalübertragung, Immunität und Wundheilung.

Proteasen können zudem mittels limitierter Proteolyse die proteolytische Aktivität weiterer Peptidasen modulieren. Dies resultiert in der Generierung zusammenhängender proteolytischer Netzwerke. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt von einer Zelle, einem Gewebe oder Organismus exprimierten Proteasen repräsentieren das Degradom. Es wird allerdings auch die Gesamtheit der Substrate und regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise Inhibitoren, einer Protease als ihr spezifisches Degradom bezeichnet (Lopez-Otin und Overall 2002).

Das komplette menschliche Degradom unterscheidet sich in verschiedenen Aspekten von dem eingesetzter Modellorganismen. Beispielsweise ist das Murine mit 672 Proteasen komplexer als das Menschliche. Außerdem sind 21 Proteasen identifiziert, die spezifisch für den menschlichen Organismus sind (Lopez-Otin und Overall 2002, Puente et al. 2003, Quesada et al. 2009). Als Beispiel für die physiologische Bedeutung humaner proteolytischer Netzwerke kann das plasmatische Blutgerinnungssystem aufgeführt werden. Die Erforschung spezifischer Proteasefunktionen in Netzwerken, die Gesamtfunktion von Netzen sowie in diese integrierte Kontroll- und Regulationsmechanismen sind aktueller Forschungsgegenstand.

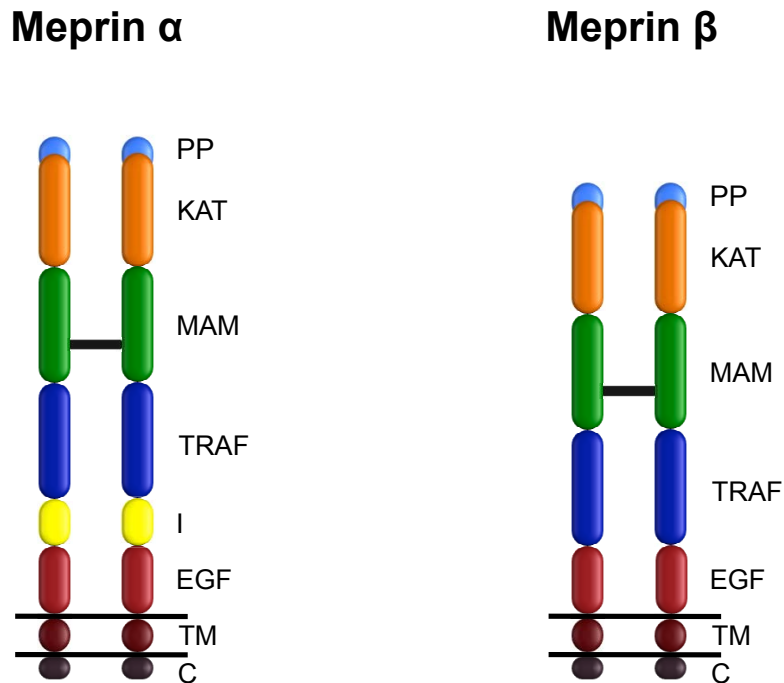
Es ist bei der dargestellten biologischen Relevanz von Proteasen nicht verwunderlich, dass deregulierte proteolytische Aktivität in humanen Pathologien resultieren kann. Beispielsweise sind Proteasen an systemischer Entzündung, Metastasierung entarteter Zellen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen involviert. Aus diesem Grund sind Proteasen vielversprechende therapeutische Zielmoleküle. Die übergeordnete Vision der Degradom-Forschung ist mittels innovativen Erkenntnissen über proteolytische Interaktionen, Regulationsmechanismen und Proteasefunktionen therapeutische Eingriffe in pathologisch deregulierte proteolytische Netzwerke vorzunehmen und betroffenen Patienten neuartige Therapieoptionen bereitzustellen. Dies ist auch wesentliches Ziel der an Meprin Proteasen durchgeführten Forschungsarbeiten.

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind Zink abhängige Metalloendoproteasen, die erstmals in den Jahren 1981/82 von verschiedenen Arbeitsgruppen in Mausniere und humanem Dünndarm entdeckt wurden (Beynon et al. 1981, Sterchi et al. 1982). Der Name Meprin steht für *metalloprotease from renal tissue*. Die für Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  kodierenden Gene (MEP1A/ MEP1B) wurden auf den Chromosomen sechs beziehungsweise acht identifiziert (Gorbea et al. 1993, Jiang et al. 1993, Hahn et al. 2000). Meprine zählen zur Astacin Peptidasenfamilie, die eine Untergruppe des Metzinkin-Proteasenklans ist. Neben den Meprinen umfasst die Astacin Familie die Proteasen Prokollagen C-Proteinase, *mammalian tolloid-like* 1 und 2 Protein sowie Ovastacin. Wichtiges Kennzeichen der Astacine ist das Zink bindende Motiv HExxHxxGxxHxxxRxDR (drei Liganden) und eine Tyrosin (fünfter Ligand) enthaltende Sequenz, die als *Met-Turn* bezeichnet wird (Gomis-Ruth et al. 2012). Die Penta-Koordination des Zink-Kations im aktiven Zentrum wird durch das katalytische Wassermolekül vervollständigt.

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind stark glykosylierte Multi-Domänen Proteine (Abbildung 1). Das N-terminale Signalpeptid leitet die Peptide in das raue endoplasmatische Retikulum. Es folgt ein Propeptid, sodass Meprine als inaktive Zymogene exprimiert werden. Angeschlossen ist die Astacin typische katalytische Domäne, die von etwa 200 Aminosäuren gebildet wird. Die MAM (*meprin A5 protein tyrosine phosphatase  $\mu$* ) Domäne soll für Protein-Protein Interaktionen, Zell-Adhäsion sowie Signaltransduktion relevant sein (Aricescu et al. 2006). Die TRAF (*tumour necrosis factor receptor associated factor*) Domäne ist möglicherweise bei Proteininteraktionen und Signaltransduktion beteiligt (Cheng et al. 1995). C-terminal folgt die EGF (*epidermal growth factor like*) ähnliche Domäne, die Transmembran und eine zytoplasmatische Proteindomäne.

Meprin  $\alpha$  unterscheidet sich von Meprin  $\beta$  in einer zusätzlichen inserierten Domäne, die N-terminal der EGF Domäne lokalisiert ist. Diese enthält eine Furinspaltstelle, sodass Meprin  $\alpha$  auf dem sekretorischen Weg von der Zellmembran abgelöst werden kann. Dem löslichen Meprin  $\alpha$  fehlt somit die EGF, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne (Marchand et al. 1995). Die zytoplasmatische Meprin  $\beta$  Domäne ist größer als die von Meprin  $\alpha$  und enthält mehrere Phosphorylierungsstellen, unter anderem ein Serin in einer Protein Kinase C Erkennungssequenz und weitere Interaktionssequenzen für intrazelluläre Proteine. Insgesamt stimmen die Aminosäuresequenzen von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  zu 42 Prozent überein (Sterchi et al. 2008).

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  bilden jeweils Homodimere, die mittels einer Disulfidbrücke zwischen den MAM Domänen stabilisiert wird (Arolas et al. 2012). Diese und weitere strukturelle Informationen konnten der im Jahr 2012 gelösten Kristallstruktur der Meprin  $\beta$  Ektodomäne entnommen werden. Das durch Furinspaltung von der Zellmembran gelöste Meprin  $\alpha$  hat die Eigenschaft zu oligomerisieren, sodass ringförmige Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht bis zu sechs Mega-Dalton ausgebildet werden können (Bertenshaw et al. 2003). Meprin  $\beta$  ist primär membrangebunden, kann aber durch die Proteasen ADAM10 oder ADAM17 proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden (Hahn et al. 2003, Jefferson et al. 2013).



**Abbildung 1: Domänenmodell von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$**

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind aus mehreren Proteindomänen aufgebaut. Das N-terminale Propeptid (PP) muss proteolytisch abgespalten werden, damit die katalytische Domäne (KAT) die volle proteolytische Aktivität entfalten kann. C-terminal folgt die *meprin A5 protein tyrosin phosphatase  $\mu$*  (MAM), *tumour necrosis factor receptor associated factor* (TRAF), *epidermal growth factor like* (EGF) Transmembran (TM) und zytosolische (C) Domäne. Zusätzlich beinhaltet Meprin  $\alpha$  zwischen EGF und TRAF Domänen eine inserierte Domäne (I). Meprine bilden Homodimere, die mittels einer Disulfidbrücke zwischen den MAM Domänen stabilisiert werden (Arolas et al. 2012).

Die Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Spaltspezifität wurde mit den massenspektrometrischen *Proteomics*-Methoden PICS (*proteomic identification of protease cleavage sites*) und TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) untersucht (Schilling und Overall 2008, Kleifeld et al. 2010, Schilling et al. 2011). Beide Methoden unterschieden sich in den Substraten, die den Meprinen präsentiert wurden. Für PICS wurde eine Bibliothek humaner Peptide verwendet, in TAILS sind native Proteine eingesetzt worden. Die PICS Auswertung zeigte eine Präferenz der Meprine für saure Aminosäuren an der P1' Position. Dies war in besonderem Maße für Meprin  $\beta$  ersichtlich. Im TAILS Ansatz wurde für beide Proteasen eine Spaltungspräferenz für Aspartat und Glutamat Aminosäuren an der P1' Position festgestellt (Becker-Pauly et al. 2011).

Die Identifikation von Substraten ermöglicht Rückschlüsse auf die biologischen Funktionen der Meprine. Zum Beispiel wurde Prokollagen I und III sowie Komponenten der Basalmembran (Kollagen IV, Nidogen 1, Fibronectin) als Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Substrate identifiziert, welches die Bedeutung dieser Proteasen im Umbau extrazellulärer Matrix verdeutlicht (Kruse et al. 2004, Kronenberg et al. 2010, Broder et al. 2013). Außerdem spalten beide Meprine das Zytokin Prointerleukin  $1\beta$  zur biologisch aktiven Form und können somit zu einer proinflammatorischen Antwort beitragen (Herzog et al. 2005, Herzog et al. 2009). Einen erheblichen Anteil zur Identifikation neuer Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Substrate lieferten die Ergebnisse der oben genannten TAILS Ansätze. Insgesamt konnten mit dieser Methode 151 neue extrazelluläre Substrate detektiert werden, darunter Inhibitoren, Proteasen, Rezeptoren, Zytokine sowie Proteine der extrazellulären Matrix. Dies eröffnet zahlreiche neue Forschungsperspektiven für bisher unbekannte biologische Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Funktionen (Jefferson et al. 2013).

Meprine sind Mediatoren verschiedener Pathologien. In dieser Hinsicht lieferten auch Untersuchungen an genetischen Tiermodellen neue Erkenntnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Meprine in Nierenerkrankungen relevant sind (Mathew et al. 2005, Bylander et al. 2008). Meprin  $\alpha$  wurde als diagnostischer Marker bei Kawasaki Patienten identifiziert. Im Meprin  $\beta$  Gen sind *SNPs* enthalten, die mit erhöhtem Risiko für diabetische Nephropathie einhergehen (Mathew et al. 2005, Kentsis et al. 2013). Dagegen sind *SNPs* des Meprin  $\alpha$  Gens mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Banerjee et al. 2009). Meprin  $\alpha$  ist zudem an inflammatorischen Lungenerkrankungen und Meprin  $\beta$  an der Pathogenese des pulmonal arteriellen Hochdrucks beteiligt (Cosgrove et al. 2011, Biasin et al. 2014).

Die bisher bekannte neurobiologische Funktion von Meprin  $\beta$  besteht in der Spaltung des Amyloid Vorläufer-Protein (APP), aus dem in der Folge A $\beta$  Peptide generiert werden können. Aggregierte A $\beta$  Peptide sollen zur Alzheimer Erkrankung beitragen. In Hirnproben von Alzheimer Patienten konnte eine Meprin  $\beta$  Überexpression detektiert werden (Bien et al. 2012). Meprin Proteasen sind außerdem in entarteten Zellen wie zum Beispiel Darmkrebs exprimiert und können durch Spaltung extrazellulärer Matrixproteine Invasion und Metastasierung von Krebszellen verursachen. Zum Krebswachstum könnte das proangiogenetische Potential von Meprin  $\alpha$  beitragen (Schutte et al. 2010). Die verstärkte Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Expression in fibrotischer Haut ist für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente von besonderem Interesse (Kronenberg et al. 2010).



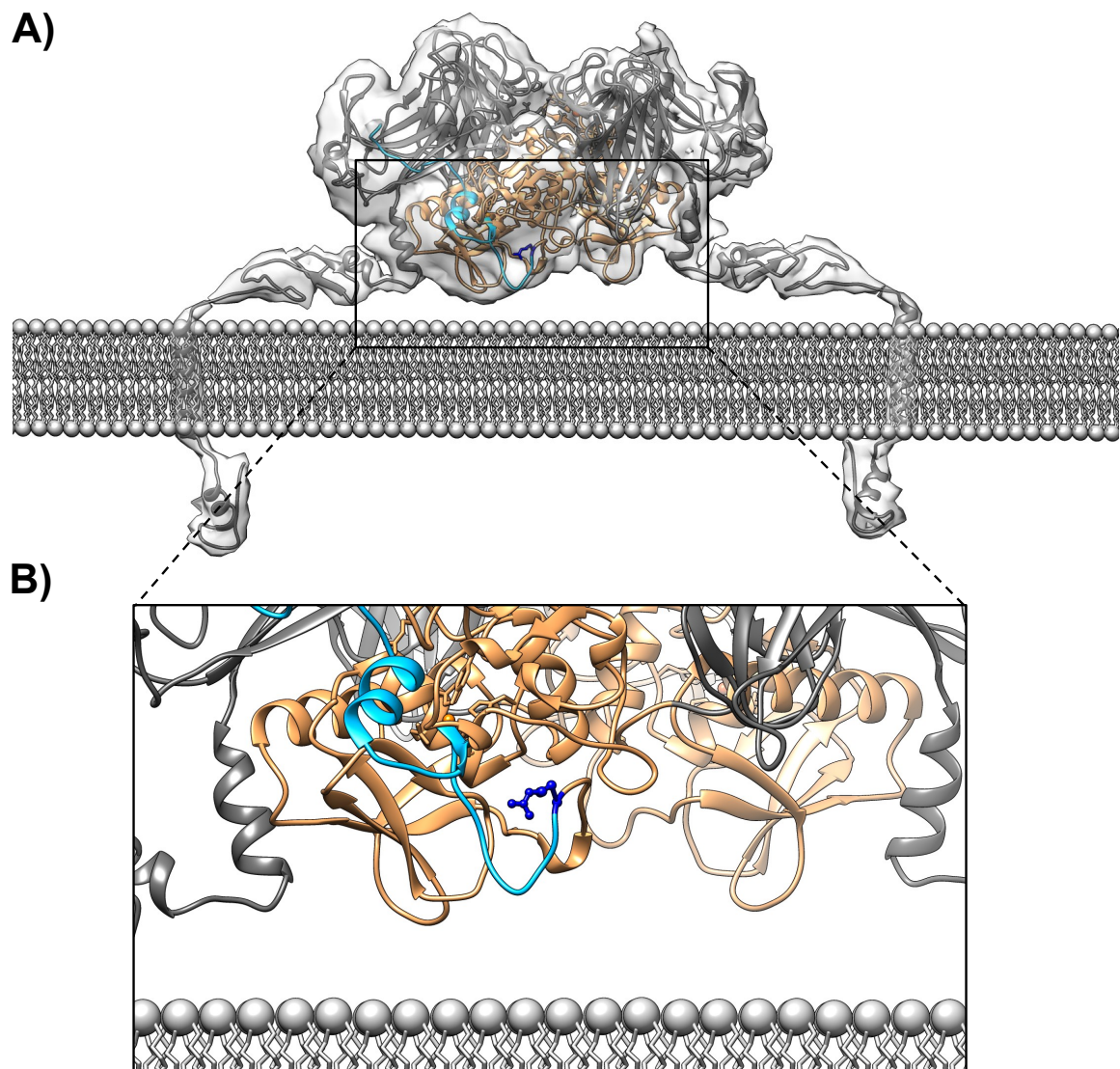
Die dargestellte Bedeutung von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  in humanen Erkrankungen macht diese Proteasen zu potentiellen therapeutischen Zielmolekülen. Wenn mit kurativer Intention in pathologisch deregulierte Meprin Aktivität eingegriffen werden soll, ist das exakte Verständnis der Regulation proteolytischer Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität von Interesse. Die bislang identifizierten Regulationsmechanismen greifen auf verschiedenen Ebenen.

Es wurden in der 5' untranslatierten Region des Meprin  $\beta$  Gens Estrogen abhängige Elemente, PEA3 (*polyoma enhancer activator-3*) und AP-1 (*activator protein-1*) Bindungsstellen detektiert. Mittels dieser Promotoren kann die Transkription der Protease moduliert werden (Matters und Bond 1999). Beispielsweise ist in transgenen Mäusen, die das Fra-2 Protein des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes überexprimieren, die Meprin  $\beta$  Expression in Endothel, Epithel, VSMC und entzündlichen Zellen erhöht (Eferl et al. 2008, Biasin et al. 2014). Im Menschen zeigten Genexpressionsanalysen ein breites Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Expressionsprofil, die stärkste Expression wurde im Dünndarm gemessen (Wu et al. 2009).

Auf Proteinebene wird die Meprin Aktivität durch Interaktion mit anderen Proteasen und Inhibitoren reguliert. Die Expression von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  als inaktive Zymogene erfordert die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Propeptides. Der effizienteste bekannte Aktivator beider Meprine ist Trypsin. Die Serinproteasen Plasmin und neutrophile Elastase wurden als Promeprin  $\alpha$  Aktivatoren, KLK (*kallikrein-related peptidase*) 4 und 8 als Aktivatoren von Promeprin  $\beta$  identifiziert. KLK 5 spaltet das Propeptid beider Meprin Zymogene (Rosmann et al. 2002, Ohler et al. 2010).

In den proteolytischen Prozessierungen, mit denen die Untersuchung der Aktivatoren erfolgte, wurden rekombinante Meprine eingesetzt, die in einem heterologen Insektenzell-System exprimiert wurden. Mit dem Ziel lösliches rekombinantes Promeprin  $\beta$  zu produzieren, wurde nur die frei vorliegende Ektodomäne der eigentlich membrangebundenen Protease exprimiert (Becker et al. 2003, Becker-Pauly et al. 2007).

Die im Jahr 2012 veröffentlichte Meprin  $\beta$  Kristallstruktur erweiterte das Verständnis über die räumlichen Orientierung und Lage der Meprin  $\beta$  Proteindomänen (Arolas et al. 2012). Es zeigte sich im Strukturmodell, dass die Propeptid Spaltstelle, an der die proteolytische Aktivierung durch Aktivatoren erfolgt, vermutlich sehr nahe der Zellmembran gelegen ist (Abbildung 2). Deshalb wurde hinterfragt, ob die publizierten löslichen Aktivatoren Zugang zu dieser räumlich verdeckten Stelle erhalten und das membrangebundene Promepirin  $\beta$  aktivieren können. Außerdem wurde nach membranständigen Promepirin  $\beta$  Aktivatoren gesucht.



**Abbildung 2: Die Promepirin  $\beta$  Struktur zeigt eine membrannähe Lokalisation der Propeptid Spaltstelle**  
Struktur des membranständigen Promepirin  $\beta$  Dimers modelliert anhand der Kristallstruktur der Ektodomäne (A). Die Spaltstelle umgebende Region ist in (B) vergrößert dargestellt. Die Ribbon-Struktur einer katalytischen Meprin  $\beta$  Domäne ist orange und das Propeptid hellblau eingefärbt. Arginin 61 ist dunkelblau hervorgehoben. Die Spaltstelle liegt nahe der Zellmembran. Die Abbildung wurde mit der Software UCSF Chimera auf Grundlage der Promepirin  $\beta$  Kristallstruktur (PDB: 4GWM) erstellt (Arolas et al. 2012, Jäckle et al. 2015).

Proteolytische Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität kann des Weiteren durch Interaktion mit Inhibitoren reguliert werden. Im Menschen wurde Cystatin C als endogener Meprin  $\alpha$  Inhibitor und Fetuin-A als Hemmstoff beider Meprine identifiziert (Hedrich et al. 2010). Synthetische Meprin Inhibitoren sind Hydroxamate, die das Zink-Ion im aktivem Zentrum chelatieren. Der potenteste Hemmstoff dieser Gruppe ist Aktinonin, mit einer Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) für Meprin  $\alpha$  im nanomolaren und Meprin  $\beta$  im mikromolaren Bereich (Kruse et al. 2004). Erkenntnisse über die Spaltspezifität und Struktur der Meprine wurden zur Entwicklung neuartiger hochspezifischer Inhibitoren genutzt (Becker-Pauly et al. 2011, Arolas et al. 2012). In dieser Arbeit konnten deshalb Inhibitoren mit verschiedenen Hemmstrategien zur spezifischen und potenten Regulation der proteolytischen Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund der Relevanz der Meprine in fibrotischen Pathologien sollte untersucht werden, ob die Regulation der proteolytischen Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität zu einer Reduktion der Prokollagen I Maturierung führt.

Zusammengefasst ist das Ziel dieser Arbeit die Regulation der proteolytischen Aktivität von Meprin  $\beta$  an der Zelloberfläche zu erforschen sowie Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  als therapeutische Zielmoleküle in fibrotischen Pathologien zu evaluieren. Die in dieser Arbeit erzielten Forschungsergebnisse werden nach Darstellung des eingesetzten Materials und der verwendeten Methodik präsentiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendetes Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Die im Labor verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 alphabetisch aufgeführt. Zusätzlich ist für jedes Laborgerät die Bezeichnung und der Hersteller mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte**

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Absauganlage	FTA-1	Grant Instruments, Cambridge
Autoklav	HST 4-5-6	Zirbus, Bad Grund
Blotting Gerät	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, Hercules
Brutschrank	WTB	Binder, Tuttlingen
Eismaschine	AF80	Scotsman, Sprockhövel
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPack Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	Bio-Rad, Hercules
Feinwaage	572-35	Kern, Balingen
Feinwaage	ARA520	OHAUS, Nänikon
Gefrierschrank (-20°C)	Comfort	Liebherr, Bulle
Inverses Mikroskop	Diavert	Leitz, Wetzlar
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	FV1000	Olympus, Tokio
Kreisschüttler	3015	GFL, Burgwedel
Kryogefrierschank (-150°C)	VIP Plus	Sanyo, Moriguchi
Kühlschrank	Profiline	Liebherr, Bulle
Kühlzentrifuge	Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Waltham
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Lumineszenzkamera	LAS-100	Fujifilm, Tokio
Magnetrührer	MR3001	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer	RH basic 2	IKA, Staufen
Mikroplattenleser	Infinite F200 Pro	Tecan, Männedorf
Mikroplattenleser (BCA-Test)	Spectra Rainbow	Tecan, Männedorf
Mikrozentrifuge	Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham
Minizentrifuge	Rotilabo-mini-centrifuge	Roth, Karlsruhe
ph-Meter	766 calimatic	Knick, Berlin

<b>Gerät</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Pipetten	Research plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	Easypet 3	Eppendorf, Hamburg
Reinigungsgerät	LA 180	Belimed, Fehring
Reinstwasseranlage	MiliQ Plus	Milipore, Darmstadt
Rollermixer	SRT9	Stuart, Stone
Rotator	SB2	Stuart, Stone
Spektrophotometer	Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Spektrophotometer	V-630	Jasco, Gross-Umstadt
Sterilbank	Herasafe HS18	Thermo Scientific, Waltham
Sterilbank	Herasafe KS	Thermo Scientific, Waltham
Tiefkühlgefrierschrank (-80°C)	Herafreeze	Thermo Scientific, Waltham
Tischzentrifuge	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen
Vortexmischer	Genie 2	Scientific Industries, New York
Wärmeblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Wärmeblock	Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Wärmemixer	ThermoMixer F1.5	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	1012	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel
Western Blot Kammer	Intelligent Dark Box	Fujifilm, Tokio
Zellkulturinkubator	CB210	Binder, Tuttlingen
Zellkulturinkubator	MCO-19A (UV)	Sanyo, Moriguchi
Zellkulturmikroskop	Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Zellkulturzentrifuge	Function Line	Thermo Scientific, Waltham
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 2.0R	Thermo Scientific, Waltham
Zellzähler	Cellometer Auto T4	Peqlab, Erlangen

## 2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 alphabetisch aufgeführt. Zusätzlich ist der Materialhersteller mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 2: Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien**

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Alufolie	Carl Roth, Karlsruhe
Autoklavierband	Carl Roth, Karlsruhe
Bechergläser	Simax, Selb
Blotting-Papier	Carl Roth, Karlsruhe
Bunsenbrenner	Usbeck, Radevormwald
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
Glasflaschen	Duran, Wertheim/Main
Handschuhe Nitril blau	Carl Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril weiß	Kirchhoff, Hamburg
Messzylinder (Glas)	Brand, Wertheim
Messzylinder (Plastik)	Vitlab, Großostheim
Mikrotiterplatte (6 Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte (96 Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (für BCA-Test)	Thermo Scientific, Waltham
Parafilm	Pechiney, Lyon
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (Western Blot)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzenkasten	Eppendorf, Hamburg
Puresept Desinfektion	Merz, Frankfurt am Main
PVDF-Membran	Milipore, Darmstadt
Reagiergefäß-Vorratsbox	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht

---

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Röhren (15/50ml)	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sicherheitsbehälter	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpell	Bayha, Tuttlingen
Tücherbox	Carl Roth, Karlsruhe
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nürnberg
Western Blot Gelgießsystem	Bio-Rad, Hercules
Western Blot Laufkammer	Bio-Rad, Hercules
Zählkammern	Peqlab, Erlangen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg



### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Proteine

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Proteine sind in Tabelle 3 alphabetisch aufgeführt. Zusätzlich ist der jeweilige Produkthersteller mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Proteine**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Actinonin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Agarose	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfathydrat	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Tablette	Roche, Basel
Complete Ultra Tablette (- EDTA)	Roche, Basel
Coomassie Blau G 250	Carl Roth, Karlsruhe
Peptid P1-P4	Genosphere, Paris
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM - high Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis
DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphinat-Inhibitor	Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Saclay
Fetal bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Fluorogenes Peptid Mepri $\alpha$	PeptaNova, Sandhausen
Fluorogenes Peptid Mepri $\beta$	PeptaNova, Sandhausen
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Walter CMP, Kiel

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagen VI (human)	Abcam, Cambridge
L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham
LSGS (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Medium 106	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Meprin $\alpha$ (aktiv)	Laboreigene Produktion
Meprin $\beta$ (aktiv)	Laboreigene Produktion
Methanol	Walter CMP, Kiel
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Peressigsäure	PanReac AppliChem, Darmstadt
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Promeprin $\alpha$	Laboreigene Produktion
Promeprin $\beta$	Laboreigene Produktion
Rotiphorese Gel 30	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Strepavidin Agarose Resin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth, Karlsruhe
TGF- $\beta$ 1	ImmunoTools, Friesoythe
Triethylendiamin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Triton X100	Carl Roth, Karlsruhe
Trometamol	Carl Roth, Karlsruhe

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypsin (sus scrofa)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypsin-EDTA 0,5% (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.1.4 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Die verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien sind mit Ingredienzien in Tabelle 4 alphabetisch aufgeführt.

**Tabelle 4: Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien**

Bezeichnung	Ingredienzien
Anodenpuffer	300 mM Tris-HCL pH 10,4
APS-Lösung	10% (w/v) APS
Biotin-Lösung	PBS-CM 1 mg/ml Biotin
Blockier-Lösung (BSA)	3% (w/v) BSA TBS
Blockier-Lösung (MMP)	10% (w/v) MMP TBS
Blockierungspuffer Immunfluoreszenz	10% (v/v) FCS 0,2% (w/v) Saponin
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Isopropanol 7,5% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,15 M Aluminiumsulfhydrat 10% (v/v) Ethanol 242 µM Coomassie G250 20 ‰ (v/v) o-Phosphorsäure
DAPI-Lösung	1 mg/ml DAPI PBS
DMEM	DMEM 10% (v/v) FCS 500 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamine
DMEM (-P/S, -L-Glutamine)	DMEM 10% (v/v) FCS
DMEM (serumfrei)	DMEM 500 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamine

Bezeichnung	Ingredienzien
Einbettungs-Lösung Immunfluoreszenz	17% Mowiol 33% Glycerol 50 mg/ml DABCO 1 µg/ml DAPI
Fixierungs-Lösung Immunfluoreszenz	4% (w/v) PFA PBS
HEPES	20 mM pH 7,5
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCL 40 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,0
LB-Agar	15 ‰ (w/v) Agar LB - Medium (autoklaviert)
LB-Medium	1% NaCl 1% Trypton 0,5% Hefeextrakt ddH <sub>2</sub> O (autoklaviert)
Lysepuffer (- EDTA)	PBS 1% (v/v) Triton X 100 1 Complete Ultra Tablette (EDTA frei) pH 7,4
Lysepuffer (+ EDTA)	PBS 1% (v/v) Triton X 100 1 Complete Tablette pH 7,4
Medium 106 (- LSGS)	Medium 106
Medium 106 (+ LSGS)	Medium 106 2% (v/v) Fetal Bovines Serum 1 µg/ml Hydrocortison 10 ng/ml Human epidermaler Wachstumsfaktor 3 ng/ml Fibroblasten Wachstumsfaktor 10 µg/ml Heparin

Bezeichnung	Ingredienzien
PBS	135 mM NaCL 2,7 mM KCL 4,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS-CM	PBS 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub>
Permeabilisierungs-Lösung Immunfluoreszenz	0,12% (w/v) Glycin 0,2% (w/v) Saponin PBS
Primärantikörper-Lösung Immunfluoreszenz	0,2% (w/v) Saponin 10% (w/v) FCS 1 ‰ Antikörper PBS
Primärantikörper-Lösung Western Blot	1% (w/v) MMP TBS
Quenching-Puffer	PBS-CM 50 mM Tris-HCL pH 8,0
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCL 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
SDS-Laufpuffer (10x)	1% (w/v) SDS 1,92 M Glycin 0,25 M Tris pH 8,3
SDS-Laufpuffer (1x)	10% (w/v) SDS-Laufpuffer (10x) 90% Mili-H <sub>2</sub> O
Sekundärantikörper-Lösung Immunfluoreszenz	0,2% (w/v) Saponin 10% (w/v) FCS 1 ‰ Antikörper PBS
Sekundärantikörper-Lösung Western Blot	5% (w/v) MMP TBS
TBS	20 mM Tris HCL 137 mM NaCL pH 7,5

Bezeichnung	Ingredienzien
TBS-T	20 mM Tris-HCL 100 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 0,2% (v/v) Triton X 100 pH 7,5
TEMED-Lösung	10% (v/v) TEMED
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCL 0,4% (w/v) SDS pH 8,8
Waschpuffer Immunfluoreszenz	0,2% (w/v) Saponin PBS

### 2.1.5 Primäre Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 5 alphabetisch aufgeführt. Die Spezifität und die Spezies, aus denen die Antikörper gewonnen wurden, sind angegeben. Die Applikation beschreibt den Einsatz des Antikörpers in Western Blot (WB) oder Immunfluoreszenz (IF) Primärantikörper-Lösung. Zusätzlich ist der Hersteller der Antikörper mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Applikation	Hersteller, Firmensitz
9B11	Myc-Tag	Maus, monoklonal	1:1000 (WB) 1:1000 (IF)	Cell Signaling, Danvers
A1 (Mary)	Mepri $\alpha$	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	Eigene Herstellung
A2066	$\alpha$ 1-Aktin	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, St. Louis
ab84036	Transferrin-Rezeptor	Kaninchen, polyklonal	1:500 (WB)	Abcam, Cambridge
B1 (Brösmeli)	Mepri $\beta$	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	Eigene Herstellung
LF-116	Humanes Typ I Kollagen, $\alpha$ 2-Carboxy-Telopeptid	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	L. Fisher, National Institutes of Health, Bethesda
LF-42	Humanes Typ I Kollagen, $\alpha$ 1-Carboxy-Propeptid	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	L. Fisher, National Institutes of Health, Bethesda
LF-68	Humanes Typ I Kollagen, $\alpha$ 1-Carboxy-Telopeptid	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	L. Fisher, National Institutes of Health, Bethesda
LF-70	Humanes Typ III Kollagen, Carboxy-Propeptid	Kaninchen, Serum	1:1000 (WB)	L. Fisher, National Institutes of Health, Bethesda
M41-14	Mepri $\alpha$	Maus, monoklonal	1:1000 (WB)	Eigene Herstellung
Penta-His	Histidin-Tag	Maus, monoklonal	1:1000 (WB)	Quiagen, Venlo
sc-32233 (6C5)	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Maus, monoklonal	1:500 (WB)	Santa-Cruz, Dallas
Strep-tag	Strep-Tag	Maus, monoklonal	1:1000 (WB)	Quiagen, Venlo
Tier 1	Mepri $\beta$	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (WB) 1:1000 (IF)	Pineda, Berlin



### 2.1.6 Sekundäre Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 6 alphabetisch aufgeführt. Die Spezifität und die Spezies, aus der die Antikörper gewonnen wurden, sind angegeben. Die Applikation beschreibt den Einsatz des Antikörpers in die Sekundärantikörper-Lösung. Zusätzlich ist der Hersteller der Antikörper mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Applikation	Hersteller, Firmensitz
Esel- $\alpha$ -Maus-Alexa 594	Maus IgG-FC	Ziege	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG HRP	Kaninchen-IgG-FC	Ziege	1:5000	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-Alexa 488	Kaninchen IgG-FC	Ziege	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG HRP	Maus-IgG-FC	Ziege	1:5000	Thermo Fisher Scientific, Waltham

### 2.1.7 Kits

Kits enthalten gebrauchsfertige Chemikalien für eine spezifische biochemische Untersuchung. Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 7 alphabetisch aufgeführt. Der Hersteller ist mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 7: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
NucleoBond Xtra Midi Prep	Macherey-Nagel, Düren
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham

### 2.1.8 Plasmide

Die für Transfektionen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 alphabetisch aufgeführt. Der Hersteller ist mit Ort angegeben.

**Tabelle 8: Verwendete Plasmide**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Matriptase 2 (TMPRSS 6)	M. Stirnberg, Bonn
Mepri $\beta$	Laboreigene Produktion
TMPRSS 4	A. Ohler, Mainz
pCDNA 3.1	M. Stirnberg, Bonn

### 2.1.9 Marker

Marker enthalten Proteine bekannter Größe. Die in dieser Arbeit verwendeten Marker sind in Tabelle 9 alphabetisch aufgeführt. Der Hersteller ist mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 9: Verwendete Marker**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Magic Mark XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, Ipswich

### 2.1.10 Zelllinien und Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme sind in Tabelle 10 alphabetisch aufgeführt. Der Hersteller ist mit Firmensitz angegeben.

**Tabelle 10: Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
COS-7	Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	DSMZ, Braunschweig
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> XL 1 Blue	Agilent Technologies, Santa Clara
HDFa	Primäre humane dermale Fibroblasten	Thermo Fisher Scientific, Waltham
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ, Braunschweig
MRC5	Primäre humane pulmonale Fibroblasten	Prof. B. Hinz, Toronto

### 2.1.11 Computersoftware

Die verwendete Software ist in Tabelle 11 alphabetisch aufgeführt. Der Firmensitz der Softwarehersteller ist angegeben. Die Dissertation wurde auf einem Computer mit dem Betriebssystem OS X 10.9.5 erstellt.

**Tabelle 11: Verwendete Computersoftware**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Firmensitz</b>
Adobe Acrobat Pro X	Adobe Systems, San Jose
Adobe Lightroom 2	Adobe Systems, San Jose
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems, San Jose
Cell^B 2.6	Olympus, Tokio
Cellometer Auto 3.3.3	Nexcelom, Lawrence
Endnote X7	Thomson Reuters, Philadelphia
Image Reader 2.6	Fujifilm, Tokio
Megellan 7.1	Tecan, Männedorf
Microsoft Office 2011 (Mac)	Microsoft, Redmond
Nanodrop V 3.5.2	Peqlab, Erlangen
Olympus Fluoview 4.0a	Olympus, Tokio
Personal Backup 5.5.7	J. Ratlev
Prism 5	Graph Pad, La Jolla

## 2.2 Verwendete Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die komplexen Prozesse eines Organismus können mit Zellkulturstudien in einem vereinfachten System untersucht werden. Die Herausforderung zellbiologischer Methoden besteht in der Kultivierung von Zellen in einer künstlichen Umgebung. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse S2 durchgeführt, um mikrobiologische Kontaminationen zu vermeiden. An der Sterilbank wurde Laborkittel und Nitrilhandschuhe getragen. Vor und nach der Arbeit wurden die Arbeitsflächen der Sicherheitswerkbank desinfiziert.

#### 2.2.1.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem Zellkulturinkubator mit angefeuchteter Atmosphäre, fünf Prozent CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 37°C gehalten. Primäre humane dermale Fibroblasten wurden in Medium 106 mit *Low Serum Growth Supplement* (LSGS) kultiviert. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit zehn Prozent (v/v) fetalen bovines Serum (FBS) wurde für primäre humane pulmonale Fibroblasten verwendet. HEK-293 und COS-7 Zellen wurden in DMEM mit zehn Prozent (v/v) FBS, 500 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamine kultiviert.

Zunächst wurden von den genannten Zelllinien Stammkulturen in T75 Kulturflaschen erstellt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium der Stammkulturen gewechselt. Bei adäquater Konfluenz (mindestens 80 Prozent) erfolgte die Passagierung der Zellen (Kapitel 2.2.1.2). Bei ausgewählten Experimenten wurde Medium ohne Serumsupplement verwendet, mit dem Ziel die Inhibition von Proteasen durch Serumbestandteile auszuschließen.

### 2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Nach dem Erzielen der adäquaten Zellkonfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Das alte Nährmedium wurde verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Einfaches Trypsin-EDTA wurde bis zur vollständigen Benetzung des Flaschenbodens zugegeben. Nachfolgend wurden die Flaschen für drei Minuten in den warmen Zellkulturinkubator gestellt. Mit einem inversen Zellkulturmikroskop wurde das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden überprüft. Die Zellsuspension wurde anschließend in 15 ml Röhren überführt, serumhaltiges Medium zugegeben und bei 1300 g für drei Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und das in der Röhre verbleibende Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Gleiche Volumina der Suspension wurden auf die neuen Zellkulturflaschen übertragen. Alternativ erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 2.2.1.3) und die Aussaat einer definierten Zellmenge. Anschließend wurde den neuen Kulturen ausreichend frisches Medium hinzugefügt. Am nächsten Tag erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie.

### 2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einem automatischen Zellzähler bestimmt. Der zu vermessenden Probe wurde nach ausreichender Mischung 20 µl Zellsuspension entnommen und in spezielle Zählkammern des Geräteherstellers eingefüllt. Diese wurden in den Zellzähler eingeführt. Nachfolgend erfolgte die Fokussierung der Zellen sowie die Auswahl der zu vermessenden Zelllinie. Die bestimmte Zellzahl wurde von der Gerätesoftware in Zellen pro Milliliter ausgegeben.

#### 2.2.1.4 Transiente Transfektion von Zellen

Mittels einer transienten Transfektion kann in eukaryotische Zellen temporär Fremd-DNA eingebracht werden. Die Transfektion wurde bei zu 80 Prozent konfluenten Zellen durchgeführt. Die Plasmid DNA und das Transfektionsreagenz Polyethylenimin wurde zu 300 µl serumfreien Medium hinzugefügt. Der Transfektionsansatz wurde anschließend mit einem Vortexgerät gründlich gemischt, bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und der Kulturflasche zugegeben. Nachfolgend wurde serumfreies Medium in die Kulturen hinzugefügt bis der Flaschenboden vollständig benetzt war. Nach vier Stunden wurde das Transfektionsansatz enthaltende Medium abgenommen und frisches Medium hinzugefügt.

#### 2.2.1.5 Applikation rekombinanter Proteine in den Zellüberstand

In einem Reaktionsgefäß wurde 300 µl serumfreies Medium vorgelegt und das berechnete Volumen vom Proteinstock hinzugefügt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und der Proteinansatz in die Kulturflasche pipettiert. Abschließend wurde Medium bis zum errechneten Volumen aufgefüllt und für die gewünschte Zeit im Inkubator inkubiert.

#### 2.2.1.6 Zellernte und Lyse

Die Morphologie der Zellen wurde vor der Zellernte am inversen Zellkulturmikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen auf Eis gestellt. Das Zellmedium wurde abgenommen, bei 16,2 g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 2.2.2.1) wurden die Überstände mit dreifachem Dithiothreitol (DTT) enthaltenden Probenpuffer versetzt und bei 95°C für fünf Minuten denaturiert.

Den Zellkulturflaschen wurde ein Milliliter eiskaltes PBS hinzugefügt. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Schabwerkzeug von der Kulturflasche gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation der Zellen bei 500 g für fünf Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert. Die Menge an zugegebenen Lysepuffer orientierte sich an der Größe der Zellpellets (80-200 µl). Für Aktivitätsmessungen wurde Lysepuffer ohne Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Die Lyse erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die verbliebenen Zellmembranfragmente bei 16,2 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.2.2.1).

Für Gelelektrophoresen wurde das Lysat mit dreifachem Probenpuffer mit Dithiothreitol (DTT) versetzt und bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Die Proben wurden entweder sofort aufgetragen oder bei -20°C für spätere Analysen aufbewahrt. Für Aktivitätsmessungen wurde das Zelllysate direkt weiterverwendet.

#### 2.2.1.7 Trypanblaufärbung

Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der zur Bestimmung der Zellvitalität verwendet wird. Der saure Farbstoff kann perforierte Zellmembranen von toten Zellen durchdringen und bindet an zytosolische Proteine. Deshalb werden die avitalen Zellen im Mikroskop als angefärbt erkannt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf und werden nicht angefärbt. Nach Zugabe der Färbelösung zu den Zellen wurde die Schale vorsichtig gemischt und umgehend unter dem Mikroskop untersucht.

#### 2.2.1.8 Immunfluoreszenz-Analyse

Die Kolokalisation von Proteasen an der Zelloberfläche wurde mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Die Methode basiert auf der indirekten Immundetektion von Proteinen (Kapitel 2.2.2.5). Es wurden Zellen in einer Mikrotiterplatte mit sechs Löchern ausgesät, in denen Deckgläschen eingelegt waren. Am folgenden Tag wurde das Anwachsen der Zellen kontrolliert und 1 µg Plasmid-DNA pro Loch transfiziert (Kapitel 2.2.1.4) und für 48 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für zehn Minuten mit Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von Permeabilisierungslösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Nachfolgend wurde Blockierlösung auf die Zellen gegeben. In einer Dunkelkammer wurden 60 µl Primärantikörperlösung vorgelegt, darauf die Deckgläschen mit den fixierten Zellen gelegt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mehrmals mit Waschpuffer gespült und mit Sekundärantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde erneut mit Waschpuffer gespült und zusätzlich zweimal mit Millipore-Wasser gewaschen. Abschließend wurde die Einbettungslösung auf 60°C erhitzt, 15 µl auf einen Objektträger vorgelegt und die Deckgläschen vorsichtig aufgelegt. Die Objektträger wurden in einer Dunkelkammer getrocknet und gelagert.



Die Auswertung erfolgte mit dem Olympus FV1000 Mikroskop. Mit der Software Olympus Fluoview 4.0 konnten die aufgenommenen Einzelkanäle fusioniert und eine Kolokalisation der Proteasen auf der Zelloberfläche dargestellt werden.

#### 2.2.1.9 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Biotinylierungen wurden erstellt, um Proteine an der Zelloberfläche nachzuweisen und zu untersuchen. Für diese Untersuchung wurden transfizierte Zellen (Kapitel 2.2.1.4) auf Eis gestellt, das Kulturmedium verworfen und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen. Anschließend wurde mit Biotin-Lösung für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Biotin bindet an die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin Aminosäuren. Aufgrund der intakten Zellmembran wurden nur die membrangebundenen Proteine mit Biotin markiert. Als Kontrollen dienten identisch transfizierte Zellen, die mit PBS-CM inkubiert wurden. Nach Entfernung der Biotin-Lösung respektive des PBS-CM wurde eiskalter *Quenching*-Puffer für zehn Minuten auf die Zellen gegeben. Abschließend wurde dreimal mit PBS-CM gewaschen.

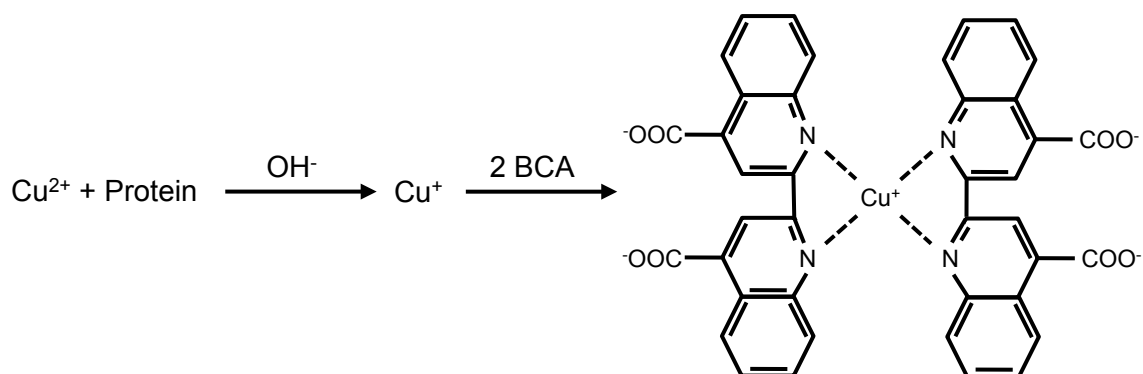
In der Folge wurden die Zellen mit einem Schaber-Werkzeug geerntet und in einem Reaktionsgefäß mit 300  $\mu$ l Lysepuffer mit EDTA für eine Stunde auf Eis inkubiert. Lysat-Kontrollen wurden abgenommen, die Proteinkonzentration (Kapitel 2.2.2.1) bestimmt und dem verbleibenden Lysat 75  $\mu$ l mit Lysepuffer gewaschene *streptavidin agarose resin beads* hinzugefügt. Die Proben wurden für eine Stunde auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Das an den Beads befestigte Streptavidin bindet mit hoher Affinität Biotin, mit dem die Oberflächenproteine markiert wurden. Nachfolgend wurden die Beads abzentrifugiert und dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden von den *beads* durch Zugabe von dreifachem Probenpuffer mit DTT und Inkubation im Wärmeblock bei 60°C für 20 Minuten abgelöst. Es folgten SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) und Western Blot (Kapitel 2.2.2.4) Analysen.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Bicinchoninsäure-Assay. Diese Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  durch Peptidbindungen und Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan. Das  $\text{Cu}^+$ -Ion bildet mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex von violetter Farbe (Abbildung 3). Die Färbungsintensität ist proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen (Smith et al. 1985, Wiechelman et al. 1988).

Der Bicinchoninsäure-Assay wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben und der Proteinstandard (10  $\mu\text{l}$ ) wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und jeweils 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und die Absorption der Proben in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Mit dem Proteinstandard wurde eine Eichgerade erstellt, aus der die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben ermittelt werden konnte.

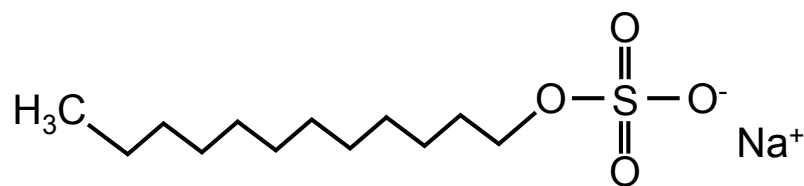


**Abbildung 3: Prinzip des Bicinchoninsäure-Assays**

$\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden durch Peptidbindungen und Aminosäureseitenketten zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, das mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex bildet. Das Absorptionsmaximum des violett gefärbten Komplexes liegt bei 562 nm.

### 2.2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinmischungen wurden mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das in konstantem Verhältnis an Proteine bindet (1,4 g SDS/ g Protein) und deren Eigenladung überdeckt (Abbildung 4). Es resultiert eine einheitliche elektrophoretische Mobilität der Proben in Richtung der Anode. Die hohe Oberflächenladung bewirkt zusätzlich eine schnelle Probenauffrennung und verhindert Proteinaggregationen.



**Abbildung 4: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat**

Das amphiphile Natriumdodecylsulfat bindet in konstantem Verhältnis an Proteine und überdeckt deren Eigenladung. In der Elektrophorese resultiert eine einheitliche Mobilität in Richtung der Anode.

Die Gel-Matrix entsteht durch Polymerisation von monomeren Acrylamid mit dem Vernetzter N, N'-Methylenbisacrylamid, die nach Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Polymerisationskatalysators N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) erfolgt. Die Porengröße des Gels wird durch die Totalacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Proteinprobe wurden Gele mit unterschiedlicher Acrylamid Konzentration verwendet. Es wurde ein diskontinuierliches Elektrophorese-System mit Lämmli-Puffern benutzt (Laemmli 1970). Dieses besteht aus einem weitporigen Sammelgel (pH 6,8) das ein engporiges Trenngel (pH 8,8) überschichtet. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Rezept für zwei Polyacrylamidgele (0,75 mm)

Ingredienzien	Trenngel			Sammelgel
	7,5%	10%	12%	3,8%
Trenngel-Puffer [ml]	2,0	2,0	2,0	-
Sammelgel-Puffer [ml]	-	-	-	1,0
Millipore-Wasser [ml]	3,6	3,2	2,7	2,4
Acrylamid-Lösung [ml]	2,0	2,7	3,2	0,5
TEMED-Lösung [ $\mu$ l]	60,0	60,0	60,0	45,0
APS-Lösung [ $\mu$ l]	60,0	60,0	60,0	45,0

Der pH-Wert des Sammelgels liegt nahe am isoelektrischen Punkt der im Laufpuffer enthaltenen Aminosäure Glycin, deren elektrophoretische Mobilität daher gering ist (Folge-Ion). Derweil ist die Beweglichkeit von  $\text{Cl}^-$ -Ionen im elektrischen Feld hoch (Leit-Ion). Die Mobilitäten der Protein-Ionen liegen zwischen der von Leit- und Folge-Ionen. Es resultiert eine Vortrennung der Proteine nach der elektrophoretischen Beweglichkeit im Sammelgel. Im engporigen Trenngel hat die Molekülgröße Einfluss auf die Mobilität, sodass die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lottspeich und Engels 2012).

Ein Proteinstandart wurde verwendet um das Molekulargewicht der Proben zu bestimmen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 Volt für 45 Minuten durchgeführt. Um hochmolekulare Proteine adäquat aufzutrennen wurde die Elektrophoresezeit verlängert. Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet (Kapitel 2.2.2.4) oder direkt mit einer Coomassie-Färbung (Kapitel 2.2.2.3) sichtbar gemacht.

### 2.2.2.3 Coomassie-Färbung

Proteine können direkt im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie-Färbung dargestellt werden. Die Färbung beruht auf der Einlagerung von Coomassie-Farbstoff in basische Seitenketten von Aminosäuren. Die Färbelösung enthält zusätzlich Aluminiumsulfathydrat, um die Spezifität zu erhöhen und den Prozess der Färbung zu beschleunigen (Kang 2002).

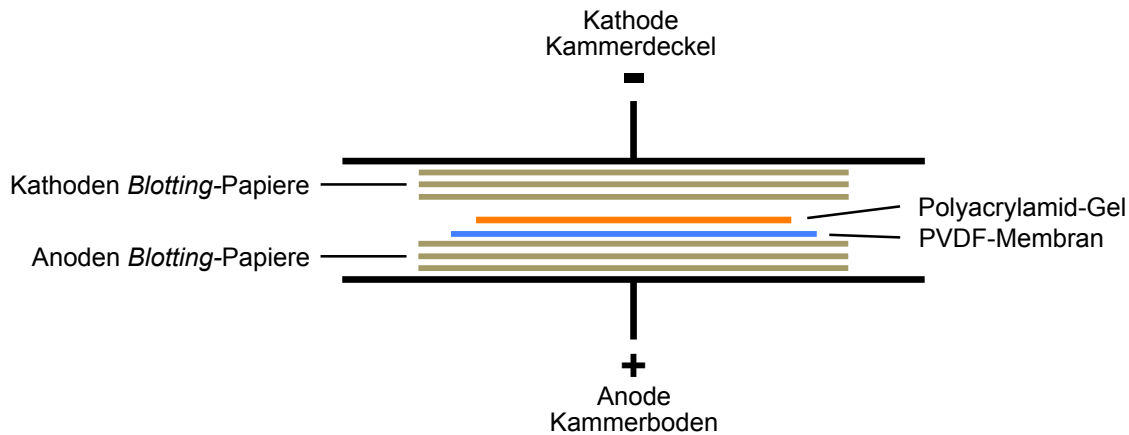
Das Polyacrylamid-Gel wurde in eine Schale mit Coomassie-Färbelösung eingelegt und auf den Rotator gestellt bis Proteinbanden zu detektieren waren. Anschließend wurde die Färbelösung entsorgt und das Gel in Entfärber inkubiert bis das unspezifische Hintergrundsignal an Intensität abnahm und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Das Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

### 2.2.2.4 Western Blot (*semidry*)

Die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine mussten für weiterführende Analysen elektrophoretisch auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert werden. Dies erfolgte mit dem *semidry* Western Blot Verfahren (Towbin et al. 1979, Gultekin und Heermann 1988).

Für diese Methode wurden *Blotting*-Papiere mit Anoden- oder Kathodenpuffer befeuchtet. Die PVDF-Membran wurde mit Ethanol aktiviert und nachfolgend in Milli-Wasser abgewaschen. Anschließend wurde mit Anodenpuffer getränktes *Blotting*-Papier und die PVDF-Membran in ein *Blotting*-Gerät eingelegt. Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen Membran und mit Kathodenpuffer getränktem *Blotting*-Papier positioniert. Auf Freiheit von Luftblasen zwischen den Komponenten wurde geachtet. Der Kammerdeckel diente als Kathode und konnte mittels eines Verschlussmechanismus Druck auf die eingelegten Komponenten ausüben. Der Aufbau der Western Blot Kammer ist in Abbildung 5 schematisch abgebildet.

Am *Blotting*-Gerät konnte die angelegte Spannung sowie die Dauer der Spannungsapplikation adjustiert werden. Die Elektrophorese wurde bei 0,75 mm dicken Gelen bei konstant 25 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Bei 1,5 mm dicken Polyacrylamid-Gelen wurde die Elektrophorese-Zeit bei gleicher Spannung auf 60 Minuten verlängert.



**Abbildung 5: Aufbau der Western Blot Kammer**

Mittels eines Western Blot Gerätes wurden die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Kammerboden diente als Anode, der Kammerdeckel als Kathode. Das Polyacrylamid-Gel wurde luftblasenfrei zwischen PVDF-Membran und mit Kathodenpuffer benetztem *Blotting*-Papier eingelegt. Die Elektrophorese wurde bei 0,75 mm dicken Gelen bei konstant 25 Volt für 30 Minuten durchgeführt.

PVDF: Polyvinylidendifluorid

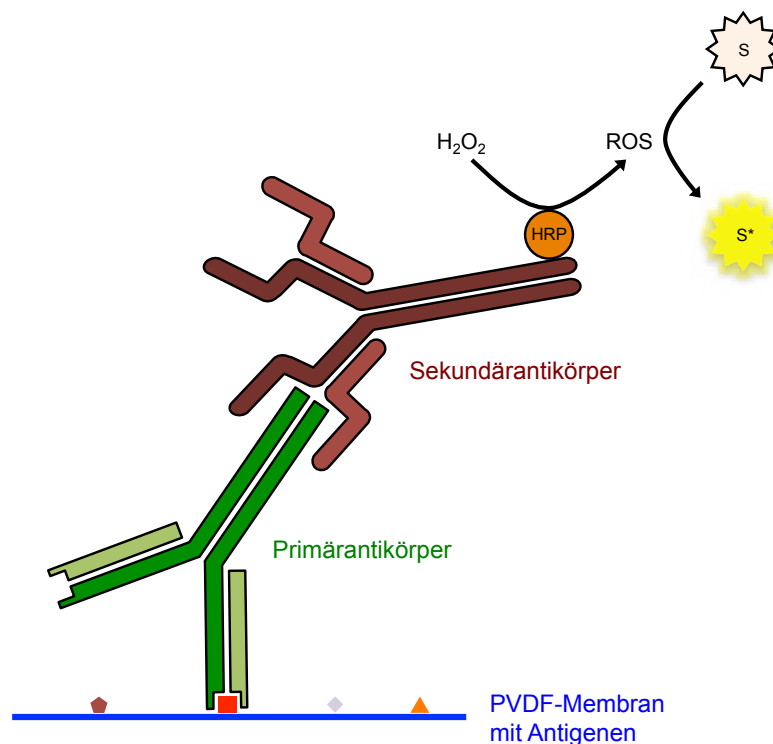
#### 2.2.2.5 Indirekte Immundetektion von Proteinen

Proteine können auf der PVDF-Membran mittels indirekten Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 6). Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Kapitel 2.2.2.4) wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit fünf Prozent Magermilchpulver in *Tris-buffered saline* (TBS) oder drei Prozent bovinen Serum Albumin (BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt.

Anschließend wurden die primären Antikörper in der gewünschten Verdünnungsstufe (Tabelle 5) in ein Prozent Magermilchpulver in TBS oder drei Prozent BSA angesetzt und die PVDF-Membran mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das Epitop des zu untersuchenden Proteins. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch drei maliges Waschen mit TBS-T und einmal TBS für je zehn Minuten entfernt.

Es folgte die Inkubation der Membran mit sekundärem Antikörper (Tabelle 6) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper bindet an die FC-Region des primären Antikörpers und ist an das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt. Abschließend wurde erneut dreimal mit TBS-T und ein mal mit TBS für je zehn Minuten gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Die PVDF-Membran wurde auf Klarsichtfolie gelegt und mit 300  $\mu\text{l}$  Substratlösung benetzt, die zu gleichen Teilen aus Peroxidase-Puffer und dem Chromogen Luminol bestand. Die *horseradish peroxidase* setzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies um, die Luminol oxidieren. In den nachfolgenden Reaktionen entsteht Chemilumineszenz, die mittels einer Lumineszenz-Kamera in einer abgedunkelten Entwicklungskammer detektiert werden kann (Lottspeich und Engels 2012). Das gemessene Signal wird von der eingesetzten Gerätesoftware als TIFF-Bilddatei ausgegeben. Sofern erforderlich, konnten Bildgröße, Helligkeit und Kontrast der erzeugten Rohdaten mit der Software Adobe Photoshop adjustiert werden.



#### Abbildung 6: Prinzip der indirekten Immundetektion von Proteinen

Der Primärantikörper detektiert spezifische Antigene auf der PVDF-Membran. Der mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper bindet den Primärantikörper. Die HRP-Peroxidase setzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) um, die das Chromogen Luminol (S) oxidieren. In den nachfolgenden Reaktionen entsteht Chemilumineszenz ( $\text{S}^*$ ), die von einer Lumineszenzkamera detektiert werden kann.

PVDF: Polyvinylidendifluorid

ROS: Reactive oxygen species

### 2.2.2.6 Bestimmung der proteolytischen Aktivität rekombinanter Meprine

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von rekombinantem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  erfolgte mit synthetischen fluorogenen Peptiden. Das Design der Peptide beruht auf der Spaltungspräferenz von Meprin  $\alpha$  und im besonderen Maße Meprin  $\beta$  für saure Aminosäuren an der P1'-Position. Dies wurde mit den *Proteomics*-Methoden *protease identification of cleavage sites* (PICS) für Peptide und mit *terminal amine isotopic labeling of substrates* (TAILS) für native Substrate gezeigt (Becker-Pauly et al. 2011). Die Primärstrukturen der verwendeten fluorogenen Peptide sind in Tabelle 13 dargestellt.

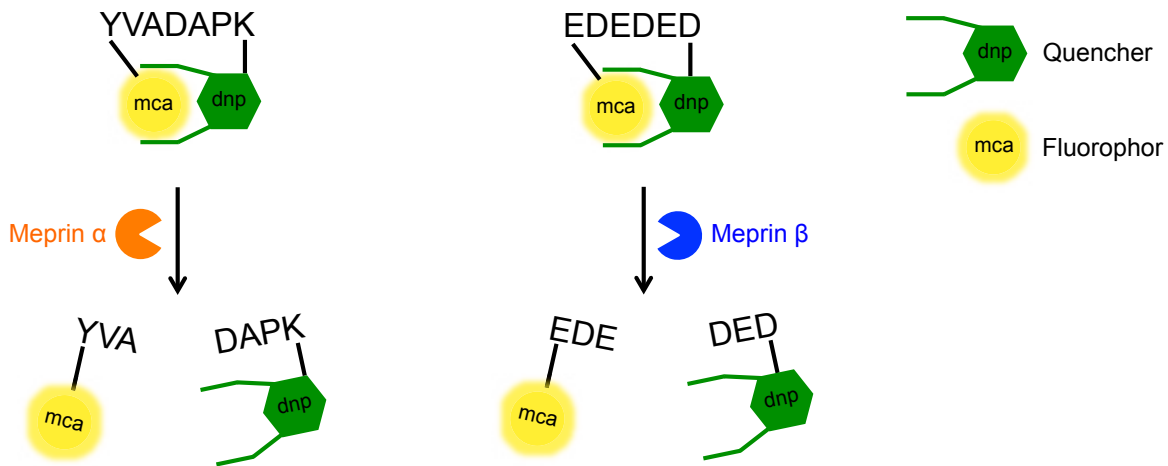
**Tabelle 13: Primärstrukturen der fluorogenen Peptide**

Substrat	Primärstruktur
Meprin $\alpha$	(mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp)
Meprin $\beta$	(mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp)

Die Peptide waren mit dem *quencher* aus 2,4-Dinitrophenyl (dnp) sowie der fluorogenen Gruppe aus (7-Methyloxy coumarin-4-yl)acetyl (mca) gekoppelt (Abbildung 7). Der *quencher* überdeckt die fluorogene Gruppe von nativen Peptiden, sodass bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm nur geringe Fluoreszenz detektiert wird. Nach der proteolytischen Spaltung des Substrates wird die fluorogene Gruppe vom *quencher* getrennt. Dies resultiert im Anstieg der gemessenen Fluoreszenz (Broder und Becker-Pauly 2013).

Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden die gewünschte Konzentration der Enzyme in 20 mM HEPES-Puffer in einem Totalvolumen von 100  $\mu$ l eingesetzt. Unmittelbar vor dem Messstart wurde 10  $\mu$ M Meprin  $\alpha$  respektive 50  $\mu$ M Meprin  $\beta$  Substrat in die Proben hinzugefügt. Die Messung erfolgte in einem Spektrophotometer bei 37°C alle 30 Sekunden für maximal zwei Stunden. Es wurden von jedem Testansatz Triplikate erstellt und die Messwerte von jedem aufgenommenen Zeitpunkt gemittelt, um die Genauigkeit zu erhöhen. Der erste Messwert wurde von den Nachfolgenden abgezogen. Zusätzlich wurde der Pufferleerwert in der Auswertung berücksichtigt. Die absolute Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit der Zeit dargestellt und durch lineare Regression die Steigung der Kurven ermittelt. Diese wurde in den Graphen als relative proteolytische Aktivität in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Die Ausgabe des Graphen erfolgte mit der Software GraphPad Prism.





**Abbildung 7: Bestimmung der Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität mittels fluorogener Peptide**

Informationen aus *Proteomics*-Studien wurden eingesetzt, um Substrate für Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  zu erstellen, die mit *quencher* (dnp) und Fluorophor (mca) gekoppelt waren (Broder und Becker-Pauly 2013). Nach proteolytischer Spaltung des Peptids durch Meprine kann der *quencher* das Fluorophor nicht überdecken. Dies resultiert im Anstieg der gemessenen Fluoreszenz.

### 2.2.2.7 Bestimmung der proteolytischen Aktivität von membrangebundenem Meprin $\beta$

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von membrangebundenem Meprin  $\beta$  basiert auf den in Kapitel 2.2.2.6 beschriebenen Werkzeugen. Transfizierte Zellen (Kapitel 2.2.1.4) wurden vorsichtig mit einem Schaber vom Flaschenboden gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 500 g für fünf Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, das Zellpellet mit 900  $\mu$ l PBS resuspendiert und die Zellzahl der Proben bestimmt (Kapitel 2.2.1.3). Gleiche Zellzahlen wurden in eine Mikrotiterplatte mit 48 Löchern vorgelegt und PBS zugegeben, bis das totale Reaktionsvolumen von 300  $\mu$ l erzielt wurde. Unmittelbar vor dem Messstart wurde das Meprin  $\beta$  spezifische fluorogene Peptid (50  $\mu$ M) den Proben hinzugefügt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Spektrophotometer bei 37°C, das bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm die resultierende Fluoreszenz detektiert. Die Messung erfolgte alle 30 Sekunden für maximal zwei Stunden. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate gebildet und hiervon der Mittelwert bestimmt. Der erste Messwert wurde von den Folgenden abgezogen. Die absolute Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit der Zeit dargestellt und durch lineare Regression die Steigung der Kurven ermittelt. Diese wurde in den Graphen als relative proteolytische Aktivität in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Die Ausgabe der Graphen erfolgte mit der Software GraphPad Prism.

### 2.2.2.8 Bestimmung proteolytischer Spaltstellen durch Massenspektrometrie

Die exakte Spaltposition der Matriptase 2 im Propeptid von Meprin  $\beta$  wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt. Für diese Analyse wurden 10  $\mu\text{g}$  Promeprin  $\beta$  mit 2,05  $\mu\text{g}$  rekombinanter Matriptase 2 oder 5  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender HEK-293 Zellen für acht Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dreifachem Probenpuffer mit DTT und Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten gestoppt. Als Kontrollen wurden 3  $\mu\text{g}$  Promeprin  $\beta$  und Trypsin aktiviertes Meprin  $\beta$  in Probenpuffer genommen und denaturiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) auf einem 7,5 prozentigen Gel bei 200 Volt für 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurde das native Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen (Kapitel 2.2.2.3). Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt.

Die nachfolgenden technischen Analyseschritte wurden dankenswerterweise durch Dr. rer. nat. T. Koudelka (Institut für Experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Systematische Proteomics und Bioanalytik, Prof. Dr. A. Tholey, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt. Die Banden wurden in kleinste Würfel zerschnitten, entfärbt und die Disulfidverbindungen der Proteine durch 10 mM DTT reduziert und irreversibel durch 55 mM Iodacetamid alkyliert. Anschließend wurden die Gelstücke mit 30 mM Formaldehyd und 15 mM Natriumcyanoborhydrid über Nacht bei 25°C inkubiert, um primäre Aminogruppen (Protein N-Terminus und Lysinseitenketten) zu markieren. Die Reaktion wurde gestoppt, indem den Proben Ammoniumhydrogencarbonat im Überschuss hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Gelstücke gewaschen und über Nacht mit 100 ng Chymotrypsin in 20 mM HEPES Puffer mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  inkubiert.

Die Massenspektrometrie wurde bei einer Toleranz von 10 ppm, MS/MS Massentoleranz 0,5 Da für *collision induced dissociation*-Spektrum und 0,02 Da für das *higher energy collision induced dissociation*-Spektrum durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software Mascot, Sequest und MS Amanda ausgewertet.

### 2.2.2.9 Expression und Reinigung von rekombinantem Promeprin $\alpha$ und Promeprin $\beta$

Rekombinantes Promeprin  $\alpha$  und Promeprin  $\beta$  wurde wie publiziert exprimiert und gereinigt (Becker et al. 2003, Becker-Pauly et al. 2007). Zusammengefasst, wurden die Meprine heterolog in Insektenzellen (BTI-TN-5B1-4) exprimiert. Dies erfolgte mit dem *Bac-to-Bac* System (Thermo Fischer Scientific, Waltham) gemäß den Herstellerangaben. Das N-terminal mit Streptavidin markierte Promeprin  $\alpha$  und Polyhistidin markierte Promeprin  $\beta$  wurde mit einer Streptactin (IBA, Göttingen) beziehungsweise Ni-NTA (Quiagen, Venlo) Affinitätschromatographie gereinigt. Es folgten die Konzentration der Eluate und die Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Aliquots wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2.10 Generierung von konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen und rekombinanter Matriptase 2

Konditioniertes Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen und rekombinante Matriptase 2 wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. M. Stirnberg (Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) bereitgestellt. Die Generierung erfolgte wie veröffentlicht (Stirnberg et al. 2010, Jäckle et al. 2015). Zusammengefasst, wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293) mit dem Expressionsvektor pcDNA4-MT2-Myc-His stabil transfiziert. Dieser kodiert für das Matriptase 2 Protein mit C-terminalen cMyc und Polyhistidin Markern. Für Kontrollansätze wurden Zellen mit dem Leervektor pcDNA4 (Mock) transfiziert. Die konditionierten Medien wurden anschließend konzentriert. Die Reinigung von rekombinanter Matriptase 2 erfolgte durch Affinitätschromatographie mit einer HisPur Cobalt Spin Säule (Thermo Fisher Scientific, Waltham) gemäß Herstellerangaben. Die gewonnenen Aliquots wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.2.11 Maturierung von rekombinantem Promeprin $\beta$ mit konditioniertem Medium und rekombinanter Matriptase 2

Die proteolytischen *in vitro* Prozessierungen für Western Blot Studien wurden durchgeführt, indem 100  $\mu\text{g}$  rekombinantes Promeprin  $\beta$  (Kapitel 2.2.2.9) mit Matriptase 2 oder pcDNA4 (Mock) konditioniertem Medium (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Kapitel 2.2.2.10) für 1, 30 und 60 Minuten in einem HEPES gepufferten Mastermix (170  $\mu\text{l}$  Totalvolumen) bei 37°C inkubiert wurden. Zu jedem genannten Zeitpunkt wurde 50  $\mu\text{l}$  vom Hauptansatz abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von dreifachem Probenpuffer mit DTT und Denaturieren bei 95°C für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurden alle Proben auf 7,5 prozentige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Es folgten Immunoblot Analysen (Kapitel 2.2.2.4, 2.2.2.5).

#### 2.2.2.12 Maturierung von rekombinantem humanem Prokollagen I mit Meprin $\alpha$

Für Untersuchungen der Kollagen Maturierung wurde als Kontrolle rekombinantes Kollagen I verwendet, das mit Meprin  $\alpha$  prozessiert wurde. Für diese Analyse wurde in Hefezellen (*Pichia pastoris*) exprimiertes humanes Prokollagen I (40 nM) mit 0,3 nM rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$  für zehn Minuten bei 37°C in HEPES Puffer (Totalvolumen: 50  $\mu\text{l}$ ) prozessiert (Broder et al. 2013). Die Reaktion wurde durch Zugabe von dreifachem Probenpuffer und Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten beendet. Abschließend wurden die Proben aliquotiert und bei -20°C eingelagert. Auf 1,5 mm Polyacrylamid-Gele wurde 15  $\mu\text{l}$  Probenvolumen aufgetragen.

#### 2.2.2.13 Proteolytische Prozessierung von Kollagen VI mit Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$

Die proteolytischen *in vitro* Prozessierungen wurden durchgeführt, indem humanes *full length* Kollagen VI (5  $\mu\text{g}$ ) mit rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$  (5 nM/ 100 nM) oder porcinem Trypsin (1,7  $\mu\text{M}$ / 3,4  $\mu\text{M}$ ) für zwei Stunden bei 37°C in HEPES Puffer (50  $\mu\text{l}$  Totalvolumen) inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dreifachem Probenpuffer mit DTT und Denaturieren bei 95°C für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurden die Proben (je 15  $\mu\text{l}$ ) auf zehn prozentige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Proteine wurden in den Gelen durch Coomassie-Färbungen (Kapitel 2.2.2.3) dargestellt.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden dienen der Vervielfältigung von zur Transfektion benötigten Plasmiden. Dank gilt dem hilfswissenschaftlichem Mitarbeiter Florian Peters und der Auszubildenden technischen Assistentin Wiona Burmeister für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

#### 2.2.3.1 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue

Die Fremd-DNA wurde mittels Transformation in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue eingebracht. Hierfür wurde *E. coli* Bakterienlösung auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid-DNA den Bakterien hinzugefügt. Nachfolgend wurde sorgfältig gemischt und der Ansatz in die gereinigte Elektroporations-Küvette gegeben. Die Zellmembran wurde vorübergehend durch Elektroporation mit 2,5 kV permeabilisiert, damit die zugegebene Fremd-DNA in die Bakterien gelangen kann.

#### 2.2.3.2 Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmiden durch Midi-Präparation

Im Anschluss an die Transformation (Kapitel 2.2.3.1) wurde die Bakteriensuspension mit 150 µl LB-Medium resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf einem Wärmemixer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Bakteriensuspension mit einem flambierten Spatel auf Antibiotikum beinhaltende LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein einzelner Klon unter sterilen Bedingungen mit einer Pipetten-Spitze abgenommen, in eine 50 ml Röhre mit antibiotikahaltigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Rollermixer bei 200 rpm (*revolutions per minute*) inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde auf zwei Röhren aufgeteilt, bei 4000 rpm (Biofuge Primo R) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra Midi Prep Kit* nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Bakterienpellets mit je 4 ml Resuspensionspuffer in Lösung gebracht und die Röhren gründlich gevortext. Anschließend wurden die Bakterien mit 8 ml Lysepuffer lysiert, invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde 8 ml Neutralisationspuffer hinzugefügt und erneut invertiert.

Nachdem die Säule durch Zugabe von 12 ml Equilibrierungspuffer equilibriert war, wurde das Lysat auf die Säule aufgetragen. Nachfolgend wurde der Filter mit 5 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und entfernt. Die Säule wurde mit 8 ml Waschpuffer gewaschen und 5 ml Elutionspuffer hinzugefügt. Das Eluat wurde zu 1 ml Fraktionen in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, 700 µl Isopropanol hinzugefügt und gevortext. Die Proben wurden für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 15.000 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 prozentigen Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde bei 37°C für 15-30 Minuten getrocknet. Abschließend wurde das Pellet mit 20 µl DEPC-Wasser in einem Thermomixer mit 500 rpm bei 37°C für 15 Minuten gelöst. Die Fraktionen wurden vereint und die erzielte DNA-Konzentration mittels Spektrophotometer bestimmt (Kapitel 2.2.3.3).

### 2.2.3.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einem Nanodrop Spektrophotometer nach den Angaben des Herstellers. Es wurde von der zu analysierenden Probe 1 µl auf die Messvorrichtung des Gerätes pipettiert und anschließend die Absorption bei 260 nm gemessen. Die aromatischen Ringe der Basen sind für das Absorptionsmaximum verantwortlich. Durch Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ( $E = \epsilon \times c \times d$ ; E=Extinktion,  $\epsilon$ =Extinktionskoeffizient, c=Konzentration, d=Dicke der Küvette) wurde die DNA-Konzentration der Probe bestimmt. Sie wurde von der Nanodrop Software in ng/µl ausgegeben.

## 2.2.4 Statistische Analyseverfahren

Die proteolytische Aktivität des membrangebundenen Meprin  $\beta$  wurde statistisch ausgewertet, indem der absolute Fluoreszenzwert von Meprin  $\beta$ / Mock Proben zum Zeitpunkt 60 Minuten gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Die weiteren Proben des Experiments wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Das Experiment wurde insgesamt fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt, um ausreichend biologische Replikate zu erstellen.

Die Messwerte wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung untersucht. Anschließend erfolgte die multivariante Varianz-Analyse (ANOVA) mit anschließender Schefé-Adjustierung der p-Werte. Die statistische Auswertung wurde dankenswerterweise von Dr. rer. nat. S. Freitag-Wolf (Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) mit der Statistiksoftware SPSS durchgeführt. In Diagrammen sind die errechneten p-Werte durch Sterne gekennzeichnet (\* =  $p < 0,5$ ; \*\* =  $p < 0,1$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Regulation der proteolytischen Aktivität des membrangebundenen Meprin $\beta$

Die im Folgenden beschriebenen Daten wurden im Fachjournal „*Biochemical Journal*“ publiziert (Jäckle et al. 2015) (Kapitel 7.1.3). Die wichtigsten Befunde des Projektes sind zusammenfassend dargestellt.

##### 3.1.1 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch lösliches Trypsin aktiviert

Es sollte die Hypothese, dass eine Aktivierung von membrangebundenen Promeprin  $\beta$  nicht durch lösliche Serinproteasen erfolgen kann, überprüft werden. Für diese Untersuchung wurde aus der Gruppe der löslichen Serinproteasen pankreatisches Trypsin ausgewählt, weil diese Protease als der potenteste Aktivator von löslichem Meprin  $\beta$  bekannt ist (Ohler et al. 2010).

Es wurden in Doppelansätzen COS-7 Zellen mit Meprin  $\beta$  transfiziert sowie Kontrollansätze mit pCDNA 3.1 (Mock) erstellt (Kapitel 2.2.1.4). Das pankreatische Trypsin wurde in einer Konzentration von 5 nM im Zellmedium der Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen eingesetzt (Kapitel 2.2.1.5). Als Vergleich dienten Meprin  $\beta$  transfizierte Zellen, in deren Medium kein Trypsin hinzugefügt wurde. Nach einer Inkubation von 24 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen (Kapitel 2.2.1.6). Diese wurden nachfolgend separiert, um von jedem Ansatz sowohl Immunoblot Analysen erstellen als auch die Meprin  $\beta$  Aktivität auf der Zelloberfläche bestimmen zu können.

Für Immunoblot Analysen wurden die COS-7 Zellen lysiert (Kapitel 2.2.1.6) und die Proteine des Lysates durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Promeprin  $\beta$  Maturierung wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B-1 untersucht (Abbildung 8A) (Kapitel 2.2.2.5). Die Ladungskontrolle erfolgte durch einen Aktin Immunoblot.



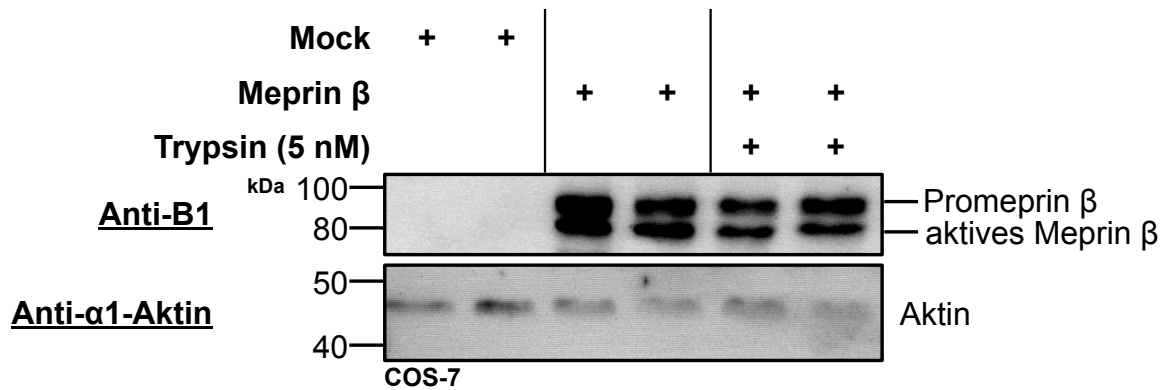
In den pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten COS-7 Zellen konnte erwartungsgemäß kein Meprin  $\beta$  Signal detektiert werden. Die Meprin  $\beta$  transfizierten Ansätze zeigten Banden für Promeprin  $\beta$  bei 90 kDa und der aktiven Protease bei 80 kDa. Im Fall der Aktivierung von membranständigem Promeprin  $\beta$  durch lösliches Trypsin wäre im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrolle eine reduzierte Signalintensität der Promeprin  $\beta$  Bande bei gleichzeitig intensiver Bande des aktiven Meprin  $\beta$  zu erwarten gewesen. Das Verhältnis der Bandenintensitäten von Zymogen und aktivem Meprin  $\beta$  unterschied sich nicht zwischen Trypsin inkubierten Ansätzen und den nicht inkubierten Kontrollen.

Das mit Immunoblots erzielte Ergebnis sollte um die Bestimmung der proteolytischen Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität ergänzt werden. Für diese Analyse wurden die COS-7 Zellen mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen fluorogenen Peptid (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) inkubiert. Die resultierende Fluoreszenz wurde in einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation von 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten gemessen (Kapitel 2.2.2.7). Die resultierende Fluoreszenz ist in Abbildung 8B in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Von den in Abbildung 8A abgebildeten Doppelansätzen ist von jedem Transfektionsansatz jeweils ein Beispiel gezeigt.

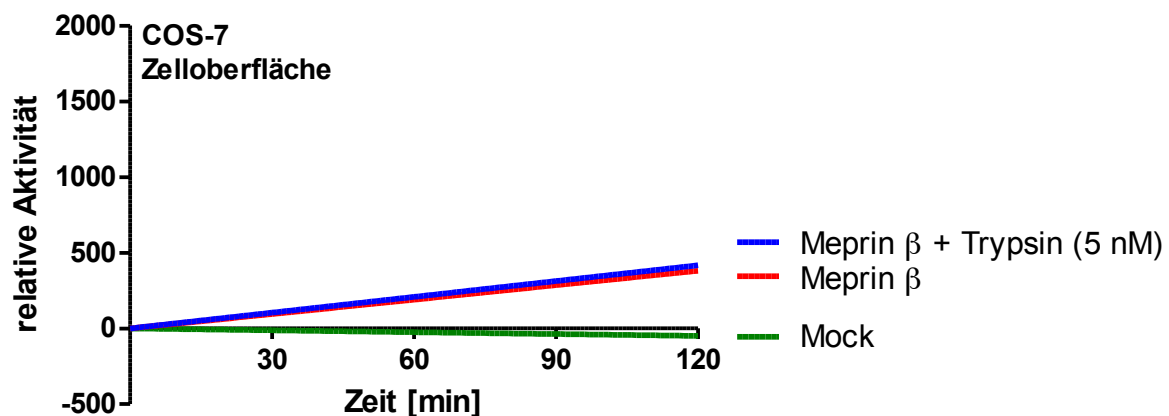
Auf Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen, die nicht mit Trypsin inkubiert wurden, konnte eine basale proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität auf der Zelloberfläche gemessen werden. Die Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität lag auf den mit Trypsin inkubierten Zellen ebenfalls in diesem basalen Bereich. Aus diesem Grund erfolgte keine Aktivierung des membrangebundenen Promeprin  $\beta$  durch lösliches Trypsin. In den pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten COS-7 Zellen konnte erwartungsgemäß keine ansteigende Fluoreszenz gemessen werden.

Aus den Western Blot Analysen und Aktivitätsassays konnte geschlossen werden, dass membrangebundenes Promeprin  $\beta$  nicht durch pankreatisches lösliches Trypsin maturiert werden kann.

A)



B)



### Abbildung 8: Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch pankreatisches Trypsin aktiviert

COS-7 Zellen wurden in Doppelansätzen mit Meprin  $\beta$  oder pCDNA 3.1 (Mock) transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Anschließend wurde ein Doppelansatz der Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen mit 5 nM pankreatischem Trypsin für 24 Stunden inkubiert. Die geernteten Zellen wurden separiert, um von jedem Ansatz Immunoblot Analysen erstellen und die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche bestimmen zu können.

**A)** Für Immunoblot Analysen wurden die Zellen lysiert (Kapitel 2.2.1.6) und die Proteine durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Maturierung von Promeprin  $\beta$  wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B-1 untersucht (Kapitel 2.2.2.5). In pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten Zellen war erwartungsgemäß kein Meprin  $\beta$  Signal erkennbar. Die Meprin  $\beta$  transfizierten Ansätze zeigten Banden für das Zymogen bei 90 kDa und die aktive Protease bei 80 kDa. Das Verhältnis der Bandenintensitäten von Zymogen und aktiver Protease in den Trypsin inkubierten Zellen glich der nicht inkubierten Kontrolle. Das membrangebundene Promeprin  $\beta$  wurde deshalb nicht durch lösliches Trypsin maturiert. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

**B)** Die Bestimmung der Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität erfolgte mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp). Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Anregung von 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7). Die Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität der Trypsin inkubierten Zellen war im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrolle nicht erhöht. Auf pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten Zellen konnte keine ansteigende Fluoreszenz gemessen werden.

kDa: kilo Dalton

mca: (7-Methyloxycoumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

### 3.1.2 Rekombinantes Promeprin $\beta$ wird durch Matriptase 2 (TMPRSS 6) aktiviert

Es sollte untersucht werden, ob die Serinprotease Matriptase 2 (TMPRSS 6) rekombinantes Promeprin  $\beta$  aktivieren kann. Für diese Untersuchung wurden Prozessierungsansätze mit Promeprin  $\beta$  und Matriptase 2 erstellt, gefolgt von Immunoblot Untersuchungen und der Bestimmung der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität.

Um grundsätzlich die Aktivierungskapazität festzustellen, wurde rekombinantes lösliches Promeprin  $\beta$  (100 nM) mit konditioniertem Medium löslicher Matriptase 2 überexprimierender Zellen für 1, 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Kapitel 2.2.2.10, 2.2.2.11). Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit unbehandeltem rekombinantem Promeprin  $\beta$  erstellt. Als Positivkontrolle diente Trypsin aktiviertes Meprin  $\beta$ . Die Aktivierung erfolgte mit Trypsin, da es als potenter Aktivator von rekombinantem löslichem Promeprin  $\beta$  bekannt ist (Ohler et al. 2010).

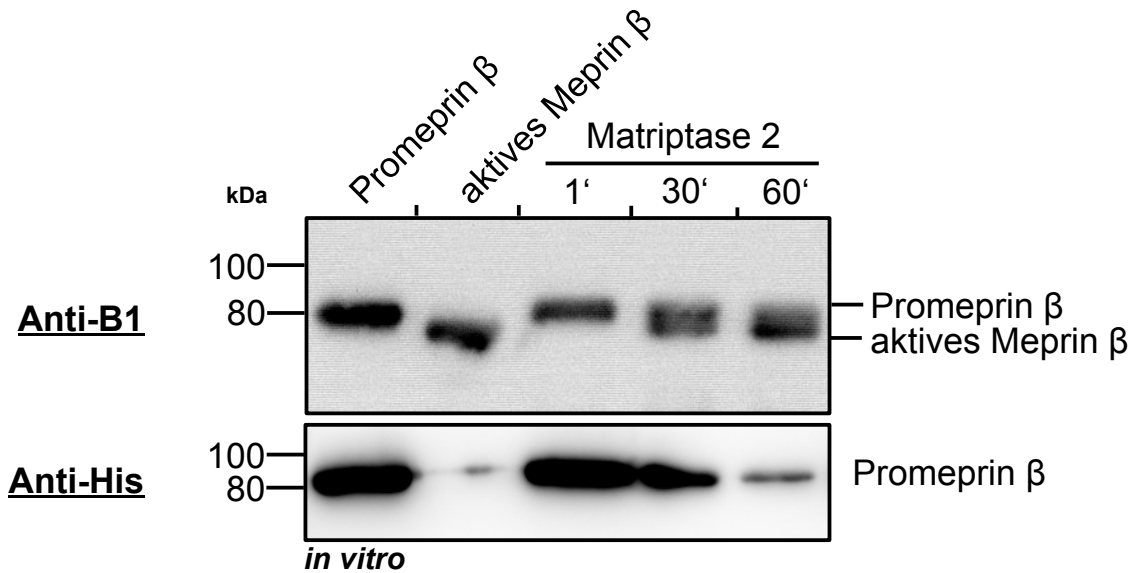
Anschließend wurden die Proteine der Prozessierungsansätze durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Untersuchung der Promeprin  $\beta$  Aktivierung erfolgte im Immunoblot (Kapitel 2.2.2.5) mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B1. Die Maturierung des Zymogens konnte zusätzlich mit einem monoklonalen His-Tag Antikörper untersucht werden, weil nur am Propeptid von Meprin  $\beta$  ein entsprechender Polyhistidin Marker vorhanden ist (Abbildung 9).

Promeprin  $\beta$  wurde im unbehandelten Kontrollansatz bei beiden Immunoblots in einer Bande bei 80 kDa detektiert. Das mit Trypsin aktivierte Meprin  $\beta$  wurde im Anti-B1 Immunoblot in einer Bande unterhalb von 80 kDa sichtbar. Entsprechend zeigte sich im Anti-His Immunoblot nur ein sehr schwaches Signal für das Zymogen. Die Inkubation von Promeprin  $\beta$  mit konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen resultierte in beiden Immunoblots in der zeitabhängigen Abnahme des Zymogen Signals. Gleichzeitig konnte im Anti-B1 Immunoblot ab dem 30 Minuten inkubierten Ansatz ein Signal unterhalb von 80 kDa für das aktive Meprin  $\beta$  erkannt werden. Der 60 Minuten inkubierte Ansatz zeigte im Vergleich zum 30 Minuten inkubierten Ansatz eine intensivere Bande für aktives Meprin  $\beta$ .

Die im Immunoblot beobachtete Maturierung von Promeprin  $\beta$  sollte um die Messung der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität ergänzt werden. Für diese Untersuchung wurde 5 nM Promeprin  $\beta$  mit verschiedenen Konzentrationen (80, 160 und 240 nM) rekombinanter Matriptase 2 inkubiert (Kapitel 2.2.2.11).

Die Meprin  $\beta$  Aktivität wurde in einem Spektrophotometer mit dem spezifischen fluorogenen Peptid (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) durch Messung der Fluoreszenz bei einer Anregung von 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten bestimmt (Kapitel 2.2.2.6). Die Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (Abbildung 10).

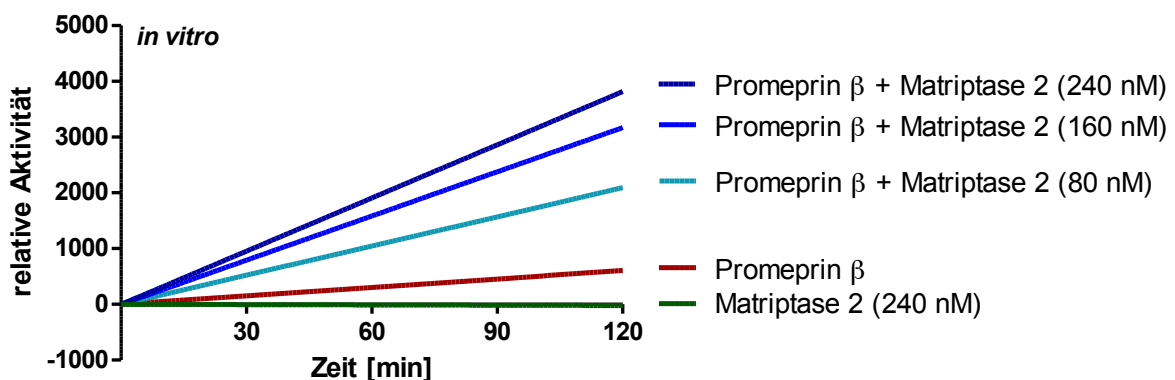
Das unbehandelte lösliche Promeprin  $\beta$  zeigte eine geringe Basalaktivität. Die Inkubation des Zymogens mit rekombinanter löslicher Matriptase 2 (80 nM) resultierte in einer gesteigerten proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität. Der Grad der Aktivitätssteigerung von Meprin  $\beta$  konnte jeweils erhöht werden durch Steigerung der verwendeten Matriptase 2 Konzentration auf 160 und 240 nM. Als Kontrolle wurde das fluorogene Peptid mit 240 nM rekombinanter Matriptase 2 inkubiert, um eine unspezifische Spaltung des Peptids durch die Matriptase 2 auszuschließen. In dieser Probe konnte kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden.



**Abbildung 9: Lösliche Matriptase 2 maturiert rekombinantes lösliches Promerin  $\beta$**

Rekombinantes Promerin  $\beta$  (100 nM) wurde mit konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen für 1, 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Kapitel 2.2.2.9, 2.2.2.11). Als Kontrolle wurden Ansätze mit unbehandeltem rekombinantem Promerin  $\beta$  und Trypsin aktiviertem Meprin  $\beta$  erstellt. Anschließend wurden die Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und die Maturierung von Promerin  $\beta$  im Immunoblot mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B1 und einen monoklonalen His-Tag Antikörper untersucht (Kapitel 2.2.2.5). Das unbehandelte Promerin  $\beta$  wurde in beiden Immunoblots bei etwa 80 kDa detektiert. Die Probe mit Trypsin aktivierten Meprin  $\beta$  zeigte im Anti-B1 Immunoblot eine Bande unter 80 kDa und gleichzeitig im Anti-His Immunoblot fast keine Promerin  $\beta$  Bande. Die Inkubation des Zymogens mit konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen resultierte in beiden Immunoblots zeitabhängig in verminderten Promerin  $\beta$  Banden. Das Signal des aktiven Meprin  $\beta$  war im Anti-B1 Immunoblot in den 30 und 60 Minuten inkubierten Ansätzen erkennbar.

kDa: kilo Dalton



**Abbildung 10: Rekombinante lösliche Matriptase 2 aktiviert rekombinantes lösliches Promerin  $\beta$**

Rekombinantes Promerin  $\beta$  (5 nM) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (80, 160 und 240 nM) rekombinanter Matriptase 2 (Kapitel 2.2.2.11) inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität mit dem fluorogenen Peptid (mca)-EDED-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten gemessen (Kapitel 2.2.2.6). Promerin  $\beta$  zeigte eine geringe basale Aktivität. Die Inkubation des Zymogens mit rekombinanter Matriptase 2 resultierte abhängig von der verwendeten Konzentration in gesteigerter Meprin  $\beta$  Aktivität. Als Kontrolle wurde das fluorogene Peptid nur mit rekombinanter Matriptase 2 (240 nM) inkubiert. In diesem Ansatz konnte keine ansteigende Fluoreszenz gemessen werden.

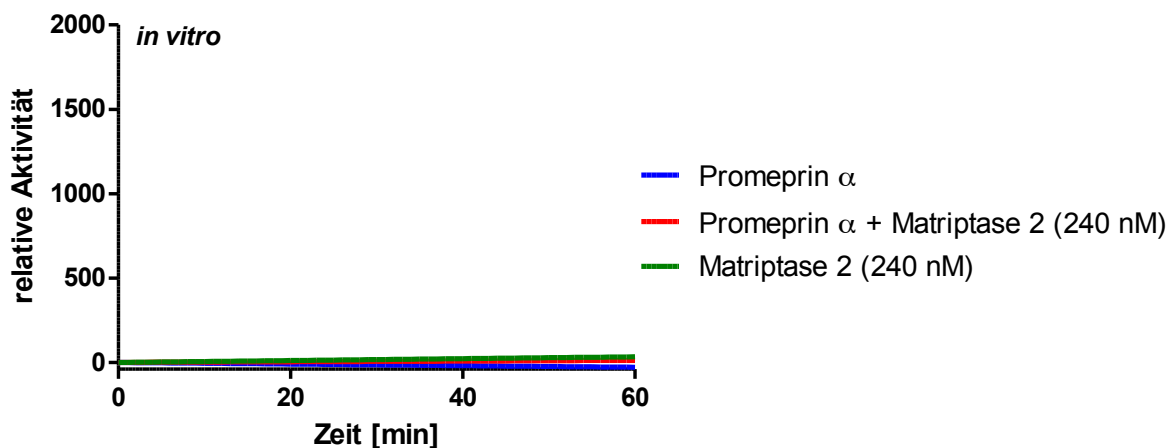
mca: (7-Methyloxycoumarin-4-yl) acetyl  
dnp: 2,4-Dinitrophenyl

### 3.1.3 Rekombinantes Promeprin $\alpha$ wird nicht durch rekombinante Matriptase 2 aktiviert

Nach Identifikation der Matriptase 2 als Aktivator von rekombinarem löslichem Promeprin  $\beta$  sollte untersucht werden, ob diese Serinprotease ebenfalls rekombinantes Promeprin  $\alpha$  aktivieren kann.

Für diese Analyse wurde 5 nM Promeprin  $\alpha$  mit 240 nM rekombinanter Matriptase 2 inkubiert. Die proteolytische Mepirin  $\alpha$  Aktivität wurde mit dem fluorogenen Peptid (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) durch Messung der Fluoreszenz in einem Spektrophotometer bei 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 60 Minuten bestimmt (Kapitel 2.2.2.6). Die gemessene Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (Abbildung 11).

Promeprin  $\alpha$  zeigte im Gegensatz zu Promeprin  $\beta$  (Abbildung 10) keine Basalaktivität. Die Inkubation von Promeprin  $\alpha$  mit rekombinanter Matriptase 2 resultierte nicht in einem Anstieg der proteolytischen Mepirin  $\alpha$  Aktivität. Als Kontrolle wurde das fluorogene Peptid mit 240 nM rekombinanter Matriptase 2 inkubiert, um eine unspezifische Spaltung des Peptids auszuschließen. Dieser Ansatz zeigte keinen Anstieg der Fluoreszenz.



**Abbildung 11: Rekombinante Matriptase 2 ist kein Aktivator von rekombinarem Promeprin  $\alpha$**

Rekombinantes Promeprin  $\alpha$  (5 nM) wurde mit 240 nM rekombinanter Matriptase 2 inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Mepirin  $\alpha$  Aktivität mit dem fluorogenen Peptid (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 60 Minuten gemessen (Kapitel 2.2.2.6). Das mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierte Promeprin  $\alpha$  zeigte wie das unbehandelte Zymogen keinen Anstieg der Fluoreszenz. Als Kontrolle wurde das fluorogene Peptid nur mit rekombinanter Matriptase 2 (240 nM) inkubiert. Dieser Ansatz zeigte keine ansteigende Fluoreszenz.

mca: (7-Methyloxycoumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

### 3.1.4 Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Spaltstellen in Promeprin $\beta$

Die mit Aktivitätsmessungen und Immunoblots gezeigte Promeprin  $\beta$  Aktivierung durch rekombinante Matriptase 2 (Kapitel 3.1.2) sollte mit Massenspektrometrie gestützter Identifikation der proteolytischen Spaltstellen in Promeprin  $\beta$  validiert werden.

Für diese Untersuchung wurde 10  $\mu$ g rekombinantes Promeprin  $\beta$  mit rekombinanter Matriptase 2 oder konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen für acht Stunden bei 37°C inkubiert (Kapitel 2.2.2.8). Als Kontrollen dienten mit Trypsin aktiviertes Meprin  $\beta$  sowie unbehandeltes Promeprin  $\beta$ . Die Proteine wurden anschließend auf ein Polyacrylamidgel geladen, durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) getrennt und mit Coomassie-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) angefärbt (Abbildung 12A).

Das unbehandelte Promeprin  $\beta$  war bei 85 kDa und mit Trypsin aktiviertes Meprin  $\beta$  in einer Bande bei 75 kDa zu detektieren. Wie erwartet, waren in dem Ansatz mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierten Promeprin  $\beta$  Proteinbanden für das Zymogen und aktives Meprin  $\beta$  erkennbar. Allerdings war die Bande des aktiven Meprin  $\beta$  von schwächerer Intensität als im Ansatz mit Trypsin aktivierten Meprin  $\beta$ . Der mit konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen inkubierte Promeprin  $\beta$  Ansatz, enthielt zwischen 70 und 85 kDa zwei nicht eindeutig abgrenzbare Proteinbanden für Pro- und aktives Meprin  $\beta$ . Weitere Proteinbanden zeigten sich bei 55 und 65 kDa, deren Inhalt zu diesem Zeitpunkt unbekannt war. Die Proteinbande bei 85 kDa war von schwächerer Intensität als die bei 75 kDa liegende. Gleichfalls hatte die 85 kDa Bande eine geringere Intensität als die Promeprin  $\beta$  Proteinbande in der Kontrolle mit unbehandeltem Zymogen. Die Bande des aktiven Meprin  $\beta$  war stärker als in dem mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierten Ansatz.

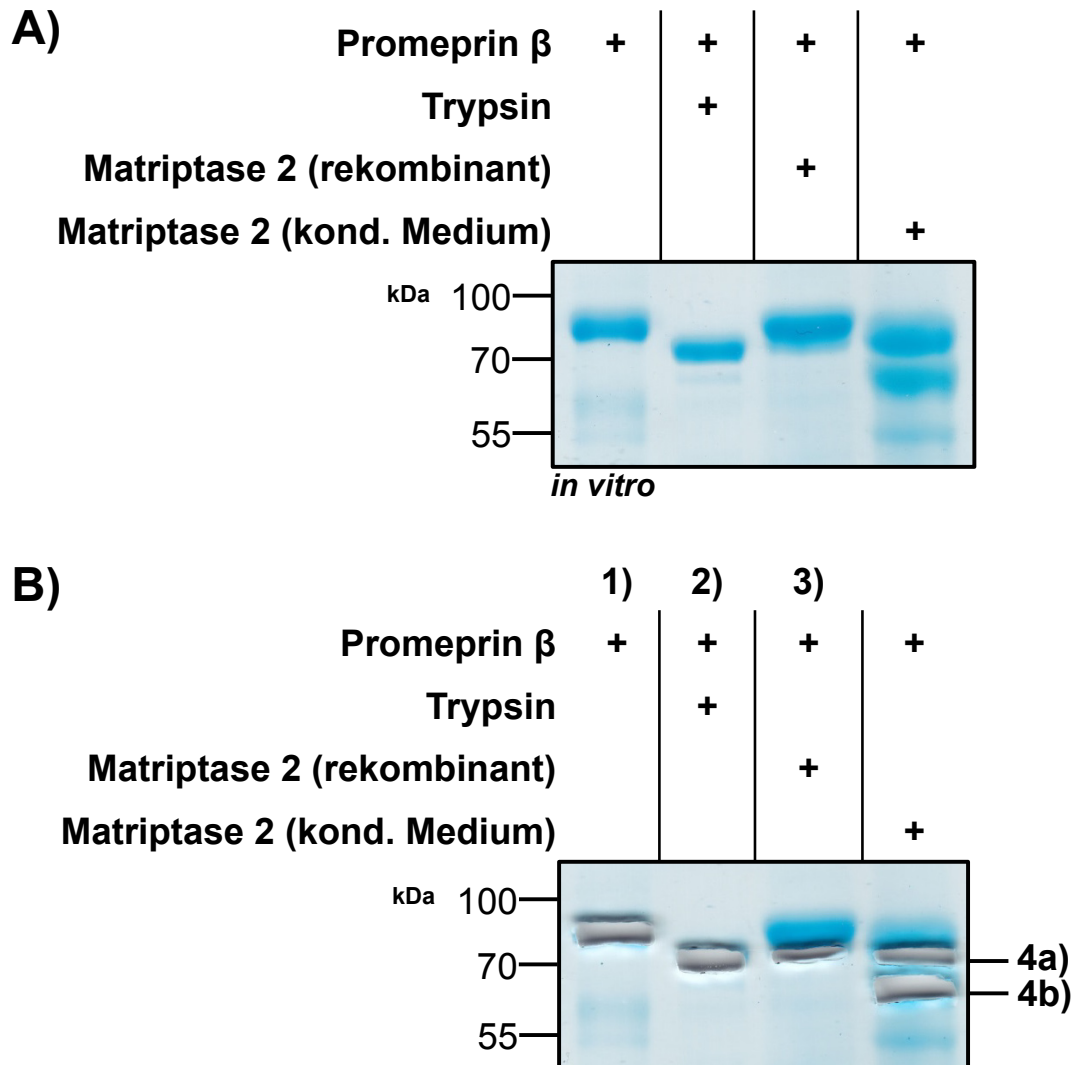
Anschließend wurden die Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten (Abbildung 12B) und für die massenspektrometrischen Analysen vorbereitet (Kapitel 2.2.2.8). Es wurde eine chemische Markierungs-Strategie durchgeführt, mit dem Ziel die Matriptase 2 verursachten proteolytischen Spaltstellen in Promeprin  $\beta$  zu identifizieren. Die Proben wurden vor dem enzymatischen Verdau mit der Arbeitsprotease reaktiv dimethyliert, um Trypsin oder Matriptase 2 generierte neo N-termini von den Spaltstellen der verdauenden Arbeitsprotease zu differieren.

Die LC-MS/MS Analysen erfolgten durch Dr. rer. nat. T. Koudelka (Institut für Experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Systematische Proteomics und Bioanalytik, Prof. Dr. A. Tholey, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) mit den in Kapitel 2.2.2.8 aufgeführten Messparametern. Die generierten Daten wurden mit der Humanproteom-Datenbank (UniprotKB/ SwissProt, *reviewed*) abgeglichen. In der Auswertung wurden nur sehr sichere Peptididentifikationen (<1% FDR) berücksichtigt.

Die mit Massenspektrometrie identifizierten Peptide sind in der vollständigen Promeprin  $\beta$  Aminosäuresequenz grün markiert dargestellt (Abbildung 13). Rot gefärbt sind N-terminale Aminosäuren, die durch die chemische Markierungs-Strategie dimethyliert wurden. An diesen Positionen erfolgte proteolytische Spaltung durch Trypsin oder Matriptase 2.

In allen untersuchten Proben (Bande 1-4b, Abbildung 12) wurden mindestens zehn in der Größe differierende Peptide mit Promeprin  $\beta$  entsprechenden Aminosäuresequenzen erkannt. In der unbehandelten Promeprin  $\beta$  Kontrolle (Bande 1) war erwartungsgemäß kein Peptid mit N-terminal markierter Aminosäure enthalten. Der Ansatz mit Trypsin aktiviertem Meprin  $\beta$  (Bande 2) enthielt an Asn 62 ein N-terminal dimethyliertes Peptid. Die Proben mit rekombinanter Matriptase 2 (Bande 3) und Matriptase 2 konditioniertem Medium (4a) beinhalteten ebenfalls beide an Asn 62 N-terminal dimethylierte Peptide. Dieses Messergebnis konnte mit LC-MSMS durch Detektion des starken  $\alpha_1$ -Ion Peak, der für N-terminal dimethylierte Aminosäuren charakteristisch ist, validiert werden (Abbildung 37). Daraus folgte, dass Matriptase 2 das Meprin  $\beta$  Propeptid proteolytisch an Position Arg 61/Asn 62 spaltet. Die Probe der Bande 4b enthielt im Vergleich zu Bande 4a keine zusätzlichen Spaltstellen. In dem Ansatz mit Trypsin aktivierten Meprin  $\beta$  (Bande 2) konnte N-terminal von Asn 62 eine zusätzliche Spaltstelle detektiert werden, die nicht in der LC-MSMS Messung validiert werden konnte.





**Abbildung 12: Für massenspektrometrische Analysen verwendete Polyacrylamidgelle zur Identifizierung der Matriptase 2 Spaltstelle in Promeprin  $\beta$**

Rekombinantes Promeprin  $\beta$  (10  $\mu$ g) wurde mit rekombinanter Matriptase 2 oder konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen für acht Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente unbehandeltes Promeprin  $\beta$  sowie Trypsin aktiviertes Meprin  $\beta$ . Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und im Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Färbung dargestellt (Kapitel 2.2.2.3).

**A)** Promeprin  $\beta$  war bei etwa 85 kDa und das Trypsin aktivierte Meprin  $\beta$  in einer Bande bei 75 kDa zu detektieren. Der Prozessierungsansatz mit rekombinanter Matriptase 2 zeigte unter dem Zymogen bei 75 kDa die Bande des aktivierten Meprin  $\beta$ . Das mit konditioniertem Medium Matriptase 2 überexprimierender Zellen behandelte Promeprin  $\beta$  wurde ebenfalls maturiert. Dies zeigte sich in der vermindert intensiven Promeprin  $\beta$  Proteinbande und verstärkten Bande der aktiven Protease. Zusätzlich waren in dieser Probe weitere Proteinbanden bei 55 und 65 kDa detektierbar, deren Inhalt zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war.

**B)** Aus dem in A) gezeigten Polyacrylamidgel wurden die interessierenden Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Reaktionsgefäße überführt und für massenspektrometrische Analysen vorbereitet (Kapitel 2.2.2.8).

kDa: kilo Dalton

kond.: konditioniert

Promepirin  $\beta$  (Bande 1):

```

1 MDLWNLWFL FLDALLVISG LATPENFDVD GGMDQDIFDI NEGLGLDLFE GDIRLDRAQI RNSIIGEKYR WPHTIPYVLE 80
81 DSLEMNARGV ILNAEERYRL KTCIDFKPWA GETNYISVFK GSGCWSSVGN RRVGKQELSI GANCDRIATV QHEFLHALGF 160
161 NHEQSRSDRD DYVRIMWDRI LSGREHNFT YSDDISDSL NVPYDYSVMH YSKTAFQNGT EPTIVTRISD FEDVIGORMD 240
241 FSDSDLI KLN QLYNCSSSL S FMDSCSFELE NVCGMIOSSG DNADWQRVSO VPRGPESDHS NMGCCQSGSF FMHFDSSSVN 320
321 VGATAVLESR TLYPKRGFC LQFVLYNNGS ESDQLNIYIR EYSADNVDGN LTLVEEIKI PTGSW QLYHV TLKVTKKFRV 400
401 VFGRRKGS GA SLGGLSIDI NLSETRCPHH IWHIRNFTQF IGSPNGTLYS PPFYSSKGYA FQIYLNLAHV TNAGIYFHLI 480
481 SGANDDQLQW PCPWOQATMT LLDQNPDIRO RMSNORSITT DPFMTDNGN YFWDREPSKVG TVALF SNGTQ FRRGGGYGTS 560
561 AFITHERLKS RDFIKGDDVY ILLTVEDISH I NSTQIQLT P APSVQDLCSK TTCKNDGVCT VRDGKAECRC QSGEDWWYMG 640
641 ERCEKRGSTR DTIVIAVSST VAVFALMLII TLVSVYCTR K YRERMSSNR PNLTPQNQHA F 701

```

Promepirin  $\beta$  + Trypsin (Bande 2):

```

1 MDLWNLWFL FLDALLVISG LATPENFDVD GGMDQDIFDI NEGLGLDLFE GDIRLDRAQI RNSIIGEKYR WPHTIPYVLE 80
81 DSLEMNARGV ILNAEERYRL KTCIDFKPWA GETNYISVFK GSGCWSSVGN RRVGKQELSI GANCDRIATV QHEFLHALGF 160
161 NHEQSRSDRD DYVRIMWDRI LSGREHNFT YSDDISDSL NVPYDYSVMH YSKTAFQNGT EPTIVTRISD FEDVIGORMD 240
241 FSDSDLI KLN QLYNCSSSL S FMDSCSFELE NVCGMIOSSG DNADWQRVSO VPRGPESDHS NMGCCQSGSF FMHFDSSSVN 320
321 VGATAVLESR TLYPKRGFC LQFVLYNNGS ESDQLNIYIR EYSADNVDGN LTLVEEIKI PTGSW QLYHV TLKVTKKFRV 400
401 VFGRRKGS GA SLGGLSIDI NLSETRCPHH IWHIRNFTQF IGSPNGTLYS PPFYSSKGYA FQIYLNLAHV TNAGIYFHLI 480
481 SGANDDQLQW PCPWOQATMT LLDQNPDIRO RMSNORSITT DPFMTDNGN YFWDREPSKVG TVALF SNGTQ FRRGGGYGTS 560
561 AFITHERLKS RDFIKGDDVY ILLTVEDISH I NSTQIQLT P APSVQDLCSK TTCKNDGVCT VRDGKAECRC QSGEDWWYMG 640
641 ERCEKRGSTR DTIVIAVSST VAVFALMLII TLVSVYCTR K YRERMSSNR PNLTPQNQHA F 701

```

Promepirin  $\beta$  + rekombinante Matriptase 2 (Bande 3):

```

1 MDLWNLWFL FLDALLVISG LATPENFDVD GGMDQDIFDI NEGLGLDLFE GDIRLDRAQI RNSIIGEKYR WPHTIPYVLE 80
81 DSLEMNARGV ILNAEERYRL KTCIDFKPWA GETNYISVFK GSGCWSSVGN RRVGKQELSI GANCDRIATV QHEFLHALGF 160
161 NHEQSRSDRD DYVRIMWDRI LSGREHNFT YSDDISDSL NVPYDYSVMH YSKTAFQNGT EPTIVTRISD FEDVIGORMD 240
241 FSDSDLI KLN QLYNCSSSL S FMDSCSFELE NVCGMIOSSG DNADWQRVSO VPRGPESDHS NMGCCQSGSF FMHFDSSSVN 320
321 VGATAVLESR TLYPKRGFC LQFVLYNNGS ESDQLNIYIR EYSADNVDGN LTLVEEIKI PTGSW QLYHV TLKVTKKFRV 400
401 VFGRRKGS GA SLGGLSIDI NLSETRCPHH IWHIRNFTQF IGSPNGTLYS PPFYSSKGYA FQIYLNLAHV TNAGIYFHLI 480
481 SGANDDQLQW PCPWOQATMT LLDQNPDIRO RMSNORSITT DPFMTDNGN YFWDREPSKVG TVALF SNGTQ FRRGGGYGTS 560
561 AFITHERLKS RDFIKGDDVY ILLTVEDISH I NSTQIQLT P APSVQDLCSK TTCKNDGVCT VRDGKAECRC QSGEDWWYMG 640
641 ERCEKRGSTR DTIVIAVSST VAVFALMLII TLVSVYCTR K YRERMSSNR PNLTPQNQHA F 701

```

Promepirin  $\beta$  + Matriptase 2 konditioniertes Medium (Bande 4a):

1	MDLWNLSWFL FLDALLVISG LATPENFDVD GGMQDIFDI NEGLGLDLFE GDIRLDRAQI R	SIIGEKYR WPHTIPYVLE	80				
81	D	SLEMNAGV ILNAFERYRL KTCIDFKPWA GETNYISVFK GSGCWSSVGN RRVGKQELSI GANCDRIATV QHEFLHALGF	160				
161	WHEQSRSDRD DYVRIMWDRI L	SGREHNFT YSDDISDSL NVPYDYSVMH YSKTAFQNGT EPTIVTRISD FEDVIGQRM	240				
241	FSDSDL	LKLN QLYNCSLS FMDSCSF	ELE NVCGMIQSSG DNADWQVRSQ VPRGPESDHS NMGCQGS GF FMHFDSSSVN	320			
321	VGATAVLESR TLYPKRGP	C LQF	LYNSGS ESDQLNIYIR EY	SADNVDGN LTLVEEIKEI PTGSW	QLYHV TLKVTKKFRV	400	
401	VF	GRKGS GA SLGGLSIDI NLSETRCPH I	W	HIRNFTQF IGSPNG	TLYS PPFYSSKGYA FQIY	LNLAHV TNAGIYFHLI	480
481	SGANDDQLQW PCPWQATMT	LLDQNPDIRO RMSNORSITT DPFMTDNGN YFWDRPSKVG TVAL	E	SNGTQ FRRGGYGTS	560		
561	AFITHERL	KS R	DFIKGDDVY ILLTVEDISH I	NSTQIQLT APSVDLCSK TTCKNDGVCT VRDGKAECRC QSGEDWWYMG	640		
641	ERCEKRGSTR DTIVIAVSST VAVFALMLII TLVSVYCTRK KYRERMSSNR PNLTQNHQA F	701					

Promepirin  $\beta$  + Matriptase 2 konditioniertes Medium (Bande 4b):

1	MDLWNLSWFL FLDALLVISG LATPENFDVD GGMQDIFDI NEGLGLDLFE GDIRLDRAQI R	SIIGEKYR WPHTIPYVLE	80				
81	D	SLEMNAGV ILNAFERYRL KTCIDFKPWA GETNYISVFK GSGCWSSVGN RRVGKQELSI GANCDRIATV QHEFLHALGF	160				
161	WHEQSRSDRD DYVRIMWDRI L	SGREHNFT YSDDISDSL NVPYDYSVMH YSKTAFQNGT EPTIVTRISD FEDVIGQRM	240				
241	FSDSDL	LKLN QLYNCSLS FMDSCSF	ELE NVCGMIQSSG DNADWQVRSQ VPRGPESDHS NMGCQGS GF FMHFDSSSVN	320			
321	VGATAVLESR TLYPKRGP	C LQF	LYNSGS ESDQLNIYIR EY	SADNVDGN LTLVEEIKEI PTGSW	QLYHV TLKVTKKFRV	400	
401	VF	GRKGS GA SLGGLSIDI NLSETRCPH I	W	HIRNFTQF IGSPNG	TLYS PPFYSSKGYA FQIY	LNLAHV TNAGIYFHLI	480
481	SGANDDQLQW PCPWQATMT	LLDQNPDIRO RMSNORSITT DPFMTDNGN YFWDRPSKVG TVAL	E	SNGTQ FRRGGYGTS	560		
561	AFITHERL	KS R	DFIKGDDVY ILLTVEDISH I	NSTQIQLT APSVDLCSK TTCKNDGVCT VRDGKAECRC QSGEDWWYMG	640		
641	ERCEKRGSTR DTIVIAVSST VAVFALMLII TLVSVYCTRK KYRERMSSNR PNLTQNHQA F	701					

**Abbildung 13: Matriptase 2 spaltet Promepirin  $\beta$  proteolytisch an Position Arg 61/ Asn 62**

Das massenspektrometrische Untersuchungsergebnis der entnommenen Proteinbanden (Abbildung 12) ist an der vollständigen Promepirin  $\beta$  Aminosäuresequenz dargestellt. Grün eingefärbte Peptide konnten mit hoher Sicherheit identifiziert werden (FDR<1%). N-terminal dimethylierte Aminosäuren sind rot markiert und indizieren an dieser Position erfolgte proteolytische Spaltung. Trypsin und Matriptase 2 spalten das Meprin  $\beta$  Propeptid an Position Arg 61/ Asn 62. Der Messansatz von Bande 4b zeigte im Vergleich zu Bande 4a keine zusätzlichen Spaltstellen. Die massenspektrometrischen Analysen erfolgten durch Dr. T. Koudelka (Institut für Experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Systematische Proteomics und Bioanalytik, Prof. Dr. A. Tholey, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) mit den in Kapitel 2.2.2.8 beschriebenen Messparametern.

FDR: *False Discovery Rate*

### 3.1.5 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird nicht durch rekombinante lösliche Matriptase 2 aktiviert

Nach Identifikation der Matriptase 2 als Aktivator des rekombinanten löslichen Promeprin  $\beta$  sollte analysiert werden, ob rekombinante Matriptase 2 auch membrangebundenes Promeprin  $\beta$  aktivieren kann.

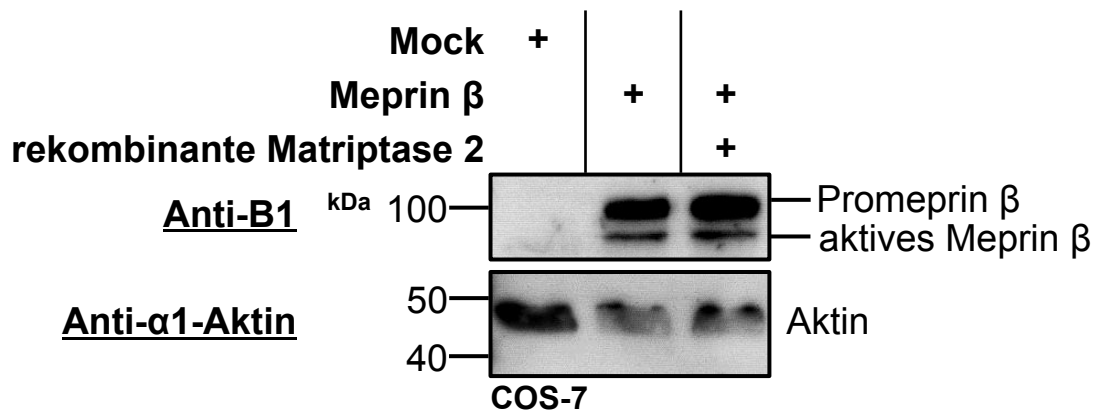
Für diese Untersuchung wurden COS-7 Zellen mit Meprin  $\beta$  transfiziert, anschließend 98 nM rekombinante Matriptase 2 in den Überstand hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.1.5). Als Kontrolle dienten pCDNA 3.1 (Mock) und Meprin  $\beta$  transfizierte Zellen, die nicht mit Matriptase 2 inkubiert wurden. Die geernteten Zellen wurden separiert, um jeweils Immunoblot Analysen durchführen und die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche bestimmen zu können.

Die Zellen wurden für die Immunoblot Analysen lysiert (Kapitel 2.2.1.6) und die Proteine des Lysates mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt (Abbildung 14). Die Maturierung von Promeprin  $\beta$  wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B-1 untersucht (Kapitel 2.2.2.5). Die Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen zeigten ein starkes Signal für das Promeprin  $\beta$  bei 100 kDa und ein schwächeres für aktives Meprin  $\beta$  bei 90 kDa. Dieses Verhältnis der Bandenintensitäten war in den mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierten Zellen nicht zugunsten des aktiven Meprin  $\beta$  verändert. Daraus folgte, dass die rekombinante Matriptase 2 das membrangebundene Promeprin  $\beta$  nicht maturieren kann. In der pCDNA 3.1 (Mock) Kontrolle konnte erwartungsgemäß kein Meprin  $\beta$  Signal detektiert werden. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

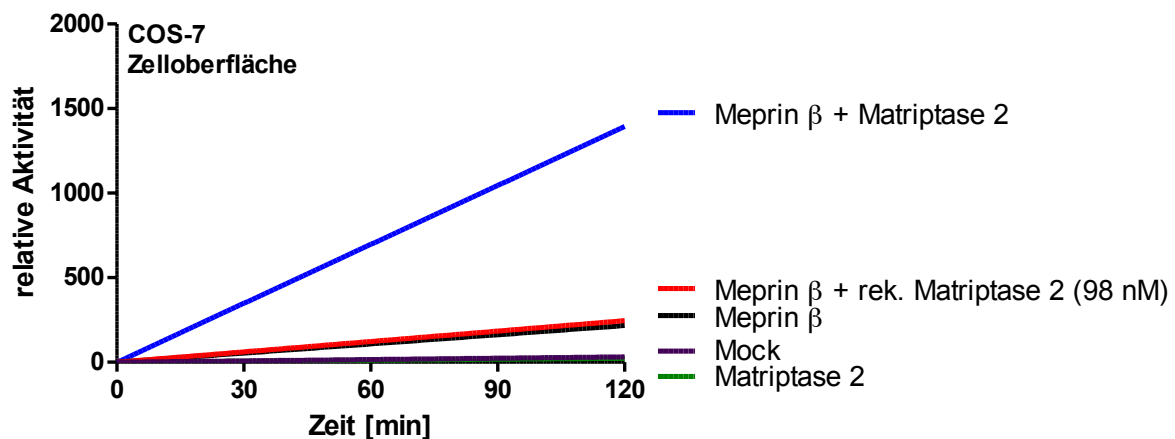
Auf den nicht lysierten verbleibenden Zellen wurde die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen fluorogenen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7).

Auf Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen konnte eine geringe basale Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität gemessen werden. Die mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierten Meprin  $\beta$  transfizierten COS-7 Zellen zeigten im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen keine höhere Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität. Auf pCDNA 3.1 (Mock) sowie Matriptase 2 transfizierten COS-7 Zellen war keine Fluoreszenz detektierbar. Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfizierte Zellen wurden als Kontrolle für aktives membrangebundenes Meprin  $\beta$  verwendet (Kapitel 3.1.6). Die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität lag bei den ko-transfizierten Zellen höher als bei den nur Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen.

A)



B)



**Abbildung 14: Die membranständige, nicht aber die lösliche Matriptase 2 ist Aktivator des membrangebundenen Promeprin  $\beta$**

COS-7 Zellen wurden mit Meprin  $\beta$  oder pCDNA 3.1 (Mock) transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Anschließend wurden dem Medium Meprin  $\beta$  transfizierter Zellen 98 nM rekombinante Matriptase 2 hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.1.5). Die geernteten Zellen wurden separiert, um aus gleichen Ansätzen Immunoblot Analysen durchführen und die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche bestimmen zu können.

**A)** Die Zellen wurden für die Immunoblot Analysen lysiert (Kapitel 2.2.1.6) und die Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Maturierung der Protease wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper B-1 untersucht (Kapitel 2.2.2.5). Die Meprin  $\beta$  transfizierten Ansätze zeigten Banden für Promeprin  $\beta$  bei 100 Da und für die aktive Protease bei 90 kDa. Das Bandenverhältnis der mit rekombinanter Matriptase 2 inkubierten Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen glich der nicht inkubierten Kontrolle. In den pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten Zellen war erwartungsgemäß kein Signal für Meprin  $\beta$  vorhanden. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

**B)** Die Bestimmung der Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität erfolgte mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp). Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7). Die Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen zeigten eine niedrige Basalaktivität. Diese konnte durch Inkubation mit rekombinanter Matriptase 2 nicht gesteigert werden. In den Matriptase 2 sowie pCDNA 3.1 (Mock) transfizierten Zellen konnte kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Als Positivkontrolle für aktives Meprin  $\beta$  an der Zelloberfläche wurde Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert. Dieser Ansatz zeigte im Vergleich zu den nur Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen eine erhöhte Oberflächenaktivität (Kapitel 3.1.6).

kDa: kilo Dalton

rek.: rekombinant

mca: (7-Methyloxy coumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

### 3.1.6 Membrangebundenes Promeprin $\beta$ wird durch membrangebundene Matriptase 2 aktiviert

Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante Matriptase 2 lösliches Promeprin  $\beta$  (Kapitel 3.1.2), aber nicht das membrangebundene Promeprin  $\beta$  (Kapitel 3.1.5) aktivieren kann. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die membrangebundene Matriptase 2 membrangebundenes Promeprin  $\beta$  aktivieren kann.

Für diese Analyse wurden COS-7 sowie HEK-293 Zellen mit Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrollen dienten Transfektionsansätze mit den einzelnen Proteasen und pCDNA 3.1 (Mock). Die transfizierten Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und nachfolgend geerntet. Die Zellen wurden aufgeteilt, um von jedem Ansatz Immunoblot Analysen durchführen und die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche bestimmen zu können.

Für Immunoblot Analysen wurden die Zellen lysiert (Kapitel 2.2.1.6) und die Proteine des Lysates mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Meprin  $\beta$  Maturierung wurde mit dem polyklonalen Antikörper Anti-B1 untersucht (Kapitel 2.2.2.5) (Abbildung 15). Die Matriptase 2 Expression wurde mit einem Anti-Myc Antikörper nachgewiesen. Mit einem Aktin Immunoblot erfolgte die Ladungskontrolle.

Die Proteasen wurden in COS-7 und HEK-293 Zellen in den entsprechend transfizierten Ansätzen exprimiert. Die Bande der Matriptase 2 war etwa bei 100 kDa zu detektieren. Das Promeprin  $\beta$  Signal war bei 100 kDa und die Bande des aktiven Meprin  $\beta$  bei 90 kDa erkennbar. Die Signalintensität von Zymogen und aktiver Protease unterschied sich in den Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Ansätzen zwischen den Zelllinien. In COS-7 Zellen waren die Banden des Zymogens und der aktiven Protease von ausgeglichener Intensität. Demgegenüber überwiegte in den HEK-293 Zellen die Promeprin  $\beta$  Bande. In Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen zeigte sich in beiden Zelllinien eine Maturierung von Promeprin  $\beta$ . Die Bande des Zymogens war im Vergleich zur Meprin  $\beta$ / Mock Kontrolle von verminderter Intensität. Gleichzeitig war das Signal des aktiven Meprin  $\beta$  stärker als in der Meprin  $\beta$ / Mock Kontrolle. Dieser Effekt war in den HEK-293 Zellen stärker als in COS-7 Zellen ausgeprägt.

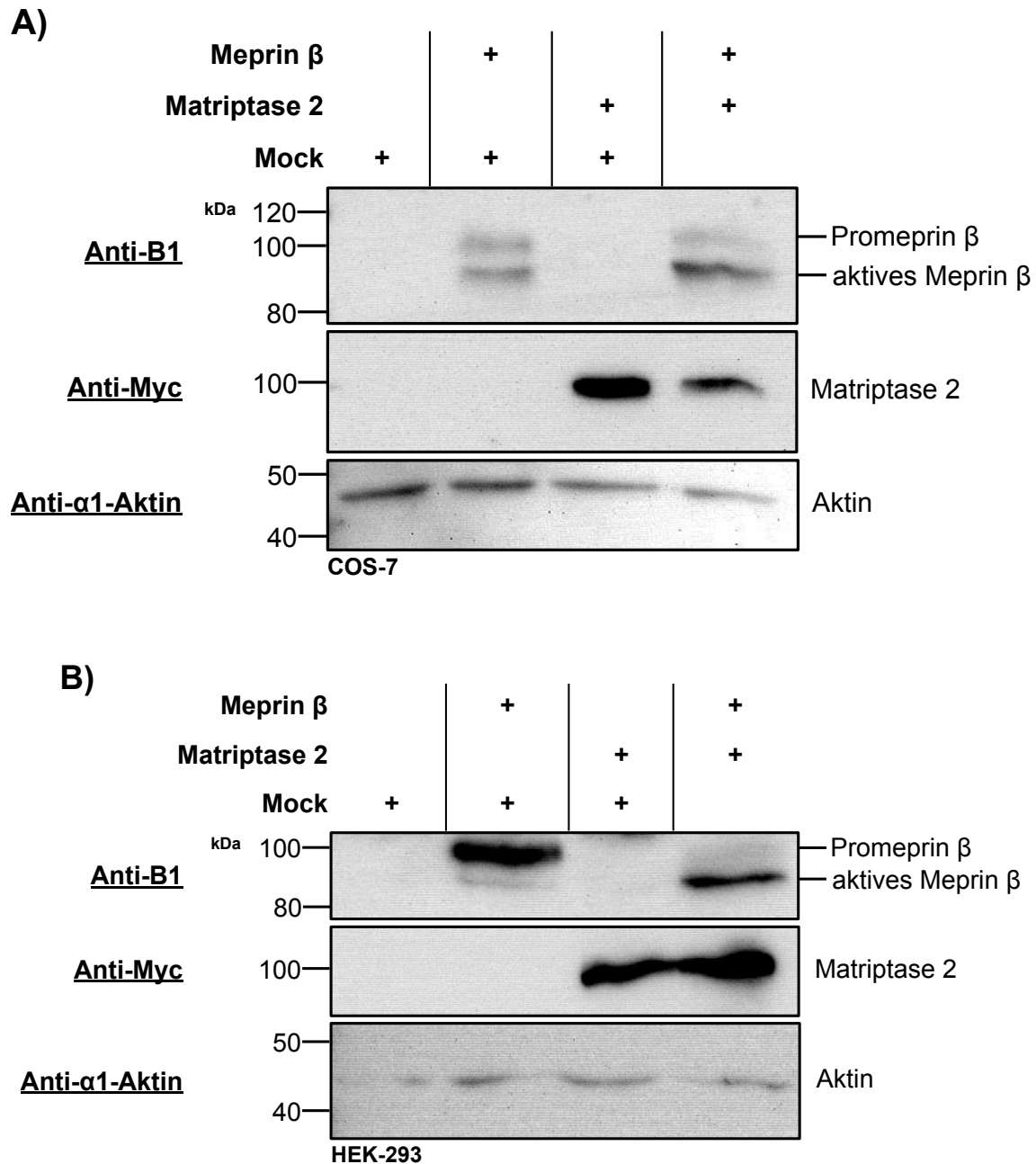
Dieser Befund sollte um die Bestimmung der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche ergänzt werden. Für diese Untersuchung wurden die transfizierten COS-7 Zellen mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen fluorogenen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) inkubiert und mit einem Spektrophotometer die Fluoreszenz bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7). Die detektierte Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität von transfizierten COS-7 Zellen ist in Abbildung 16A dargestellt, die zugehörigen Immunoblots in Abbildung 15.

Auf Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen war eine basale proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität messbar. Im Vergleich zu diesem Ansatz zeigten Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen eine erhöhte Meprin  $\beta$  Aktivität auf der Zelloberfläche. Auf den pCDNA 3.1 (Mock) sowie Matriptase 2/ Mock transfizierten Zellen wurde eine niedrigere Fluoreszenz als in Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen gemessen.

Das Experiment wurde zur Reproduktion und statistischen Auswertung fünfmal unabhängig voneinander wiederholt (Abbildung 16B). Die Fluoreszenz wurde in allen Proben 60 Minuten nach dem Start der Messung abgelesen und die auf Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten COS-7 gemessene Fluoreszenz 100 Prozent gesetzt. Die Messergebnisse der anderen Ansätze wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. In dem Diagramm entspricht der Balken dem Mittelwert und die Fehlerbalken indizieren die mittlere Standardabweichung. Zum Vergleich der Gruppen erfolgte nach Überprüfung der Normalverteilung eine multiple ANOVA mit anschließender p-Wert Adjustierung nach Scheffé. Ein errechneter p-Wert unter 0,001 ist mit drei Sternen (\*\*\*) indiziert (Kapitel 2.2.4).

Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfizierte COS-7 Zellen verfügten eine etwa vierfach höhere relative Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität im Vergleich zu den Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten COS-7 Zellen. Dieser Unterschied war höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).



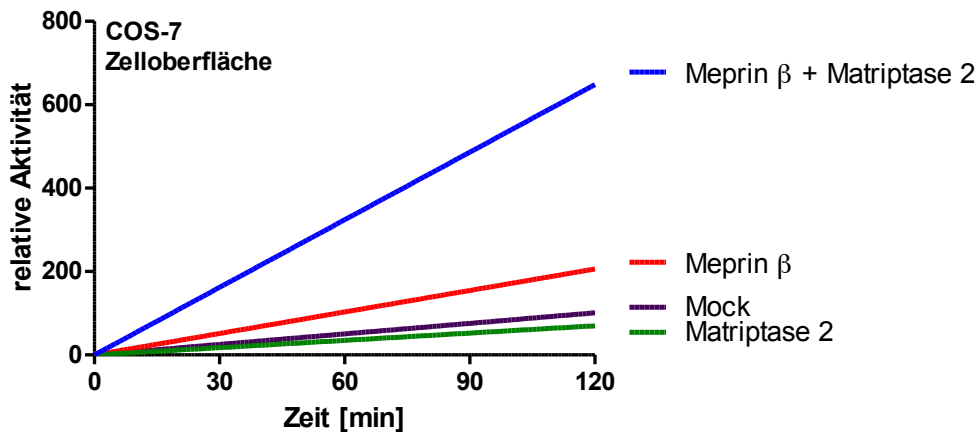


**Abbildung 15: Western Blot zur Maturierung von Promepin  $\beta$  durch membrangebundene Matriptase 2**

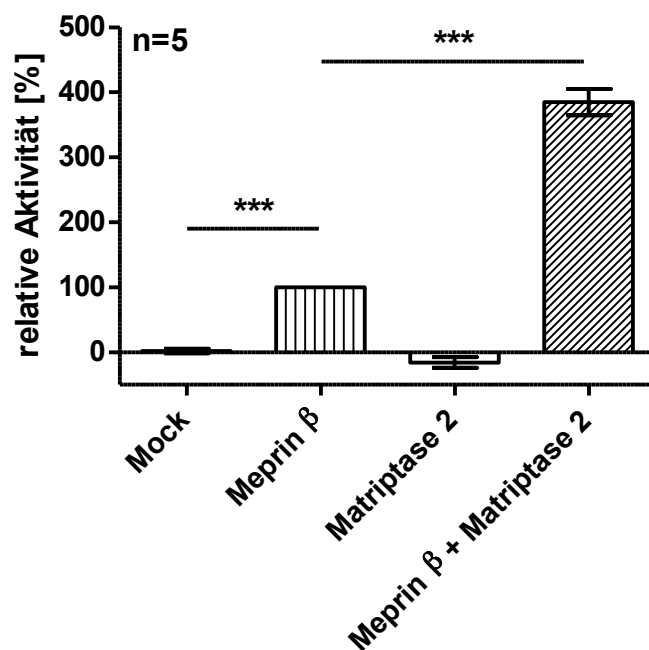
COS-7 (A) sowie HEK-293 (B) Zellen wurden mit Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrollen dienten Transfektionsansätze mit pCDNA 3.1 (Mock) und den einzelnen Proteasen. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die Proteine des Lysates mit SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 2.2.1.6, 2.2.2.2). Die Maturierung von Meprin  $\beta$  wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper Anti-B1 untersucht (Kapitel 2.2.2.5). Die Matriptase 2 Expression wurde mit einem Anti-Myc Antikörper nachgewiesen. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot. Promepin  $\beta$  war bei 100 kDa und das aktive Meprin  $\beta$  bei etwa 90 kDa zu detektieren. In Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen unterschied sich das Verhältnis der Bandenintensitäten von Promepin  $\beta$  und aktiven Meprin  $\beta$ . In COS-7 Zellen war die Signalintensität des Zymogens und der aktiven Protease etwa gleich, in HEK-293 Zellen überwog das Promepin  $\beta$  Signal. In beiden Zelllinien erfolgte in den Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfizierten Ansätzen eine Maturierung von Promepin  $\beta$ . Dies zeigte sich im Vergleich zu den Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen in der verminderten Intensität der Promepin  $\beta$  Bande sowie einem stärkeren Signal für aktives Meprin  $\beta$ .

kDa: kilo Dalton

A)



B)



**Abbildung 16: Ko-Transfektion von Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 resultiert in einer erhöhten Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität**

Die Aktivierung von Promeprein  $\beta$  durch Matriptase 2 sollte durch Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin  $\beta$  auf der Zelloberfläche validiert werden. Die Zelloberflächenaktivität wurde mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7).

**A)** Dargestellt ist das Messergebnis der in Abbildung 15 gezeigten COS-7 Zellen. Auf Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen konnte eine basale Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität gemessen werden. Im Vergleich zu diesem Ansatz war in Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen die Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität erhöht. In Mock sowie Matriptase 2/ Mock transfizierten Proben wurde eine geringere Fluoreszenz als in den Meprin  $\beta$  transfizierten Zellen detektiert.

**B)** Das in A) dargestellte Experiment wurde in unabhängigen Experimenten (n=5) wiederholt und statistisch ausgewertet. Es wurde jeweils der Fluoreszenzwert 60 Minuten nach Messbeginn verwendet und der Wert der Meprin  $\beta$ / Mock 100% gesetzt. Die Ergebnisse der weiteren Ansätze wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Die Balken indizieren den Mittelwert  $\pm$  mittleren Standardfehler. Die Gruppen wurden mit multipler ANOVA verglichen, mit nachfolgender Adjustierung der p-Werte nach Scheffé. (\*\*\*) indiziert einen p-Wert unter 0,001 (Kapitel 2.2.4).

mca: (7-Methyloxycoumarin-4-yl) acetyl  
dnp: 2,4-Dinitrophenyl

### 3.1.7 Kolokalisation von Meprin $\beta$ und Matriptase 2 auf der COS-7 Zelloberfläche

Nach Identifikation der membrangebundenen Matriptase 2 als Aktivator des membrangebundenen Promepirin  $\beta$  (Kapitel 3.1.5) sollte die grundsätzliche Möglichkeit der direkten Interaktion zwischen Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 überprüft werden. Aus diesem Grund wurden Kolokalisationsstudien mit konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM) sowie Studien mit biotinylierten Zelloberflächenproteinen durchgeführt.

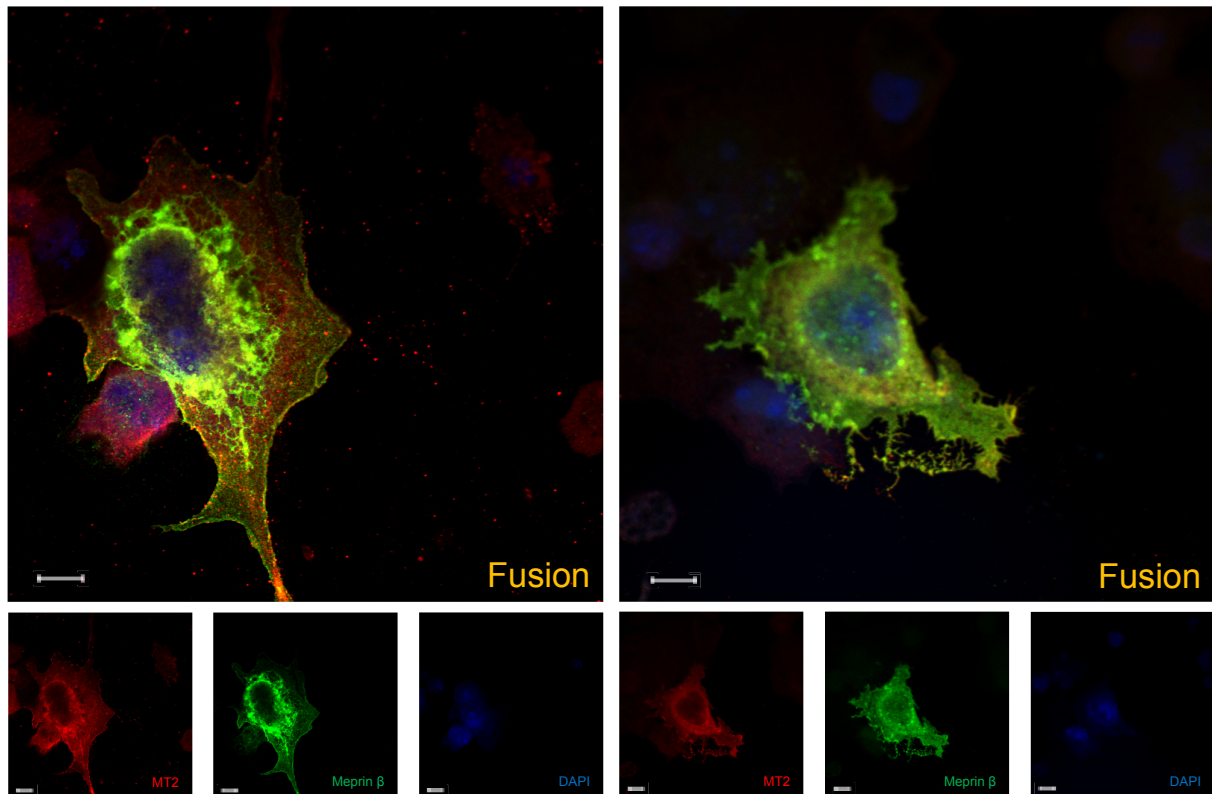
Zur Vorbereitung der konfokalen Mikroskopie wurden COS-7 Zellen mit Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert (Kapitel 2.2.1.4) und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) und eine Permeabilisierung mit Saponin (Kapitel 2.2.1.8). Als Primärantikörper wurde der polyklonale Meprin  $\beta$  Antikörper Tier 1 und zur Detektion der Matriptase 2 ein monoklonaler Myc-Tag-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Als Sekundärantikörper dienten Alexa Fluor 488 und 594 gekoppelte Antikörper. Die konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie erfolgte an dem Olympus Mikroskop FV1000 dankenswerterweise durch Dr. rer. nat. J. Prox (Universität Kiel, Institut für Biochemie). Mit der Bildbearbeitungssoftware Olympus Fluoview 4.0 wurden die aufgenommenen Einzelkanäle fusioniert, eine Anpassung des Kontrasts vorgenommen und der Maßstab indiziert.

Die Immunfluoreszenz von zwei repräsentativen Zellen ist in Abbildung 17 dargestellt. In der fusionierten Aufnahme zeigte sich die Kolokalisation beider Proteasen auf dem sekretorischen Weg sowie an der Zelloberfläche der transfizierten COS-7 Zellen in einem orangefarbenen Signal. Der abgebildete Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Mit dem Ziel das Ergebnis der Immunfluoreszenz zu bestätigen und die Expression von Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 direkt auf der Zelloberfläche nachzuweisen, erfolgte eine Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen. Für diese Untersuchung wurden COS-7 Zellen mit Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit pCDNA 3.1 (Mock) und den einzelnen Proteasen. Von jedem Transfektionsansatz wurden Doppelansätze erstellt. Nach 48 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und jeweils ein Ansatz mit Biotin-Lösung inkubiert, der andere zur Kontrolle mit PBS-CM (Kapitel 2.2.1.9). Anschließend erfolgte die Zellernte und Lyse (Kapitel 2.2.1.6). Vom Lysat wurden Kontrollproben entnommen und die enthaltenen Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt.

Im Immunoblot der Lysate (Abbildung 18A) wurde die Expression von Meprin  $\beta$  mit dem polyklonalen Antikörper Anti-B1 und Matriptase 2 mit einem Myc-Tag Antikörper in den biotinylierten sowie in den nicht biotinylierten Ansätzen nachgewiesen (Kapitel 2.2.2.5). Wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, erfolgte in Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen eine Maturierung von Promeprin  $\beta$ . Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

Dem verbleibenden Lysat wurden Strepavidin-*beads* hinzugefügt mit dem Ziel die biotinylierten Proteine zu konzentrieren (Kapitel 2.2.1.9). Nachfolgend erfolgte die SDS-PAGE des Proteinkonzentrates. Im Immunoblot (Abbildung 18B) konnte mit oben beschriebenen Antikörpern Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 in den biotinylierten Ansätzen nachgewiesen werden. Matriptase 2 war bei 100 kDa, Promeprin  $\beta$  ebenfalls bei 100 kDa und matures Meprin  $\beta$  bei 90 kDa zu detektieren. Aus diesem Ergebnis folgte, dass beide Proteasen an der Zelloberfläche der COS-7 Zellen exprimiert sind. In der gebundenen Fraktion der Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen war erneut die Maturierung von Promeprin  $\beta$  erkennbar. Als Positivkontrolle der Biotinylierung wurde ein Transferrin Rezeptor (TFR) Immunoblot erstellt. Nur in den biotinylierten Ansätzen zeigten sich TFR-Signale bei 100 kDa. Mit dem GAPDH-Immunoblot wurde die zelluläre Integrität zum Zeitpunkt der Biotinylierung überprüft. Im Größenbereich zwischen 30 und 40 kDa, in dem GAPDH Signale zu erwarten wären, waren keine Banden detektierbar.

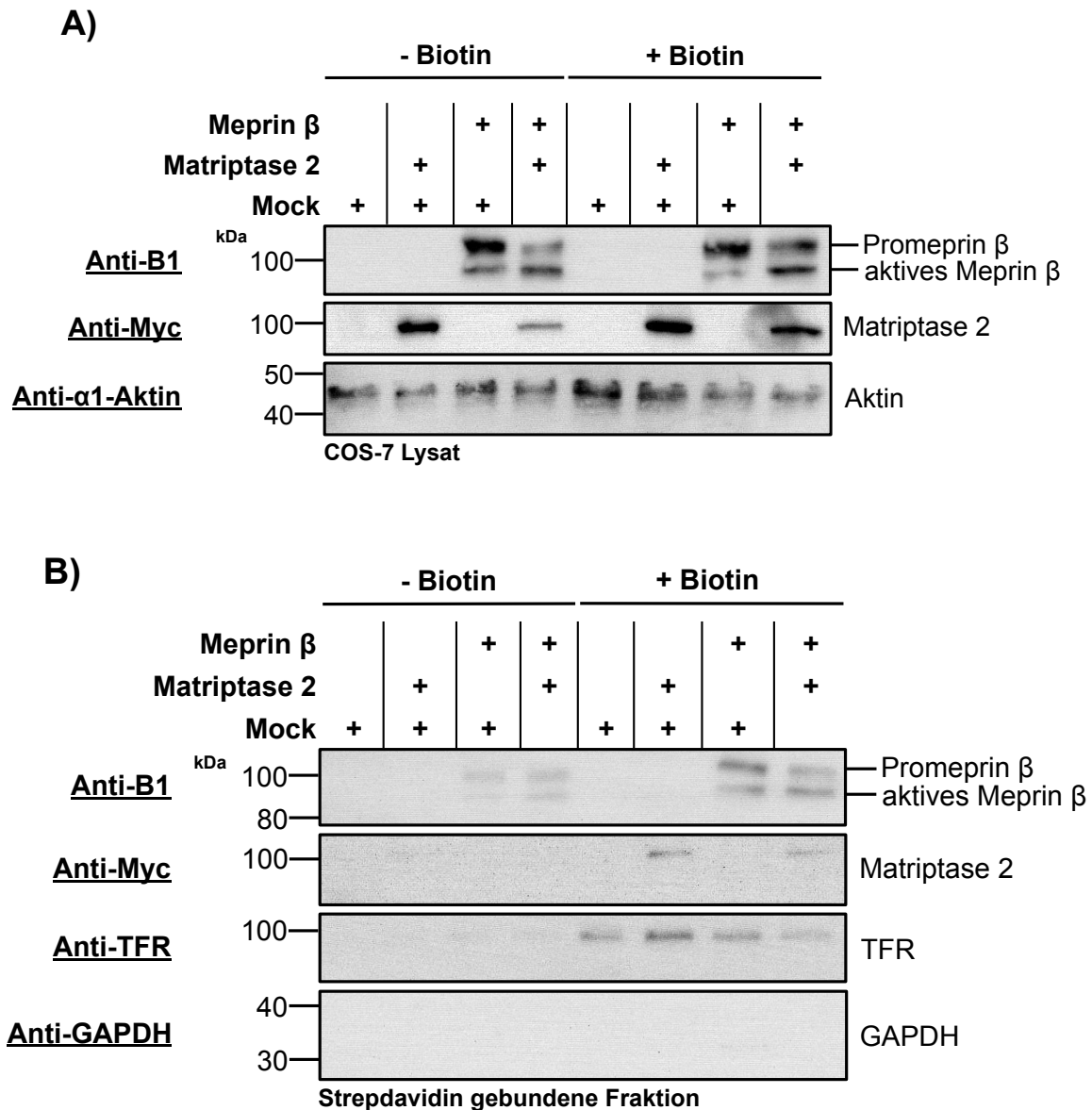


**Abbildung 17: Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 sind auf der Oberfläche von COS-7 Zellen kolokalisiert**

COS-7 Zellen wurden mit Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 ko-transfiziert und für 48 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.1.4). Anschließend erfolgte eine PFA Fixierung und Saponin Permeabilisierung der Zellen (Kapitel 2.2.1.8). Als Primärantikörper dienten ein polyklonaler Meprin  $\beta$  Antikörper sowie ein monoklonaler Myc-Tag Antikörper (MT2). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM) erfolgte dankenswerterweise durch Dr. rer. nat. J. Prox. Mit der Bildbearbeitungssoftware Olympus Fluoview 4.0 wurden die aufgenommenen Einzelkanäle fusioniert und eine Anpassung des Kontrasts vorgenommen. Die Kolokalisation von Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 auf dem sekretorischen Weg und der Zelloberfläche ist an zwei repräsentativen Zellen dargestellt. Der abgebildete Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

MT2: Matriptase 2

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindol



**Abbildung 18: Nachweis von biotinyliertem Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 in der Streptavidin gebundenen Fraktion**

COS-7 Zellen wurden in Doppelansätzen mit Meprin  $\beta$ / Matriptase 2, den einzelnen Proteasen sowie pCDNA 3.1 (Mock) transfiziert und für 48 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.1.4). Anschließend erfolgte in einem Ansatz die Biotinylierung der Zelloberfläche (+ Biotin), im Kontrollansatz wurde PBS-CM (- Biotin) hinzugefügt. Nach Zellernte und -lyse (Kapitel 2.2.1.6) wurden Lysatkontrollen abgenommen und in dem verbleibenden Lysat biotinylierte Proteine mit Streptavidin-beads aufkonzentriert (Kapitel 2.2.1.9).

**A)** Die Proteine der Lysate wurden durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Die Expression der transfizierten Proteasen wurde mit einem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper (Anti-B1) und einem monoklonalen Myc-Antikörper (Matriptase 2) nachgewiesen (Kapitel 2.2.2.5). Die Ladungskontrolle erfolgte durch einen Aktin Immunoblot. Erneut zeigte sich in Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen die Maturierung von Promepirin  $\beta$  (Kapitel 3.1.6).

**B)** Die Proteine der Streptavidin gebundenen Fraktion wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 konnten mit den beschriebenen Antikörpern in den biotinylierten Ansätzen nachgewiesen werden. Daraus folgte, dass beide Proteasen auf der Zelloberfläche der COS-7 Zellen exprimiert waren. In dem biotinylierten Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 Ansatz war die Maturierung von Promepirin  $\beta$  erkennbar. Der TFR-Immunoblot diente als positiv Kontrolle der Oberflächenbiotinylierung und der GAPDH-Immunoblot indizierte eine intakte Zelloberfläche zum Zeitpunkt der Biotinylierung.

kDa: kilo Dalton

TFR: Transferrin Rezeptor

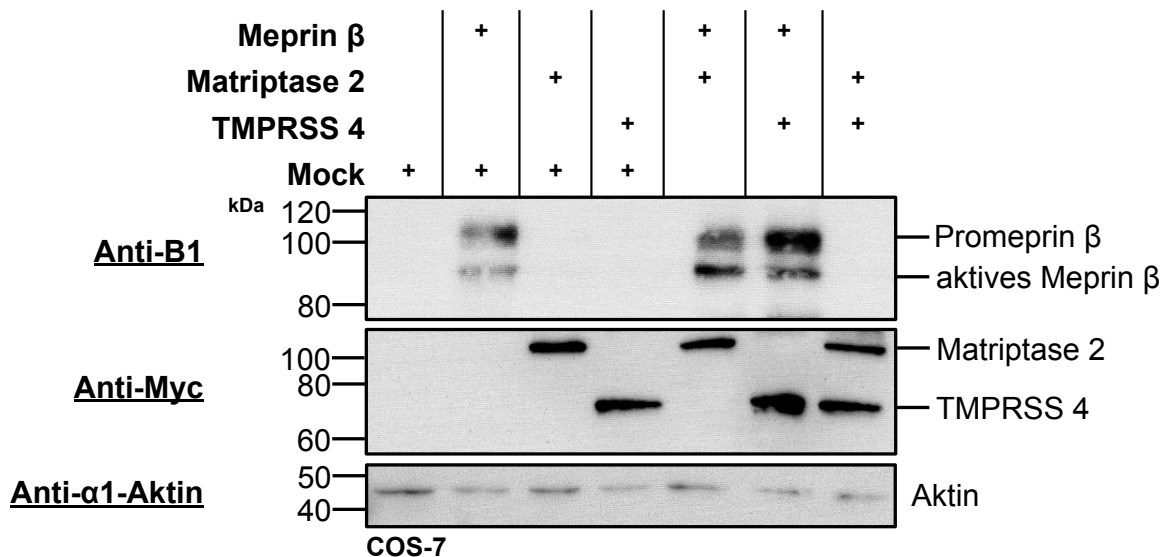
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

### 3.1.8 TMPRSS 4 ist kein Aktivator des membrangebundenen Promeprin $\beta$

Nach Identifikation der membrangebundenen Matriptase 2 als Aktivator von membrangebundenen Promeprin  $\beta$  sollte untersucht werden, ob Typ zwei Transmembran Serin Proteasen (TTSP) grundsätzlich Aktivatoren des Meprin  $\beta$  Zymogens sind. Als weiteres Mitglied der TTSP-Familie wurde die Transmembran Serin Protease 4 (TMPRSS 4) ausgewählt und auf Promeprin  $\beta$  aktivierende Eigenschaften evaluiert.

Für diese Untersuchung wurden COS-7 Zellen mit Meprin  $\beta$  und TMPRSS 4 ko-transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrollen dienten weitere Transfektionsansätze mit pCDNA 3.1 (Mock), den einzelnen Proteasen, Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 sowie TMPRSS 4/ Matriptase 2. Die transfizierten Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und anschließend geerntet. Die gewonnenen Zellen wurden aufgeteilt, um sowohl Lysate für Immunoblot Analysen zu gewinnen als auch die Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität zu bestimmen. Die Proteine der Lysate (Kapitel 2.2.1.6) wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und die Meprin  $\beta$  Maturierung mit dem polyklonalen Antikörper Anti-B1 untersucht (Abbildung 19). Mit einem Anti-Myc Antikörper wurde die Expression von Matriptase 2 sowie TMPRSS 4 nachgewiesen. Die Ladungskontrolle erfolgte durch einen Aktin Immunoblot.

Die Proteasen wurden in den entsprechend transfizierten Ansätzen exprimiert. Im Anti-Myc Immunoblot war die Bande der Matriptase 2 bei etwa 100 kDa und TMPRSS 4 bei 70 kDa zu detektieren. Im Anti-B1 Immunoblot war das Promeprin  $\beta$  Signal bei 100 kDa und die Bande des muren Meprin  $\beta$  bei 90 kDa erkennbar. Wie bereits in Kapitel 3.1.6 beschrieben, erfolgte in den Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen eine Promeprin  $\beta$  Maturierung, die im Vergleich zur Meprin  $\beta$ / Mock Kontrolle durch die vermindert intensive Promeprin  $\beta$  Bande bei gleichzeitig verstärktem Signal für matures Meprin  $\beta$  gekennzeichnet war. Die Meprin  $\beta$ / TMPRSS 4 ko-transfizierten Zellen zeigten nicht dieses Bandenmuster, sondern die Bandenkonfiguration der Meprin  $\beta$ / Mock Kontrolle. Daraus folgte, dass TMPRSS 4 membranständiges Promeprin  $\beta$  nicht maturiert.



**Abbildung 19: TMPRSS 4 ist kein Aktivator des membrangebundenen Promeprin  $\beta$**

COS-7 Zellen wurden mit Meprin  $\beta$  und TMPRSS 4 oder Matriptase 2 ko-transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrollen dienten Transfektionsansätze mit pCDNA 3.1 (Mock) sowie den einzelnen Proteasen. Nach 48 stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die Proteine des Lysats mit SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 2.2.1.6, 2.2.2.2). Die Meprin  $\beta$  Maturierung wurde mit dem polyklonalen Meprin  $\beta$  Antikörper Anti-B1 untersucht. Die Expression von Matriptase 2 und TMPRSS 4 wurde mit einem Anti-Myc Antikörper nachgewiesen. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot. Promeprin  $\beta$  war bei etwa 100 kDa und das mature Meprin  $\beta$  bei etwa 90 kDa detektierbar. Im Vergleich zu den Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen zeigte sich in den Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen erneut die Promeprin  $\beta$  Maturierung (Abbildung 15). Die diesen Ansatz kennzeichnende Bandenkonfiguration war nicht in den Meprin  $\beta$ / TMPRSS 4 ko-transfizierten Zellen erkennbar.

kDa: kilo Dalton

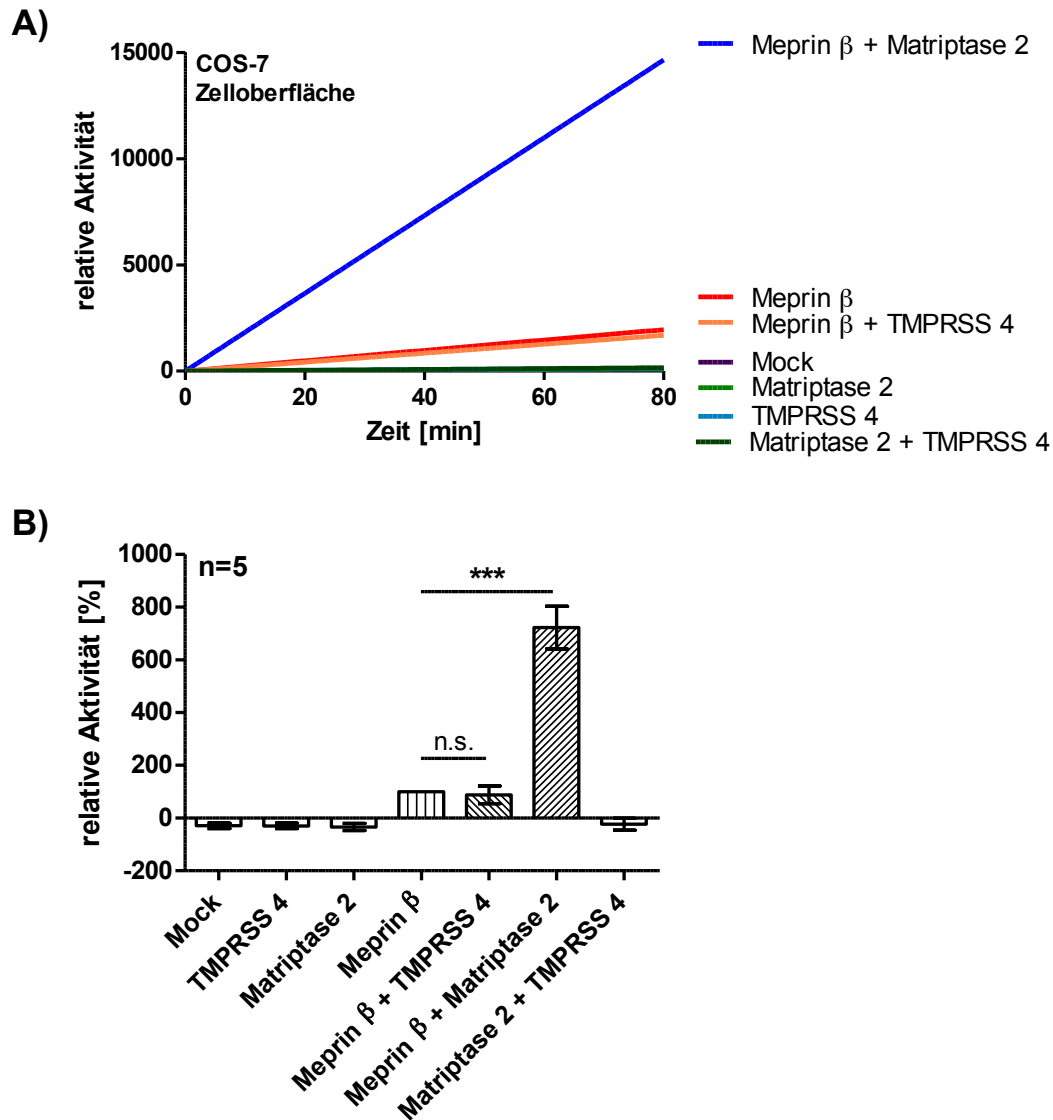
Das im Immunoblot erzielte Ergebnis sollte um die Messung der proteolytischen Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität ergänzt werden. Für diese Analyse wurden die transfizierten COS-7 Zellen mit dem Meprin  $\beta$  spezifischen fluorogenen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) inkubiert und mit einem Spektrophotometer die Fluoreszenz bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 80 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7). Die Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität der transfizierten COS-7 Zellen ist in Abbildung 20A gezeigt, deren Immunoblots in Abbildung 19 dargestellt sind.

Die Meprin  $\beta$ / TMPRSS 4 ko-transfizierten Zellen zeigten eine Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität, die im Bereich der Meprin  $\beta$ / Mock Kontrolle liegt. Im Vergleich zu diesen Ansätzen war die Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität auf den Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen erhöht. In den pCDNA 3.1 (Mock), Matriptase 2/ Mock, TMPRSS 4/ Mock und Matriptase 2/ TMPRSS 4 Kontrollansätzen wurde eine geringere Fluoreszenz als in den Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten COS-7 Zellen gemessen.



Zur Reproduktion und statistischen Auswertung wurde das Experiment fünfmal unabhängig voneinander wiederholt (Abbildung 20B). Die Fluoreszenz wurde in allen Proben 60 Minuten nach dem Start der Messung abgelesen. Die auf Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten COS-7 Zellen gemessene Fluoreszenz wurde 100 Prozent gesetzt und die Ergebnisse der anderen Ansätze hierzu ins Verhältnis gesetzt. In dem Balkendiagramm entspricht der Balken dem Mittelwert und die Fehlerbalken indizieren die mittlere Standardabweichung. Der Gruppenvergleich erfolgte nach Überprüfung auf Normalverteilung durch eine multiple ANOVA mit anschließender p-Wert Adjustierung nach Scheffé. Ein p-Wert unter 0,001 ist mit drei Sternen (\*\*\*) indiziert (Kapitel 2.2.4).

Die Oberflächenaktivität auf Meprin  $\beta$ / Mock transfizierten Zellen unterschied sich nicht signifikant von den Meprin  $\beta$ / TMPRSS 4 ko-transfizierten Zellen ( $p=0,446$ ), war aber höchst signifikant different vom Meprin  $\beta$ / Matriptase 2 Ko-Transfektionsansatz ( $p<0,001$ ).



**Abbildung 20: Meprin  $\beta$  / TMPRSS 4 Ko-Transfektion resultiert nicht in einer erhöhten Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität**

Die Promein  $\beta$  aktivierende Eigenschaft von TMPRSS 4 sollte durch Analyse der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität auf der Zelloberfläche untersucht werden. Die Zelloberflächenaktivität wurde mit dem Meprin  $\beta$  spezifischem Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 80 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.7).

**A)** Dargestellt ist die Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität von den COS-7 Zellen, deren Immunoblots in Abbildung 19 dargestellt sind. Auf Meprin  $\beta$  / Mock und Meprin  $\beta$  / TMPRSS 4 transfizierten Zellen konnte eine etwa gleiche Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität gemessen werden. Im Vergleich zu diesen Ansätzen zeigten die Meprin  $\beta$  / Matriptase 2 ko-transfizierten Zellen erneut eine erhöhte Meprin  $\beta$  Oberflächenaktivität (Abbildung 15). In den Mock, Matriptase 2 / Mock, TMPRSS 4 / Mock und TMPRSS 4 / Matriptase 2 Kontrollansätzen wurde eine geringere Fluoreszenz als in den Meprin  $\beta$  / Mock transfizierten COS-7 Zellen gemessen.

**B)** Das in A) dargestellte Experiment wurde in unabhängigen Experimenten (n=5) wiederholt und statistisch ausgewertet. Es wurde der Fluoreszenzwert 60 Minuten nach Messbeginn für die Auswertung verwendet. Der Wert der Meprin  $\beta$  / Mock Proben wurde 100 Prozent gesetzt und die Ergebnisse der anderen Ansätze hierzu ins Verhältnis gesetzt. Die Balken indizieren den Mittelwert  $\pm$  mittleren Standardfehler. Die Gruppen wurden mit multipler ANOVA verglichen, mit nachfolgender Anpassung der p-Werte nach Scheffé. Der Unterschied der relativen Fluoreszenz von Meprin  $\beta$  / Mock und Meprin  $\beta$  / TMPRSS 4 transfizierten Zellen war nicht signifikant (p=0,446). Der Unterschied zwischen Meprin  $\beta$  / Mock und Meprin  $\beta$  / Matriptase 2 Transfektionsansätzen war höchst signifikant (p<0,001) (Kapitel 2.2.4).

mca: (7-Methyloxycoumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

n.s.: nicht signifikant

## 3.2 Kollagen als Substrat von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$

### 3.2.1 Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$ maturieren von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I

Kollagen I wird als Vorläufermolekül mit C- und N-terminalen Propeptiden exprimiert. Damit Kollagenfibrillen ausgebildet werden können, müssen diese proteolytisch abgespalten werden. Im Jahr 2013 wurden mit Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  die ersten Proteasen identifiziert, die sowohl C- als auch N-Propeptide von Prokollagen I abspalten können (Broder et al. 2013). In dieser Studie wurde rekombinantes Prokollagen I verwendet, das in einem Hefezell-System (*Pichia pastoris*) exprimiert wurde. Ausgehend von den publizierten Ergebnissen sollte untersucht werden, ob von primären humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I durch Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  zu maturem Kollagen I gespalten werden kann.

Für diesen Zweck wurden primäre humane dermale Fibroblasten (HDFa) sowie primäre humane pulmonale Fibroblasten (MRC5) kultiviert. Dankenswerterweise stellte Prof. Dr. Boris Hinz (Institut für Zahnheilkunde, Universität Toronto) die MRC5-Zelllinie für diese Experimente zur Verfügung. Die Zellkulturen wurden bei 80 Prozent Konfluenz mit 10 nM rekombinant aktivem humanen Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  für 24 Stunden bei 37°C inkubiert (Becker et al. 2003, Becker-Pauly et al. 2007) (Kapitel 2.2.1.5). Als Kontrollen dienten Zellkulturansätze, denen die inaktiven Zymogene Promeprin  $\alpha$ , Promeprin  $\beta$  oder keine Proteasen hinzugefügt wurden. Nach dem Erzielen der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände von den Kulturen gewonnen, die enthaltenen Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt (Abbildung 21).

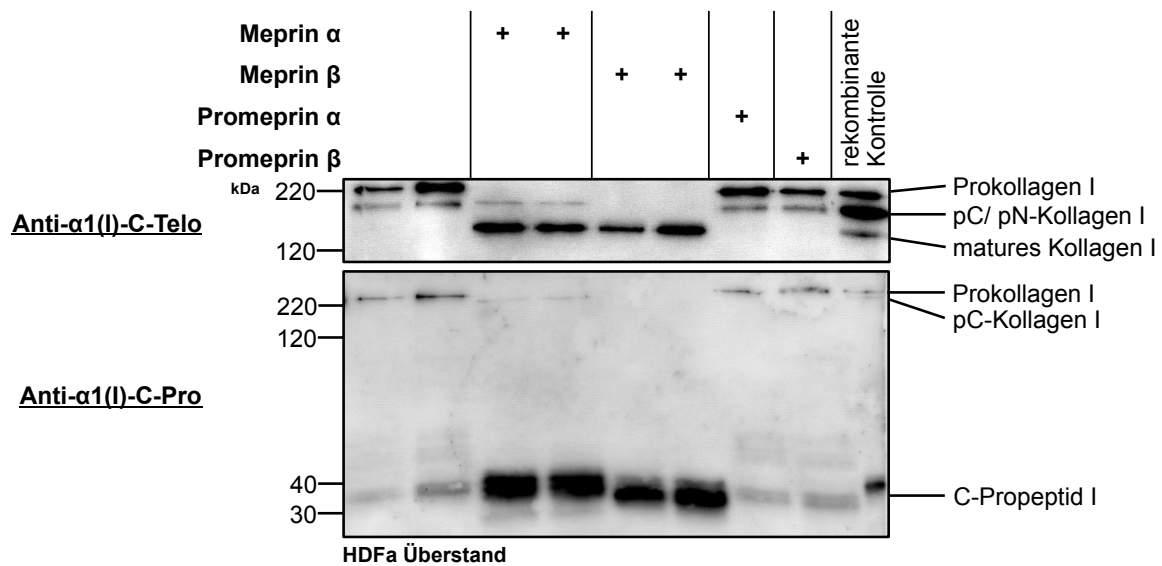
Die Analyse der Prokollagen I Maturierung erfolgte mit Antikörpern gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo, LF-68) und das C-terminale Propeptid (Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Pro, LF-42) der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen I (Kapitel 2.2.2.5). Die Antikörper wurden freundlicherweise von L. W. Fisher (National Institutes of Health, Bethesda) bereitgestellt (Fisher et al. 1995). Der Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo Antikörper ermöglicht die Darstellung aller Kollagen I Maturierungsstufen. Prokollagen I wird mit diesem Antikörper bei 220 kDa, die intermediären Kollagen I Formen, bei denen das C- oder das N-Propeptid proteolytisch abgespalten wurde bei 195 kDa und matures Kollagen I bei 170 kDa detektiert. Der Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Pro Antikörper erkennt Prokollagen I (220 kDa), pC-Kollagen I (205 kDa), bei dem das N-terminale Propeptid abgespalten wurde, sowie das maturierte C-Propeptid (35 kDa).

---

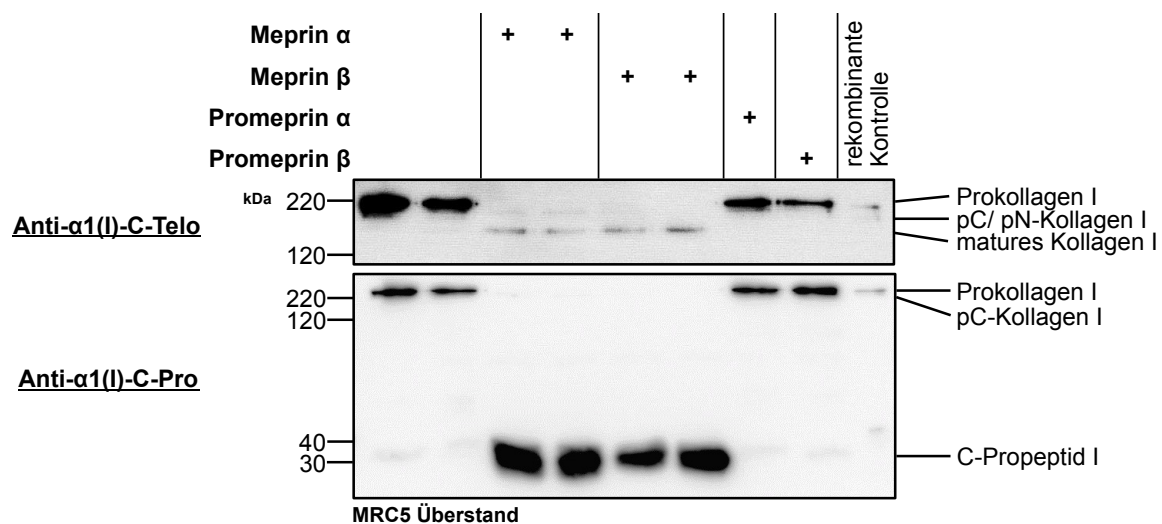
Auf die Polyacrylamidgele wurde zusätzlich mit rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$  maturiertes rekombinantes humanes Kollagen I aufgetragen, um die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen zu erleichtern (Kapitel 2.2.2.12).

Die Addition von aktivem Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  in das Zellmedium von Haut- und Lungenfibroblasten resultiert in der Maturierung von primärem humanen Prokollagen I (Abbildung 21). Dies zeigte sich bei Analyse des Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo Immunoblots in fehlenden Prokollagen I Signalen und gleichzeitigem Auftreten von murenen Kollagen I Banden im Vergleich zur unbehandelten und Zymogen-Kontrolle. Schwache Banden für die intermediären Kollagen I Formen konnten in Ansätzen mit aktivem Meprin  $\alpha$ , aber nicht mit aktivem Meprin  $\beta$  detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützend zeigte der Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Pro Antikörper in Ansätzen mit den aktiven Proteasen fehlende Prokollagen I Signale im Vergleich zu den Kontrollen. Erneut war in Ansätzen mit aktivem Meprin  $\alpha$  ein schwaches pC-Kollagen Signal detektierbar, das nicht in der Meprin  $\beta$  enthaltenden Probe ersichtlich war. Zusätzlich waren in den Ansätzen mit aktiven Proteasen intensivere Banden für prozessierte C-Propeptide im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar. In den Ansätzen mit aktivem Meprin  $\alpha$  inkubierten dermalen Fibroblasten zeigte sich unterhalb der Bande des prozessierten C-Propeptids eine zusätzliche Bande bei etwa 30 kDa. Abschließend ist zu konstatieren, dass die deskribierten Maturierung indizierenden Veränderungen des Kollagen I Bandenmusters nicht in Promeprin  $\alpha$  und Promeprin  $\beta$  addierten Proben evident ist.

A)



B)

**Abbildung 21: Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  maturieren von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I**

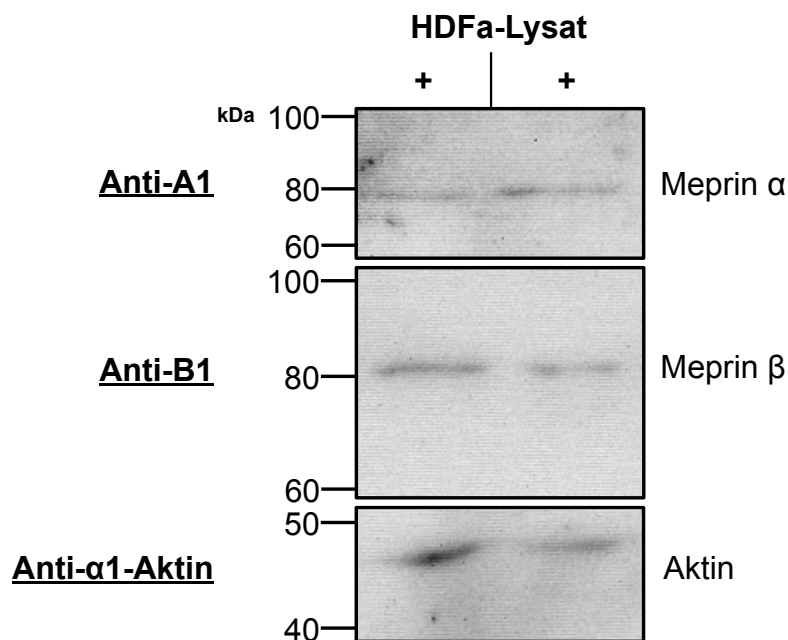
Primäre humane dermale Fibroblasten (HDFa) (A) und pulmonale Fibroblasten (MRC5) (B) wurden mit 10 nM rekombinatem aktivem humanem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  oder den inaktiven Zymogenen Promelin  $\alpha$  und Promelin  $\beta$  für 24 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.2.12). Als Kontrolle dienten Fibroblasten ohne Zugabe von Proteasen. Die Proteine des Zellüberstands wurden mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Mittels Immunoblots wurde die Prokollagen I Maturierung mit Antikörpern gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Telo) und das C-terminale Propeptid (Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Pro) analysiert (Kapitel 2.2.2.5). Die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen wurde durch den Vergleich mit Meprin  $\alpha$  prozessiertem rekombinatem Prokollagen I erleichtert (rekombinante Kontrolle) (Kapitel 2.2.2.12). In beiden Zelllinien konnten mit den Antikörpern in Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  inkubierten Ansätzen fehlende Prokollagen I Signale (220 kDa) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt werden. Gleichfalls konnte in den Proben mit aktiven Proteasen mit dem Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Telo Antikörper matures Kollagen I (170 kDa) und mit dem Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Pro Antikörper prozessierte C-Propeptide (35 kDa) detektiert werden. Diese Effekte waren nicht in Ansätzen mit Promelin  $\alpha$  und Promelin  $\beta$  ersichtlich.

kDa: kilo Dalton

### 3.2.2 Regulation der Kollagen I Maturierung durch spezifische Inhibition von endogenem Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$

Es konnte in Kapitel 3.2.1 gezeigt werden, dass Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I zu maturem Kollagen I spalten können. Es wurde hinterfragt, ob die spezifische Inhibition der proteolytischen Aktivität von endogenem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  in einer reduzierten Prokollagen I Maturierung resultiert.

Als Grundlage für diese Analyse sollte endogenes Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  in humanen dermalen Fibroblasten (HDFa) durch Immunoblots und Messung der spezifischen proteolytischen Aktivität nachgewiesen werden. Für diese Untersuchung wurden kultivierte primäre humane dermale Fibroblasten geerntet und lysiert (Kapitel 2.2.1.6). Die enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt. Die Immundetektion von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  erfolgte zunächst mit polyklonalen Antikörpern (Anti-A1, Anti-B1) (Kapitel 2.2.2.5). In zwei unabhängigen Kulturansätzen der humanen dermalen Fibroblasten konnten Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  bei circa 80 kDa detektiert werden (Abbildung 22). Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

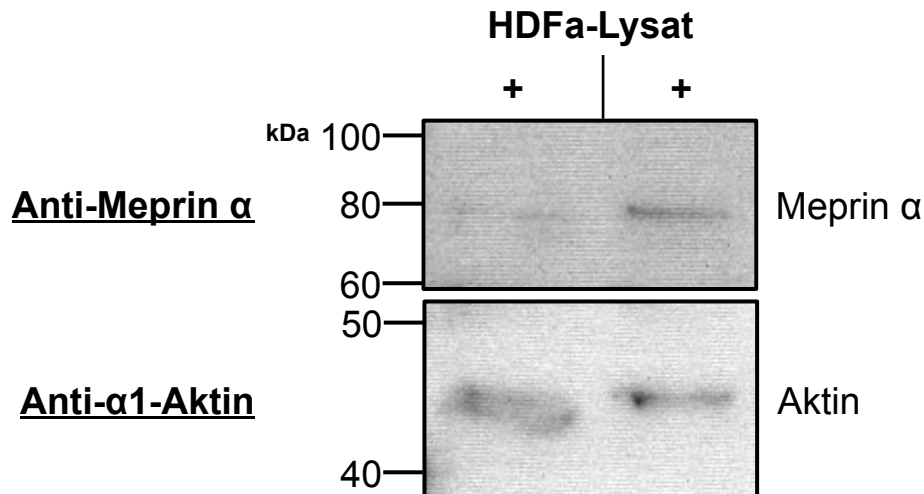


**Abbildung 22: Nachweis von endogenem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  im Lysat humaner dermalen Fibroblasten**

Die Proteine des Zelllysates von humanen dermalen Fibroblasten (HDFa) wurden mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt und Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  mit polyklonalen Antikörpern (Anti-A1, Anti-B1) bei circa 80 kDa detektiert. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

kDa: kilo Dalton

Dieses Ergebnis sollte mittels spezifischer monoklonaler Antikörpern validiert werden. Erneut wurde Meprin  $\alpha$  mit dem monoklonalen Antikörper bei 80 kDa erkannt (Abbildung 23). Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot. Gleichfalls wurde versucht Meprin  $\beta$  mit einem monoklonalen Antikörper nachzuweisen. Dies war aufgrund mangelnder Spezifität des Antikörpers nicht möglich (Immunoblot nicht gezeigt).



**Abbildung 23: Nachweis von endogenem Meprin  $\alpha$  mit monoklonalen Antikörper**

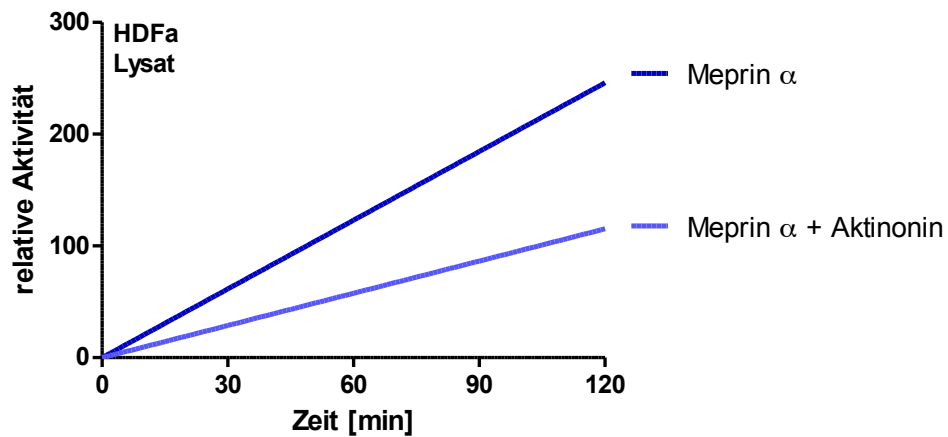
Meprin  $\alpha$  konnte zusätzlich mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Für diese Analyse wurden die Proteine des Zelllysates von humanen dermalen Fibroblasten (HDFa) mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt. Meprin  $\alpha$  konnte mit einem monoklonalen Antikörper bei 80 kDa detektiert werden. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.  
kDa: kilo Dalton

Nachfolgend wurde die proteolytische Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität im Lysat der Fibroblasten bestimmt. Für dieses Experiment wurde das von einer Kultur gewonnene Lysat separiert mit dem Ziel zusätzliche Kontrollproben mit addiertem Inhibitor zu erstellen. Als Hemmstoff diente 10  $\mu$ M Aktinonin, das ein potenter Metalloprotease-Inhibitor ist (Kruse et al. 2004). In jedem Messansatz wurde 60  $\mu$ g Proteinlysate geladen. Die Proben wurden vor der Messung für zehn Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, um eine adäquate Wirkung des Inhibitors sicherzustellen.

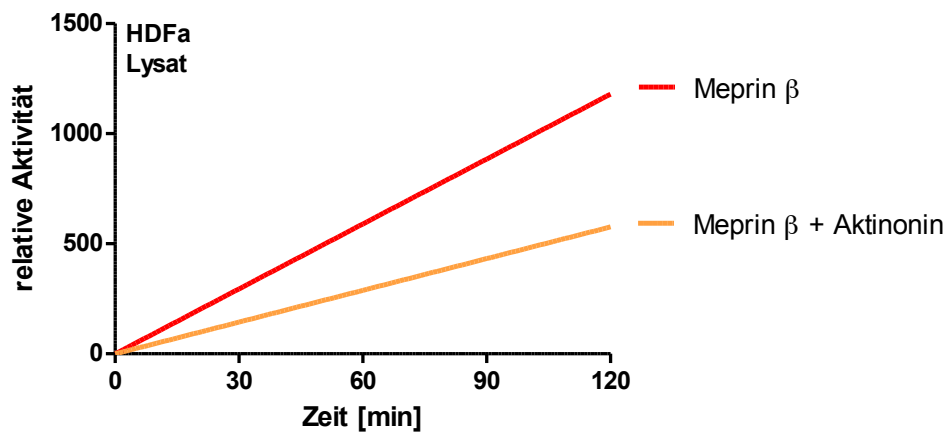
Im Anschluss wurde die proteolytische Aktivität von Meprin  $\alpha$  mit dem fluorogenen Peptid (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) und von Meprin  $\beta$  mit dem spezifischen Peptid (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) bestimmt (Kapitel 3.1.5). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Spektrophotometer bei einer Anregungswelle von 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten (Abbildung 24). In den Fibroblasten Lysaten war proteolytische Aktivität von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  enthalten, die durch Aktinonin inhibiert werden konnte.



A)



B)



**Abbildung 24: Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  im Lysat humaner dermaler Fibroblasten**

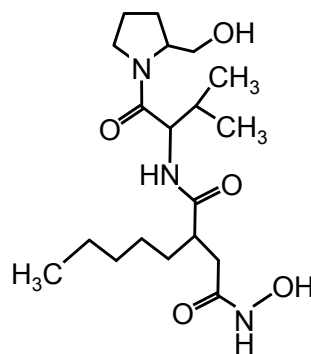
Die proteolytische Aktivität in Zelllysaten von humanen dermalen Fibroblasten (HDFa) wurde in Anwesenheit von Aktinin ( $10 \mu\text{M}$ ) oder unbehandelt gemessen. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin  $\alpha$  (A) erfolgte mit dem fluorogenem Substrat (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) und von Meprin  $\beta$  (B) mit (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp). Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer mit Anregung bei 405 nm und einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.6). Dem Lysat war Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität enthalten, die mit Aktinin inhibiert werden konnte.

mca: (7-Methyloxy coumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

min: Minuten

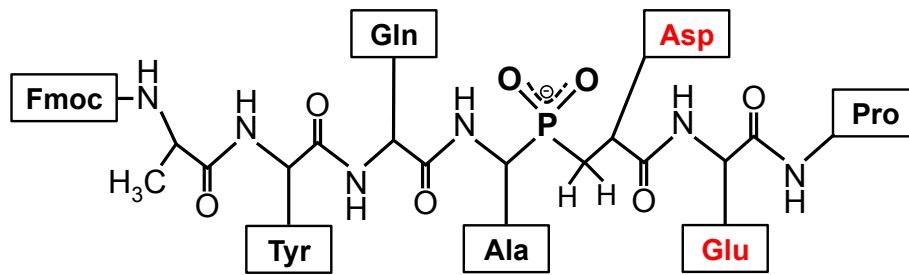
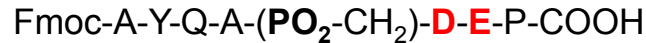
Für die effiziente Inhibition von endogenem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind potente und zugleich spezifische Hemmstoffe notwendig. Deshalb erfolgte im Anschluss die Selektion und Evaluation von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Inhibitoren. Aktinonin wurde aufgrund der inhibitorischen Potenz für Meprin  $\alpha$  ( $K_i=20$  nM) und Meprin  $\beta$  ( $K_i=2$   $\mu$ M) ausgewählt. Der natürlich vorkommende Hemmstoff zählt zur Gruppe der Metalloprotease-Inhibitoren und wurde kommerziell erworben (Kruse et al. 2004). Die Strukturformel ist in Abbildung 25 dargestellt. Die negative Ladung der Hydroxamat-Gruppe bindet das positiv geladene Metall-Ion im aktiven Zentrum von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  und inhibiert die proteolytische Aktivität der Proteasen. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 50  $\mu$ M für Experimente eingesetzt.



**Abbildung 25: Strukturformel des Hydroxamat-Inhibitors Aktinonin**

Aktinonin enthält eine Hydroxamat-Gruppe, die das zentrale Metall-Ion im aktiven Zentrum der Meprine bindet und die proteolytische Aktivität der Proteasen inhibiert.

Des Weiteren wurde für die geplanten Untersuchungen ein neuer, hochpotenter und spezifischer *small compound*-Inhibitor ausgewählt. Die  $K_i$  beträgt für Meprin  $\beta$  50 pM und für Meprin  $\alpha$  550 nM. Der Aufbau des Inhibitors ist in Abbildung 26 dargestellt. Die zentrale Phosphinat-Gruppe imitiert den Übergangszustand der zu spaltenden Peptidbindung und schirmt das positiv geladene Metall-Ion im aktiven Zentrum von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  ab, sodass eine Inhibition der proteolytischen Aktivität erzielt wird. Das Rückgrat des Hemmstoffes besteht aus den Aminosäuren Alanin, Tyrosin, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Prolin. An Alanin ist eine Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) gebunden. Die Selektion der Aminosäuren erfolgte auf Basis der Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Spaltspezifität (Becker-Pauly et al. 2011) sowie der Meprin  $\beta$  Struktur (Arolas et al. 2012). Die beschriebenen Eigenschaften des Phosphinat-Inhibitors sind bisher unveröffentlicht (Lécorché et al., *unveröffentlichte Befunde*).



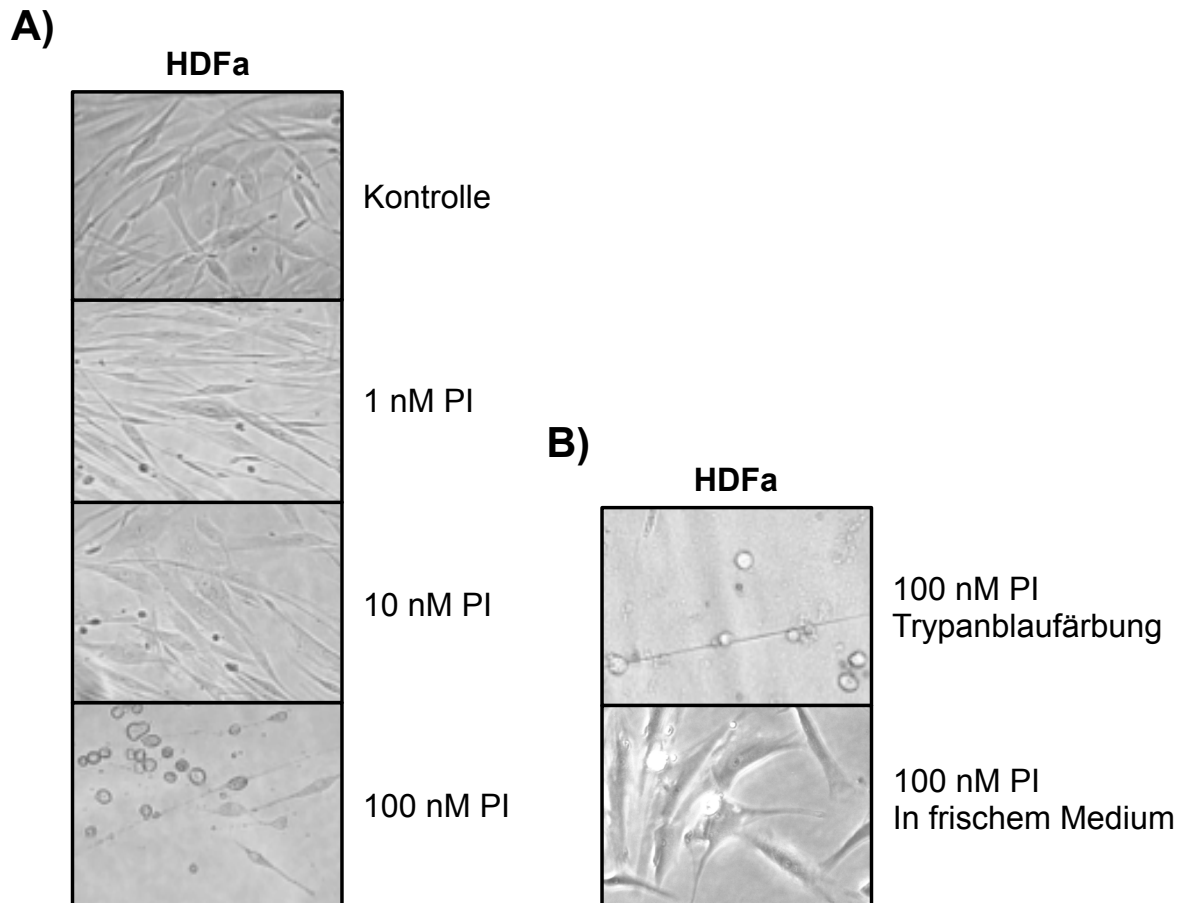
**Abbildung 26: Aufbau des Phosphinat-Inhibitors**

Der *small compound*-Inhibitor besteht aus einer zentralen Phosphinat-Gruppe und den Aminosäuren Alanin, Tyrosin, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Prolin.

Fmoc: Fluorenylmethoxycarbonyl

Aufgrund fehlender Studienergebnisse zur Wirkung des Inhibitors in Zellkultur, wurden humane dermale Fibroblasten (HDFa) mit differierenden Phosphinat-Inhibitor Konzentrationen (1-100 nM) für 24 Stunden inkubiert. Zunächst wurde die Zellmorphologie mikroskopisch beurteilt (Abbildung 27A). Entgegen der Erwartung lösten sich bei einer Inhibitor Konzentration von 100 nM die Fibroblasten vom Flaschenboden. Es resultierte die Frage nach der Vitalität dieser Zellen. Aus diesem Grund wurde eine Trypanblau-Färbung der abgelösten Fibroblasten durchgeführt. Der Farbstoff wurde von den Zellen nicht aufgenommen, was eine intakte Plasmamembran vitaler Zellen indiziert. Nachfolgend wurden die abgelösten Fibroblasten in frischem Nährmedium ohne Inhibitor ausgesät. Dort zeigten die Zellen erneute Adhärenz am Kulturboden (Abbildung 27B). Daraus folgte, dass die gelösten Fibroblasten vital sind. Der Phosphinat-Inhibitor wurde in nachfolgenden Inhibitionsstudien in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt.

Zusätzlich sollten im Rahmen der geplanten Untersuchungen Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Hemmstoffe eingesetzt werden, die eine alternative Inhibitionsstrategie verwenden. Die Inhibitoren sind generierte Peptide, die aus fünf bis acht Aminosäuren mit Dextro-Konfiguration aufgebaut sind. Die Primärstrukturen der Peptide P1 bis P4 sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Selektion der Aminosäuren erfolgte auf Basis der proteolytischen Spaltspezifität von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  mit dem Ziel eine spezifische Substratbindung zu erzielen (Becker-Pauly et al. 2011). Die Dextro-Konfiguration der Aminosäuren soll die proteolytische Spaltung des Peptids durch Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  unterbinden. Die Peptide wurden von der Firma Genosphere Biotechnologies (Paris) auf Bestellung synthetisiert. Mit RP-HPLC und Massenspektrometrie erfolgte die Überprüfung der Probenreinheit. Die Reinheit der Peptide P1 bis P4 war größer als 80 Prozent (Anhang, Kapitel 7).



**Abbildung 27: Inkubation kultivierter humaner dermaler Fibroblasten mit hohen Phosphinat-Inhibitor Konzentrationen resultiert im Verlust der Zelladhärenz**

Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit differierenden Phosphinat-Inhibitor Konzentrationen (1-100 nM) (A) für 24 Stunden inkubiert. Entgegen der Erwartung lösten sich bei einer Konzentration von 100 nM Fibroblasten vom Flaschenboden. Diese wurden einer Trypanblau-Färbung (B) unterzogen, um die Zellvitalität zu untersuchen (Kapitel 2.2.1.7). Dies erfolgte an einem Olympus Mikroskop (CKX41) bei 40-facher Vergrößerung. Die fehlende Aufnahme des Farbstoffes in die Fibroblasten indiziert eine intakte Plasmamembran vitaler Zellen. Die Aussaat der Zellen in frischem Nährmedium resultierte in erneuter Adhärenz.

PI: Phosphinat-Inhibitor

**Tabelle 14: Primärstrukturen der verwendeten Peptide P1-P4 aus D-Aminosäuren**

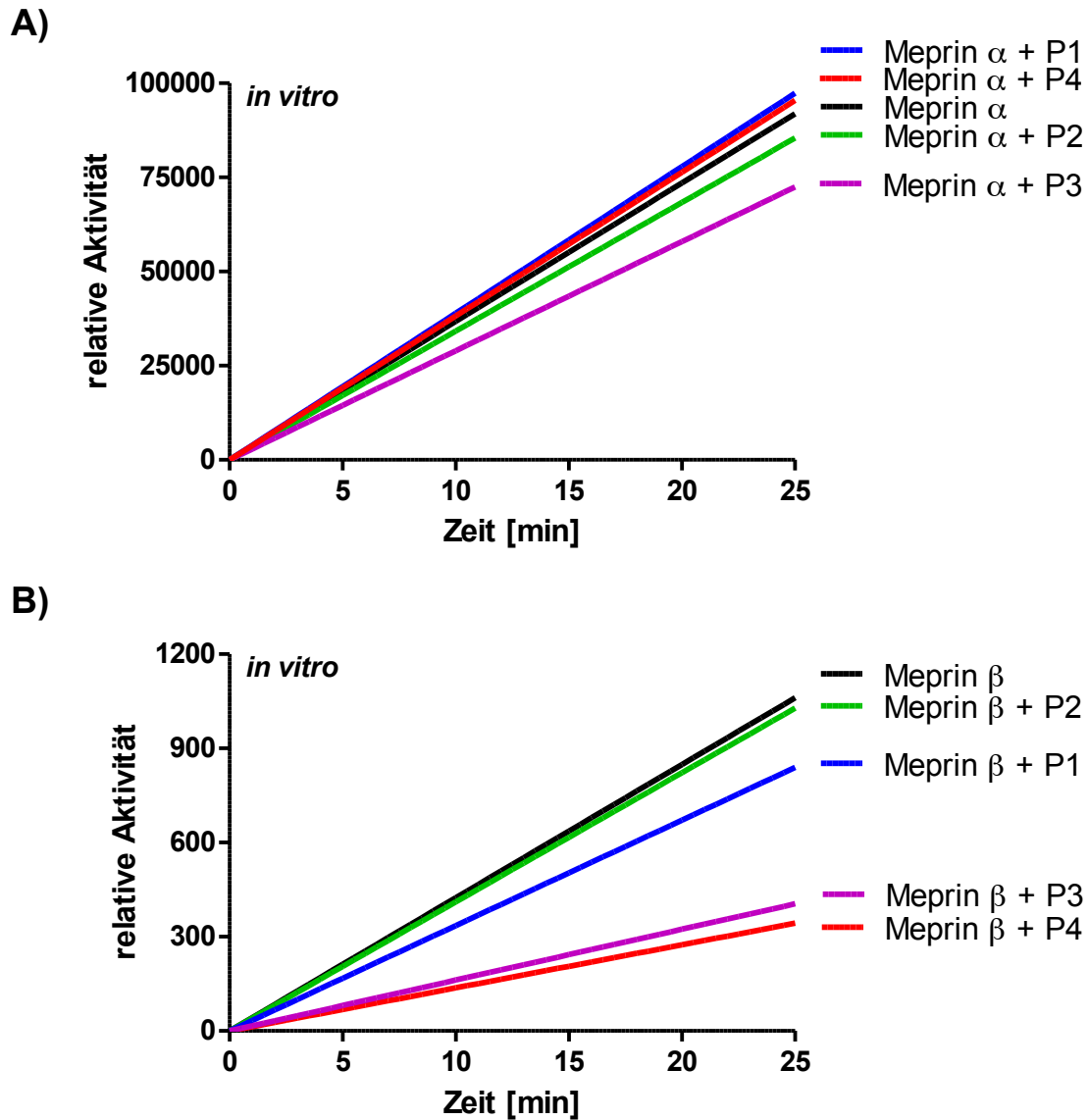
Peptid	Primärstruktur
P1	NH <sub>2</sub> -KKLADEPE-COOH
P2	NH <sub>2</sub> -IFHPD-COOH
P3	NH <sub>2</sub> -KDEDED-COOH
P4	NH <sub>2</sub> -EDEDED-COOH

Die Analyse der Inhibitor-Potenz erfolgte durch Inkubation von 5 nM rekombinant aktivem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  mit 10  $\mu$ M der Peptide P1 bis P4. Für jedes Peptid wurden drei technische Replikate pro Protease erstellt. Die Messplatte wurde für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert, um eine Bindung der Inhibitoren an die Proteasen zu ermöglichen. Nachfolgend wurde das fluorogene Substrat (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) den Reaktionsgefäßen zugeführt. Das hochspezifische Meprin  $\beta$  Substrat ((mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp)) wurde für dieses Experiment nicht verwendet, weil die Primärstruktur dem zu testenden Hemmstoffen zu sehr gleicht. Die proteolytische Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Anregung von 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 120 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.6). In der Auswertung sind nur die ersten 25 Minuten berücksichtigt, aufgrund der zu diesem Zeitpunkt in einzelnen Messproben auftretenden Substratsättigung.

Die proteolytische Aktivität von Meprin  $\alpha$  wurde durch Inkubation mit den Peptiden P1, P2 und P4 kaum verändert (Abbildung 28A). Lediglich Peptid P3 inhibierte in geringem Maße die Meprin  $\alpha$  Aktivität. Die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität wurde am potentesten durch Peptid P4 inhibiert (Abbildung 28B). Peptid P3 hemmte etwas weniger stark als Peptid P4. Peptid P1 zeigte geringes und Peptid P2 keinen inhibitorischen Effekt. Für die anschließend beschriebenen Inhibitionsstudien wurde Peptid P4 ausgewählt und in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt.

Mit Aktinonin, Phosphinat und Peptid P4 wurden Inhibitoren mit differierender Potenz gegenüber Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  selektiert. Diese wurden anschließend zur Regulation der endogenen proteolytischen Aktivität von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  eingesetzt mit dem Ziel die Prokollagen I Maturierung in Kulturen humaner dermaler Fibroblasten (HDFa) zu reduzieren.

Für diese Untersuchung wurde das Nährmedium kultivierter Fibroblasten mit der im Text angegebenen Inhibitor-Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Es wurden von jeder Untersuchungsprobe unabhängige Doppelansätze erstellt. Nach dem Erzielen der Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgenommen und aufbereitet. Die Fibroblasten wurden geerntet und lysiert (Kapitel 2.2.1.6). Das Lysat wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt.



**Abbildung 28: Analyse der inhibitorischen Potenz der Peptide P1-P4 auf die proteolytische Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität**

Humanes rekombinantes Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  (5 nM) wurden mit den Peptiden P1 bis P4 (10  $\mu$ M) für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Peptide bestehen aus den in Tabelle 14 dargestellten Aminosäuren in D-Konfiguration. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin  $\alpha$  (A) und von Meprin  $\beta$  (B) erfolgte mit dem fluorogenem Substrat (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp). Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Anregung von 405 nm und einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 25 Minuten detektiert (Kapitel 2.2.2.6). Meprin  $\alpha$  wurde in geringem Maße durch Peptid P3 inhibiert. Die stärkste inhibitorische Potenz gegenüber Meprin  $\beta$  zeigte Peptid P4.

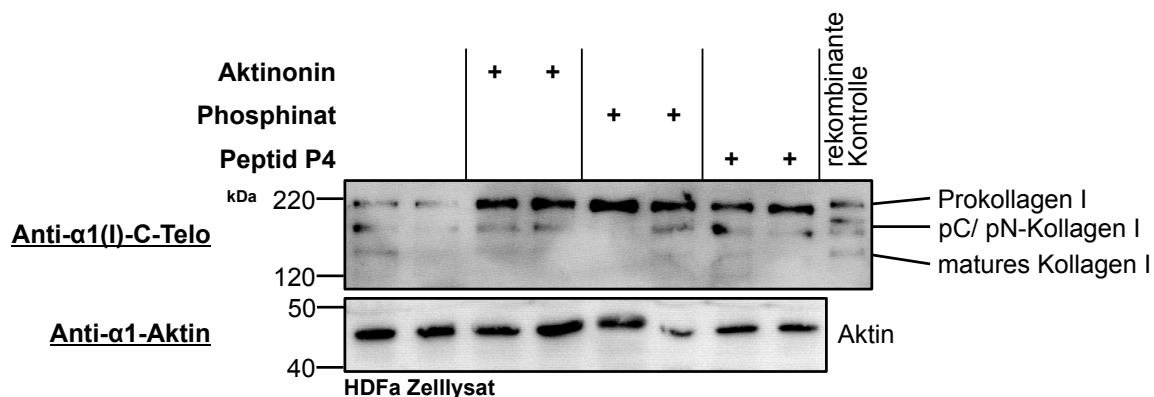
mca: (7-Methyloxy coumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

min: Minuten

Die Analyse der Prokollagen I Maturierung erfolgte mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo, LF-68) der  $\alpha 1$ -Proteinkette von Kollagen I (Kapitel 2.2.2.5). Detektionscharakteristika dieses Antikörpers sind in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Der Immunoblot des Zelllysates, mit dem die Prokollagen I Maturierung an der Zelloberfläche wiedergegeben wird, ist in Abbildung 29 dargestellt. Auf dem Gel wurde zusätzlich mit rekombinantem humanem Meprin  $\alpha$  maturiertes Prokollagen I aufgetragen, um die Zuordnung der Maturierungsstufen zu erleichtern. In den unbehandelten Kontrollproben waren Prokollagen I, die intermediären sowie matures Kollagen I detektierbar. Im Vergleich dazu zeigte sich in mit Inhibitoren inkubierten Proben ein intensiveres Prokollagen I Signal. Die Ladungskontrolle des Polyacrylamidgels erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

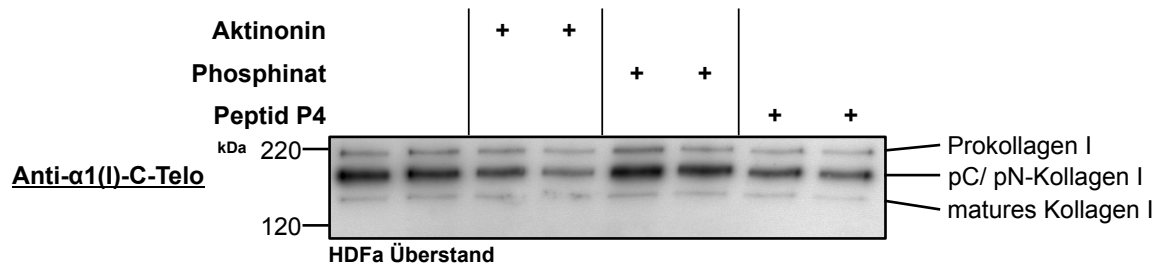


**Abbildung 29: Regulation der Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität reduziert die Prokollagen I Maturierung an der Zelloberfläche**

Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit den Inhibitoren Aktinonin (50  $\mu$ M), Phosphinat (10 nM) und Peptid P4 (10  $\mu$ M) für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Fibroblasten ohne Zugabe von Inhibitoren. Die Zellen wurden lysiert (Kapitel 2.2.1.6), die enthaltenen Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt. Die Prokollagen I Maturierung wurde mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo) analysiert (Kapitel 2.2.2.5). Die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen erfolgte durch den Vergleich mit Meprin  $\alpha$  prozessiertem rekombinantem Prokollagen I. Die mit Inhibitoren inkubierten Proben zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verstärkte Prokollagen I Signale (220 kDa). Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

kDa: kilo Dalton

Demgegenüber konnte in der Immunoblot-Analyse des Überstandes keine eindeutige Veränderung des Kollagen-Bandenmusters nach Zugabe der Inhibitoren erkannt werden (Abbildung 30). In allen Proben wurden Signale von Prokollagen I, den intermediären Formen sowie matures Kollagen I detektiert.



**Abbildung 30: Regulation der Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität reduziert nicht die Prokollagen I Maturierung im Überstand**

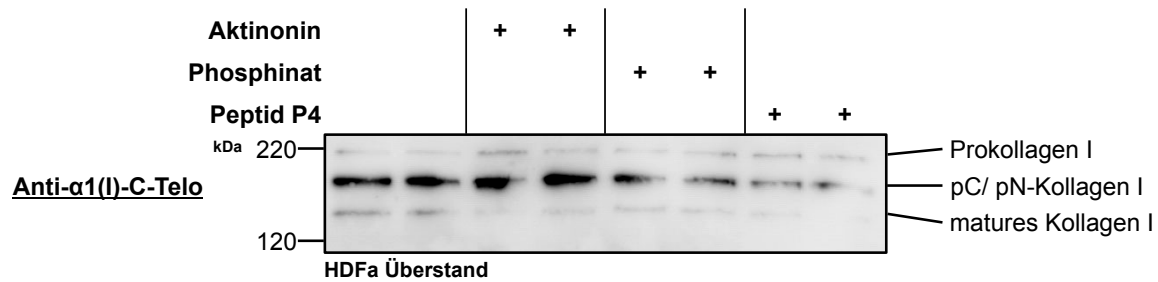
Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit den Inhibitoren Aktinonin (50  $\mu$ M), Phosphinat (10 nM) und Peptid P4 (10  $\mu$ M) für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Fibroblasten ohne Addition von Inhibitoren. Dem Überstand enthaltene Proteine wurden mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt und die Prokollagen I Maturierung mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Telo) analysiert (Kapitel 2.2.2.5). Das Bandenmuster der mit Inhibitoren inkubierten Ansätze glich der unbehandelten Kontrolle.

kDa: kilo Dalton

Es resultierte die Frage, ob die 24-stündige Inkubationszeit suffizient für die Detektion von geringen Veränderungen des Prokollagen I Bandenmusters im Totalüberstand ist. Aus diesem Grund wurde im nachfolgenden Experiment die Inkubationszeit auf 120 Stunden verlängert. Den Ansätzen wurde nach 72 Stunden die gleiche Inhibitor Stoffmenge wie zu Beginn addiert. Die weitere Verarbeitung des Kulturüberstandes erfolgte wie oben beschrieben. Der Immunoblot ist in Abbildung 31 dargestellt.

In den unbehandelten Kontrollproben sind Prokollagen I, die intermediären Kollagen Formen sowie matures Kollagen I detektierbar. Die mit Inhibitoren inkubierten Ansätze zeigten geringere Signalintensitäten für matures Kollagen I im Vergleich zur Kontrolle. In den mit Aktinonin versetzten Proben sind stärkere Prokollagen I Signale als in den Kontrollansätzen erkennbar. Dieser Effekt ist in den mit Phosphinat-Inhibitor und Peptid P4 inkubierten Proben in schwächerer Form erkennbar. Im Vergleich zu Abbildung 30 sind die detektierten Kollagen Signale insgesamt von geringerer Intensität.





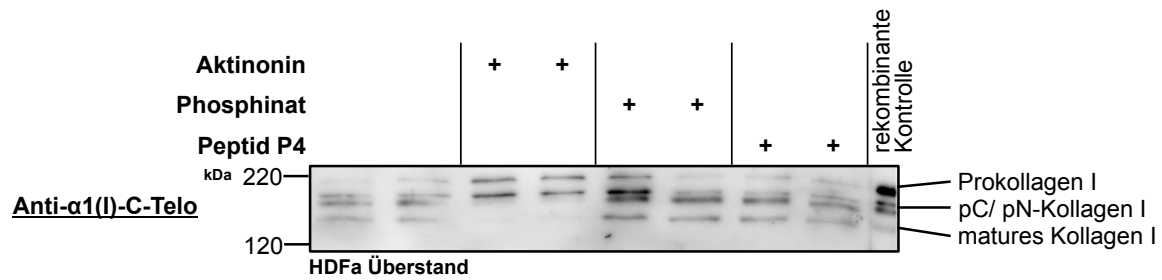
**Abbildung 31: Prolongierte Inkubation von humanen dermalen Fibroblasten mit Inhibitoren**

Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit den Inhibitoren Aktinonin (50  $\mu\text{M}$ ), Phosphinat (10 nM) und Peptid 4 (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Als Kontrolle dienten Fibroblasten ohne Addition von Inhibitoren. Die gesamte Inkubationszeit betrug 120 Stunden. Nach 72 Stunden wurde den Kulturen die gleiche Stoffmenge an Inhibitoren wie zu Beginn hinzugefügt. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt und die Prokollagen I Maturierung mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha 1(\text{I})\text{-C-Telo}$ ) untersucht (Kapitel 2.2.2.5). In den mit Inhibitoren inkubierten Ansätzen war die Signalintensität des matures Kollagen I im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Gleichfalls war die Prokollagen I Bande in diesen Proben stärker als in der Kontrolle.

kDa: kilo Dalton

Mit der Intention die Veränderungen des Kollagen I Bandenmusters im Überstand deutlicher darzustellen, wurde im nächsten Experiment die Kollagensynthese der humanen dermalen Fibroblasten durch Inkubation mit TGF- $\beta 1$  (1,5 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert. Den Kulturen wurde anschließend frisches Medium mit den Inhibitoren Aktinonin (50  $\mu\text{M}$ ), Phosphinat (10 nM) und Peptid P4 (50  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und weitere 24 Stunden inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand abgenommen und wie oben beschrieben verarbeitet. Der resultierende Immunoblot ist in Abbildung 32 dargestellt.

In den unbehandelten Kontrollproben sind Prokollagen I, die intermediären Kollagen I Formen sowie matures Kollagen I detektierbar. Die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen erfolgte durch den Vergleich mit rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$  maturierten Kollagen I. Mit Aktinonin inkubierte Proben zeigten ein intensiveres Prokollagen I Signal als die Kontrollansätze sowie fehlende Banden für matures Kollagen I. In diesem Ansatz war zudem ein stärkeres Signal für pC-Kollagen I bei gleichzeitig schwächerem Signal für pN-Kollagen I detektierbar. Diese Effekte waren nicht in Proben mit Phosphinat und Peptid P4-Inhibitor erkennbar.



**Abbildung 32: Analyse der Prokollagen I Maturierung im Überstand TGF-β1 stimulierter Fibroblasten**

Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit TGF-β1 (1,5 ng/ml) stimuliert um die Prokollagen I Synthese zu verstärken. Anschließend wurden die Inhibitoren Aktinonin (50 μM), Phosphinat (10 nM) und Peptid P4 (50 μM) den Kulturen hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Fibroblasten ohne Addition von Inhibitoren. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt und die Prokollagen I Maturierung mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti-α1(I)-C-Telo) analysiert (Kapitel 2.2.2.5). Die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen wird durch den Vergleich mit rekombinantem Meprin α prozessierten Prokollagen I erleichtert (Kapitel 2.2.2.12). In den mit Aktinonin inkubierten Ansätzen war das Prokollagen I Signal im Vergleich zur Kontrolle verstärkt und es konnte kein Signal für matures Kollagen I detektiert werden. Dieser Effekt war nicht in Phosphinat und Peptid P4-Inhibitor inkubierten Proben evident.

kDa: kilo Dalton

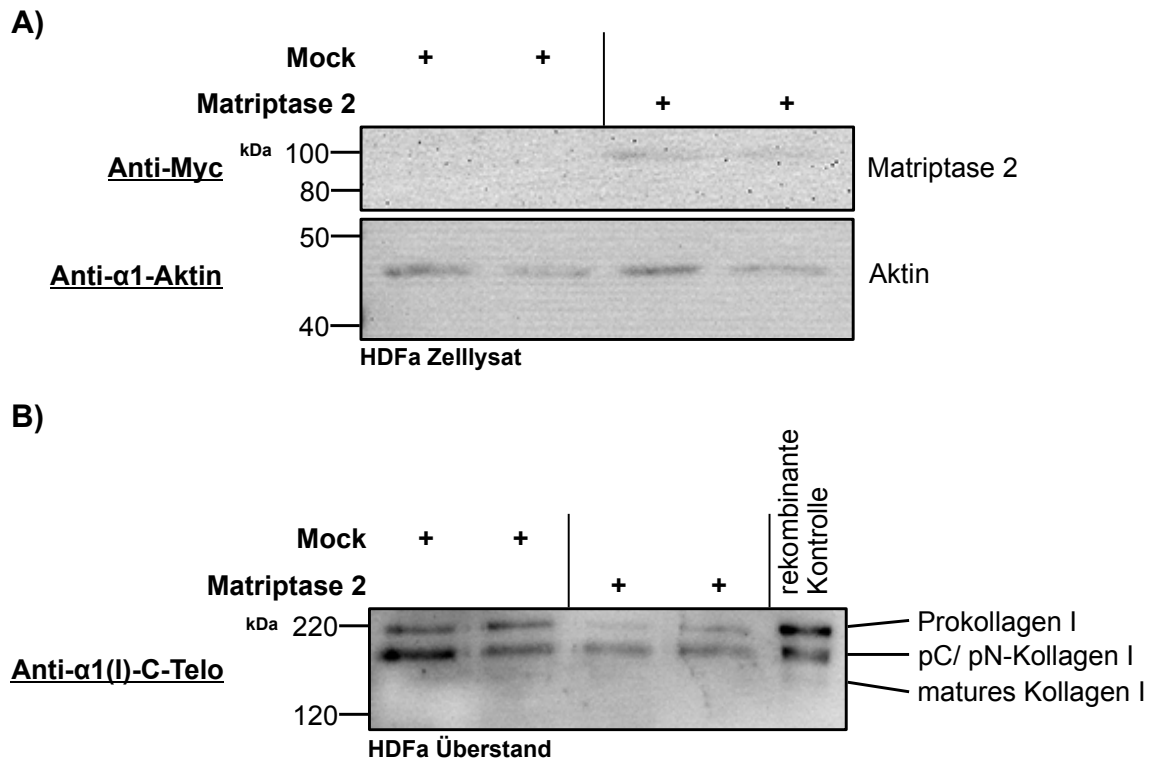
### 3.2.3 Aktivierung von membranständigem Promeprin $\beta$ durch Matriptase 2 resultiert in gesteigerter Prokollagen I Maturierung

Es konnte in Kapitel 3.2.1 gezeigt werden, dass Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  von humanen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I zu murenen Kollagen I spalten können. Nachfolgend wurde analysiert, welchen Effekt die Inhibition von endogenem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  auf die Kollagen I Maturierung erzielt (Kapitel 3.2.2). Abschließend sollte untersucht werden, inwiefern die Aktivierung von endogenem membrangebundenen Promeprin  $\beta$  eine gesteigerte Prokollagen I Maturierung verursacht.

Zu diesem Zweck wurden humane dermale Fibroblasten (HDFa) kultiviert und mit 2  $\mu$ g humaner Matriptase 2 (TMPRSS 6) transfiziert und für 48 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrolle dienten mit pCDNA 3.1 transfizierte Fibroblasten. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und verarbeitet sowie die Zellen geerntet und lysiert (Kapitel 2.2.1.6). Es folgte die Auftrennung der Proteine des Lysates und Überstandes mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) und nachfolgender Erstellung von Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) (Abbildung 33).

Die Expression der transfizierten Matriptase 2 wurde im Zelllysat mit einem Myc-Tag Antikörper kontrolliert (Abbildung 33A) (Kapitel 2.2.2.5). Die Banden konnten bei 100 kDa detektiert werden. Die Ladungskontrolle des Polyacrylamidgels erfolgte mit einem Aktin Immunoblot. Die Analyse der Prokollagen I Maturierung erfolgte mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Telo, LF-68) der  $\alpha$ 1-Proteinkette von Kollagen I (Abbildung 33B). Detektionscharakteristika dieses Antikörpers sind in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

In der Mock transfizierten Kontrolle war Prokollagen I und die intermediären Kollagen I Formen, bei denen das C- oder N-Propeptid proteolytisch abgespalten wurde, detektierbar. Matriptase 2 inkubierte Proben zeigten im Vergleich zur Kontrolle vermindert intensive Prokollagen I Banden. Gleichfalls waren die Signale der intermediären Kollagen I Formen von schwächerer Intensität. Entgegen der Erwartung wurde im gesamten Überstand der Fibroblasten kein matures Kollagen I detektiert. In der mit auf das Gel aufgetragenen Meprin  $\alpha$  maturierten Prokollagen I Kontrolle war ein sehr schwaches Signal für matures Kollagen I zu erkennen.



**Abbildung 33: Prokollagen I Maturierung im Überstand Matriptase 2 transfizierter Fibroblasten**

Humane dermale Fibroblasten (HDFa) wurden mit Matriptase 2 transfiziert (Kapitel 2.2.1.4). Als Kontrollen dienten Transfektionsansätze mit pCDNA 3.1 (Mock). Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Überstände abgenommen. Es wurden die Proteine der Zelllysate und Überstände mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Western Blots (Kapitel 2.2.2.4) erstellt.

**A)** Die Matriptase 2 Expression wurde mit einem Anti-Myc Antikörper dargestellt. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem Aktin Immunoblot.

**B)** Die Kollagen I Maturierung wurde mit einem Antikörper gegen das C-terminale Telopeptid (Anti- $\alpha$ 1(I)-C-Telo) untersucht. In Überständen Matriptase 2 transfizierter Fibroblasten zeigte sich ein schwächeres Prokollagen I Signal als in der Kontrolle. Die Zuordnung der Kollagen I Maturierungsstufen erfolgte durch den Vergleich mit rekombinantem Meprin  $\alpha$  prozessierten Prokollagen I. Entgegen der Erwartung wurde matures Kollagen I in diesem Immunoblot nicht detektiert.

### 3.2.4 Humanes Kollagen VI ist kein Substrat von Meprin $\alpha$ und Meprin $\beta$

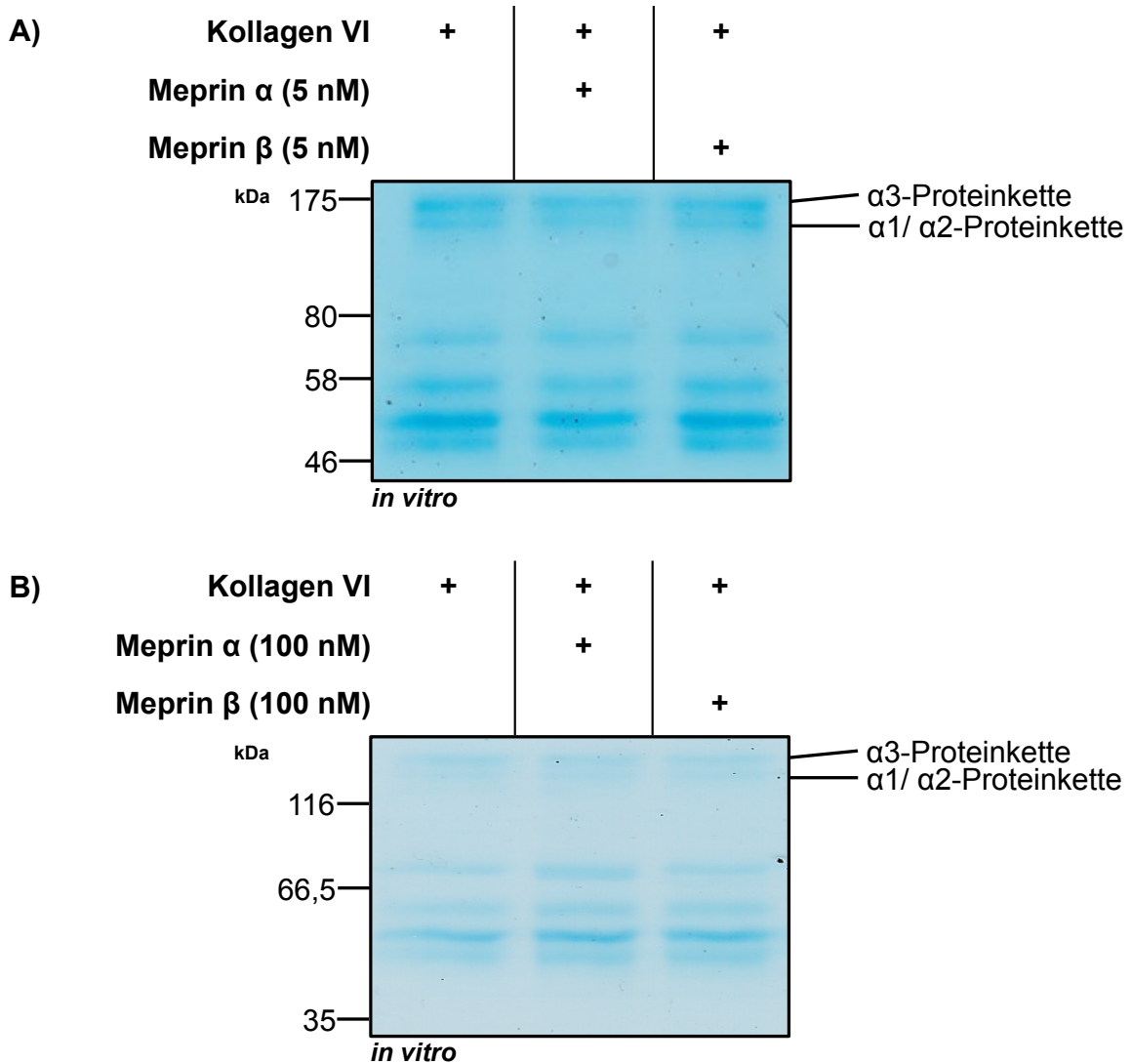
Nach der erfolgreichen proteolytischen Maturierung des in humanen Fibroblasten exprimierten Kollagen I durch Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  (Kapitel 3.2.1) sollte gleichfalls das in der Hochdurchsatzmethode TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) als Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Substrat identifizierte Kollagen VI *in vitro* durch proteolytische Ansätze validiert werden. Dieses Experiment erschien zudem interessant, da Kollagen VI nicht zu den fibrillären Kollagene zählt und somit das Substratspektrum von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  erweitert werden könnte. Die TAILS Untersuchung identifizierte in der trippelhelikalen Region der  $\alpha$ 1-Proteinkette von Kollagen VI drei für Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  identische Spaltstellen sowie zwei additional für Meprin  $\beta$  (Becker-Pauly et al. 2011). Diese sind in Tabelle 15 jeweils mit Angabe der identifizierten Spaltstelle dargestellt.

**Tabelle 15: Mit TAILS identifizierte Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Spaltstellen in der  $\alpha$ 1-Proteinkette von Kollagen VI**

Meprin $\alpha$	Gly410/ Asp411
	Gly553/ Asp554
	Gly556/ Asp557
Meprin $\beta$	Gly410/ Asp411
	Asp480/ Glu481
	Gly553/ Asp554
	Gly556/ Asp557
	Asp557/ Asp558

Die *in vitro* Validierung der TAILS Ergebnisse erfolgte durch Inkubation von aus humaner Plazenta isoliertem Kollagen VI mit 5 nM rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  (Kapitel 2.2.2.12). Die Prozessierungsansätze wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (Kapitel 2.2.2.3) im Gel dargestellt (Abbildung 34A).

Die Banden der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Proteinketten von Kollagen VI waren bei 140 kDa und die  $\alpha 3$ -Proteinkette bei etwa 175 kDa zu detektieren. Zusätzliche Proteinbanden waren bei 50-58 kDa sowie 70 kDa erkennbar. Die mit Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  inkubierten Kollagen VI Proben zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein differierendes Bandenmuster. Aus diesem Grund wurde im nachfolgenden Experiment die Konzentration der Proteasen auf 100 nM erhöht (Abbildung 34B). Erneut verminderten sich weder die Intensitäten der Kollagen VI Proteinbanden noch können neue Spaltungsfragmente detektiert werden.



**Abbildung 34: Proteolytische Prozessierung von humanen Kollagen VI mit rekombinantem Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$**

Humanes Kollagen VI (5  $\mu$ g) wurde mit rekombinantem humanen Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  (5 nM in (A), 100 nM in (B)) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert (Kapitel 2.2.2.12). Die Proteine wurden mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und Proteine im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Färbung (Kapitel 2.2.2.3) dargestellt. Es waren Proteinbanden bei 140 kDa ( $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2-Proteinketten des Kollagen VI) und bei etwa 175 kDa ( $\alpha$ 3-Proteinkette) detektiert. Weitere Proteinbanden stellten sich bei 50-58 kDa sowie 70 kDa dar. Die Inkubation von Kollagen VI mit 5 nM sowie 100 nM Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  resultierte nicht in einem zur Kontrolle abweichenden Proteinbandenmuster. Die unterschiedlichen Protein-Standards sind zu beachten.

kDa: kilo Dalton

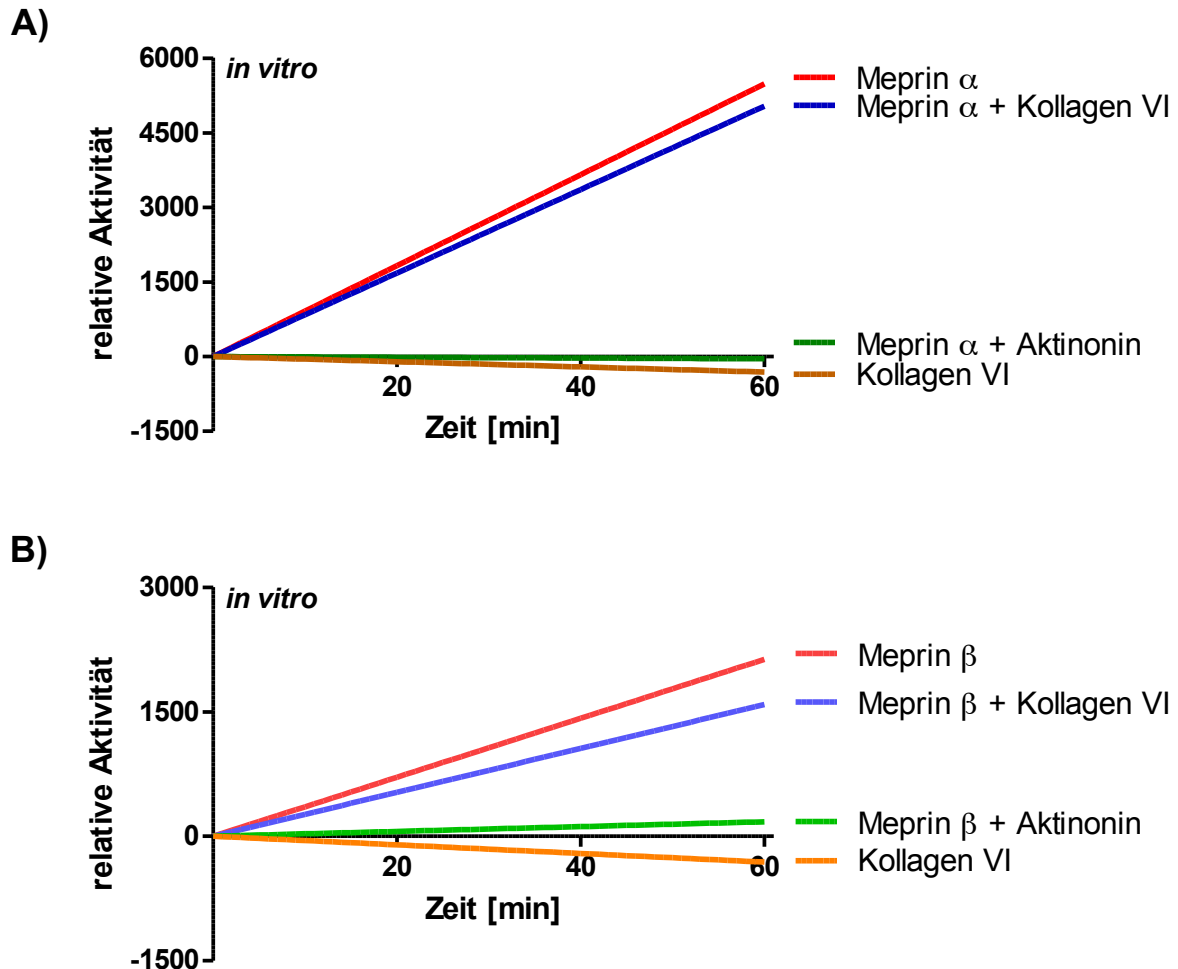
Anschließend sollte ein mögliches inhibitorisches Potential von Kollagen VI auf die proteolytische Aktivität der Proteasen analysiert werden. Für diese Untersuchung wurde 5 nM Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  mit 1  $\mu$ g Kollagen VI für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In der positiv Kontrolle wurde den Proteasen 20  $\mu$ M Aktinonin als bekannter Meprin-Inhibitor zugegeben (Kruse et al. 2004). Zusätzlich wurden Kontrollansätze erstellt, die singular Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$  oder Kollagen VI enthielten. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte für Meprin  $\alpha$  mit dem fluorogenen Peptid (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) und für Meprin  $\beta$  mit dem spezifischen Substrat (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) (Kapitel 2.2.2.6). Die resultierende Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer bei Anregung mit 405 nm mit einer Exzitation bei 320 nm alle 30 Sekunden für 60 Minuten detektiert (Abbildung 35).

Die proteolytische Aktivität von Meprin  $\alpha$  (Abbildung 35A) wurde durch Kollagen VI kaum, die von Meprin  $\beta$  (Abbildung 35B) leicht inhibiert. Daraus folgte, dass den in Abbildung 34 gezeigten Ansätzen ausreichend aktives Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  enthalten war. Im Kollagen VI Kontrollansatz sank aufgrund der fehlenden proteolytischen Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität und dem Zerfall des fluorogenen Peptides die gemessene Fluoreszenz unter den ersten Messwert (*bleaching effect*). Die Aktinonin Kontrolle zeigte eine potente Inhibition von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$ .

Um die prinzipielle Spaltbarkeit von Kollagen VI zu zeigen, wurde das Protein nachfolgend mit 1,7  $\mu$ M und 3,4  $\mu$ M pankreatischem Trypsin für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden im Anschluss mit SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und im Polyacrylamidgel durch eine Coomassie-Färbung dargestellt (Abbildung 36).

Die Probe des unbehandelten Kollagen VI präsentierte das oben beschriebene Proteinbandenmuster. In den mit Trypsin inkubierten Kollagen VI Ansätzen waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Proteinbanden bei 200 kDa, 140 kDa sowie 50-80 kDa abgeschwächt. Proteinspaltung indizierende, im Vergleich zur Kontrolle neu aufgetretene Proteinbanden, sind in geringer Intensität bei 23 kDa erkennbar.





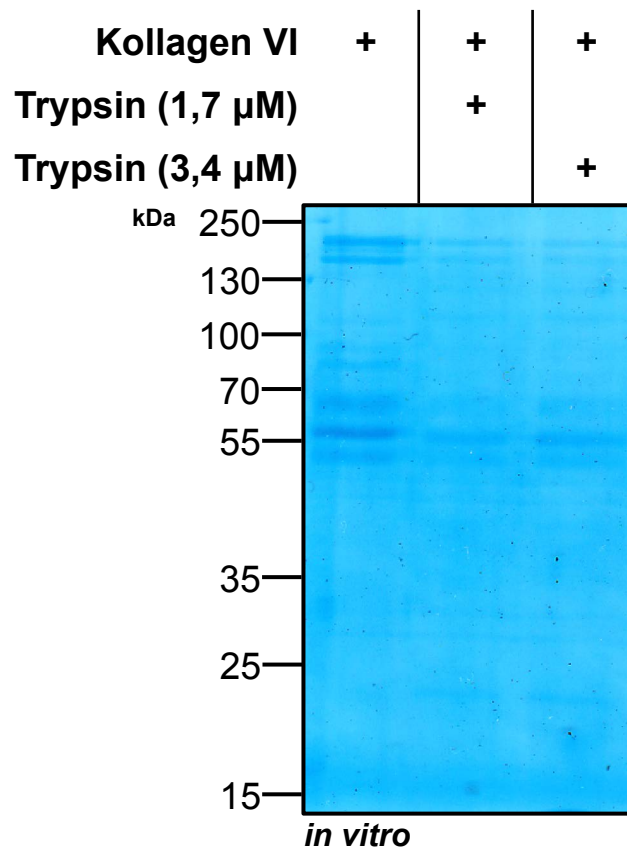
**Abbildung 35: Einfluss von Kollagen VI auf die proteolytische Aktivität von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$**

Meprin  $\alpha$  (A) und Meprin  $\beta$  (B) (5 nM) wurden mit Kollagen VI (1  $\mu$ g) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität der Proteasen für 60 Minuten bestimmt (Kapitel 2.2.2.6). Kollagen VI inhibierte in geringem Maße die Meprin  $\alpha$  Aktivität und leicht Meprin  $\beta$ . Als Kontrollen wurde das fluorogene Substrat nur mit Kollagen VI inkubiert sowie eine Inhibition der Proteasen mit dem potenten Meprin-Inhibitor Aktinonin (20  $\mu$ M) durchgeführt.

mca: (7-Methyloxy coumarin-4-yl) acetyl

dnp: 2,4-Dinitrophenyl

min: Minuten



**Abbildung 36: Proteolytische Prozessierung von humanen Kollagen VI mit pankreatischen Trypsin**

Humanes Kollagen VI (5  $\mu\text{g}$ ) wurde mit Trypsin (1,7 und 3,4  $\mu\text{M}$ ) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert (Kapitel 2.2.2.12). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.2.2) aufgetrennt und die Proteine im Gel durch Coomassie-Färbung (Kapitel 2.2.2.3) dargestellt. Proteinbanden bei 50-80, 140 und 200 kDa waren nach der Inkubation mit Trypsin abgeschwächt. Zusätzlich konnte in diesen Ansätzen Spaltfragmente bei 23 kDa in geringer Intensität erkannt werden.

kDa: kilo Dalton

## 4. Diskussion

Das menschliche Genom kodiert für insgesamt 588 Proteasen, die für zahlreiche physiologische Prozesse im menschlichen Körper essenziell sind (Puate et al. 2003, Quesada et al. 2009). Zum Beispiel maturiert die Zink abhängige Metalloendoprotease Meprin  $\beta$  Prokollagen I und III zu reifen Kollagen Molekülen (Kronenberg et al. 2010, Broder et al. 2013). Demgegenüber kann deregulierte proteolytische Aktivität in humanen Pathologien resultieren. So führt die verstärkte Meprin  $\beta$  Expression zu pathologischer Kollagen Deposition mit konsekutiver fibrotischer Morphologie und veränderter Gewebefunktion (Kronenberg et al. 2010, Biasin et al. 2014).

Für die übergeordnete Vision, Proteasen als therapeutische Moleküle in humanen Pathologien einzusetzen, ist das exakte Verständnis der Regulation proteolytischer Aktivität notwendig. In dieser Arbeit wurde die Regulation der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität analysiert und die Eignung von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  als therapeutische Zielmoleküle in fibrotischen Konditionen untersucht. Die in vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

Zunächst wird auf die Experimente zur Regulation der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität eingegangen. Erstmals wurde nachgewiesen, dass membrangebundenes Promeprin  $\beta$  nicht durch lösliche Proteasen aktiviert werden kann. Die initial aufgestellte Hypothese der eingeschränkten Zugänglichkeit löslicher Aktivatoren zur verdeckten Spaltstelle im Meprin  $\beta$  Propeptid wurde validiert (Arolas et al. 2012). Das erzielte Ergebnis ist für publizierte Meprin  $\beta$  Funktionen bedeutsam. Beispielsweise generiert nur membrangebundenes, nicht aber von der Zelloberfläche abgespaltenes Meprin  $\beta$  aus transmembranen APP A $\beta$  Peptide, die in aggregierter Form in Gehirnen von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Selko 2001, Bien et al. 2012). In diesem Prozess können daher die bisher bekannten löslichen Aktivatoren wie KLK 5 und 8 (Ohler et al. 2010) keine Regulatoren der Meprin  $\beta$  Aktivität sein, sondern eine membrangebundene Protease ist zur Promeprin  $\beta$  Aktivierung notwendig.

Aufgrund der publizierten löslichen tryptischen Proteasen erschienen membrangebundene Serinproteasen als sehr aussichtsreiche Kandidaten und es konnte Matriptase 2 (TMPRSS 6), eine Typ II Transmembran Serinprotease, als Aktivator von membrangebundenen Promeprin  $\beta$  identifiziert werden. Bislang war Matriptase 2 als wichtiger Regulator des Eisen Metabolismus bekannt (Du et al. 2008). Mutationen im Matriptase 2 Gen führen zu Eisenmangelanämie, die mittels Eisensubstitution nicht beeinflusst wird (Finberg et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass Matriptase 2 Haemojuvelin spaltet mit konsekutiver Herunterregulation von Heparin (Silvestri et al. 2008).

Die Aktivierung von Promeprin  $\beta$  durch Matriptase 2 wurde mit Immunoblots und durch Messung der spezifischen Meprin  $\beta$  Zelloberflächenaktivität in verschiedenen Zelllinien (HEK-293/ COS-7) nachgewiesen und unterscheidet sich somit methodisch von vorangegangenen publizierten Studien, in denen rekombinantes Promeprin  $\beta$  verwendet wurde, das die frei vorliegende Ektodomäne der eigentlich membrangebundenen Protease enthielt (Becker et al. 2003, Becker-Pauly et al. 2007). Die Matriptase 2 Spaltstelle wurde an Position Arg61/ Asn62 im Meprin  $\beta$  Propeptid mittels Massenspektrometrie lokalisiert. Trypsin und weitere publizierte Aktivatoren verwenden die gleiche Spaltstelle (Ohler et al. 2010). Die Spaltung nach Arginin an der P1 Position stimmt überein mit der durch *PICS* und synthetischen Peptiden identifizierten Matriptase 2 Spaltspezifität (Barre et al. 2014, Wysocka et al. 2014).

Matriptase 2 wurde gleichfalls vergeblich auf Promeprin  $\alpha$  aktivierende Funktion überprüft. Dieses Ergebnis entsprach zwar nicht der Erwartung, steht aber in Konsens mit bisher publizierten Promeprin  $\alpha$  und Promeprin  $\beta$  Aktivatoren, die über eine unterschiedliche Spezifität verfügen. Beispielsweise aktiviert KLK 4 und KLK 8 nur Promeprin  $\beta$  und Plasmin nur Promeprin  $\alpha$  (Becker et al. 2003, Ohler et al. 2010). Dies ist möglicherweise in der von Meprin  $\beta$  differierenden räumlichen Quartärstruktur begründet, sodass Matriptase 2 keinen Zugang zur Spaltstelle des Meprin  $\alpha$  Propeptids erhält.

Die Aktivierung des membrangebundenen Promeprin  $\beta$  erfolgt nicht grundsätzlich durch Typ II Transmembran Serinproteasen. In diesbezüglich durchgeführten Experimenten wurde TMPRSS 4, das zu dieser Proteasen Gruppe zählt, nicht als Promeprin  $\beta$  Aktivator validiert. Dieses Ergebnis entsprach nicht der Erwartung, weil TMPRSS 4 wie Meprin  $\beta$  an Organogenese und Zelldifferenzierung beteiligt sowie in Krebszellen exprimiert ist und dort als Promeprin  $\beta$  Aktivator hätte agieren können (Ohler und Becker-Pauly 2011).

Andererseits ist dieses Ergebnis hinweisend für eine Spezifität der Matriptase 2 vermittelten Aktivierung des membrangebundenen Promeprin  $\beta$ . Die Existenz weiterer transmembraner Promeprin  $\beta$  Aktivatoren kann nicht ausgeschlossen werden. Es wäre dieser These bezüglich interessant, Gewebe von Matriptase 2 maskierten Mäusen, die wie Meprin  $\beta$  defiziente Mäuse vital sind, auf einen Meprin  $\beta$  *knock out* Phänotyp zu untersuchen (Norman et al. 2003, Du et al. 2008).

Die identifizierten löslichen Aktivatoren sind gleichwohl für biologische Meprin  $\beta$  Funktionen relevant, weil membrangebundenes Promeprin  $\beta$  durch ADAM10 oder ADAM17 vermitteltes *shedding* von der Zelloberfläche abgespalten werden kann (Hahn et al. 2003, Jefferson et al. 2013) und nachfolgend lösliche Proteasen zur Promeprin  $\beta$  Aktivierung erforderlich werden. Dies ist beispielsweise im Dünndarm bedeutsam, wo Meprin  $\beta$  durch proteolytische Spaltung des MUC2 Proteins die Ablösung des Mukus von der Darmschleimhaut induziert. Nur von der Zellmembran abgespaltenes, nicht aber membrangebundenes Meprin  $\beta$  verfügt über diese Funktion (Schutte et al. 2014). Die fehlende Matriptase 2 Expression an der Enterozyten Zellmembran könnte zu diesem Effekt beitragen (Jäckle et al. 2015). Daher muss das von der Zelloberfläche abgespaltene Promeprin  $\beta$  im Darmlumen durch gelöste Proteasen wie Trypsin aktiviert werden.

Evidenz für *in vivo* Kolo-kalisation von Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 wurde durch konfokale Mikroskopie von murinem Dünndarm gewonnen (Jäckle et al. 2015). Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 Expression konnte auf Zellen der Lamina propria detektiert werden, die am wahrscheinlichsten Immunzellen sind. Die Meprin  $\beta$  Expression auf murinen Immunzellen ist vorbeschrieben (Crisman et al. 2004), nicht aber die der Matriptase 2. Mit Genexpressionsanalysen wurde Matriptase 2 mRNA in murinen Immunzellen nachgewiesen (Wu et al. 2009). Wie bereits beschrieben, konnte keine Kolo-kalisation auf Enterozyten detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass Matriptase 2 ein lokal spezifischer und kein ubiquitärer Promeprin  $\beta$  Aktivator ist. Auch im Menschen ist die proteolytische Interaktion zwischen Matriptase 2 und Promeprin  $\beta$  potentiell möglich, wie das übereinstimmende humane mRNA Expressionsprofil beider Proteasen belegt (Wu et al. 2009).

Daher war es interessant, Effekte dieser proteolytischen Interaktion auf direkte Meprin  $\beta$  Substrate zu untersuchen. Aufgrund der detektierten Kollokalisierung beider Proteasen auf murinen Immunzellen in intestinaler Lamina propria wurde APP751 ausgewählt, das mit Ausnahme von Neuronen ubiquitär exprimiert wird (Selkoe 2001). Es wurde eine gesteigerte Spaltung des Substrates durch Matriptase 2 induzierte Promepirin  $\beta$  Aktivierung detektiert (Jäckle et al. 2015). Dies steht in Konsens mit der publizierten Meprin  $\beta$  Eigenschaft die Leukozyten-Migration zu fördern, die unter anderem eine Spaltung von Membranproteinen wie APP erfordert (Crisman et al. 2004). In nachfolgenden Studien könnte daher die Leukozyten-Migrationseffizienz von Wildtyp mit Matriptase 2 maskierten Mäusen verglichen werden (Du et al. 2008).

Wie bereits erwähnt, spaltet membrangebundenes Meprin  $\beta$  humanes APP an der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle, was nachfolgend die Freisetzung von A $\beta$  Peptiden durch die  $\gamma$ -Sekretase erhöht (Bien et al. 2012). Dies ist vor dem Hintergrund eines potentiell pathologischen Effektes aggregierter A $\beta$  Peptide auf den Progress der Demenz vom Alzheimer Typ relevant (Selkoe 2001). Meprin  $\beta$  mRNA ist in Hirnparenchym von Patienten mit Alzheimer Erkrankung verstärkt exprimiert (Bien et al. 2012). Daher ist die Untersuchung einer pathophysiologischen Bedeutung der Promepirin  $\beta$  Aktivierung durch Matriptase 2 weiterführendes Forschungsziel. Erhöhte Matriptase 2 Expression könnte mittels verstärkten Meprin  $\beta$  induzierten APP *shedding* in vermehrter Generierung von A $\beta$  Peptiden resultieren.

Des Weiteren wird Meprin  $\beta$  an der Keratinozyten Zellmembran im Stratum granulosum exprimiert. In hyperproliferativer Haut von Psoriasis vulgaris Patienten erweiterte sich die Meprin  $\beta$  Expression auf das Stratum corneum (Becker-Pauly et al. 2007). Es wird angenommen, dass die physiologische Meprin  $\beta$  Funktion in der Differenzierung terminaler Keratinozyten besteht. Beispielsweise könnten mittels proteolytischer Meprin  $\beta$  Aktivität Zell-Zell-Verbindungen reorganisiert werden. Zum hyperproliferativen Hautzustand könnte Meprin  $\beta$  durch Aktivierung proinflammatorischer Zytokine beitragen (Herzog et al. 2009). Das im Stratum granulosum exprimierte KLK 4, wurde bisher für den lokalen Promepirin  $\beta$  Aktivator gehalten (Becker-Pauly et al. 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann diese Protease auf der Keratinozytenmembran gebundenes Promepirin  $\beta$  nicht aktivieren. Es wäre interessant, Matriptase 2 als möglichen Promepirin  $\beta$  Aktivator im Stratum granulosum und eine potentiell veränderte Expression dieser in pathologisch hyperproliferativer Haut zu analysieren.

Es ist bekannt, dass Meprin  $\beta$  unter fibrotischen Konditionen überexprimiert wird. In dieser Arbeit wurde von humanen dermalen und pulmonalen Fibroblasten exprimiertes Prokollagen I als Meprin  $\beta$  Substrat validiert. Deshalb wurde die Effizienz der Prokollagen I Maturierung untersucht, die nach Aktivierung von Promepirin  $\beta$  durch Matriptase 2 verstärkt war. Dieser Effekt könnte in der Pathogenese fibrotischer Hautzustände und der Sklerosierung pulmonaler Gefäßwände analysiert werden (Kronenberg et al. 2010, Biasin et al. 2014).

Die Validierung der Prokollagen I Maturierung durch Meprine erfolgte in Immunoblots mittels Antikörpern gegen das C-terminale Telo- und Propeptid. Zu hinterfragen sind die in diesen Experimenten detektierten Signale des C-terminalen Propeptids in unbehandelten und mit Promepirin  $\alpha$  oder Promepirin  $\beta$  inkubierten Kontrollproben. Gleichmaßen war in diesen Ansätzen auf dem Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo Immunoblot intermediäre pC-Kollagen I Moleküle, aber kein matures Kollagen I detektierbar. Dieser Effekt könnte induziert werden durch die Expression von Proteasen, die das C-terminale, aber nicht das N-terminale Propeptid maturieren können. BMP-1, das auch von primären humanen dermalen Fibroblasten exprimiert wird, wäre diesbezüglich ein geeigneter Kandidat (Kronenberg et al. 2010).

Weiterhin auffallend war die Detektion schwacher pC-Kollagen I Signale in Ansätzen mit in das Medium appliziertem rekombinantem Meprin  $\alpha$ . Dies war sowohl im Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo als auch Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Pro Immunoblots ersichtlich. Demgegenüber waren diese Banden nicht in Proben mit rekombinanten Meprin  $\beta$  ersichtlich. Diese Beobachtung stimmt mit der für Meprin  $\beta$  publizierten Eigenschaft überein, rekombinantes Prokollagen I effizienter als Meprin  $\alpha$  zu maturieren (Broder et al. 2013).

Hinterfragt werden sollen des Weiteren die im Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Pro Immunoblot des HDFa Überstandes in mit Meprin  $\alpha$  inkubierten Ansätzen unterhalb des C-terminalen Propeptids detektierten Signalbanden. Diese könnten in einer zusätzlichen Meprin  $\alpha$  Spaltstelle im C-terminalen Propeptid begründet sein. In rekombinantem Prokollagen I konnten neben der Spaltstelle Arg 1227/ Asp 1228 eine weitere an Position Ala 1218/ Asp 1219 identifiziert werden (Broder et al. 2013). Die Differenz zwischen den Spaltstellen beträgt weniger als zehn Aminosäuren und kann daher die Differenz des Molekulargewichts zwischen C-terminalem Propeptid und der zu untersuchenden Bande nicht erklären.

Das gleichzeitige Fehlen des Spaltfragmentes in Ansätzen mit aktivem Meprin  $\beta$  könnte in unterschiedlichen Spaltspezifitäten von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  begründet sein (Becker-Pauly et al. 2011). Eine definitive Analyse der Eigenschaften des Spaltfragmentes könnte mittels Massenspektrometrie erfolgen.

Das Ergebnis des Experimentes widerspricht der publizierten These einer intrazellulären Prokollagen I Maturierung, weil in den unbehandelten Kontrollen Prokollagen I nachgewiesen wurde (Canty und Kadler 2005). Die C-terminalen Propeptide sowie pC-Kollagen I könnten grundsätzlich intrazellulär prozessiert worden sein. Allerdings kann eine intrazelluläre Abspaltung des N-terminalen Propeptids nicht erfolgt sein, weil im Anti- $\alpha 1(I)$ -C-Telo Immunoblot kein matures Kollagen I vorliegt. Erst die Addition rekombinanter C- und N-Prokollagenasen ins Medium erzielte die vollständige Kollagen I Maturierung. Somit spricht dieses Ergebnis für eine extrazelluläre Prozessierung von Prokollagen I Molekülen.

Das Substratspektrum der Meprine sollte nach der erfolgreichen proteolytischen Maturierung des in humanen Fibroblasten exprimierten Prokollagen I auf nichtfibrilläre Kollagene erweitert werden. In der Proteomics-Methode TAILS wurde Kollagen VI als Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Substrat identifiziert (Jefferson et al. 2013). Dieses Ergebnis sollte durch proteolytische Prozessierungsansätze mit aus humaner Plazenta isoliertem Kollagen VI validiert werden. Entgegen der Erwartung wurde Kollagen VI nicht durch rekombinantes Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  prozessiert.

Die im TAILS Ansatz gemessenen Spaltstellen in der Kollagen VI  $\alpha 1$ -Proteinkette erschienen plausibel, weil die sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat in P1-Position enthalten waren. Diese Spaltspezifität ist für Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  charakteristisch (Becker-Pauly et al. 2011). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die im TAILS Ansatz identifizierten Spaltstellen falsch positiv sind. Als Ursache der fehlenden Prozessierung könnte das aus humaner Plazenta isolierte Kollagen VI in der Primärstruktur von dem in U373-Zellen exprimierten, das im TAILS Ansatz detektiert wurde, abweichen. Dies könnte in Mutationen im Kollagen VI Gen der U373-Zellen, die neoplastische Eigenschaft besitzen, begründet sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch die Anzahl der identifizierten Spaltstellen mit der deutlichen Distanz zwischen diesen. Alternativ wäre denkbar, dass die Quartärstruktur des aus Plazenta isolierten Kollagen VI eine Maturierung verhindert. Es könnten statt der  $\alpha 3$ -Proteinkette  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  oder  $\alpha 6$ -Proteinketten in der Kollagen VI Trippelhelix eingebaut sein (Gara et al. 2008). Diese unterscheiden sich im Molekulargewicht, sodass Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  räumlich keinen Zugang zu den detektierten Spaltstellen in der  $\alpha 1$ -Proteinkette erhalten könnte.



Die verstärkte Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Expression unter fibrotischen Konditionen (Kronenberg et al. 2010, Biasin et al. 2014) sowie die in dieser Arbeit validierte humane Prokollagen I Maturierung durch Meprine resultierte im Ziel die Eignung beider Proteasen als therapeutische Zielmoleküle in fibrotischen Pathologien zu analysieren. Durch Regulation der proteolytischen Meprin Aktivität mittels spezifischer Inhibitoren, die sich im Hemmmechanismus unterschieden, sollte eine Reduktion der Prokollagen I Maturierung erzielt werden.

Zunächst wird auf die Ergebnisse zur Evaluation der Phosphinat- und Peptidinhibitoren eingegangen, die nicht in der Zellkultur etabliert waren. Entgegen der Erwartung lösten sich beim Einsatz höherer Phosphinat-Inhibitor Konzentrationen die Fibroblasten vom Zellboden. Die Ursache der beobachteten Zellablösung ist unbekannt. Das Absterben abgelöster Zellen konnte ausgeschlossen werden. Denkbar wäre ein Einfluss der negativ geladenen Phosphinat-Gruppe des Hemmstoffes auf das Zellen umgebende Ionenmilieu mit konsekutivem Effekt auf die ionenabhängige Zelladhäsion (Takeichi 1977).

Des Weiteren wurde die Inhibitionspotenz der Peptide P1-P4, die aus fünf bis acht dextro-konfigurierten Aminosäuren bestehen, mittels Aktivitätsassays untersucht. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte auf Basis der Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Spaltspezifität (Becker-Pauly et al. 2011). Die fehlende Meprin  $\alpha$  Hemmung durch Peptid P4 stimmt überein mit der mangelnden Eigenschaft der Protease das fluorogene Peptid (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) zu spalten (Broder und Becker-Pauly 2013). Peptid P1 erzielte keinen inhibitorischen Effekt auf die Meprin  $\alpha$  Aktivität. Dies widersprach der Erwartung, weil exakt die acht im TAILS Ansatz an Position P4 bis P4' am häufigsten detektierten Aminosäuren in das Peptid eingebaut wurden. Möglicherweise erwirkt die Dextro-Konfiguration der Aminosäuren eine andere Orientierung der Seitenketten, sodass Meprin  $\alpha$  das Peptid nicht im aktiven Zentrum binden kann. Lediglich Peptid P3 erzielte eine geringe Inhibition der proteolytischen Meprin  $\alpha$  Aktivität. Dieser Inhibitor enthielt neben Aspartat und Glutamat ein N-terminales Lysin, der gemäß TAILS Ergebnissen an Position P3 und P4 häufigsten Aminosäure (Becker-Pauly et al. 2011).

Die proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität wurde am potentesten durch Peptid P4 inhibiert. Dies steht erneut in Konsens mit der effizienten Spaltung des fluorogenen Peptides (mca)-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) durch diese Protease (Broder und Becker-Pauly 2013). Peptid P3 unterschied sich von diesem im N-terminalen Lysin und inhibierte etwas weniger. Gemäß TAILS Ergebnissen ist Lysin zwar an P3, P4 sowie P5' evident, aber nicht in der bei Meprin  $\alpha$  beobachteten Häufigkeit (Becker-Pauly et al. 2011). Das N-terminale Lysin könnte im Vergleich zu Peptid P4 in einer vermindert spezifischen Bindung durch Meprin  $\beta$  resultieren und das reduzierte inhibitorische Potential verursachen.

Mit Aktinonin, Phosphinat und Peptid P4 wurden Inhibitoren mit unterschiedlicher Potenz gegenüber Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  selektiert. Der mittels Regulation der proteolytischen Meprin Aktivität erzielte Effekt auf die Prokollagen I Maturierung in Kulturen humaner dermaler Fibroblasten wurde untersucht. Im Zelllysate der Fibroblasten konnte in mit Inhibitoren inkubierten Ansätzen eine reduzierte Prokollagen I Maturierung identifiziert werden, die im Überstand zunächst nicht ersichtlich war. Erst die Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$ 1, das die Prokollagen I Synthese der Fibroblasten induziert (Varga und Jimenez 1986, Varga et al. 1987), führte im Überstand zur Reduktion der Prokollagen I Maturierung in mit Aktinonin inkubierten Proben. Die TGF- $\beta$ 1 Stimulation kann des Weiteren die Expression des c-Jun Proteins induzieren, das Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes ist (Shirasaki et al. 2014). Dieser kann den Promotor binden und die Expression der Protease induzieren (Biasin et al. 2014). Dennoch war entgegen der Erwartung im Überstand in Ansätzen mit Meprin  $\beta$  spezifischen Phosphinat- oder Peptid P4 Inhibitor keine reduzierte Prokollagen I Maturierung ersichtlich.

Dieses ambivalente Untersuchungsergebnis könnte in einem unterschiedlichen Anteil von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  an der Prokollagen I Maturierung nahe der Zellmembran und im Überstand begründet sein. An der Zelloberfläche könnte Prokollagen I vorrangig durch membrangebundenes Meprin  $\beta$  maturiert werden, einhergehend mit der im Zelllysate detektierten reduzierten Maturierung in Proben mit spezifischen Meprin  $\beta$  Inhibitoren. Demgegenüber wurden im Überstand in Ansätzen mit spezifischen Meprin  $\beta$  Inhibitoren keine Effekte auf die Prokollagen I Maturierung erzielt. Nur in Proben mit Aktinonin, das ein präferenzialer Meprin  $\alpha$  Inhibitor ( $K_i=20$  nM) ist (Kruse et al. 2004), war unter prolongierten oder stimulierten Bedingungen eine reduzierte Prokollagen I Maturierung ersichtlich. Meprin  $\alpha$  scheint daher im Überstand die verantwortliche Protease für die Prokollagen I Maturierung zu sein.

Dies resultiert in der Frage, inwiefern Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  als therapeutische Zielmoleküle in fibrotischen Pathologien einsetzbar sind. Denkbar wäre, dass ein therapeutischer Effekt der spezifischen Meprin  $\beta$  Inhibitoren von der Zugänglichkeit zum membrangebundenen Meprin  $\beta$  der Fibroblasten abhängig ist. Wird dieses, beispielsweise in fibrotischer Dermis, aufgrund topischer Applikation in ausreichender Konzentration mit spezifischen Meprin  $\beta$  Hemmstoffen versetzt, so könnte ein therapeutischer Effekt erzielbar sein. Demgegenüber wäre in Zuständen, in denen die Meprin  $\beta$  spezifische Inhibitoren das membrangebundene Meprin  $\beta$  nicht suffizient binden können, eine Reduktion der Prokollagen I Maturierung ungewiss.

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sollten nachfolgend mittels transgenen Mausmodellen *in vivo* als therapeutische Zielmoleküle untersucht werden. Hierfür könnten die Hemmstoffe zum Beispiel in *fra-2<sup>tg</sup>* Mäusen appliziert werden, die Fibrose in der Haut, Lunge, Herz, Periportalfeldern und weiteren Organen entwickeln (Eferl et al. 2008). Außerdem wurde mit diesem Modell gezeigt, dass Meprin  $\beta$  Mediator des vaskulären *Remodelling* ist, das in pulmonaler Hypertonie resultiert. Für die Applikation spezifischer Meprin  $\beta$  Inhibitoren wäre dieses Tiermodell somit besonders geeignet (Biasin et al. 2014).

Es müsste natürlich auch das Ausmaß von Effekten einer systemischen Applikation auf den Organismus untersucht werden. Als unerwünschte Nebenwirkung könnten beispielsweise Wundheilungsstörungen auftreten, weil die systemisch inhibierte proteolytische Meprin  $\beta$  Aktivität die Deposition von Kollagen I und III verhindert (Kronenberg et al. 2010, Broder et al. 2013). Besonders der therapeutische Einsatz des Hydroxamatinhibitors Aktinonin, der in stimulierten Zellen eine Reduktion der Prokollagen I Maturierung erzielte, soll kritisch betrachtet werden. Dieser Hemmstoff ist potent aber wenig spezifisch, sodass die proteolytische Aktivität weiterer Metalloproteasen beeinflusst wird (Kruse et al. 2004). Somit werden diverse proteolytische Netze moduliert und es besteht die Gefahr des Auftretens unerwünschter Nebenwirkungen. Beispielsweise zeigte Marimastat, welches ein Metalloprotease Inhibitor mit breitem Spektrum ist und in antineoplastischen Therapien eingesetzt wurde, in Studien als unerwartete Nebenwirkung inflammatorische Polyarthritiden. Deshalb musste die applizierte Dosis in nachfolgenden Untersuchungen verringert werden (Wojtowicz-Praga et al. 1998, Whittaker et al. 1999, Coussens et al. 2002).

Dagegen spricht für einen möglichen *in vivo* Einsatz von Aktinonin, dass dieser Hemmstoff Mäusen systemisch für Experimente appliziert wurde und keine schweren Nebenwirkungen publiziert wurden (Takayama et al. 2008). Es müsste aber in diesen Mäusen sorgfältig Gewebe mit physiologischer Meprin  $\beta$  Aktivität, wie beispielsweise die Cutis, auf Unversehrtheit der Struktur untersucht werden (Becker-Pauly et al. 2007).

Aufgrund der Spezifität des Phosphinatinhibitors sollte dieser zunächst systemisch eingesetzt werden. Als Beispiel für den erfolgreichen klinischen Einsatz von Protease Hemmstoffen, die gleich dem verwendeten Phosphinatinhibitor peptidomimetische Analoga des Übergangszustandes sind, soll Ritonavir genannt werden (Kempf et al. 1998). Dieser ist ein HIV-Protease Inhibitor, der systemisch appliziert wird obwohl Interaktionen mit humanen Proteasen beschrieben sind. Unter anderem wird die Chymotrypsin ähnliche proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms durch Ritonavir inhibiert (Andre et al. 1998). Potentiell durch systemische Applikation auftretende unerwünschte Wirkungen des Phosphinatinhibitors wären zudem durch topische Applikation möglicherweise reduzierbar. Beispielsweise könnten fibrotische Hautzustände lokal mittels Inhibitor enthaltenden Cremes oder das pulmonale *Remodelling* durch Inhalation mit Hemmstoff angereicherter Aerosolen therapiert werden.

Zusammengefasst, wurde in dieser Arbeit eine differenzierte Regulation der proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zellmembran beschrieben sowie Matriptase 2 als erster Aktivator des membranständigen Promeprin  $\beta$  identifiziert. Diese neuen Erkenntnisse werden für zukünftige Forschungsprojekte über physiologische und pathophysiologische Meprin  $\beta$  Funktionen von Relevanz sein. Des Weiteren wurde mittels gezielter Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Regulation, die Prokollagen I Maturierung reduziert. Spannender Forschungsausblick ist daher Meprine mittels *in vivo* Modellen als therapeutische Zielmoleküle zu validieren. Abschließend muss konstatiert werden, dass in dieser Arbeit relevante Beiträge für die Degradom Forschung generiert wurden und Meprine interessante Optionen für zukünftige Forschungsprojekte eröffnen.

## 5. Zusammenfassung

Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  sind Zink abhängige Metalloendoproteasen, die zur Astacin Peptidasenfamilie zählen. Meprin  $\alpha$  wird auf dem sekretorischen Weg von der Zelloberfläche abgespalten, Meprin  $\beta$  ist ein Typ I Transmembranprotein und kann mittels proteolytischem *Shedding* von der Zelloberfläche gelöst werden. Meprine sind in zahlreichen humanen Pathologien wie zum Beispiel Nierenerkrankungen, Fibrose und der Generierung von Amyloid  $\beta$  Peptiden relevant. Für das übergeordnete Ziel, Meprine in diesen Erkrankungen als therapeutische Moleküle einzusetzen, ist das Verständnis der Regulation proteolytischer Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Aktivität bedeutsam.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Regulation der Promepirin  $\beta$  Aktivierung an der Zellmembran analysiert. Erstmals wurde nachgewiesen, dass membrangebundenes Promepirin  $\beta$  nicht durch lösliche Proteasen aktiviert werden kann. Trypsin, der potenteste bekannte Meprin Aktivator, konnte membrangebundenes Promepirin  $\beta$  nicht maturieren, wie mittels Immunoblots und durch Bestimmung der spezifischen Meprin  $\beta$  Aktivität gezeigt wurde. Somit bestätigte sich die initial aus der Meprin  $\beta$  Kristallstruktur entwickelte Hypothese, dass lösliche Aktivatoren keinen Zugang zur verdeckten und nahe der Zellmembran gelegenen Propeptid Spaltstelle erhalten und eine membrangebundene Protease zur Aktivierung des transmembranösen Promepirin  $\beta$  notwendig ist.

Es wurde Matriptase 2 (TMPRSS 6), ein Mitglied der Typ II Transmembran Serin Proteasen (TTSP), als erster membrangebundener Aktivator von Promepirin  $\beta$  identifiziert. Dies wurde in Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 Ko-Transfektionsansätzen in COS-7/ HEK-293 Zellen mittels Immunoblots sowie Bestimmung der spezifischen proteolytischen Meprin  $\beta$  Aktivität an der Zelloberfläche validiert. Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten die Matriptase 2 Spaltstelle im Meprin  $\beta$  Propeptid an Position Arg 61/ Asn 62. Promepirin  $\alpha$  wird nicht durch Matriptase 2 aktiviert. In Überexpressionsstudien wurde die Kolokalisation von Meprin  $\beta$  und Matriptase 2 auf der Membran von COS-7 Zellen detektiert. TMPRSS 4 ist kein Aktivator des membrangebundenen Promepirin  $\beta$ . TTSP Mitglieder sind somit keine prinzipiellen Promepirin  $\beta$  Aktivatoren, hinweisend für eine Spezifität der Matriptase 2 als Promepirin  $\beta$  Aktivator.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit Prokollagen I, das von humanen Fibroblasten exprimiert wurde, als Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  Substrat validiert werden. Dagegen hatte der Versuch das Substratspektrum von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  auf nicht fibrilläre Kollagene zu erweitern keinen Erfolg: humanes Kollagen VI wird nicht durch Meprine *in vitro* gespalten. Anschließend wurden Inhibitoren mit differenter Potenz und unterschiedlichem Hemmmechanismus selektiert und mittels dieser die proteolytische Meprin Aktivität in humanen dermalen Fibroblasten reguliert. Es resultierte eine reduzierte Prokollagen I Maturierung im Zelllysat. Dagegen wurden im Überstand nur nach prolongierter Inkubation oder Stimulation in mit Aktinonin inkubierten Fibroblasten Effekte auf die Prokollagen I Maturierung erzielt.

Die erzielten Ergebnisse eröffnen zahlreiche interessante Perspektiven für zukünftige Forschungsprojekte. Es könnte die *in vivo* Relevanz der Matriptase 2 und eine Beteiligung dieser bei Meprin  $\beta$  induzierten Pathologien, wie beispielsweise Fibrose oder A $\beta$  Generierung, analysiert werden. Weiterführendes Forschungsziel ist zudem die Applikation selektiver Meprin Inhibitoren in geeigneten *in vivo* Fibrose Modellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Andre, P., Groettrup M., Klenerman P., de Giuli R., Booth B. L. Jr., Cerundolo V., Bonneville M., Jotereau F., Zinkernagel R. M., Lotteau V. (1998): An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13120-13124.
- Aricescu, A. R., Hon W. C., Siebold C., Lu W., van der Merwe P. A., Jones E. Y. (2006): Molecular analysis of receptor protein tyrosine phosphatase mu-mediated cell adhesion. *Embo j*, 25, 701-712.
- Arolas, J. L., Broder C., Jefferson T., Guevara T., Sterchi E. E., Bode W., Stöcker W., Becker-Pauly C., Gomis-Ruth F. X. (2012): Structural basis for the sheddase function of human meprin beta metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16131-16136.
- Banerjee, S., Oneda B., Yap L. M., Jewell D. P., Matters G. L., Fitzpatrick L. R., Seibold F., Sterchi E. E., Ahmad T., Lottaz D., Bond J. S. (2009): MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*, 2, 220-231.
- Barre, O., Dufour A., Eckhard U., Kappelhoff R., Beliveau F., Leduc R., Overall C. M. (2014): Cleavage Specificity Analysis of Six Type II Transmembrane Serine Proteases (TTSPs) Using PICS with Proteome-Derived Peptide Libraries. *PLoS One*, 9, e105984.
- Beck, I. T. (1973): The role of pancreatic enzymes in digestion. *Am J Clin Nutr*, 26, 311-325.
- Becker, C., Kruse M. N., Slotty K. A., Kohler D., Harris J. R., Rosmann S., Sterchi E. E., Stöcker W. (2003): Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem*, 384, 825-831.
- Becker-Pauly, C., Barre O., Schilling O., Auf dem Keller U., Ohler A., Broder C., Schutte A., Kappelhoff R., Stöcker W., Overall C. M. (2011): Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics*, 10, M111 009233.

- Becker-Pauly, C., Howel M., Walker T., Vlad A., Aufenvenne K., Oji V., Lottaz D., Sterchi E. E., Debela M., Magdolen V., Traupe H., Stöcker W. (2007): The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol*, 127, 1115-1125.
- Bertenshaw, G. P., Norcum M. T., Bond J. S. (2003): Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J Biol Chem*, 278, 2522-2532.
- Beynon, R. J., Shannon J. D., Bond J. S. (1981): Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J*, 199, 591-598.
- Biasin, V., Marsh L. M., Egemnazarov B., Wilhelm J., Ghanim B., Klepetko W., Wygrecka M., Olschewski H., Eferl R., Olschewski A., Kwapiszewska G. (2014): Meprin beta, a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol*, 233, 7-17.
- Bien, J., Jefferson T., Causevic M., Jumpertz T., Munter L., Multhaup G., Weggen S., Becker-Pauly C., Pietrzik C. U. (2012): The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J Biol Chem*, 287, 33304-33313.
- Broder, C., Becker-Pauly C. (2013): The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J*, 450, 253-264.
- Broder, C., Arnold P., Vadon-Le Goff S., Konerding M. A., Bahr K., Muller S., Overall C. M., Bond J. S., Koudelka T., Tholey A., Hulmes D. J., Moali C., Becker-Pauly C. (2013): Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 14219-14224.
- Bylander, J., Li Q., Ramesh G., Zhang B., Reeves W. B., Bond J. S. (2008): Targeted disruption of the meprin metalloproteinase beta gene protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, 480-490.
- Canty, E. G. und Kadler K. E. (2005): Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*, 118, 1341-1353.



- Chalaris, A., Rabe B., Paliga K., Lange H., Laskay T., Fielding C. A., Jones S. A., Rose-John S., Scheller J. (2007): Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, 110, 1748-1755.
- Cheng, G., Cleary A. M., Ye Z. S., Hong D. I., Lederman S., Baltimore D. (1995): Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science*, 267, 1494-1498.
- Cosgrove, S., Chotirmall S. H., Greene C. M., McElvaney N. G. (2011): Pulmonary proteases in the cystic fibrosis lung induce interleukin 8 expression from bronchial epithelial cells via a heme/meprin/epidermal growth factor receptor/Toll-like receptor pathway. *J Biol Chem*, 286, 7692-7704.
- Coussens, L. M., Fingleton B., Matrisian L. M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295, 2387-2392.
- Crisman, J. M., Zhang B., Norman L. P., Bond J. S. (2004): Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J Immunol*, 172, 4510-4519.
- Du, X., She E., Gelbart T., Truksa J., Lee P., Xia Y., Khovananth K., Mudd S., Mann N., Moresco E. M., Beutler E., Beutler B. (2008): The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, 320, 1088-1092.
- Eferl, R., Hasselblatt P., Rath M., Popper H., Zenz R., Komnenovic V., Idarraga M. H., Kenner L., Wagner E. F. (2008): Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10525-10530.
- Finberg, K. E., Heeney M. M., Campagna D. R., Aydinok Y., Pearson H. A., Hartman K. R., Mayo M. M., Samuel S. M., Strouse J. J., Markianos K., Andrews N. C., Fleming M. D. (2008): Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*, 40, 569-571.
- Fisher, L. W., Stubbs J. T., Young M. F. (1995): Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop Scand Suppl*, 266, 61-65.
- Gara, S. K., Grumati P., Urciuolo A., Bonaldo P., Kobbe B., Koch M., Paulsson M., Wagener R. (2008): Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J Biol Chem*, 283, 10658-10670.

- Gomis-Ruth, F. X., Trillo-Muyo S., Stöcker W. (2012): Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biol Chem*, 393, 1027-1041.
- Gorbea, C. M., Marchand P., Jiang W., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Bond J. S. (1993): Cloning, expression, and chromosomal localization of the mouse meprin beta subunit. *J Biol Chem*, 268, 21035-21043.
- Gultekin, H. und Heermann K. H. (1988): The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*, 172, 320-329.
- Hahn, D., Illisson R., Metspalu A., Sterchi E. E. (2000): Human N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin): genomic structure of the alpha and beta subunits. *Biochem J*, 346, 83-91.
- Hahn, D., Pischitzis A., Roesmann S., Hansen M. K., Leuenberger B., Luginbuehl U., Sterchi E. E. (2003): Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease. *J Biol Chem*, 278, 42829-42839.
- Hedrich, J., Lottaz D., Meyer K., Yiallourous I., Jahnen-Dechent W., Stöcker W., Becker-Pauly C. (2010): Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry*, 49, 8599-8607.
- Herzog, C., Haun R. S., Kaushal V., Mayeux P. R., Shah S. V., Kaushal G. P. (2009): Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 379, 904-908.
- Herzog, C., Kaushal G. P., Haun R. S. (2005): Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. *Cytokine*, 31, 394-403.
- Jäckle, F., Schmidt F., Wichert R., Arnold P., Prox J., Mangold M., Ohler A., Pietrzik C. U., Koudelka T., Tholey A., Gütschow M., Stirnberg M., Becker-Pauly C. (2015): Metalloprotease meprin beta is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem J*, 470, 91-103.
- Jefferson, T., Auf dem Keller U., Bellac C., Metz V. V., Broder C., Hedrich J., Ohler A., Maier W., Magdolen V., Sterchi E., Bond J. S., Jayakumar A., Traupe H., Chalaris A., Rose-John S., Pietrzik C. U., Postina R., Overall C. M., Becker-Pauly C. (2013): The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell Mol Life Sci*, 70, 309-333.

- Jiang, W., Sadler P. M., Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., Bond J. S. (1993): Tissue-specific expression and chromosomal localization of the alpha subunit of mouse meprin A. *J Biol Chem*, 268, 10380-10385.
- Kang, D. G. Y. S., Suh, M., Kang C. (2002): Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23, 1511-1512.
- Kempf, D. J., Sham H. L., Marsh K. C., Flentge C. A., Betebenner D., Green B. E., McDonald E., Vasavanonda S., Saldivar A., Wideburg N. E., Kati W. M., Ruiz L., Zhao C., Fino L., Patterson J., Molla A., Plattner J. J., Norbeck D. W. (1998): Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy. *J Med Chem*, 41, 602-617.
- Kentsis, A., Shulman A., Ahmed S., Brennan E., Monuteaux M. C., Lee Y. H., Lipsett S., Paulo J. A., Dedeoglu F., Fuhlbrigge R., Bachur R., Bradwin G., Arditi M., Sundel R. P., Newburger J. W., Steen H., Kim S. (2013): Urine proteomics for discovery of improved diagnostic markers of Kawasaki disease. *EMBO Mol Med*, 5, 210-220.
- Kleifeld, O., Doucet A., auf dem Keller U., Prudova A., Schilling O., Kainthan R. K., Starr A. E., Foster L. J., Kizhakkedathu J. N., Overall C. M. (2010): Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol*, 28, 281-288.
- Kronenberg, D., Bruns B. C., Moali C., Vadon-Le Goff S., Sterchi E. E., Traupe H., Bohm M., Hulmes D. J., Stöcker W., Becker-Pauly C. (2010): Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol*, 130, 2727-2735.
- Kruse, M. N., Becker C., Lottaz D., Kohler D., Yiallourous I., Krell H. W., Sterchi E. E., Stöcker W. (2004): Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J*, 378, 383-389.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lopez-Otin, C., Overall C. M. (2002): Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 509-519.
- Lottspeich, F., Engels, J. W. (2012): *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage.

- Marchand, P., Tang J., Johnson G. D., Bond J. S. (1995): COOH-terminal proteolytic processing of secreted and membrane forms of the alpha subunit of the metalloprotease meprin A. Requirement of the I domain for processing in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 270, 5449-5456.
- Mathew, R., Futterweit S., Valderrama E., Tarectecan A. A., Bylander J. E., Bond J. S., Trachtman H. (2005): Meprin-alpha in chronic diabetic nephropathy: interaction with the renin-angiotensin axis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F911-921.
- Matters, G. L., Bond J. S. (1999): Meprin B: transcriptional and posttranscriptional regulation of the meprin beta metalloproteinase subunit in human and mouse cancer cells. *Apmis*, 107, 19-27.
- Norman, L. P., Jiang W., Han X., Saunders T. L., Bond J. S. (2003): Targeted Disruption of the Meprin Gene in Mice Leads to Underrepresentation of Knockout Mice and Changes in Renal Gene Expression Profiles. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 1221-1230.
- Ohler, A., Becker-Pauly C. (2011): Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion. *Biol Chem*, 392, 653-664.
- Ohler, A., Debela M., Wagner S., Magdolen V., Becker-Pauly C. (2010): Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem*, 391, 455-460.
- Puente, X. S., Sanchez L. M., Overall C. M., Lopez-Otin C. (2003): Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, 4, 544-558.
- Quesada, V., G. Ordonez R., Sanchez L. M., Puente X. S., Lopez-Otin C. (2009): The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res*, 37, 239-243.
- Rawlings, N. D., Barrett A. J. (1993): Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*, 290, 205-218.
- Rosmann, S., Hahn D., Lottaz D., Kruse M. N., Stöcker W., Sterchi E. E. (2002): Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J Biol Chem*, 277, 40650-40658.

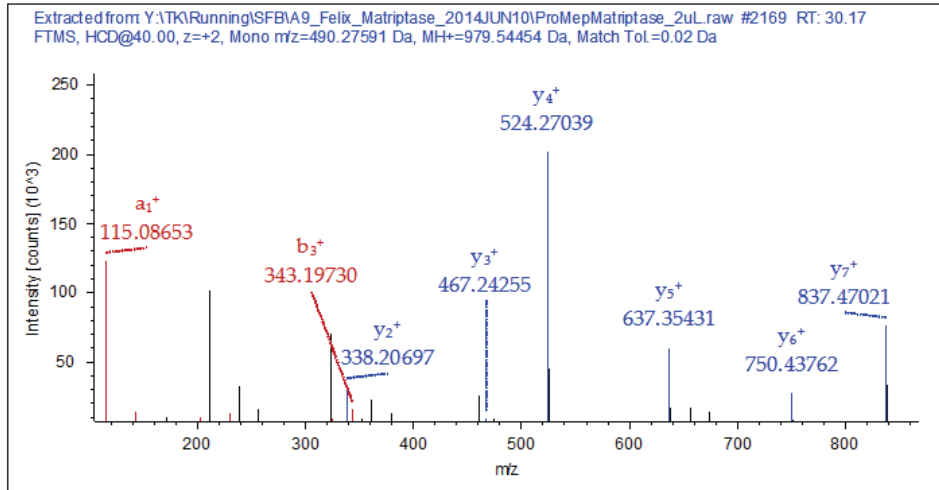
- Schilling, O., Overall C. M. (2008): Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat Biotechnol*, 26, 685-694.
- Schilling, O., Huesgen P. F., Barre O., Auf dem Keller U., Overall C. M. (2011): Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry. *Nat Protoc*, 6, 111-120.
- Schutte, A., Ermund A., Becker-Pauly C., Johansson M. E., Rodriguez-Pineiro A. M., Backhed F., Muller S., Lottaz D., Bond J. S., Hansson G. C. (2014): Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 12396-12401.
- Schutte, A., Hedrich J., Stöcker W., Becker-Pauly C. (2010): Let it flow: Morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin alpha2. *PLoS One*, 5, e8835.
- Selkoe, D. J. (2001): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*, 3, 75-80.
- Shirasaki, T., Honda M., Shimakami T., Murai K., Shiimoto T., Okada H., Takabatake R., Tokumaru A., Sakai Y., Yamashita T., Lemon S. M., Murakami S., Kaneko S. (2014): Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. *Hepatology*, 60, 1519-1530.
- Silvestri, L., Pagani A., Nai A., De Domenico I., Kaplan J., Camaschella C. (2008): The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*, 8, 502-511.
- Smith, P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- Sterchi, E. E., Green J. R., Lentze M. J. (1982): Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clin Sci (Lond)*, 62, 557-560.
- Sterchi, E. E., Stöcker W., Bond J. S. (2008): Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29, 309-328.

- Stirnberg, M., Maurer E., Horstmeyer A., Kolp S., Frank S., Bald T., Arenz K., Janzer A., Prager K., Wunderlich P., Walter J., Gütschow M. (2010): Proteolytic processing of the serine protease matriptase-2: identification of the cleavage sites required for its autocatalytic release from the cell surface. *Biochem J*, 430, 87-95.
- Takayama, J., Takaoka M., Yamamoto S., Nohara A., Ohkita M., Matsumura Y. (2008): Actinonin, a meprin inhibitor, protects ischemic acute kidney injury in male but not in female rats. *Eur J Pharmacol*, 581, 157-163.
- Takeichi, M. (1977): Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*, 75, 464-474.
- Towbin, H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.
- Varga, J., Jimenez S. A. (1986): Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 138, 974-980.
- Varga, J., Rosenbloom J., Jimenez S. A. (1987): Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J*, 247, 597-604.
- Whittaker, M., Floyd C. D., Brown P., Gearing A. J. (1999): Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev*, 99, 2735-2776.
- Wiechelman, K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D. (1988): Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-237.
- Wojtowicz-Praga, S., Torri J., Johnson M., Steen V., Marshall J., Ness E., Dickson R., Sale M., Rasmussen H. S., Chiodo T. A., Hawkins M. J. (1998): Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol*, 16, 2150-2156.
- Wu, C., Orozco C., Boyer J., Leglise M., Goodale J., Batalov S., Hodge C. L., Haase J., Janes J., Huss J. W., Su A. I. (2009): BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*, 10, R130.

Wysocka, M., Gruba N., Miecznikowska A., Popow-Stellmaszyk J., Gütschow M., Stirnberg M., Furtmann N., Bajorath J., Lesner A., Rolka K. (2014): Substrate specificity of human matriptase-2. *Biochimie*, 97,121-127.

## 7. Anhang

### 7.1.1 Massenspektrometrische Identifikation der proteolytischen Spaltstellen in Promeprin $\beta$



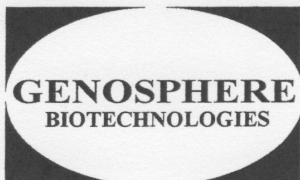
#### Abbildung 37: Validierung der Spaltstelle von Matriptase 2 in Promeprin $\beta$ durch LC-MS/MS Spektrometrie

In den Matriptase 2 inkubierten Promeprin  $\beta$  Proben, konnten Peptide mit der N-terminal dimethylierten Aminosäure Asn 62 detektiert werden. Dieses sollte mit LC-MS/MS Analyse validiert werden. Das Spektrum zeigte den für N-terminal dimethylierte Peptide charakteristischen Peak für das  $a_1$ -Ion. Das Spektrum wurde ohne weitere Modifikationen aus dem Programm *Proteom discoverer* entnommen. Die Analysen erfolgten durch Dr. T. Koudelka (Institut für experimentelle Medizin, UKSH Kiel) mit den in Kapitel 2.2.2.8 beschriebenen Parametern. m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

### 7.1.2 Syntheseberichte eingesetzter Peptide

Die Syntheseberichte der zur Inhibition eingesetzten synthetischen Peptide sind in den nachfolgenden Seiten aufgeführt.



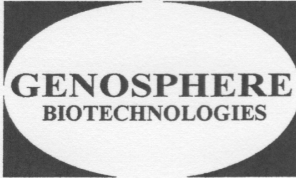


# PEPTIDE SYNTHESIS

## SYNTHESIS REPORT

*Peptide N°:* 89312  
*Your Reference:* Peptid 1  
*Sequence:* 'N' KKLADPEE  
                   D-enantiomers  
 'N'-terminus: NH<sub>2</sub>                    'C'-terminus: COOH  
  
*Length:* 8 a.a.  
  
*Molecular Weight:* 929  
  
*Form:* Lyophilized

<i>Amount:</i>	2	mg
<i>Analysis:</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RP-HPLC</li> <li>• Mass Spectrum</li> </ul>	
<i>Results:</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Purity: &gt;80%</li> <li>•MS: 928.41</li> </ul>	(RP-HPLC at 220 nm) (Average)
<i>Note:</i>	-	



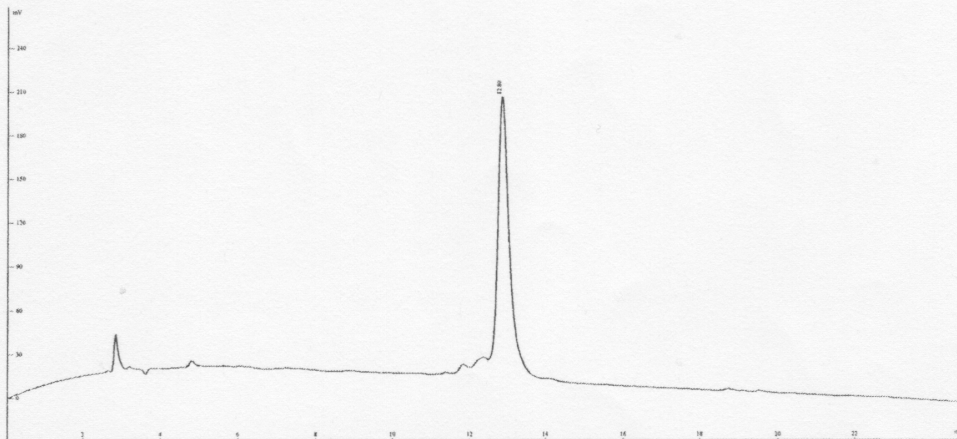
# PEPTIDE SYNTHESIS

## ANALYTICAL DATA: HPLC

**Peptide N°:** 89312  
**Your Reference:** Peptid 1  
**Sequence:** KKLADPEPE  
 D-enantiomers  
**Sample:** 10  $\mu$ l injected  
**Conditions:** Column: Analytical C8 ; 1ml/min  
 Solvent A:0,1% TFA ; Solvent B:0,1% TFA in CH<sub>3</sub>CN  
 Gradient: 5-30%B - 25 min  
 Detection: 220nm

### Data:

Peak N°	Time (min)	Area ( $\mu$ V-sec)	Area (%)
1	12.80	4160483	>80%

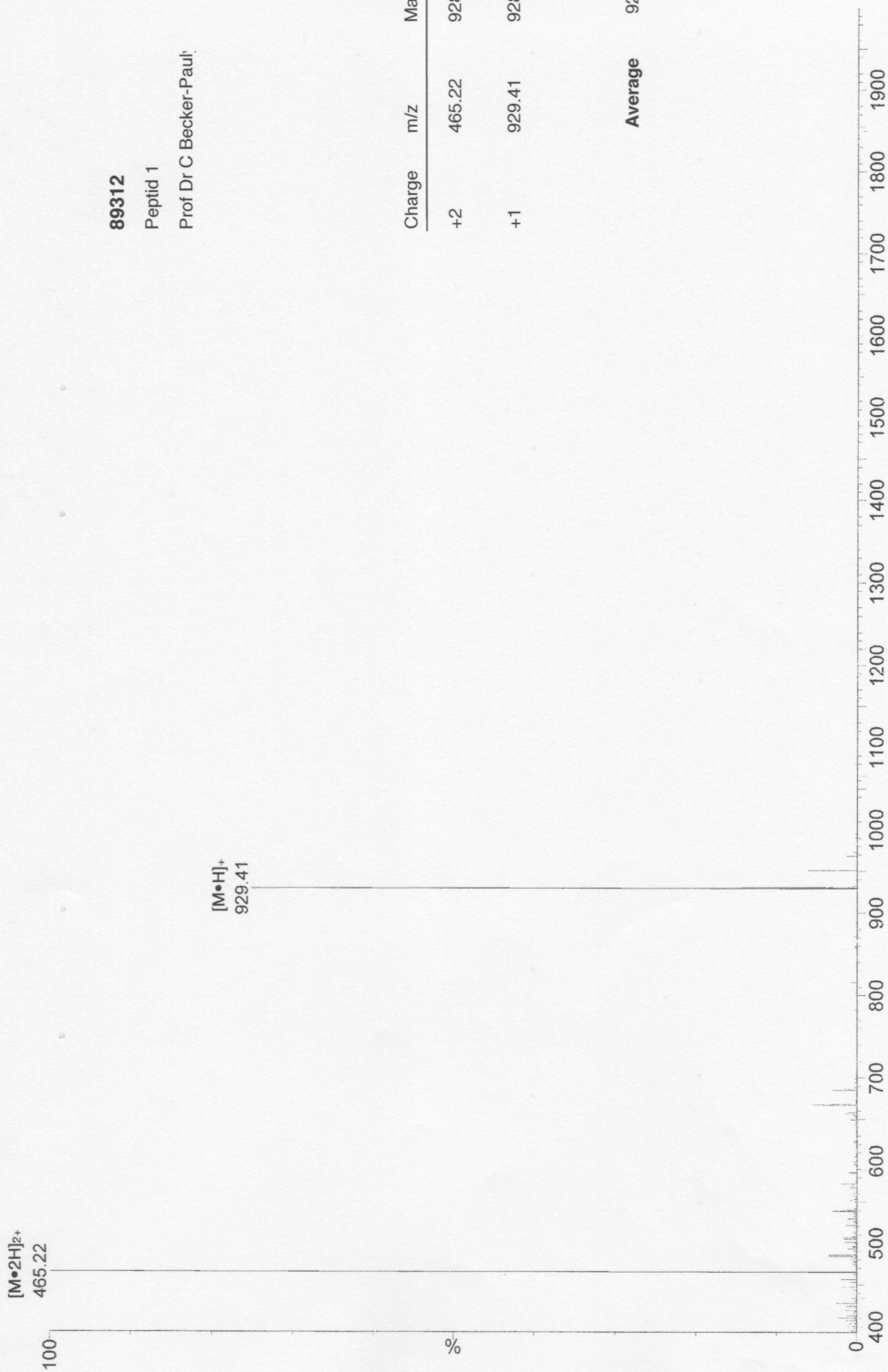


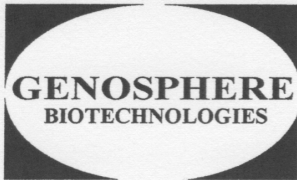


# PEPTIDE SYNTHESIS

ANALYTICAL DATA: MASS SPECTRUM

89312  
Peptid 1  
Prof Dr C Becker-Paul



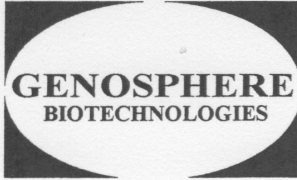


# PEPTIDE SYNTHESIS

## SYNTHESIS REPORT

*Peptide N°:* 89313  
*Your Reference:* Peptid 2  
*Sequence:* 'N' IFHPD  
 D-enantiomers  
 'N'-terminus: NH<sub>2</sub> 'C'-terminus: COOH  
*Length:* 5 a.a.  
*Molecular Weight:* 628  
*Form:* Lyophilized

<i>Amount:</i>	2	mg
<i>Analysis:</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RP-HPLC</li> <li>• Mass Spectrum</li> </ul>	
<i>Results:</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Purity: &gt;80%</li> <li>•MS: 627.18</li> </ul>	(RP-HPLC at 220 nm) (Average)
<i>Note:</i>	-	



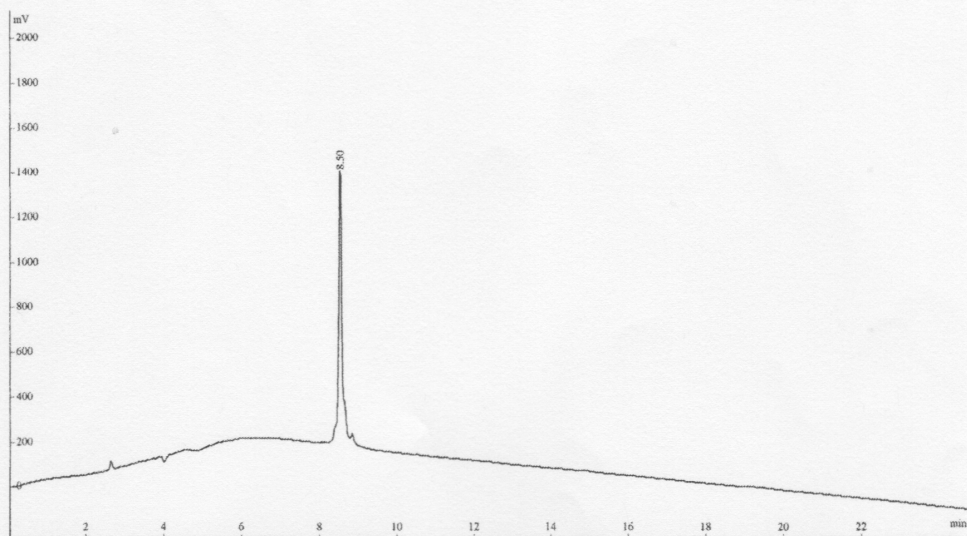
# PEPTIDE SYNTHESIS

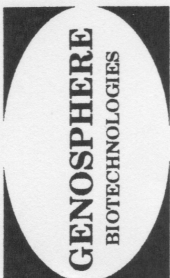
## ANALYTICAL DATA: HPLC

**Peptide N°:** 89313  
**Your Reference:** Peptid 2  
**Sequence:** IFHPD  
D-enantiomers  
**Sample:** 10 µl injected  
**Conditions:** Column: Analytical C8 ; 1ml/min  
Solvent A:0,1% TFA ; Solvent B:0,1% TFA in CH3CN  
Gradient: 10-35%B - 25 min  
Detection: 220nm

### Data:

Peak N°	Time (min)	Area (µV-sec)	Area (%)
1	8.50	6731342	>80%





# PEPTIDE SYNTHESIS

ANALYTICAL DATA: MASS SPECTRUM

89313

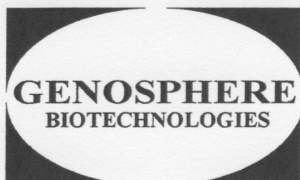
Peptid 2

Prof Dr C Becker-Paul



Charge	m/z	Mass
+1	628.19	627 18

Average 627 18



# PEPTIDE SYNTHESIS

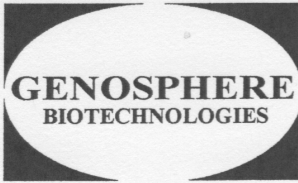
---

▼

## SYNTHESIS REPORT

*Peptide N°:* 89314  
*Your Reference:* Peptid 3  
*Sequence:* 'N' KDEDED  
D-enantiomers  
'N'-terminus: NH<sub>2</sub> 'C'-terminus: COOH  
*Length:* 6 a.a.  
*Molecular Weight:* 750  
*Form:* Lyophilized

<i>Amount:</i>	2	mg
<i>Analysis:</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• RP-HPLC</li><li>• Mass Spectrum</li></ul>	
<i>Results:</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Purity: &gt;80%</li><li>•MS: 749.34</li></ul>	(RP-HPLC at 220 nm) (Average)
<i>Note:</i>	-	



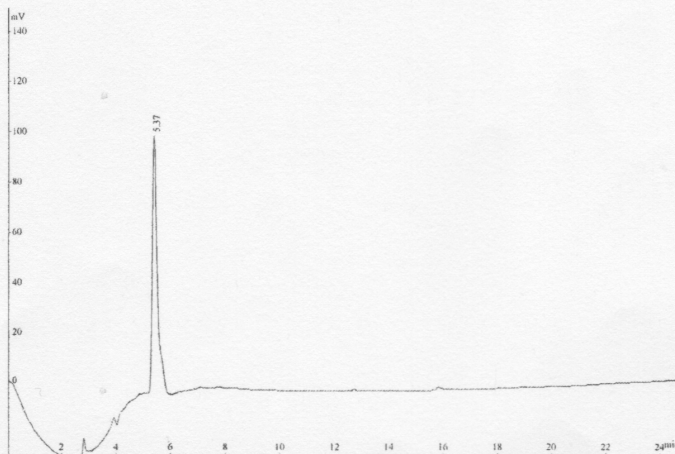
# PEPTIDE SYNTHESIS

## ANALYTICAL DATA: HPLC

**Peptide N°:** 89314  
**Your Reference:** Peptid 3  
**Sequence:** KDEDED  
D-enantiomers  
**Sample:** 10 µl injected  
**Conditions:** Column: Analytical C8 ; 1ml/min  
Solvent A:0,1% TFA ; Solvent B:0,1% TFA in CH3CN  
Gradient: 10-35%B - 25 min  
Detection: 220nm

### Data:

Peak N°	Time (min)	Area (µV-sec)	Area (%)
1	5.37	1205908	>80%



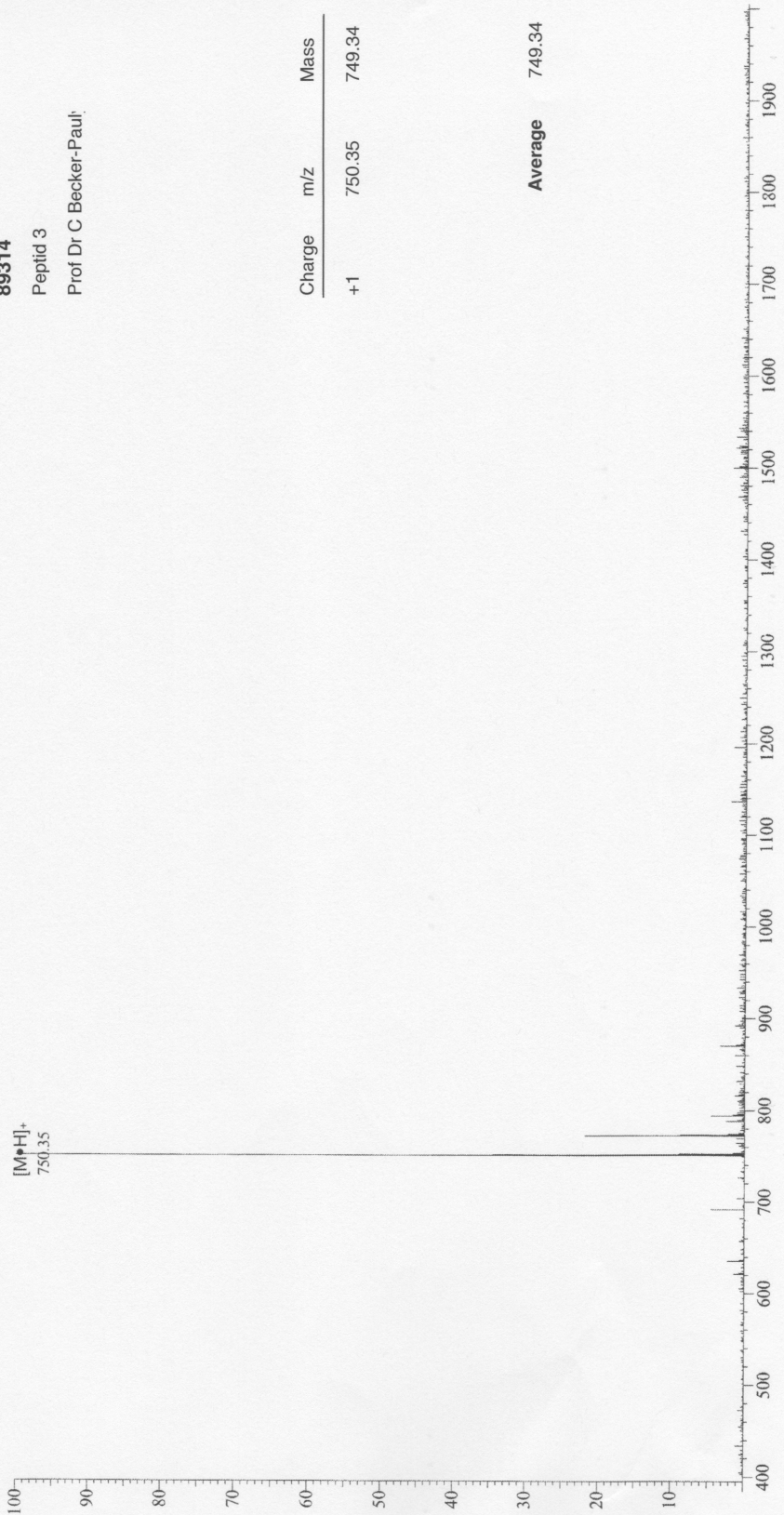




# PEPTIDE SYNTHESIS

## ANALYTICAL DATA: MASS SPECTRUM

**89314**  
Peptid 3  
Prof Dr C Becker-Paul



Charge	m/z	Mass
+1	750.35	749.34
<b>Average</b>		<b>749.34</b>



► Fifteen years and tens of thousands of successful syntheses delivered with full guarantee.

► We guarantee & we deliver

Fully characterized peptides mg to multi-g synthesis  
 Unique >99% purity level Personalized service  
 Optimum synthetic routes Fastest turn around  
 MALDI-TOF mass spectra & reversed-phase HPLC trace

► Qualified team of chemists

Difficult hydrophobic sequences  
 Long to very long peptides  
 Large range of modifications: Biotin, DNP, phosphorylation, cyclization, NO<sub>2</sub>, FA, fluorescence, PEG, protein

► Turnaround

Synthesis	Average (*)
25 mg, >70%	2 weeks
15 mg, >80%	2-3 weeks
10 mg, >95%	3 weeks
5 mg, >99%	3-4 weeks

(\*peptides 15-20 aa)

# Peptide Synthesis QUOTE

**Date:** 14/10/2013

**For the attention of:**

Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly  
 Biochemisches Institut

Christian-Albrecht-Universität

Tel.: +49-431-880-7118

Fax.: +49-431-880-5007

Email: [checkerpauly@biochem.uni-kiel.de](mailto:checkerpauly@biochem.uni-kiel.de)

Hello,

Thank you very much for your patience in waiting for this quote. Please don't hesitate to contact us if you need any further assistance. We wish to be of service to you.

We look forward to hearing from you very soon.

Mit freundlichen Grüßen

Customer Services

## YOUR REQUEST:

**Service:** Peptide synthesis  
**Sequence:**  
 Peptid 1: E D E D E D (6 aa)  
**Modification:** All amino-acids: D-enantiomers  
**Quantity:** 50 mg AND 100 mg  
**Purity:** >80%

## OUR OFFER:

Reference A169301

**Synthesis, purification & analysis:**

Peptid 1, 50 mg: € 630,- (\*)  
 Peptid 1, 100 mg: € 828,- (\*)

(+ Freight: € 48,-)

(\*) AP16913- promotion, valid until 28/02/2014

**Analytical data:**

- Analytical HPLC trace at 220 nm
- Mass spectrum

Acceptable orders should include a copy of an institutional purchase order that shows our Reference number, a Purchase Order Number, Shipping & Invoicing addresses (+VAT number for EU members). Our payment terms are net 30 days.

### Quietly reliable!

| Custom Antibodies | Custom Peptides | Custom Synthetic Genes | Protein Sequencing |  
 Genosphere Biotechnologies +33-142 71 70 21 (tel) Customer Services  
 2 rue des Gravilliers +33-142 71 70 23 (fax) info@genosphere-biotech.com  
 F-75003 Paris - France order@genosphere-biotech.com www.genosphere-biotech.com

## 7.1.3 Publizierter Fachartikel

Biochem. J. (2015) 470, 91–103 doi:10.1042/BJ20141417

91

## Metalloprotease meprin $\beta$ is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding

Felix Jäckle<sup>\*1</sup>, Frederike Schmidt<sup>\*1</sup>, Rielana Wichert<sup>\*</sup>, Philipp Arnold<sup>†</sup>, Johannes Prox<sup>\*</sup>, Martin Mangold<sup>‡</sup>, Anke Ohler<sup>§</sup>, Claus U. Pietrzik<sup>§</sup>, Tomas Koudelka<sup>||</sup>, Andreas Tholey<sup>||</sup>, Michael Gütschow<sup>‡</sup>, Marit Stirnberg<sup>‡</sup> and Christoph Becker-Pauly<sup>\*1</sup>

<sup>\*</sup>Unit for Degradomics of the Protease Web, Institute of Biochemistry, University of Kiel, 24118 Kiel, Germany

<sup>†</sup>Anatomical Institute, University of Kiel, 24118 Kiel, Germany

<sup>‡</sup>Pharmaceutical Institute, University of Bonn, 53121 Bonn, Germany

<sup>§</sup>Institute of Pathobiochemistry, University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University of Mainz, 55128 Mainz, Germany

<sup>||</sup>Institute of Experimental Medicine, University of Kiel, 24118 Kiel, Germany

Increased expression of metalloprotease meprin  $\beta$  is associated with fibrotic syndromes and Alzheimer's disease (AD). Hence, regulation of meprin activity might be a suitable strategy for the treatment of these conditions. Meprin  $\beta$  is a type I transmembrane protein, but can be released from the cell surface by ectodomain shedding. The protease is expressed as an inactive zymogen and requires proteolytic maturation by tryptic serine proteases. In the present study, we demonstrate, for the first time, the differences in the activation of soluble and membrane bound meprin  $\beta$  and suggest transmembrane serine protease 6 [TMPRSS6 or matriptase-2 (MT2)] as a new potent activator, cleaving off the propeptide of meprin  $\beta$  between Arg<sup>61</sup> and Asn<sup>62</sup> as determined

by MS. We show that MT2, but not TMPRSS4 or pancreatic trypsin, is capable of activating full-length meprin  $\beta$  at the cell surface, analysed by specific fluorogenic peptide cleavage assay, Western blotting and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Maturation of full-length meprin  $\beta$  is required for its activity as a cell surface sheddase, releasing the ectodomains of transmembrane proteins, as previously shown for the amyloid precursor protein (APP).

**Key words:** amyloid precursor protein, cell membrane, enzymology, matriptase-2, meprin  $\beta$ , sheddase.

### INTRODUCTION

Metalloprotease meprin  $\beta$  is a multidomain type I transmembrane protein of the astacin family of zinc-endopeptidases [1]. The enzyme builds disulfide-linked homodimers and acts as a sheddase at the cell surface [2].

Employing different proteomic techniques meprin  $\beta$  was found to exhibit unique features in terms of substrate and cleavage specificity. Proteomic identification of protease cleavage sites (PICS) [3] revealed a striking preference of meprin  $\beta$  for negatively charged amino acids aspartate and glutamate around the scissile bond [4]. This makes meprin  $\beta$  the only known extracellular protease capable of cleaving entirely acidic peptides, which was a breakthrough for the design of specific peptidic substrates [5]. Terminal amine isotopic labelling of substrates (TAILS) [6], another MS-based proteomics approach, enabled identification of a broad substrate spectrum of meprin  $\beta$  [7]. Among these was procollagen I, which led to the identification of an important biological function of meprin  $\beta$  as procollagen proteinase [8]. Fibrillar collagens undergo proteolytic processing for the release of globular C- and N-terminal propeptides, an essential step in collagen assembly [9]. Meprin  $\beta$  was found to cleave-off the C- and N-terminal propeptides of collagen I and III, thereby inducing spontaneous fibril formation [8,10]. This biological activity was indeed reflected by significantly decreased collagen deposition in the skin of meprin  $\beta$  knockout mice [8]. Meprin  $\beta$  overexpression instead is associated with increased collagen deposition, as found in fibrotic conditions [10,11].

Although meprin  $\beta$  is predominantly membrane bound, a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and 17 were shown to release meprin  $\beta$  from the cell surface by ectodomain shedding [7,12]. Recently, it was demonstrated that solubilization of meprin  $\beta$  is required for the proteolytic release of the mucus layer from the small intestinal epithelium, a process important for proper barrier function [13]. Shedding of meprin  $\beta$  might also be a regulatory mechanism in the control of amyloid precursor protein (APP) processing. It was shown that full-length meprin  $\beta$ , but not the soluble enzyme, cleaves APP at the  $\beta$ -secretase cleavage site, thereby releasing increased levels of A $\beta$  peptides [14], a hallmark for the development and progression of Alzheimer's disease (AD) [15].

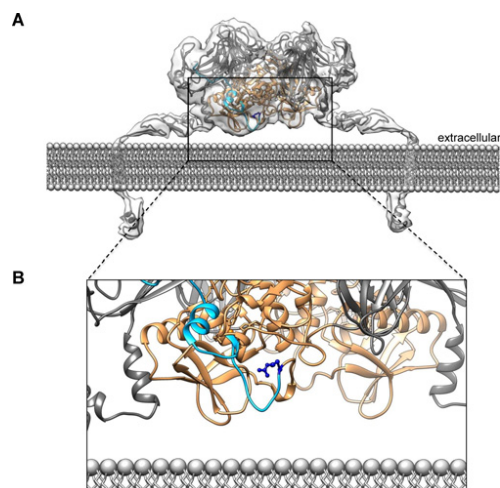
Regarding meprin  $\beta$  activity as a trigger for different pathological conditions, it is of interest to understand how this protease is regulated. Fetuin-A was reported as an endogenous inhibitor of human meprin  $\beta$ , as well as several hydroxamate compounds, however all lack striking specificity [16,17]. As meprin  $\beta$  is expressed as an inactive zymogen, identification and control of specific activators may be a way to regulate meprin  $\beta$  activity. Pancreatic trypsin and human tissue kallikrein-related peptidases 4, 5 and 8 were found to activate soluble meprin  $\beta$  [18]. However, concerning the structural properties of meprin  $\beta$ , we hypothesized that the buried activation site in the propeptide is somewhat shielded towards soluble tryptic proteases by its close proximity to the plasma membrane [2]. Therefore, we investigated transmembrane serine protease 6 (TMPRSS6), also called MT2, as a potential activator of membrane bound meprin  $\beta$ .

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; APP, amyloid precursor protein; CLSM, confocal laser scanning microscopy; Dnp, 2,4-dinitrophenyl; HEK, human embryonic kidney; Mca, (7-methyloxycoumarin-4-yl) acetyl; MT2, matriptase-2; PNGaseF, peptide-N-glycosidase F; TfR, transferrin receptor; TMPRSS4/6, transmembrane serine protease 4/6.

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed (email cbeckerpauly@biochem.uni-kiel.de).

© 2015 Authors; published by Portland Press Limited



**Figure 1** Meprin  $\beta$  crystal structure reveals concealed localization of the propeptide cleavage site

The cleavage site for maturation within the propeptide of meprin  $\beta$  is in close proximity to the plasma membrane as shown in the recently solved crystal structure (PDB accession number 4GWM). Hence, activation requires direct interaction between meprin  $\beta$  and an appropriate tryptic serine protease at the cell surface. **(A)** Orientation of dimeric meprin  $\beta$  at the plasma membrane. **(B)** Higher magnification of the specific activation site in one subunit. Ribbon structure of the catalytic domain is displayed in orange and the propeptide is shown in light blue. Arg<sup>91</sup> residue at the scissile bond is highlighted as a ball-stick-model in dark blue.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

All chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich; Carl Roth; Merck; Roche; Thermo Fisher Scientific.

### Expression and purification of recombinant promeprin $\alpha$ and promeprin $\beta$

Expression and purification of recombinant meprins was performed as described before [19,20]. In short, meprins were heterologously expressed in insect cells using the Bac-to-Bac system (Gibco, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. All media and supplements were purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific. Purification of N-terminal Strep-tagged meprin  $\alpha$  and His-tagged meprin  $\beta$  was achieved by Streptactin (IBA) or Ni-NTA (nitrilotriacetic acid; Qiagen) affinity chromatography respectively.

### Generation of matriptase-2 conditioned medium and purification of recombinant secreted matriptase-2

Human embryonic kidney (HEK)293 cells were stably transfected with the expression vector pcDNA4-MT2-Myc-His encoding the MT2 protein tagged at the C-terminus with c-Myc and His<sup>6</sup> or the empty vector pcDNA4 (mock). Medium of transfected HEK293 cells was conditioned as described before [21]. Additionally, secreted C-terminal Myc- and His-tagged MT2 was purified from conditioned medium by affinity chromatography. For this, cells were seeded into five 175 cm<sup>2</sup> flasks and cultured in

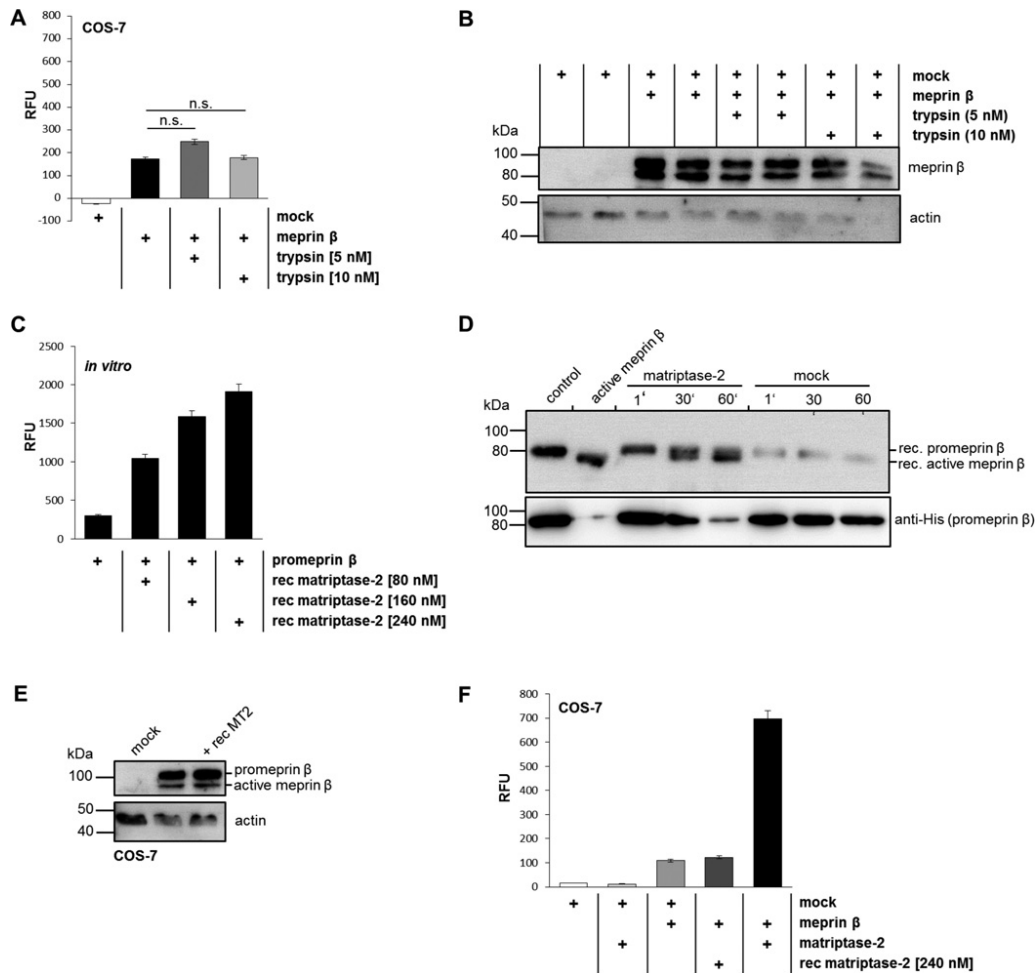
full medium until reaching confluence (80%–90%). After two washing steps with PBS, medium was replaced by FBS-free Opti-MEM. Cells were cultured for a further 2 days to increase the protein concentration. Conditioned medium was then collected and concentrated using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (10000 MWCO, Millipore). Concentrated medium was then added to HisPur Cobalt Spin Column (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. MT2 was eluted in the presence of 250 mM imidazole (Supplementary Figure S1).

### Recombinant protein cleavage assays

Recombinant promeprin  $\beta$  (5 nM) was incubated with different concentrations of recombinant MT2 (80 nM, 160 nM, 240 nM) in HEPES buffer (total volume: 100  $\mu$ l). Promeprin  $\alpha$  (5 nM) was incubated with 240 nM recombinant MT2 for 1, 30 and 60 min. Subsequently, a quenched fluorogenic peptide assay was performed as described below. For Western blot analysis, 100  $\mu$ g recombinant promeprin  $\beta$  was incubated with MT2 or pcDNA 4 (mock) conditioned medium (0.05  $\mu$ g/ $\mu$ l) for 1, 30 and 60 min in a HEPES buffered master mix (total volume: 170  $\mu$ l). At each time point, 50  $\mu$ l of the solution was taken and reaction was terminated by addition of 3 $\times$  sample buffer including DTT, followed by denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 5 min. Samples were separated by SDS/PAGE (170 V, 60 min) on a 7.5% gel. Western blot analysis was performed as described below. Meprin  $\beta$  was detected by a polyclonal antibody (Pineda; anti-meprin  $\beta$ ) and zymogen maturation was investigated by the use of a monoclonal penta histidine antibody (Qiagen).

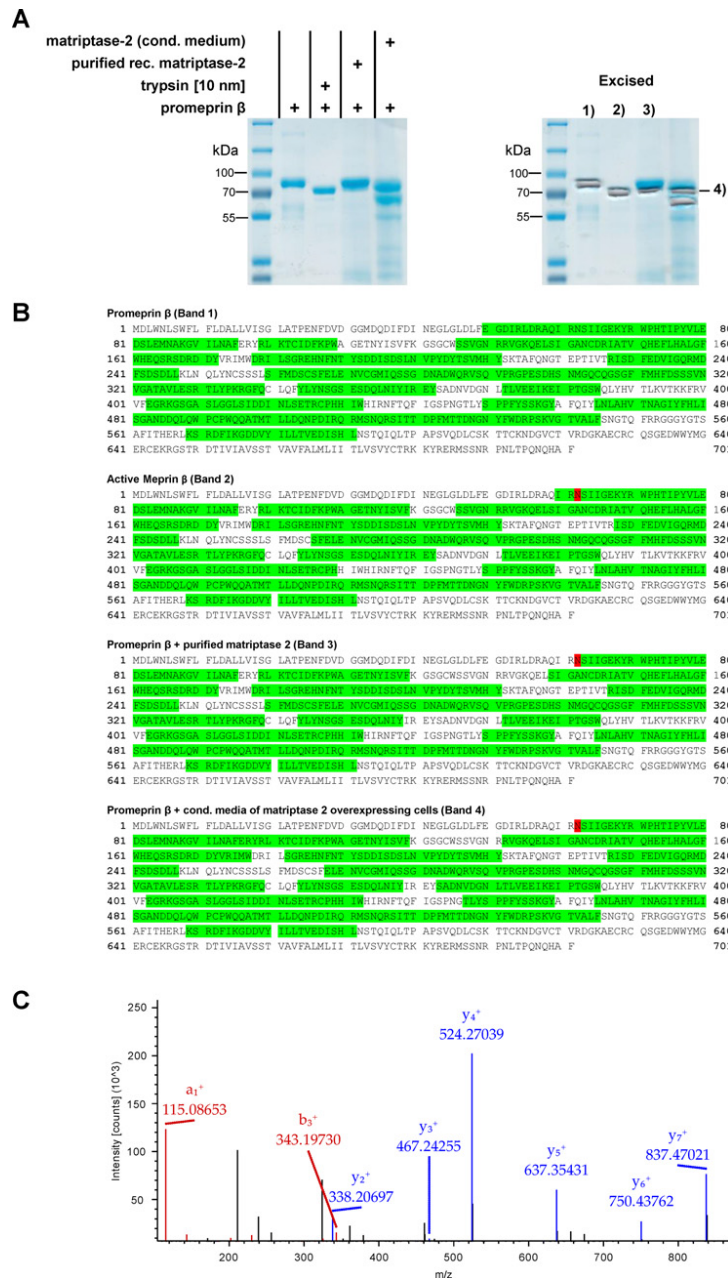
### MS

Promeprin  $\beta$  (10  $\mu$ g) was incubated with recombinant MT2 (2  $\mu$ g) or MT2 conditioned medium (25  $\mu$ g) for 8 h at 37  $^{\circ}$ C. Reaction was terminated by addition of 3 $\times$  Laemmli buffer including DTT and denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 5 min. Additionally, promeprin  $\beta$  and active meprin  $\beta$  samples (3  $\mu$ g each) were prepared as controls. Protein samples were separated by SDS/PAGE (7.5%, 200 V, 45 min) and Coomassie stained. Bands were excised with a scalpel and subsequently cut into small cubes (approximately 2 mm<sup>3</sup>), destained and then reduced and alkylated with 10 mM DTT and 55 mM IAA (iodoacetic acid) respectively. For labelling of primary amino groups (protein N-terminal and lysine residues) gel pieces were treated with formaldehyde (30 mM) and sodium cyanoborohydride (15 mM) overnight at 25  $^{\circ}$ C. To quench the reaction high, excess of ammonium bicarbonate was added. Gel pieces were washed and then digested with chymotrypsin (100 ng) overnight in 20 mM HEPES, 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Peptides were extracted and analysed by LC-MS/MS utilizing a U3000 nano-LC (Dionex) coupled online to an Orbitrap Velos MS (Thermo). Data was searched against the complete canonical human database (UniprotKB/SwissProt, reviewed) with common contaminants appended (2013/07/08, 20 382 sequences) and with the following settings: MS mass tolerance; 10 ppm, MS/MS mass tolerance; 0.5 Da for collision-induced dissociation (CID) and 0.02 Da for higher-energy collisional dissociation (HCD), enzyme specificity; none, fixed modifications; carbamidomethyl (C) and dimethylation (K), variable modifications; dimethylation (any N-terminus), oxidation (M). Data was searched with Mascot, Sequest and MS Amanda and the results percolated using Proteome Discoverer 1.4 (1.4.0.288) and only high-confident peptide identifications (<1% FDR, false discovery rate) considered.



**Figure 2** MT2 is an activator of recombinant soluble meprin  $\beta$

(A) Membrane bound meprin  $\beta$  is not activated by pancreatic trypsin. Meprin  $\beta$  or pcDNA 3.1 (mock) transfected COS-7 cells were incubated with pancreatic trypsin (5 and 10 nM). Cell surface activity of meprin  $\beta$  was determined using 50  $\mu$ M of the specific quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K-e-dnp). Fluorescence intensity was measured at 405 nm with an excitation at 320 nm every 30 s for 2 h. Notably, meprin  $\beta$  cell surface activity did not increase after trypsin incubation compared with non-treated samples. (B) Western-blot analysis of meprin  $\beta$  or pcDNA 3.1 (mock) transfected COS-7 cells after trypsin incubation. Proteins from cell lysates were separated under reducing conditions using SDS/PAGE. After immunoblotting membranes were exposed to polyclonal anti-meprin  $\beta$  antibody. Equal protein loading was confirmed by blotting actin. Maturation of meprin  $\beta$  could not be detected. (C) Recombinant promeprin  $\beta$  (5 nM) was incubated with different concentrations of recombinant soluble MT2 (80 nM, 160 nM and 240 nM). Meprin  $\beta$  activity was measured using 50  $\mu$ M of the specific quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K-e-dnp). Fluorescence intensity was detected at 405 nm with an excitation at 320 nm every 30 s for 2 h. Recombinant MT2 (240 nM) was incubated with the fluorogenic peptide as control. RFU, relative fluorescence units. (D) Recombinant promeprin  $\beta$  (100 nM) was incubated with conditioned medium from either MT2 or empty vector transfected HEK293 cells for 1, 30 and 60 min followed by Western blot analysis. As control untreated promeprin  $\beta$  and trypsin activated meprin  $\beta$  were used. Polyclonal anti-meprin  $\beta$  serum and monoclonal His-tag antibody, detecting the N-terminal His-tagged propeptide, were used for immunodetection. (E) COS-7 cells were transfected with full-length meprin  $\beta$  or pcDNA 3.1 (mock) as control for 48 h. Recombinant MT2 (98 nM) was added to the medium of meprin  $\beta$  transfected cells for 24 h. Western blot analysis of COS-7 cells did not show maturation of meprin  $\beta$ . Equal protein loading was confirmed by blotting actin. (F) COS-7 cell surface activity of meprin  $\beta$  was not increased by addition of recombinant MT2. Full-length meprin  $\beta$  transfected COS-7 cells were incubated with recombinant MT2 or COS-7 cells were co-transfected with full-length meprin  $\beta$  and MT2 or pcDNA 3.1 (mock). Specific proteolytic activity was measured by the meprin  $\beta$  specific quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K-e-dnp). Fluorescence intensity was detected at 405 nm with an excitation at 320 nm every 30 s for 2 h.



**Figure 3** Proteomic identification of the MT2-dependent cleavage in promeprin  $\beta$  by MS

(A) Recombinant promeprin  $\beta$  was incubated with recombinant MT2 or conditioned medium of MT2 overexpressing cells and analysed by SDS/PAGE. As controls non-treated and trypsin-activated promeprin  $\beta$  (active meprin) were loaded. Excised bands used for analysis are indicated (figure right). (B) Sequence coverage of indicated bands following in-gel chymotryptic digestion.

### Cell culture and transient transfection

COS-7 and HEK293 cells were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma–Aldrich) supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine in humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. In some experiments, cells were grown serum-free to exclude inhibitory effects on meprin  $\beta$ .

Equal numbers of COS-7 or HEK293 cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks. Transient transfection with meprin  $\beta$ , MT2, APP751 or empty vector (pcDNA 3.1) was performed at 80% cell confluence. Plasmid DNA was mixed with the transfection reagent polyethylenimine (Polysciences) in serum-free medium and incubated for 30 min at room temperature. For transfection, 2  $\mu$ g of each plasmid in working reactant were added to the cell medium (4 ml), which was changed to fresh medium after 4 h.

### Incubation of COS-7 cells with recombinant matriptase-2 and pancreatic trypsin

COS-7 cells were co-transfected with meprin  $\beta$  or pcDNA 3.1 (mock) as described above. Cells were washed with PBS and subsequently recombinant MT2 (98 nM) or pancreatic porcine trypsin (5 or 10 nM, Sigma–Aldrich) was added to the medium for 24 h. Cell surface activity was measured as described below and Western blot analysis was performed.

### Cell lysates, SDS/PAGE and Western blot analysis

Cell culture media were collected and cells were carefully detached in PBS with a cell scraper and centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C. The remaining cell pellet was washed three times in PBS. Cell lysis buffer [Triton-X 100 1% (v/v), complete protease inhibitor cocktail (Roche), PBS, pH 7.4] was added in relationship to the respective cell pellet size. Cell lysis was performed for 30 min on ice. Subsequently lysate was centrifuged at 13 000 g for 30 min at 4°C and protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Samples were denatured in 3× or 5× sample buffer including DTT at 95°C for 5 min. Subsequently samples were separated by SDS/PAGE (7.5% or 10%, 170 V, 40 min). Afterwards, proteins were blotted (Bio-Rad) on to a PVDF-membrane (Immobilon P, Millipore; 25 V, 30 min). Proteins of corresponding cell culture supernatants were loaded on 12% Bis-Tris-PA (polyacrylamide) gels and transferred on to PVDF membranes by tank blotting (350 mA, 90 min). Membranes were blocked in 5% dry milk or 3% BSA in TBS for 1 h at room temperature. Blocked membranes were incubated with the primary antibodies anti-meprin  $\beta$  (polyclonal serum, generated against a peptide of the ectodomain), anti-myc (Cell Signaling), anti-APP (polyclonal antibody directed against N-terminus of APP, Thermo Fisher Scientific), anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase; Cell Signaling) and anti-actin (Sigma–Aldrich) for detection in cell lysates. Supernatants were analysed using anti-N-APP (22C11, Millipore), anti-sAPP $\alpha$  (6E10, Covance) and anti-sAPP $\beta$  (Covance). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) was applied for 1 h at room temperature. Chemiluminescence was detected in the Intelligent Dark Box (Fujifilm) using the Super signal west femto kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions.

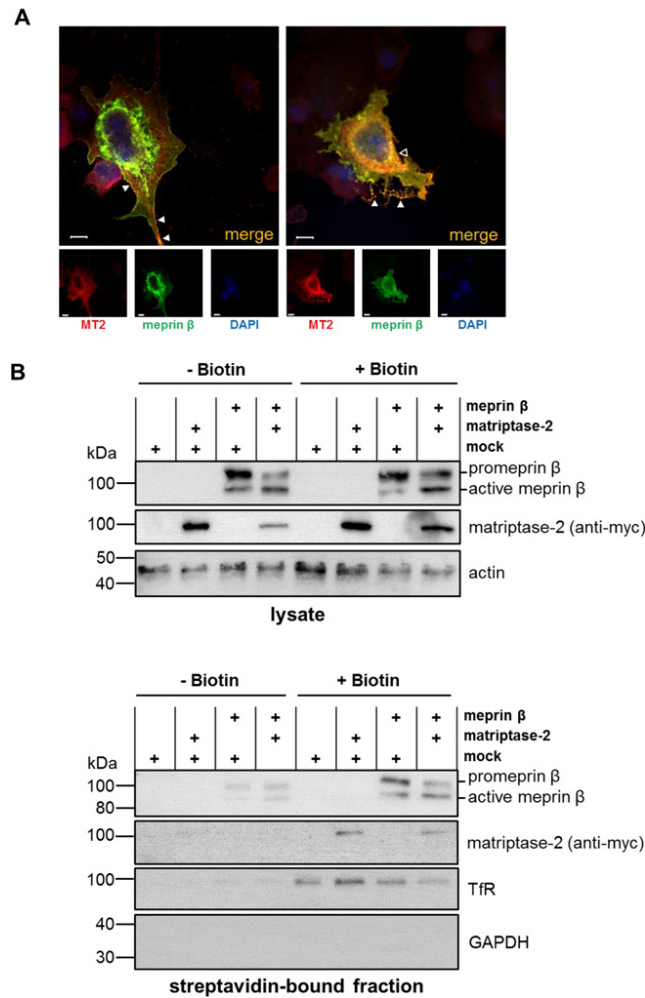
### Quenched fluorogenic peptide cleavage assay

For quantification of meprin activity, a quenched fluorogenic peptide assay was used. The quenched substrates were designed with regard to meprin  $\beta$  specific cleavage pattern [4]. For meprin  $\beta$  the substrate (mca-EDEDED-(K- $\epsilon$ -dnp) {Mca [(7-methyloxycoumarin-4-yl) acetyl] and Dnp (2,4-dinitrophenyl)} and for meprin  $\alpha$  (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) was used. Fluorescence intensity was detected at 37°C every 30 s for at least 60 min using a spectrophotometer (Tecan). Proteolytic activity was calculated in relation to the emission at 405 nm with excitation at 320 nm. Meprin  $\beta$  cell surface activity was measured after cells were washed three times in PBS and counted by a cellometer (Peqlab). Total sample volume with adjusted cell amount was respectively 300  $\mu$ l including 50  $\mu$ M of the fluorogenic substrate. Redundant cell suspension was used for Western blot analysis. Duplicates of each sample were measured, the mean values calculated and normalized to the initial point of measurement. Cell surface activity measurements were performed in five independent experiments and were statistically evaluated as described below.

### Co-localization studies

COS-7 cells were seeded in six-well plates including small cover slips. Full-length meprin  $\beta$  and matriptase-2 (1  $\mu$ g of plasmid DNA/well) were transfected as described above. After 48 h, cells were washed with PBS and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. Subsequently, cells were permeabilized [0.12% (w/v) glycine, 0.2% (w/v) saponin in PBS] for 10 min at room temperature and blocked [10% FCS, 0.2% (w/v) saponin in PBS]. Cover slips were incubated with 60  $\mu$ l of primary antibody solution [respective diluted antibody, 0.2% (w/v) saponin, 10% (v/v) FCS in PBS] in a dark chamber for 1 h at room temperature and subsequently washed [0.2% saponin (w/v) in PBS]. Fluorophor coupled secondary antibody was then added to the cover slips. Samples were washed again [0.2% (w/v) saponin in PBS] and additionally with double-distilled H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O). Cover slips were then fixed with 15  $\mu$ l of Mowiol/DABCO solution [17% (w/v) Mowiol, 33% (v/v) glycerol, 50 mg/ml DABCO

Highlighted in green: high confident peptide identifications (<1% FDR). Highlighted in red: amino acids that were identified to be N-terminally dimethylated, i.e., the N-terminus following MT2 and trypsin (active meprin) cleavage of promeprin  $\beta$ . Note: for band 2 (active meprin), additional sequence coverage was identified N-terminal to Asn<sup>62</sup>. This suggests that another N-terminus also exists. However, only the N-terminus at Arg<sup>61</sup>/Asn<sup>62</sup> was identified and confirmed with MS/MS. (C) MS/MS spectrum of N<sup>+</sup>SIIGEK\*Y (\*dimethylated), the MT2 cleavage site on promeprin  $\beta$  (Arg<sup>61</sup>/Asn<sup>62</sup>). The spectrum shows the intense a1 and yn-1 ions characteristic for N-terminal dimethylated peptides. Spectrum was extracted from Proteome discoverer (1.4.0.288) without further modification. LC-MS methods: Nano-HPLC-MS was performed on an UltiMate 3000 RS Nano/Cap System (Dionex) coupled online to an Orbitrap LTQ Velos (Dionex). Samples were desalted for 6 min [Acclaim PepMap100 C-18, 300  $\mu$ m I.D.  $\times$  5 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å (1 Å = 0.1 nm)] at a flow rate of 30  $\mu$ l/min using 3% ACN, 0.1% TFA (trifluoroacetic acid). An Acclaim PepMap100 C-18 column (75  $\mu$ m I.D.  $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m, 100 Å) was used for analytical separation at a flow rate of 300 nl/min using binary gradients of buffers A (0.05% FA, formaldehyde) and B (80% ACN and 0.04% FA). The elution used gradient steps of 5%–10% B (6–7 min), 10%–50% B (7–67 min) and 50%–95% B (67–72 min) along with an isocratic wash (95% B, 72–82 min) and column re-equilibration (5% B, 82–95 min) steps. MS scans were acquired in the mass range of 300–2000 *m/z* at a resolution of 60000. The five most intense signals were subjected to CID and HCD fragmentation using a dynamic exclusion of 180 s and a repeat count of 3. MS/MS parameters, – minimum signal intensity: 1000, isolation width: 3.0 Da, charge state:  $\geq$ 2, HCD resolution: 7500, normalized collision energy of 35 and 40 for CID and HCD respectively.



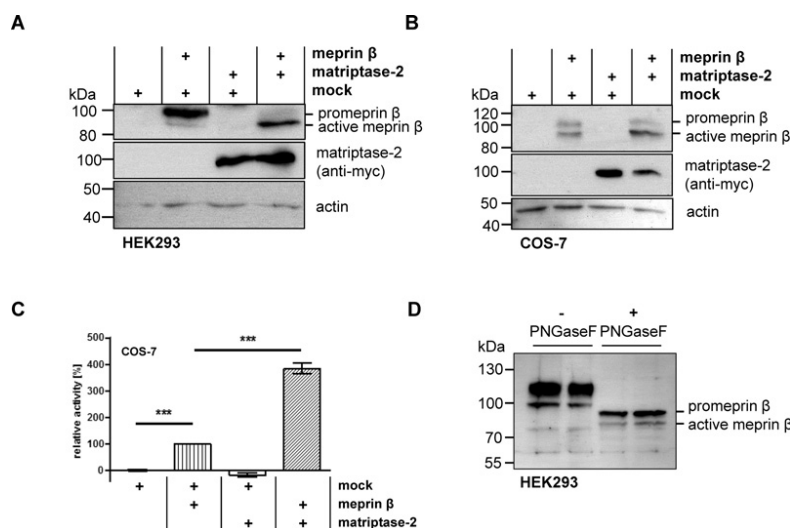
**Figure 4** Meprin  $\beta$  and MT2 are co-localized at the cell surface

(A) COS-7 cells were co-transfected with meprin  $\beta$  and MT2 for 48 h. Cells were paraformaldehyde fixed and permeabilized by saponin treatment. For immunostaining polyclonal antibody against meprin  $\beta$  and monoclonal myc-tag antibody (MT2) were used. Nuclei were stained by DAPI. CLSM revealed co-localization of both enzymes at the cell surface. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) COS-7 cells were co-transfected with full-length meprin  $\beta$  and MT2 for 48 h. Enzymes and pcDNA 3.1 (mock) as control were transfected in different combinations. Primary amine biotinylation of cell surface proteins was performed as described in 'Experimental'. After immunoblotting membranes of total lysates were exposed to polyclonal anti-meprin  $\beta$  or monoclonal anti-myc (MT2) antibodies. Co-transfection of both enzymes revealed a shift to the active form of meprin  $\beta$ . Equal protein loading was confirmed by blotting actin. Blotting of precipitated proteins in the streptavidin-bound fraction after biotinylation reveals cell surface localization of meprin  $\beta$  and MT2. As observed in the lysate increased maturation of meprin  $\beta$  could be detected when co-transfected with MT2. TfR was blotted as positive control for surface biotinylation and GAPDH to prove cellular integrity.

(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane), 1  $\mu$ g/ml DAPI, Roth). Additionally, immunostainings of paraffin embedded small intestine sections from C57/BL6 mice were performed. Tissue sections were pre-heated at 60°C for 15 min and dewaxed two times in xylene for 10 min, two times in 100% ethanol for 5 min and 5 min in decreasing ethanol concentrations (95%, 70%, 50%, 30%). Antigens were regained in 10 mM citric buffer

(pH 5.5) and boiled for 10 min at 100°C. After cooling down to room temperature, tissue sections were washed in PBS and blocked in Protein Block Serum Free (Dako) for 20 min at room temperature. Primary antibody [anti-meprin  $\beta$  (1/1000), anti-MTP-2 (1/500) L1410, Santa Cruz Biotechnology] was diluted in Antibody Diluent with Background Reducing Agents (Dako) in a humid chamber at 4°C overnight. Tissue sections were





**Figure 5** MT2 activates membrane bound meprin  $\beta$

HEK293 (A) and COS-7 cells (B) were co-transfected with meprin  $\beta$  and MT2 for 48 h. pcDNA 3.1 (mock) was used as control. Proteins from cell lysates were separated under reducing conditions using SDS/PAGE. After immunoblotting, membranes were exposed to polyclonal anti-meprin  $\beta$  or monoclonal anti-myc (MT-2) antibodies. Co-transfection of both enzymes revealed a molecular mass shift of meprin  $\beta$ . Equal protein loading was confirmed by blotting actin. (C) COS-7 cell surface activity of meprin  $\beta$  was measured using 50  $\mu$ M of the meprin  $\beta$  specific quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K-e-dnp). Fluorescence intensity was detected at 405 nm with an excitation at 320 nm every 30 s for 2 h. For statistical analysis, five independent experiments were performed. Activity of meprin  $\beta$  and mock transfected cells after 60 min was set to 100%. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. Multiple ANOVA was performed for comparison of groups followed by Scheffé *P*-value adjustment. (\*\*\*) indicates a *P*-value below 0.001. (D) HEK293 were transfected with meprin  $\beta$  for 24 h. PNGaseF treatment of cell lysates was performed according to the manufacturer's instructions (PNGaseF, New England BioLabs) using 20  $\mu$ g of total protein. Proteins were separated by SDS/PAGE and transferred on to a PVDF membrane. Meprin  $\beta$  detection was carried out with polyclonal anti-meprin  $\beta$  antiserum. Notably, even after full deglycosylation by PNGaseF meprin  $\beta$  still appears as double band.

washed in PBS three times and incubated with fluorophore coupled secondary antibody (1/300, Mobitech) in a dark chamber for 1.5 h at room temperature. Tissue sections were washed in PBS three times and nuclei were stained with DAPI (1  $\mu$ g/ml in PBS) for 5 min at room temperature. After an additional washing step, tissue sections were embedded in Fluorescent Mounting Medium (Dako). Immunofluorescence analysis was performed using a confocal laser-scanning microscope FV 1000 (Olympus).

#### Primary amine biotinylation

Biotin solution [1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) in PBS (0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS)] was added to the cells for 30 min at 4 °C. Subsequently, cells were incubated with quenching buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0 in PBS/CM) for 10 min and then washed with PBS/CM. Afterwards, cells were lysed [50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X 100, 0.1% (w/v) SDS, complete protease inhibitor cocktail (Roche)] on ice for 30 min. Lysate controls were taken and protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Washed streptavidin agarose resin beads (Thermo Fisher Scientific) were added to the remaining lysate. Samples were mixed on a rotator for 1 h at 4 °C. Finally, beads were washed with lysis buffer and proteins were removed from the beads by addition of 3 $\times$  sample buffer including DTT and denaturation for 20 min at 60 °C. Lysates and bound fractions were

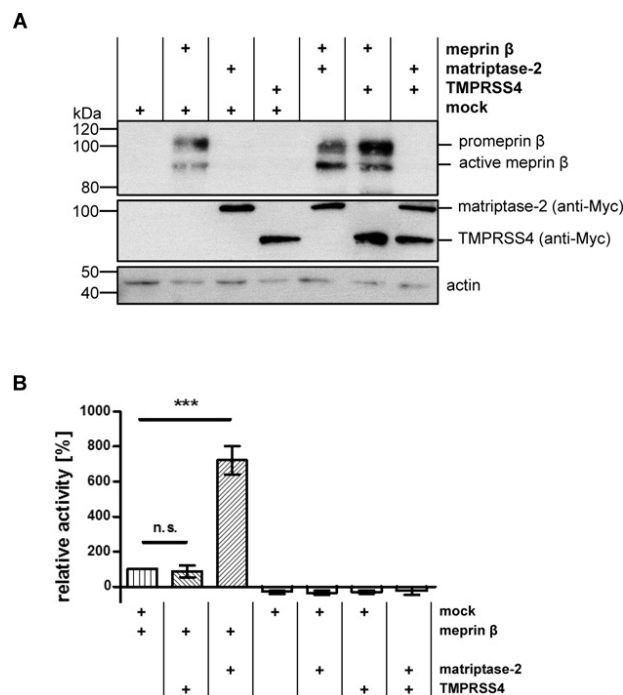
analysed by Western blot analysis. Anti-TfR (transferrin receptor, Abcam) and anti-GAPDH (Santa Cruz) antibodies were used as positive and negative control respectively, for primary amine biotinylation

#### Deglycosylation by PNGaseF

HEK293 cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks to 50% confluence and transiently transfected with meprin  $\beta$ , as described above. After 24 h, cells were washed with PBS and cell lysates were prepared using EDTA-free lysis buffer [1% (v/v) Triton X-100; EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche) PBS, pH 7.4]. Amount of total protein was determined by BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). Peptide-*N*-glycosidase F (PNGaseF) treatment was performed according to the manufacturer's instructions (New England BioLabs) using 20  $\mu$ g of total protein. Samples were mixed with 5 $\times$  reducing sample buffer, heated at 95 °C for 7 min and resolved on 7.5% SDS/PAGE. Proteins were transferred on to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) by semi-dry Western blot. Meprin  $\beta$  was detected using a specific polyclonal antiserum.

#### Molecular modelling

Molecular graphics and analyses were performed with the UCSF Chimera package (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) supported by NIGMS P41-GM103311). Promepirin  $\beta$  (PDB accession number 4GWM) and mature meprin  $\beta$  (PDB accession number 4GWN)



**Figure 6** MT2 but not TMPRSS4 activates membrane-bound meprin  $\beta$

COS-7 cells were co-transfected with full-length meprin  $\beta$  and MT2 or TMPRSS4 for 48 h. pcDNA 3.1 (mock) was transfected as control. **(A)** Proteins from cell lysates were separated under reducing conditions using SDS/PAGE. After immunoblotting membranes were exposed to polyclonal anti-meprin  $\beta$  or monoclonal anti-myc antibodies (MT2 and TMPRSS4). Again, co-transfection of meprin  $\beta$  and MT2 revealed a shift to the active form of meprin  $\beta$ . This effect could not be observed in the co-transfection with TMPRSS4. Equal protein loading was confirmed by blotting actin. **(B)** Cell surface activity of meprin  $\beta$  was measured using 50  $\mu$ M of the meprin  $\beta$ -specific quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K- $\epsilon$ -dnp). Fluorescence intensity was detected at 405 nm with an excitation at 320 nm every 30 s for 80 min. For statistical analysis, five independent peptide cleavage assays were performed. Activity of meprin  $\beta$  and mock transfected cells after 60 min was set to 100%. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M.. Multiple ANOVA was performed for comparison of groups followed by Scheffé *P*-value adjustment. (\*\*\*) indicates a *P*-value below 0.001.

were used with additional EGF (epidermal growth factor)-like and transmembrane regions fused to it. For MT2, no crystal structure is available. Therefore the protease domain was homology modelled using the Swiss-model automated mode [22]. As a template, the protease domain of matriptase was used (PDB accession number 1EAX) and the other domains of MT2 are represented by round spheres.

## RESULTS

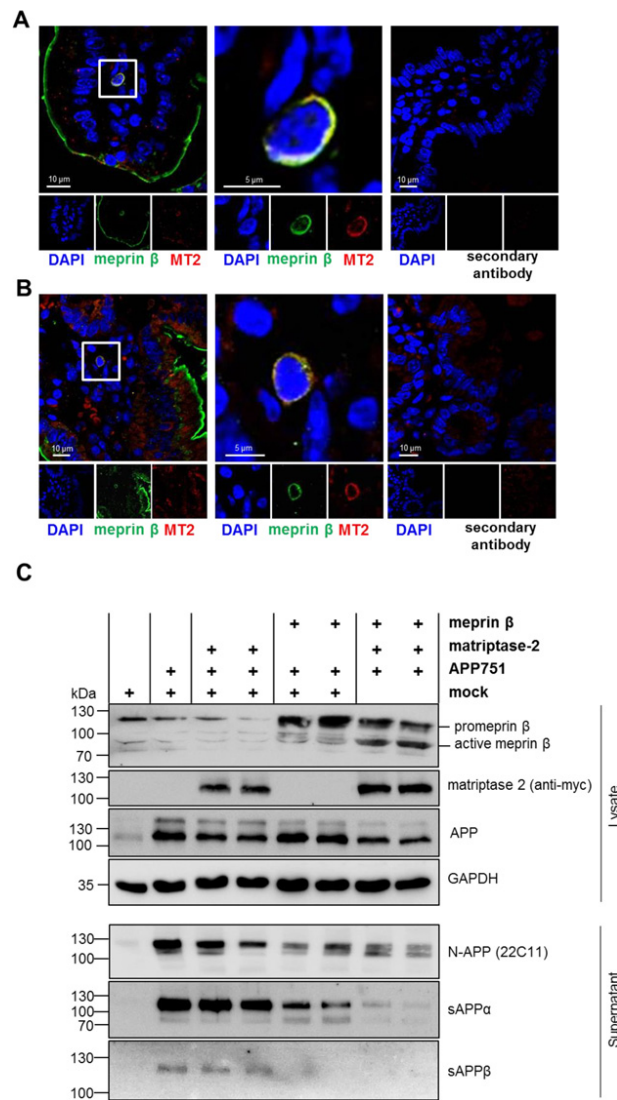
The previously solved crystal structure of the entire ectodomain of human meprin  $\beta$  provides evidence for close proximity of the active site cleft to the plasma membrane in the full-length protein (Figure 1, Supplementary Movie) [2]. Promepin  $\beta$  requires proteolytic processing of the propeptide by tryptic serine proteases to gain full activity [18]. A model of membrane bound meprin  $\beta$  based on the crystal structure data revealed that the cleavage site for activation in full-length meprin  $\beta$  seems to be hardly accessible (Figure 1). We therefore hypothesized that close interaction of transmembrane meprin  $\beta$  and its activator is necessary for maturation at the cell surface, which may require a membrane bound serine protease.

### Pancreatic trypsin does not activate membrane-bound meprin $\beta$

To investigate this hypothesis, we incubated full-length meprin  $\beta$  overexpressing COS-7 cells with pancreatic trypsin, the most potent activator of soluble meprin  $\beta$  [18], in different concentrations, washed the cells and measured specific meprin  $\beta$  activity at the cell surface. For this the quenched fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K- $\epsilon$ -dnp) was used that was previously shown to be meprin  $\beta$  specific [5]. Indeed, no increased activity of membrane bound meprin  $\beta$  could be observed after trypsin incubation (Figure 2A), demonstrating as a proof of principle that the activation site in full-length meprin  $\beta$  is not accessible to solvent tryptic proteases. Additionally, no maturation of full-length promepin  $\beta$  after trypsin incubation was detected by Western blot (Figure 2B). Thus, pancreatic trypsin is an effective activator of shed meprin  $\beta$ , mediated by ADAM10 and ADAM17, but lacks the capacity to cleave-off the inhibitory propeptide at the plasma membrane.

### Recombinant soluble promepin $\beta$ is activated by matriptase-2

To test if a transmembrane serine protease is required for maturation of full-length meprin  $\beta$ , we investigated MT2 as

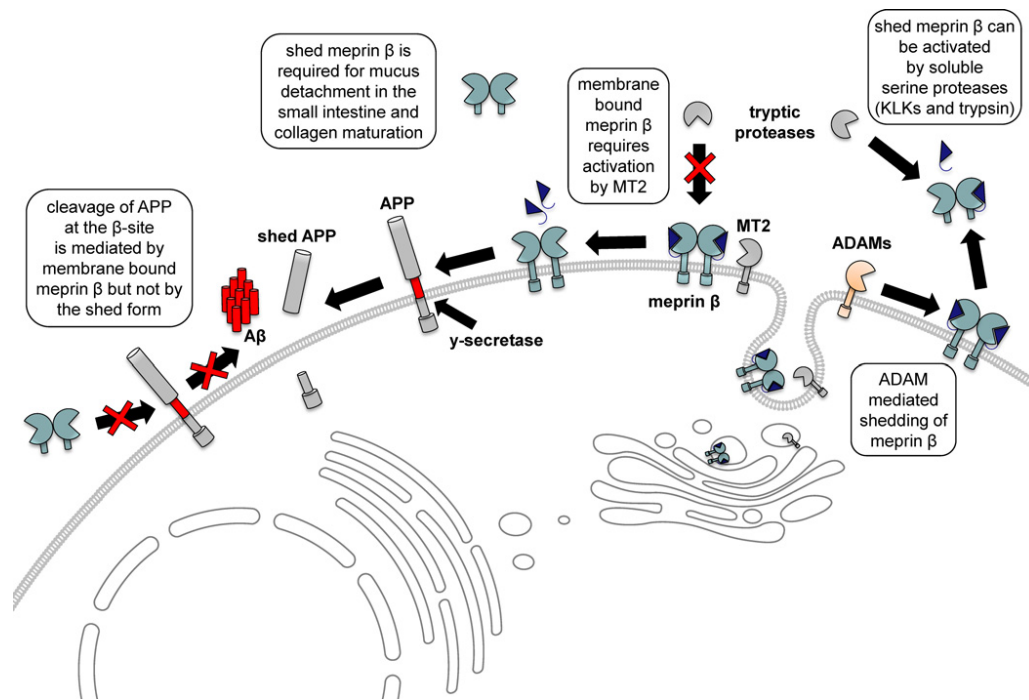


**Figure 7** Endogenous co-localization of meprin  $\beta$  and MT2 and shedding of APP751

**(A and B)** Immunofluorescence stainings of C57/BL6 mice show co-localization of meprin  $\beta$  and MT2 in the small intestine. Meprin  $\beta$  (green) and MT2 (red) co-localize in immune cells of the ileum of wild-type mice. Secondary antibody control is shown in the right figures. (Scale bar = 10  $\mu$ m). For the analysis of meprin  $\beta$  activity towards a transmembrane protein HEK293 cells were co-transfected with meprin  $\beta$ , MT2 and APP751. pcDNA 3.1 (mock) served as control. Proteins from lysates were analysed by Western blotting using polyclonal anti-meprin  $\beta$ , monoclonal anti-myc (MT2) and polyclonal anti-APP antibodies. Again a higher amount of active meprin  $\beta$  was observed when co-expressed with MT2. GAPDH was used as a loading control. Corresponding cell culture supernatants were loaded on Bis-Tris-PA gels and transferred to a PVDF membrane for analysis of soluble APP variants.

a possible candidate. Soluble purified forms of both enzymes were incubated and specific meprin  $\beta$  activity was analysed. Indeed, promeprin  $\beta$  showed increased proteolytic activity after dose-dependent MT2 incubation, using the meprin  $\beta$ -specific fluorogenic peptide mca-EDEDED-dnp (Figure 2C). This was

in line with the release of the propeptide of meprin  $\beta$  after time-dependent MT2 incubation, visualized by Western blotting (Figure 2D). An antibody directed against the ectodomain of meprin  $\beta$  revealed a molecular mass shift corresponding to the loss of the propeptide. Using an antibody detecting the N-terminal



**Figure 8** Activation of soluble and membrane-bound meprin  $\beta$  and its biological relevance

Metalloprotease meprin  $\beta$  requires different tryptic enzymes for its maturation at the cell surface or as soluble protein. MT2 activates full-length meprin  $\beta$ , whereas pancreatic trypsin and human kallikrein-related peptidases (KLKs) 4, 5, and 8 cleave-off the propeptide of soluble meprin  $\beta$ . ADAM10 and 17 are ectodomain sheddases of meprin  $\beta$ . Active membrane-bound meprin  $\beta$  is able to shed the APP from the cell surface.

His-tagged propeptide of meprin  $\beta$  resulted in the loss of the signal after MT2 treatment. Similar effects were observed when recombinant soluble meprin  $\beta$  was incubated with pancreatic trypsin, a known activator of the human metalloprotease [18]. Next, we analysed if soluble MT2, in contrast with pancreatic trypsin, is capable of activating membrane-bound meprin  $\beta$ . Therefore, meprin  $\beta$  overexpressing COS-7 cells were incubated with 98 nM purified soluble MT2. As seen for trypsin no maturation of full-length promeprin  $\beta$  after soluble MT2 incubation was detected by Western blotting (Figure 2E). Accordingly, no activation of transmembrane meprin  $\beta$  could be observed after treatment with soluble MT2 using the meprin  $\beta$ -specific peptide cleavage assay (Figure 2F). In contrast, co-transfection with full-length MT2 revealed a strong increase in meprin  $\beta$  activity.

Cleavage of promeprin  $\beta$  by MT2 was further analysed employing MS. Samples were reductively dimethylated prior to enzymatic digestion to distinguish the N-terminus, formed by processing of the proprotein with MT2, from internal peptides generated during in-gel digestion. We identified a peptide ranging from Asn<sup>62</sup> to Tyr<sup>69</sup> to be N-terminally dimethylated. The MS/MS spectrum of this peptide exhibited a strong  $\alpha 1$ -ion which is characteristic of N-terminally dimethylated peptides, i.e. further confirming this peptide to be derived from the neo-N-terminus (Figure 3). Indeed, the same typical tryptic cleavage site between

Arg<sup>61</sup> and Asn<sup>62</sup> that is necessary for activation of the promeprin  $\beta$  by trypsin could be confirmed (Figure 3). Cleavage after arginine at P1 position fits nicely to the known cleavage specificity of MT2 [23–27].

It was previously shown that proteolytic activation of promeprin  $\beta$  and its homolog promeprin  $\alpha$  is not the same [18]. For instance, kallikrein-related peptidases (KLK) 4 and 8 specifically activate promeprin  $\beta$  but not promeprin  $\alpha$ , whereas plasmin activates promeprin  $\alpha$  only. Thus, we analysed if MT2 can cleave-off the propeptide of promeprin  $\alpha$  as well. Incubation of soluble promeprin  $\alpha$  with purified MT2 did not result in increased activity of the metalloprotease, as measured in a fluorogenic peptide assay using (mca)-YVADAPK-(K- $\epsilon$ -dnp) as substrate (result not shown).

#### Membrane bound promeprin $\beta$ is activated by matriptase-2 at the cell surface

To test the capability of full-length MT2 as a potential activator, meprin  $\beta$  and MT2 were co-expressed in COS-7 cells. First, we analysed if both proteases are co-localized in these cells and therefore performed confocal laser scanning microscopy (CLSM). Indeed, meprin  $\beta$  and MT2 showed co-localization within the secretory pathway (black arrowhead) and at the plasma membrane (white arrowheads) indicating the possibility of direct interaction

(Figure 4A). To further isolate cell surface proteins, primary amine biotinylation with meprin  $\beta$  and MT2 overexpressing COS-7 cells was performed. Subsequent Western blot of these fractions revealed not only positive signals for MT2 and meprin  $\beta$ , but showed additionally a shift of full-length pro-meprin  $\beta$  to a lower molecular mass form, which was also detected in the lysate fractions (Figure 4B). Weak non-specific binding of meprin  $\beta$  to streptavidin beads in the non-biotinylated fractions was also observed, probably due to its massive glycosylation [2], but to a much lower extent compared with the positive fractions. To further test if the band-shift of meprin  $\beta$  co-expressed with MT2 is due to pro-enzyme maturation additional Western blot analyses not only in COS-7 but additionally in HEK293 cells were performed (Figure 5). Here, the shift of meprin  $\beta$  to a lower molecular mass form was even more prominent in HEK293 compared with COS-7 cells (Figures 5A and 5B respectively). The maturation of the metalloprotease observed by Western blot correlated with a significant increase of specific meprin  $\beta$  activity at the cell surface of COS-7 cells, when co-expressed with MT2 (Figure 5C). HEK293 cells were inappropriate for cell surface activity assays due to their weak attachment after meprin  $\beta$  transfection. The relative activity of meprin  $\beta$  measured by cleavage of the specific fluorogenic peptide (mca)-EDED-(K- $\epsilon$ -dnp) was increased ~4-fold in the MT2 co-expressing cells compared with meprin  $\beta$  expression alone. To exclude an effect on protein glycosylation due to altered cellular localization and transport of meprin  $\beta$  mediated by MT2, cell lysates were incubated with PNGaseF to remove N-linked glycans (Figure 5D). Notably, even after full deglycosylation, two bands still appeared indicating proteolytic cleavage being responsible for the lower molecular mass form.

Next we investigated if activation of membrane bound pro-meprin  $\beta$  by MT2 is a specific proteolytic process or if the maturation is basically possible by any kind of tryptic transmembrane serine proteases. Therefore, COS-7 cells were transfected with meprin  $\beta$  and/or TMPRSS4. Subsequent Western blot analysis revealed no shift of full-length meprin  $\beta$  in the presence of TMPRSS4 (Figure 6A). This was in line with the cell surface activity of meprin  $\beta$ , which showed no difference between single and co-expression of the enzymes, but again was significantly increased in the presence of MT2 (Figure 6B).

To provide evidence for a biological relevance of the meprin  $\beta$  MT2 interaction, we performed confocal fluorescence microscopy of the murine small intestine. Here we could show that both proteases indeed co-localize at the plasma membrane most probably of certain immune cells, but not on the epithelial cells, where only meprin  $\beta$  is present (Figure 7A). Additionally, we analysed the shedding capacity of meprin  $\beta$  towards its known substrate APP. As we found co-localization of meprin  $\beta$  and MT2 on some immune cells in the lamina propria, we decided to analyse the APP751 isoform, which is rather ubiquitously expressed, except for neurons [28]. Therefore, we transfected HEK293 cells with meprin  $\beta$  and/or MT2, as well as APP751 (Figure 7B). Here, we confirmed the previously reported shedding of APP by meprin  $\beta$ , demonstrated by decreased sAPP $\alpha$  levels. Indeed, in the presence of both meprin  $\beta$  and MT2 almost complete absence of sAPP $\alpha$  was observed, indicating enhanced shedding by meprin  $\beta$ . Accordingly, we observed increased levels of a shortened soluble APP fragment detected by a N-terminal APP antibody that most probably represents meprin  $\beta$ -specific sAPP $\beta$ . Importantly, no proteolytic effect on APP751 by MT2 alone was detectable. Additionally, using an antibody that specifically recognizes an epitope in sAPP $\beta$  generated by BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) but not meprin  $\beta$  revealed a decrease in band intensity in the presence of meprin  $\beta$  and MT2. This clearly

indicates a BACE-1 independent increase in APP shedding in our experiment.

Overall, we identified MT2 as a specific activator of transmembrane metalloprotease meprin  $\beta$  (Supplementary Movie). Future analyses will show how this proteolytic interaction influences the biological activity of meprin  $\beta$  in health and disease.

## DISCUSSION

Regulation of proteolytic enzymes can occur on very different levels, e.g. by altered mRNA expression, by specific endogenous or synthetic inhibitors or other activity modifying factors. This very complex and highly balanced proteolytic network, the protease web, is important for almost all physiological processes in the human body and de-regulation of protease activity often leads to pathological conditions.

Metalloprotease meprin  $\beta$  was found to be up-regulated in fibrotic conditions, such as keloids [10] and pulmonary hypertension [11], where it contributes to increased collagen maturation and deposition [8]. Hence, regulation of meprin  $\beta$  activity might be a suitable approach for the treatment of these diseases. We and others have shown that the hydroxamate inhibitor actinonin effectively reduces meprin  $\beta$  activity, but it clearly lacks specificity upon other metalloproteases [16,29]. Therefore, it is also of interest to study those proteins that positively regulate meprin  $\beta$  activity, including activators. Here, pancreatic trypsin as well as KLK4, KLK5 and KLK8 have been identified as potent activators *in vitro* [18,30,31]. However, the structural properties of meprin  $\beta$  were ambiguous and only by solving the crystal structure did it become evident that the active site clefts in meprin  $\beta$  homodimers may be in very close proximity to the plasma membrane [2]. The so far characterized activators were all identified by analysing the recombinant soluble ectodomain of meprin  $\beta$ . This is not completely artificial since it is known that ADAM10 and ADAM17 can shed meprin  $\beta$  from the cell surface, which for instance has an important impact on the release of the mucus layer in the small intestine [13] and abrogates the  $\beta$ -secretase activity of meprin  $\beta$  towards APP cleavage. The buried activation site in full-length meprin  $\beta$  however seems to be hardly assessable for soluble serine proteases and we therefore hypothesized that transmembrane bound enzymes are suitable candidate proteases for activation. Herein, we demonstrate transmembrane MT2 to be a potent activator of meprin  $\beta$  at the cell surface, whereas incubation with soluble MT2 and even pancreatic trypsin, the most effective activator known so far, did not result in maturation of membrane bound meprin  $\beta$ . Additionally, TMPRSS4, another transmembrane serine protease, was not capable of activating meprin  $\beta$ , pin-pointing a more specific role of MT2. However, one cannot exclude that other membrane bound serine proteases, besides MT2, can activate meprin  $\beta$  at the cell surface too.

So far, MT2 has attracted much attention because of its key role in human iron homeostasis. Patients with mutations in the MT2-encoding gene suffer from iron-refractory iron deficiency anaemia characterized by inappropriately elevated levels of the hormone hepcidin [32]. It has been shown that MT2 down-regulates hepcidin by cleaving haemojuvelin at the cell surface [33].

Although MT2 is predominantly expressed in the liver, it became obvious from mRNA expression analyses [34] and by employing the BioGPS database ([www.biogps.org](http://www.biogps.org)) that meprin  $\beta$  and MT2 share quite ubiquitous expression patterns in humans, enabling possible *in vivo* relevance of the proteolytic interaction reported herein. In line with meprin  $\beta$  expression, high MT2

mRNA was also detected in kidney and additionally at minor levels in uterus with smaller amounts in many other tissues including the brain, lung and testis [34]. Both, meprin  $\beta$  and MT2 knockout mice exhibit no dramatic developmental phenotype [35–38], which implies that only under certain challenged conditions can distinct effects be observed, based on the MT2-mediated meprin  $\beta$  maturation at the cell surface.

Localization of meprin  $\beta$  at the cell surface or as soluble protein clearly has impact on its biological function, as mentioned for the MUC2 (mucin 2) cleavage [13]. We have previously shown that meprin  $\beta$  sheds the APP at the  $\beta$ -secretase cleavage site, thereby increasing  $\gamma$ -secretase-mediated A $\beta$  release [14]. These A $\beta$  peptides tend to aggregate, forming cytotoxic amyloid plaques found in the brains of AD patients. Indeed, meprin  $\beta$  mRNA expression is up-regulated in AD, indicating a possible role of this particular metalloprotease in the onset and progression of the disease [14]. In the same study, it was shown that only full-length membrane-bound meprin  $\beta$  is able to shed APP, reminiscent of the  $\beta$ -secretase BACE-1, and that this activity is completely abolished for the soluble meprin  $\beta$ . Therefore, it will be important to investigate in the future, if increased MT2 expression is associated with enhanced shedding activity of meprin  $\beta$ , e.g. leading to elevated levels of A $\beta$  peptides. In the present work, we identified co-localization of meprin  $\beta$  and MT2 at the plasma membrane of transfected COS-7 cells and endogenously in the murine small intestine. Meprin  $\beta$  was previously shown to promote leucocyte migration, which may include cleavage of cell adhesion molecules, such as the APP. Hence, activation of meprin  $\beta$  at the cell surface by MT2 or other so far unidentified membrane-bound serine proteases may well be an important regulatory mechanism of this metalloprotease under certain conditions in health and disease.

Noteworthy, meprin  $\beta$  and MT2 are not co-expressed ubiquitously indicating specific regulation of the membrane-bound form of the metalloprotease. For instance, at the apical side of the intestinal epithelium, MT2 is not expressed. However, it was demonstrated that in this particular compartment meprin  $\beta$  needs to be shed to get access to the mucus layer where it cleaves MUC2 [13]. Once released from the cell surface, meprin  $\beta$  can easily be activated by soluble serine proteases, such as pancreatic trypsin or kallikrein-related peptidases. Under these conditions, MT2 activity at the cell surface is not required.

Overall, in this straight forward biochemical approach we demonstrated for the first time that there are striking differences in the activation of soluble shed meprin  $\beta$  compared with its full-length form at the cell surface. Moreover, we demonstrated co-localization of meprin  $\beta$  and MT2 on certain immune cells in the lamina propria. That this leads to increased cleavage of cell surface molecules, as shown for the shedding of APP751, has to be demonstrated further. This might also be important for proenzyme maturation of other cell surface proteases, previously demonstrated to be shed under certain conditions, such as ADAMs or MMPs (matrix metalloproteinases) (Figure 8).

#### AUTHOR CONTRIBUTION

Felix Jäckle, Frederike Schmidt, Johannes Prox, Rielana Wichert and Christoph Becker-Pauly designed and performed experiments. Marit Stirnberg, Martin Mangold, Michael Gütschow, Claus Pietrzik and Anke Ohler provided essential reagents. Tomas Koudeika and Andreas Tholey performed MS and data analysis. Philipp Arnold made homology models and generated the movie. Felix Jäckle and Christoph Becker-Pauly analysed the data and wrote the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Institute of Medical Informatics and Statistics, University of Kiel, for statistical advice. We thank Xavier Gomis-Rüth for the pdb-file of membrane bound dimeric meprin  $\beta$ .

#### FUNDING

This work was supported by the SFB877 "Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology" (project A9 and Z2), [grant numbers BE 4086/2-1 (to C.B.-P.) and STI 660/1-1 (to M.S.)] and [grant number PI 379/6-1 (to C.U.P.)].

#### REFERENCES

- Sterchi, E.E., Stocker, W. and Bond, J.S. (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29**, 309–328 [CrossRef PubMed](#)
- Arolas, J.L., Broder, C., Jefferson, T., Guevara, T., Sterchi, E.E., Bode, W., Stocker, W., Becker-Pauly, C. and Gomis-Rüth, F.X. (2012) Structural basis for the sheddase function of human meprin beta metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 16131–16136 [CrossRef PubMed](#)
- Schilling, O., Barre, O., Huesgen, P.F. and Overall, C.M. (2010) Proteome-wide analysis of protein carboxy termini: C terminomics. *Nat. Methods* **7**, 508–511 [CrossRef PubMed](#)
- Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., Auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schutte, A., Kappelhoff, R., Stocker, W. and Overall, C.M. (2011) Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol. Cell Proteomics* **10**, M111 009233 [CrossRef PubMed](#)
- Broder, C. and Becker-Pauly, C. (2013) The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem. J.* **450**, 253–264 [CrossRef PubMed](#)
- Kleinfeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R.K., Starr, A.E., Foster, L.J., Kizhakkedathu, J.N. and Overall, C.M. (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.* **28**, 281–288 [CrossRef PubMed](#)
- Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V.V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E. et al. (2013) The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 309–333 [CrossRef PubMed](#)
- Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Konerding, M.A., Bahr, K., Muller, S., Overall, C.M., Bond, J.S., Koudeika, T., Tholey, A. et al. (2013) Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 14219–14224 [CrossRef PubMed](#)
- Hulmes, D.J. (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* **137**, 2–10 [CrossRef PubMed](#)
- Kronenberg, D., Bruns, B.C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E.E., Traupe, H., Bohm, M., Hulmes, D.J., Stocker, W. and Becker-Pauly, C. (2010) Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2727–2735 [CrossRef PubMed](#)
- Biasin, V., Marsh, L.M., Egemnazarov, B., Wilhelm, J., Ghanim, B., Klepetko, W., Wygrecka, M., Olschewski, H., Eferl, R., Olschewski, A. and Kwapiszewska, G. (2014) Meprin beta, a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J. Pathol.* **233**, 7–17 [CrossRef PubMed](#)
- Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M.K., Leuenberger, B., Luglinbuehl, U. and Sterchi, E.E. (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin beta metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **278**, 42829–42839 [CrossRef PubMed](#)
- Schutte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M.E., Rodriguez-Pineiro, A.M., Backhed, F., Muller, S., Lottaz, D., Bond, J.S. and Hansson, G.C. (2014) Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 12396–12401 [CrossRef PubMed](#)
- Bien, J., Jefferson, T., Causevic, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen, S., Becker-Pauly, C. and Pietrzik, C.U. (2012) The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J. Biol. Chem.* **287**, 33304–33313 [CrossRef PubMed](#)
- Pernecky, R., Alexopoulos, P. and Kurz, A. (2014) Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers. *Trends Mol. Med.* **20**, 8–15 [CrossRef PubMed](#)
- Kruse, M.N., Becker, C., Lottaz, D., Kohler, D., Yiallourous, I., Krell, H.W., Sterchi, E.E. and Stocker, W. (2004) Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 383–389 [CrossRef PubMed](#)

- 17 Hedrich, J., Lottaz, D., Meyer, K., Yiallourou, I., Jahnhen-Dechent, W., Stocker, W. and Becker-Pauly, C. (2010) Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry* **49**, 8599–8607 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 18 Ohler, A., Debela, M., Wagner, S., Magdolen, V. and Becker-Pauly, C. (2010) Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol. Chem.* **391**, 455–460 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 19 Becker, C., Kruse, M.N., Slotty, K.A., Kohler, D., Harris, J.R., Rosmann, S., Sterchi, E.E. and Stocker, W. (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol. Chem.* **384**, 825–831 [PubMed](#)
- 20 Becker-Pauly, C., Howel, M., Walker, T., Vliad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E.E., Debela, M., Magdolen, V. et al. (2007) The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1115–1125 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 21 Stirnberg, M., Maurer, E., Horstmeier, A., Kolp, S., Frank, S., Bald, T., Arenz, K., Janzer, A., Prager, K., Wunderlich, P. et al. (2010) Proteolytic processing of the serine protease matriptase-2: identification of the cleavage sites required for its autocatalytic release from the cell surface. *Biochem. J.* **430**, 87–95 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 22 Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 23 Beliveau, F., Desilets, A. and Leduc, R. (2009) Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J.* **276**, 2213–2226 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 24 Sisay, M.T., Steinmetzer, T., Stirnberg, M., Maurer, E., Hammami, M., Bajorath, J. and Gutschow, M. (2010) Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2. *J. Med. Chem.* **53**, 5523–5535 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 25 Stirnberg, M. and Gutschow, M. (2013) Matriptase-2, a regulatory protease of iron homeostasis: possible substrates, cleavage sites and inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 1052–1061 [PubMed](#)
- 26 Wysocka, M., Gruba, N., Miecznikowska, A., Popow-Stellmaszyk, J., Gutschow, M., Stirnberg, M., Furtmann, N., Bajorath, J., Lesner, A. and Rolka, K. (2014) Substrate specificity of human matriptase-2. *Biochimie* **97**, 121–127 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 27 Barre, O., Dufour, A., Eckhard, U., Kappelhoff, R., Beliveau, F., Leduc, R. and Overall, C.M. (2014) Cleavage specificity analysis of six type II transmembrane serine proteases (TTSPs) using pics with proteome-derived peptide libraries. *PLoS One* **9**, e105984 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 28 Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J. Alzheimers Dis.* **3**, 75–80 [PubMed](#)
- 29 Bauvois, B. and Dauzonne, D. (2006) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med. Res. Rev.* **26**, 88–130 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 30 Johnson, G.D. and Hersh, L.B. (1994) Expression of meprin subunit precursors. Membrane anchoring through the beta subunit and mechanism of zymogen activation. *J. Biol. Chem.* **269**, 7682–7688 [PubMed](#)
- 31 Rosmann, S., Hahn, D., Lottaz, D., Kruse, M.N., Stocker, W. and Sterchi, E.E. (2002) Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J. Biol. Chem.* **277**, 40650–40658 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 32 Finberg, K.E., Heaney, M.M., Campagna, D.R., Aydinok, Y., Pearson, H.A., Hartman, K.R., Mayo, M.M., Samuel, S.M., Strouse, J.J., Markianos, K. et al. (2008) Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat. Genet.* **40**, 569–571 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 33 Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J. and Camaschella, C. (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hepcidin. *Cell Metab.* **8**, 502–511 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 34 Ramsay, A.J., Reid, J.C., Velasco, G., Quigley, J.P. and Hooper, J.D. (2008) The type II transmembrane serine protease matriptase-2—identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. *Front. Biosci.* **13**, 569–79 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 35 Folgueras, A.R., de Lara, F.M., Pendas, A.M., Garabaya, C., Rodriguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., Lopez-Otin, C. and Velasco, G. (2008) Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* **112**, 2539–2545 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 36 Du, X., She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, Y., Khovanan, K., Mudd, S., Mann, N., Moresco, E.M., Beutler, E. and Beutler, B. (2008) The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* **320**, 1088–1092 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 37 Norman, L.P., Jiang, W., Han, X., Saunders, T.L. and Bond, J.S. (2003) Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1221–1230 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 38 Finberg, K.E., Whittlesey, R.L., Fleming, M.D. and Andrews, N.C. (2010) Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood* **115**, 3817–3826 [CrossRef](#) [PubMed](#)

Received 20 November 2014/15 June 2015; accepted 15 June 2015  
 Published as BJ Immediate Publication 15 June 2015, doi:10.1042/BJ20141417

## 8. Danksagung

Von Herzen bedanke ich mich bei allen, die meine Arbeit unterstützt haben.

- Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. C. Becker-Pauly für die Möglichkeit spannende Projekte zu bearbeiten, die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Labors und die professionelle Betreuung. Ich bedanke mich für zahlreiche konstruktive Anmerkungen, große Freiheiten in der Ausgestaltung der Arbeit, für das Vertrauen auf einer internationalen Konferenz zu sprechen und aktiv an offiziellen Veranstaltungen teilzunehmen.
- Insbesondere bedanke ich mich bei allen Arbeitskollegen der AG Becker-Pauly:
  - Dr. rer. nat. J. Prox danke ich für kritische Kommentare, nützliche Verbesserungsvorschläge sowie Unterstützung in der *CLSM*-Immunfluoreszenz.
  - Bei Dr. rer. nat. P. Arnold bedanke ich mich für hilfreiche Anmerkungen und den Beitrag graphischer Strukturmodelle.
  - Dank gilt den naturwissenschaftlichen Doktoranden F. Schmidt und R. Wichert für ihre ausgezeichnete Unterstützung im Labor und ihre Revisionsbeiträge.
  - Bei Dr. rer. nat. C. Tredup bedanke ich mich für die initiale Einarbeitung.
  - I. Berg, M. Friedrichsen, F. Peters sowie W. Burmeister danke ich für die freundliche Unterstützung in der Laborarbeit.
- Dr. rer. nat. T. Koudelka und Prof. Dr. rer. nat. A. Tholey (Institut für Experimentelle Medizin, AG Systematische Proteomics und Bioanalytik, UKSH Campus Kiel) danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.
- Dank gilt Dr. rer. nat. M. Stirnberg und Prof. Dr. rer. nat. M. Gütschow (Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) für die Kooperation im Matriptase 2 Projekt.
- Bei Dr. rer. nat. A. Ohler (Institut für Pathobiochemie, Universität Mainz) bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Plasmides.



- Dr. rer. nat. S. Freitag-Wolf (Institut für Medizinische Informatik und Statistik, UKSH, Campus Kiel) danke ich für die freundliche Unterstützung.
- Dr. rer. nat. M. Pachta und D. Schmiedlein (Biochemisches Institut, Universität Kiel) danke ich für erhaltene Hilfe im IT- und technischen Bereich.
- Dank gilt Dr. rer. nat. A. Chalaris (Biochemisches Institut, Universität Kiel) für überraschende sowie inspirierende Denkanstöße.
- Prof. Dr. rer. nat. S. Rose-John (Koordinator SFB 877, Biochemisches Institut, Universität Kiel), Prof. Dr. A. Grötzinger (Biochemisches Institut, Universität Kiel), Prof. Dr. rer. nat. C. Reiß (Klinik für Dermatologie, UKSH, Campus Kiel), Dr. rer. nat. C. Desel (Koordinatorin IRTG, SFB 877) danke ich für die konstruktiven Anmerkungen im Dissertations-Komitee sowie in Seminaren.
- Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für das erhaltene Stipendium.
- Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und dem Kieler Ärzteverein danke ich für die finanzielle Unterstützung, mit der eine aktive Teilnahme auf der Konferenz in Italien ermöglicht wurde.
- Der Stiftung zur Förderung der Medizinischen Forschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für den Erhalt eines Förderpreises.
- Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Freunden. Auf ihre Unterstützung war immer Verlass.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Felix Jäckle  
Geburtsdatum: 17.07.1991  
Geburtsort: Nürnberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung:

Juni 2010 Abitur am Melanchthon-Gymnasium Nürnberg

Seit Herbst 2010 -  
November 2018 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juli 2013 -  
Oktober 2014 Forschungsarbeiten in Vollzeit im Labor von Prof. Dr. rer. nat. C. Becker-Pauly am Biochemischen Institut Kiel

Juli 2013 -  
Oktober 2014 Mitglied der *Integrated Research Training Group* des Sonderforschungsbereiches 877 der Deutschen Forschungsgesellschaft

November 2016 Antrag auf vorläufige Zulassung zur Promotion

November 2016 -  
Oktober 2017 Praktisches Jahr am UKSH Kiel sowie WKK Heide

November 2017 Approbation als Arzt

September 2018 Disputation

**Vorträge und Veröffentlichungen:**

- Januar und Mai 2014                      Vorträge vor dem Biochemischen Institut Kiel
- Juni 2014                                      Vortrag vor der *Integrated Research Training Group* des Sonderforschungsbereiches 877 der Deutschen Forschungsgesellschaft
- September 2014                              Vortrag auf dem Retreat des Biochemischen Instituts Kiels in Sehlendorf
- Februar 2015                                  Teilnahme auf der Konferenz „*Proteinases and Inhibitors*“ in Tiers (Italien) und Vortrag mit dem Titel „*Activity of membrane bound metalloprotease Mepri $\beta$  is regulated by Matriptase 2*“
- Juni 2015                                        Annahme der Veröffentlichung „*Metalloprotease mepri $\beta$  is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding*“ in der internationalen *peer-reviewed* Fachzeitschrift „*Biochemical Journal*“ (siehe Kapitel 7.1.3)

**Preise und Stipendien:**

- 2013 - 2014                                      Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Promotion am Biochemischen Institut Kiel im Sonderforschungsbereich 877
- Juli 2014                                        Förderpreis der Stiftung zur Förderung der Medizinischen Forschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 2015    Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für die aktive Teilnahme auf der Konferenz „*Proteinases and Inhibitors*“ in Tiers (Italien)
- 2015    Stipendium des Kieler Ärztevereins für die aktive Teilnahme auf der Konferenz „*Proteinases and Inhibitors*“ in Tiers (Italien)

Kiel, September 2018

