

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

**Interaktion der Metalloprotease Meprin β
mit dem Zelloberflächenprotein CD99
und den CD99-Varianten D92H und D92Y**

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

vorgelegt von
Tillmann Bedau
aus Krefeld

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly,
Biochemisches Institut
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Franziska Theilig,
Anatomisches Institut
Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2021
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 30.11.2020

gez.: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Akronyme	vii
1. Einleitung	1
1.1. Proteasen	1
1.2. Meprine	2
1.2.1. Identifizierung der Metalloproteasen Meprin α und Meprin β	2
1.2.2. Domänenstruktur	3
1.2.3. Aktivierung und Shedding	3
1.2.4. Spaltspezifität	5
1.2.5. Substrate und Funktionen	6
1.3. CD99	7
1.3.1. Aufbau	7
1.3.2. Expressionsprofil	7
1.3.3. Funktion	8
1.3.4. CD99 als Substrat von Meprin β	9
1.4. Transendotheliale Migration (TEM)	10
1.4.1. TEM von Leukozyten	10
1.4.2. TEM von Krebszellen	11
1.5. Ziele dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Verwendete Materialien	13
2.2. Molekularbiochemische Methoden	16
2.2.1. Klonierungs-PCR	16
2.2.2. Gezielte Mutagenese	17
2.2.3. Agarosegelelektrophorese	17
2.2.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	18
2.2.5. Transformation von <i>E. coli XL1 blue</i> durch Elektroporation	18
2.2.6. Plasmidpräparation aus transformierten <i>E. coli XL1 blue</i>	18
2.2.7. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	19
2.2.8. DNA-Sequenzierung	19
2.2.9. RNA-Isolierung und RT-PCR	19
2.3. Zellbiologische Methoden	19
2.3.1. Zellkultur	19
2.3.2. Transiente Transfektion von Zellen	21

2.3.3.	Behandlung von Zellen mit rekombinantem Meprin β	21
2.3.4.	Zellernte	21
2.3.5.	Immunfluoreszenz-Analysen	21
2.3.6.	Durchflusszytometrie	22
2.3.7.	Transmigrationsassay	23
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	24
2.4.1.	Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung	24
2.4.2.	Elektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-PAGE)	24
2.4.3.	Coomassie-Färbung	26
2.4.4.	Western Blot	26
2.4.5.	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	26
2.4.6.	Peptidspaltungsanalyse mittels Umkehrphasen-Chromatografie (RP-HPLC)	27
2.4.7.	Identifizierung von Peptidspaltstellen	28
2.4.8.	Identifizierung von Spaltstellen <i>in cellula</i>	28
2.5.	<i>In-vivo</i> -Versuche	28
2.5.1.	Tierhaltung	28
2.5.2.	Behandlung von Mäusen mit Actinonin	29
2.5.3.	<i>Air-pouch</i> -Mausmodell	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	CD99 als Substrat der Metalloprotease Meprin β	30
3.1.1.	Zellkulturexperimente zur Analyse der Spaltung von CD99	30
3.1.1.1.	Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle in der CD99-Ektodomäne	30
3.1.1.2.	Konservierung der Meprin-Spaltstellen	31
3.1.1.3.	Spaltung von CD99L2 durch Meprin β	31
3.1.1.4.	Kinetik der CD99-Prozessierung durch Meprin β an der Zelloberfläche	35
3.1.1.5.	Einfluss von Meprin β auf die transendotheliale Migration (TEM)	36
3.1.1.6.	Rolle von CD99 und Meprin β im Src-Signalweg	37
3.1.1.7.	Analyse der Spaltung von JAM-A und VE-Cadherin durch Meprin β	41
3.1.2.	<i>In-vivo</i> -Experimente	41
3.1.2.1.	CD99-Prozessierung in Inhibitor-behandelten Mäusen	41
3.1.2.2.	Meprin- β -Expression in Leukozyten und Endothelzellen	42
3.1.2.3.	Expressionsanalyse von Meprin β auf murinen Endothelzellen	45
3.1.2.4.	<i>Air-pouch</i> -Mausmodell als Simulation der akuten Entzündung	45
3.2.	Charakterisierung von zwei Krebs-assoziierten CD99-Varianten	50
3.2.1.	Identifizierung von zwei Krebs-assoziierten Mutationen im CD99-Gen	50
3.2.2.	<i>In-vitro</i> -Analyse der Spaltung der CD99-Varianten	50
3.2.2.1.	Peptidverdau durch rekombinantes Meprin β und Bestimmung der Spaltstelle	50
3.2.2.2.	Reaktionskinetik der Peptidspaltung durch rekombinantes Meprin β	51
3.2.3.	<i>In-cellula</i> -Analyse der Spaltung der CD99-Varianten	54
3.2.3.1.	Prozessierung durch Meprin β	54
3.2.3.2.	Bestimmung der Spaltstelle	54
3.2.3.3.	Prozessierung durch endogenes Meprin β in COLO-320-Zellen	55

3.2.3.4.	Analyse der subzellulären Lokalisation	58
3.2.3.5.	Zelloberflächenproteinbiotinylierung	58
3.2.3.6.	Kinetik der Spaltung durch rekombinantes Meprin β	59
3.2.3.7.	Analyse der Induktion von intrazellulären Stressmechanismen .	60
3.2.3.8.	Beeinflussung des Zellmigrationsverhaltens	62
4.	Diskussion	64
4.1.	Limitierte Proteolyse von CD99 durch Meprin β an konservierten Spaltstellen . .	64
4.2.	Interaktion von Meprin β und CD99 im Hinblick auf Entzündung	66
4.3.	CD99 und Meprin β im Src-Signalweg	70
4.4.	Krebs-assoziierte CD99-Varianten D92H und D92Y	71
5.	Zusammenfassung	75
	Literaturverzeichnis	77
A.	Anhang	89
A.1.	Massenspektrometrie-Daten	89
	Danksagung	92
	Curriculum vitae	93

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Klassifizierung der Proteasen und Einordnung der Astacine	2
1.2.	Domänenstruktur von Meprin α und Meprin β	4
1.3.	Aktivierung von humanem Meprin β	5
1.4.	Spaltspezifität von humanem Meprin β	6
1.5.	Schema des Transmembranproteins CD99	7
1.6.	Rolle von CD99 in der transendothelialen Migration (TEM) von Leukozyten	10
3.1.	Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle in CD99 Wildtyp (WT) in HeLa-Zellen	32
3.2.	Die Meprin-Spaltstellen befinden sich in konservierten Regionen der CD99-Ektodomäne	33
3.3.	Modell der CD99-Prozessierung an der Zelloberfläche	34
3.4.	Spaltung von CD99L2 durch Meprin β in HeLa-Zellen	35
3.5.	Spaltung von CD99 durch lösliches Meprin β an der Zelloberfläche	36
3.6.	Migration von LLC-Zellen durch einen bEnd.3-Monolayer in Abhängigkeit von löslichem Meprin β	38
3.7.	Einfluss von Meprin β und CD99 auf die Phosphorylierung von Src	39
3.7.	Einfluss von Meprin β und CD99 auf die Phosphorylierung von Src (fortgeführt) . . .	40
3.8.	Analyse der Spaltung von JAM-A und VE-Cadherin durch Meprin β	42
3.9.	CD99 akkumuliert in murinen Lungen nach Behandlung mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin	43
3.10.	Spezifische Detektion von Meprin β im murinen System mit dem Antikörper „hEcto1“	43
3.11.	Gating-Strategie für die Analyse von Leukozytenpopulationen murinen Blutes	44
3.12.	Analyse der Meprin- β - und CD99-Expression verschiedener Leukozytenpopulationen im Blut von WT-, <i>Mep1a</i> ^{-/-} -, <i>Mep1b</i> ^{-/-} - und <i>Mep1a</i> ^{-/-} ; <i>Mep1b</i> ^{-/-} -Mäusen	46
3.13.	Meprin β ist auf murinen Endothelzellen exprimiert und akkumuliert in den Lungen von Mäusen mit <i>Mep1b</i> ^{-/-} - und <i>Mep1a</i> ^{-/-} ; <i>Mep1b</i> ^{-/-} -Genotyp	47
3.14.	Versuchsdesign des <i>Air-pouch</i> -Mausmodells	48
3.15.	Verminderte Zellinvasion in <i>Mep1b</i> ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu <i>Mep1b</i> ^{+/+} -Mäusen im <i>air-pouch</i> -Mausmodell	49
3.16.	Zwei Krebs-assoziierte Mutationen im <i>CD99</i> -Gen führen zum Aminosäureaustausch an Position Asp92	51
3.17.	Peptidverdau von CD99 und der CD99-Varianten durch rekombinantes Meprin β <i>in vitro</i>	52
3.17.	Peptidverdau von CD99 und der CD99-Varianten durch rekombinantes Meprin β <i>in vitro</i> (fortgeführt)	53
3.18.	Probengewinnung zur Bestimmung der CD99-Peptidspaltstellen <i>in vitro</i>	53
3.19.	Spaltung von CD99 WT, D92H und D92Y durch Meprin β <i>in cellula</i>	55
3.20.	Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle der CD99-Varianten D92H und D92Y <i>in cellula</i>	56
3.21.	Spaltung der CD99-Varianten durch endogenes Meprin β in COLO-320-Zellen	57
3.22.	Kolokalisation der CD99-Varianten mit Meprin β	58
3.23.	Die Spaltung der CD99-Varianten durch Meprin β findet an der Zelloberfläche statt .	59

3.24. Spaltungskinetik der CD99-Varianten <i>in cellula</i>	60
3.25. Untersuchung der Induktion intrazellulärer Stressmechanismen durch die CD99-Varianten	61
3.25. Untersuchung der Induktion intrazellulärer Stressmechanismen durch die CD99- Varianten (fortgeführt)	62
3.26. Einfluss der CD99-Varianten auf die Zellmigration <i>in vitro</i>	63

Tabellenverzeichnis

1.1. Mit TAILS identifizierte Meprin-Spaltstellen in CD99	9
2.1. Verwendete Zelllinien	13
2.2. Verwendete Plasmide	14
2.3. Verwendete Primärantikörper (Western Blot und Immunfluoreszenz)	14
2.4. Verwendete Primärantikörper (FACS)	15
2.5. Verwendete Primer	15
2.6. Verwendete Inhibitoren	16
2.7. Verwendete Mausstämme	16
2.8. Reaktionsansätze für die gezielte Mutagenese	17
2.9. Verwendete Medien zur Plasmidvervielfältigung	18
2.10. Verwendete Zellkulturmaterialien	20
2.11. Verwendete Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Analysen	22
2.12. Verwendete Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie-Experimente	23
2.13. Verwendete Lysepuffer	24
2.14. Verwendete Puffer für die Herstellung von Polyacrylamidgelen	25
2.15. Verwendete Puffer für die SDS-PAGE	25
2.16. Verwendete Lösungen für Coomassie-Färbung	26
2.17. Verwendete Puffer für Western-Blot-Experimente	27
2.18. Verwendete Puffer und Lösungen für die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	27
A.1. Identifizierte Peptide für WT-Peptid	89
A.2. Identifizierte Peptide für D92H-Peptid	90
A.3. Identifizierte Peptide für D92Y-Peptid	91

Akronyme

ACN	Acetonitril	28
ADAM	Adamalysin bzw. <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>	2, 4, 5, 41, 66, 68
ALL	akute lymphoblastische Leukämie	7
APP	<i>amyloid precursor protein</i>	7, 12, 66
APS	Ammoniumperoxodisulfat	25
AS	Aminosäure	6, 7, 27, 89–91
AUC	<i>area under the curve</i>	53
BMP-1	<i>bone morphogenetic protein 1</i>	2, 3, 65
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	23, 26, 27
CD	<i>cluster of differentiation</i>	8, 44, 45
CD99L2	<i>CD99 antigen-like protein 2</i>	iv, 31, 35, 65
CDS	<i>coding DNA sequence</i>	54
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>	23
CI	<i>cell index</i>	63
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>	22
COSMIC	<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>	50, 51, 71
CTF	C-terminales Fragment	30–32, 34, 35, 54, 55, 57, 59, 61, 64–66, 72, 73
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	22
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	22
DEPC	Diethylpyrocarbonat	16
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	19–21, 23
DMSO	Dimethylsulfoxid	17, 20
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	20
DTT	Dithiothreitol	25
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	20, 29
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	3–5, 74

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessig-säure	24
ER	endoplasmatisches Retikulum	3, 5, 61, 62, 73
EZM	extrazelluläre Matrix	6, 11
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	23
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	19–22
FDR	<i>false discovery rate</i>	32
FL	<i>full-length</i>	28, 30–32, 35, 41, 50, 52, 53, 57–59, 73
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>	28, 50, 52, 53
i-CLiPs	<i>intramembrane cleaving proteases</i>	66
IL	Interleukin	66, 69
IP	Immunpräzipitation	32
IZD	intrazelluläre Domäne	31, 34, 66
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>	11, 14, 41, 42, 66, 67
KG	Körpergewicht	29, 43
KO	<i>Knockout</i>	8, 44, 49, 66, 69
LB	<i>lysogeny broth</i>	18, 19
LBRC	<i>lateral border recycling compartment</i>	11
LC-ESI	<i>liquid chromatography-electrospray ionization</i>	28, 32, 55
LLC	<i>Lewis lung carcinoma</i>	iv, 13, 23, 36–38, 67
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>	28, 51
MAM	<i>meprin, A5 protein, tyrosine phosphatase μ</i>	3, 4
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>	36, 40, 43, 46, 47, 49, 57, 60
MS	Massenspektrometrie	28, 30–32, 51, 55, 56, 65, 72
MS/MS	<i>tandem-mass-spectrometry</i>	28

NTF	N-terminales Fragment	31
PAR	pseudoautosomale Region	7, 51
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>	68
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	20–23, 26, 27, 29, 45
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	16, 17
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>	10, 11
PEI	Polyethylenimin	21, 37, 39
PFA	Paraformaldehyd	22
PICS	<i>proteomic identification of cleavage sites</i>	5
PILR	<i>paired immunoglobulin like type 2 receptor</i>	8, 72
PKA	Proteinkinase A	11, 14, 39
RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>	34, 66, 73
ROSA	<i>reverse orientation splice acceptor</i>	69
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>	28
RT	Raumtemperatur	17, 21, 26, 28
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	19
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	24, 25
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>	24–29, 32, 55, 56
TAE	TRIS-Acetat-EDTA	17
TAILS	<i>terminal amine isotopic labeling of substrates</i>	5–7, 9, 30, 31, 41, 64–66
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>	26, 27
TEM	transendotheliale Migration	8, 10–12, 36, 41, 42, 45, 65–69, 72
TEMED	Tetramethylethyldiamin	25
TFA	Trifluoressigsäure	28
TLL	<i>tolloid like protein</i>	2
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>	2
TOF	<i>time of flight</i>	28, 51
TRAF	<i>tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor</i>	3–5
UPR	<i>unfolded protein response</i>	61

VE *vascular endothelial*

11, 14, 41, 42

WT Wildtyp

iv, 14, 16, 17,
27, 32, 44, 49–51,
53–55, 57–63, 67,
69, 71–74, 89

1. Einleitung

1.1. Proteasen

Bis heute konnten mehr als 90 % der ca. 20 000 proteincodierenden Gene des humanen Genoms in Proteomanalysen auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (UHLÉN et al. 2015). Die funktionelle Vielfalt der Proteine ist immens und wird durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen noch vergrößert. Auch Enzyme sind Proteine – sie spielen als Biokatalysatoren eine zentrale Rolle in der Beschleunigung und Regulation biochemischer Reaktionen und steuern so die Antworten des Organismus auf seine Umgebung. Die Enzyme werden wiederum entsprechend ihrer Funktion in sechs Enzymklassen unterteilt. Eine dieser Klassen wird nach ihrem Katalysemechanismus als „Hydrolasen“ bezeichnet; und eine weitere Untergruppe der Hydrolasen stellen die „Peptidasen“ bzw. „Proteasen“ dar.

Proteasen katalysieren mit der Hydrolyse von Peptidbindungen eine irreversible posttranslationale Proteinmodifikation, die Proteolyse. Ungefähr 2 % des Genoms codieren für Proteasen (TURK 2006). Die Anzahl der vom humanen Organismus exprimierten Proteasen, gemeinsam mit deren Substratrepertoire auch „Degradom“ genannt, wird aktuell auf 589 beziffert (PÉREZ-SILVA et al. 2016; LÓPEZ-OTÍN 2015). Im Laufe der Evolution haben sich unterschiedliche Katalysemechanismen entwickelt, anhand welcher sich Proteasen weiter untergliedern lassen (Abb. 1.1). Die größte Proteasefamilie im humanen System ist die der Metalloproteasen mit 192 Familienmitgliedern.

Die Bezeichnung „Degradom“ stellt die *degradierende* Funktion von Proteasen in den Vordergrund, wie sie bei der Verdauung von mit der Nahrung aufgenommen Proteinen oder beim intrazellulären Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen in Lysosomen oder durch das Proteasom zu beobachten ist. Andererseits haben viele Proteasen *prozessierende* Funktion; durch diese limitierte Proteolyse können in diesen Fällen z. B. Signalkaskaden initiiert, Proteine maturiert oder Zymogene aktiviert werden. Beispiele für solche Aktivierungskaskaden sind das Blutgerinnungssystem, das Komplementsystem oder die Auslösung der Apoptose durch die Caspasen 8 und 9. Im Gegensatz zur Proteindegradierung ist hier die Proteolyse substratspezifisch und limitiert, d. h. strikt reguliert. Gerät diese Regulation außer Kontrolle – sei es durch hereditäre oder erworbene Defekte –, können durch übermäßige oder unzureichende proteolytische Aktivität pathophysiologische Mechanismen ausgelöst werden, die sich in Krankheitsbildern wie Krebs, Alzheimer-Demenz, Atherosklerose, Thrombose oder Infektionen manifestieren können (TURK 2006). Auch viele Transmembranproteine sind Substrate von Proteasen und werden durch limitierte Proteolyse prozessiert. So werden

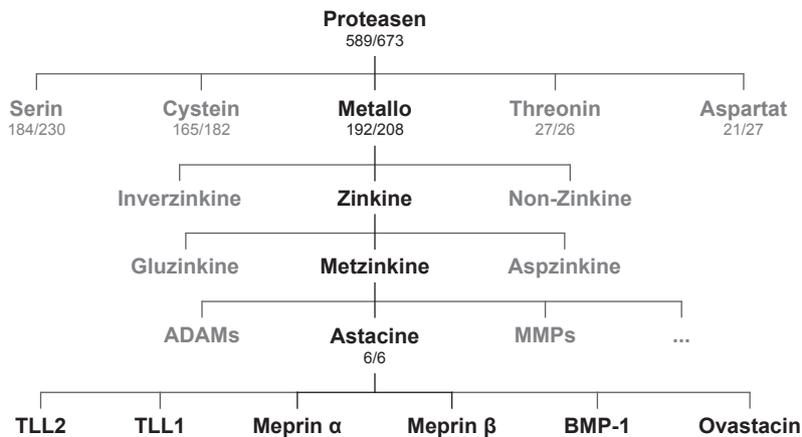


Abbildung 1.1.: Klassifizierung der Proteasen und Einordnung der Astacine. Klassifizierung der Proteasen anhand struktureller Gemeinsamkeiten (s. MEROPS-Datenbank (RAWLINGS et al. 2016)). Die sechs humanen Astacine Meprin α , Meprin β , *bone morphogenetic protein 1* (BMP-1), *Ovastacin*, *tolloid like protein* (TLL) 1 und TLL 2 sind Metalloproteasen und gehören zur Metzinkin-Superfamilie. Zahlen: Anzahl der experimentell nachgewiesenen Proteasen im humanen/murinen System (PÉREZ-SILVA et al. 2016). Mitglieder aller grau dargestellten Gruppen sind aus Übersichtsgründen nicht aufgeführt. Abbildung modifiziert und aktualisiert nach STERCHI et al. 2008.

latex

beispielsweise manche Rezeptorliganden in ihrer Vorläuferform als Transmembranprotein exprimiert und müssen anschließend auf einen Stimulus hin durch membranernahe Proteolyse von der Zelloberfläche losgelöst bzw. solubilisiert werden (z. B.: Adamalysin (ADAM)17 generiert löslichen *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) aus membranständigem TNF α , (Gooz 2010)). Dieser Vorgang wird auch als *ectodomain shedding* oder nur *Shedding* bezeichnet; die beteiligten Proteasen nennt man dementsprechend *Sheddasen*.

1.2. Meprine

1.2.1. Identifizierung der Metalloproteasen Meprin α und Meprin β

Meprine wurden zum ersten Mal in den frühen 1980er Jahren beschrieben. Zwei Arbeitsgruppen berichteten unabhängig voneinander über proteolytische Aktivität in Mäusenieren bzw. in der Dünndarmmukosa von Menschen und Ratten, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften keiner bekannten Protease zugeordnet werden konnte (BEYNON et al. 1981; STERCHI et al. 1982; STERCHI et al. 1983). Der Name „Meprin“ als Akronym für *metallo-endopeptidase from renal tissue* wurde für die neue Protease vorgeschlagen und setzte sich letztendlich durch (BOND et al. 1983). Es war auffällig, dass die Meprin-Aktivität in Nierenhomogenaten sehr unterschiedlich war, je nachdem welchem Mausstamm die analysierten Tiere angehörten; man führte diese Unterschiede auf das Vorkommen einer aktiven und einer inaktiven Meprin-Variante zurück (BOND et al. 1983; BEYNON und BOND 1983; BUTLER und BOND 1988). Wenig später wurde jedoch klar, dass die beiden Formen nicht Varianten ein und desselben Enzyms sind, sondern vielmehr zwei distinkte Proteasen:

Meprin α und Meprin β (MACADAM et al. 1990; KOUNNAS et al. 1991; GORBEA et al. 1991). Der Vergleich der Primärstruktur von murinem Meprin α und der Protease, die unabhängig in humanem Dünndarmepithel entdeckt wurde, zeigte, dass die beiden Proteine ortholog sind. Infolgedessen wurde Meprin zusammen mit anderen Metalloproteasen wie *bone morphogenetic protein 1* (BMP-1) aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in der katalytischen Domäne in einer neuen Proteasefamilie, den Astacinen, zusammengefasst, die eine Untergruppe der Metzinkine sind (Abb. 1.1) (DUMERMUTH et al. 1991). Die Aufklärung der genomischen Grundlage der murinen (JIANG et al. 1992; GORBEA et al. 1993) sowie der humanen (DUMERMUTH et al. 1993; ELDERING et al. 1997) Meprine zeigte, dass ihre Domänenstruktur sehr ähnlich ist und die Sequenzidentität 42 % (murin) bzw. 44 % (human) beträgt.

1.2.2. Domänenstruktur

Meprin α und Meprin β bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem Propeptid, vier extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen Region (Abb. 1.2A). Beide werden über den sekretorischen Weg zur Zellmembran transportiert. Meprin β wird dort als Typ-I-Transmembranprotein in die Zellmembran integriert (Abb. 1.2B); Meprin α besitzt eine zusätzliche Domäne, die sogenannte *inserted domain*, N-terminal von der Transmembranregion, innerhalb welcher Proteasen des endoplasmatischen Retikulums (ER) konstitutiv spalten, sodass Meprin α nicht membranständig vorliegt, sondern sezerniert wird (MARCHAND et al. 1995; ELDERING et al. 1997; TANG und BOND 1998). Die katalytische Domäne folgt C-terminal auf das Propeptid und beinhaltet das für die Astacine typische Sequenzmotiv HExxHxxGxxHxxxRxDR (x: beliebige Aminosäure; Einbuchstabencode der Aminosäuren nach IUPAC-IUB JCBN 1984) im aktiven Zentrum (Abb. 1.2C). Es folgen extrazellulär die *meprin*, *A5 protein*, *tyrosine phosphatase μ* (MAM)-, *tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor* (TRAF)- und *epidermal growth factor* (EGF)-like-Domäne (TANG und BOND 1998; STERCHI et al. 2008). Diese nichtkatalytischen Domänen sind an der Bildung von Quartärstrukturen der beiden Meprine beteiligt: in Abhängigkeit davon, welche Protease von einer Zelle exprimiert und welche Spezies untersucht wird, bilden sich durch Disulfidbrücken verbundene Homo- und Heterodimere sowie durch weitere nichtkovalente Interaktionen Oligomere aus (STERCHI et al. 2008). Im humanen System konnten bisher nachgewiesen werden: (1.) Meprin- β -Homodimere, verbunden durch nichtkovalente Interaktion der Protease- und MAM-Domäne sowie eine Disulfidbrücke zwischen den MAM-Domänen (Abb. 1.2B) (AROLAS et al. 2012); (2.) große extrazelluläre Meprin- α -Hoomooligomere (BECKER et al. 2003); (3.) Heterodimere aus Meprin α und Meprin β (PETERS et al. 2019).

1.2.3. Aktivierung und Shedding

Beide Meprine werden als inaktive Zymogene exprimiert. In der Kristallstruktur von Meprin β ist zu erkennen, dass das Propeptid das katalytische Zentrum verdeckt und so inhibitorisch wirkt

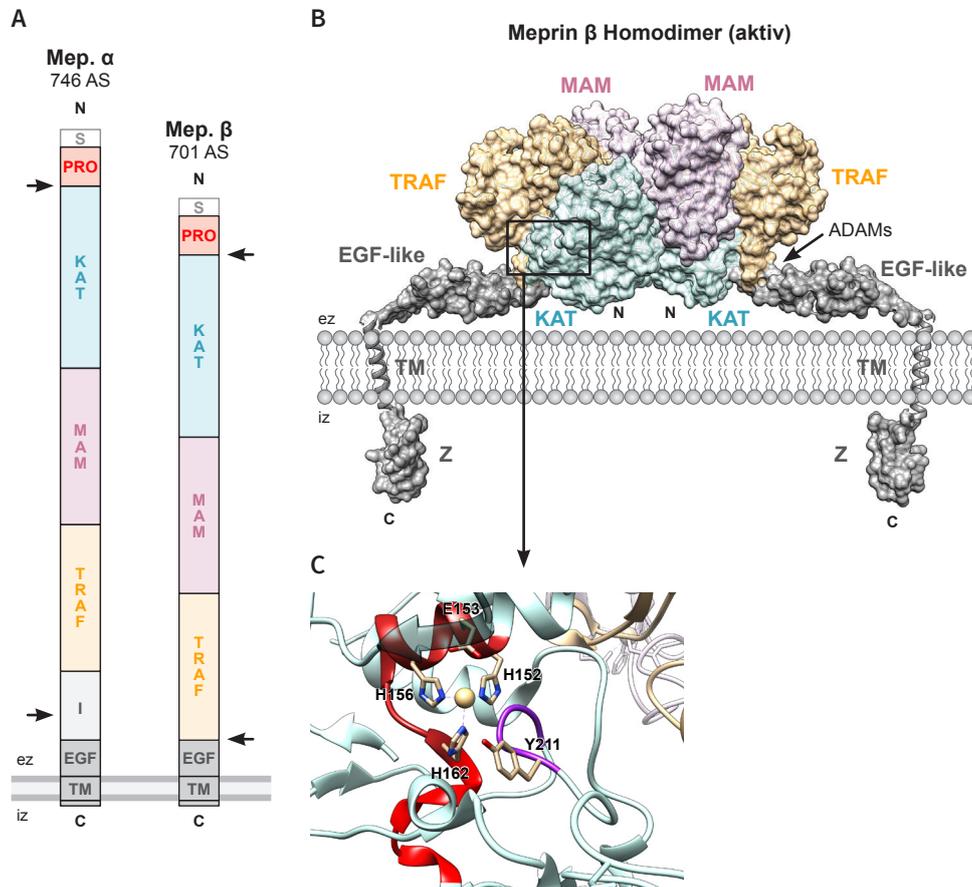


Abbildung 1.2.: Domänenstruktur von Meprin α und Meprin β . (A) Humanes Meprin α und Meprin β sind Typ-I-Transmembranproteine bestehend aus Signalpeptid (S), Propeptid (PRO), katalytischer Domäne (KAT), *meprin*, *A5 protein*, *tyrosine phosphatase μ* (MAM)-, *tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor* (TRAF)- und *epidermal growth factor* (EGF)-like-Domäne, Transmembranregion (TM) und einer kurzen zytoplasmatischen Region. In der zusätzlichen *inserted domain* (I) wird konstitutiv gespalten, sodass Meprin α sezerniert wird; Meprin β kann ebenfalls unter bestimmten Bedingungen membrannah gespalten und so sezerniert werden (Pfeile). Beide Proteasen müssen durch Abspaltung des Propeptids von Serinproteasen aktiviert werden (N-terminale Pfeile). ez: extrazellulär; iz: intrazellulär; C: C-Terminus; N: N-Terminus. (B) Modell von aktivem humanem Meprin β als membrangebundenes Homodimer basierend auf der Röntgenkristallstruktur der Ektodomäne (Protein Data Bank ID: 4GWN). Zur EGF-like-Domäne, der TM-Region und dem zellulären Teil (Z) gibt es keine Strukturdaten; sie wurden nachträglich *in silico* modelliert. Die Farben der Domänen gleichen denen aus Schema (A). Pfeil: Spaltstelle der Meprin-Sheddase Adamalysin (ADAM)10 und ADAM17 zwischen TRAF und EGF-like. (C) Aktives Zentrum in KAT als Vergrößerung aus (B). Das charakteristische Sequenzmotiv der Astacine (HExxHxxGxxHxxxRxDR) ist in rot dargestellt (His152-Arg169), der sog. Met-Turn in lila (Ser207-Tyr211). Das durch His152, His156 und His162 komplexierte Zn^{2+} -Ion (gelb) bindet ein Wassermolekül, das wiederum von Glu153 aktiviert wird und dann den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung des gebundenen Substrates nukleophil angreift und zur Hydrolyse führt.

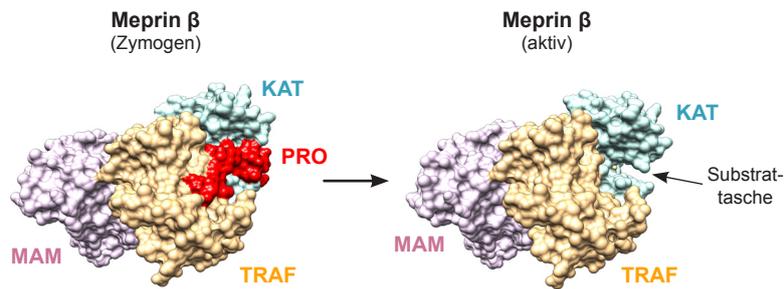


Abbildung 1.3.: Aktivierung von humanem Meprin β . Der Vergleich der Röntgenkristallstrukturen von humanem pro-Meprin β (PDB ID: 4GWM) und aktivem Meprin β verdeutlicht, dass erst durch Abspaltung des inhibitorischen Propeptids (PRO, rot) die Tasche um das katalytische Zentrum freigegeben wird, in der das Substrat binden kann. Aus Übersichtsgründen ist hier im Gegensatz zu Abb. 1.2B nicht das Homodimer, sondern jeweils das lösliche Monomer gezeigt.

(AROLAS et al. 2012). Erst durch die Abspaltung des Propeptids werden die Meprine katalytisch aktiv (Abb. 1.3). Diese Spaltung wird durch Serinproteasen wie Trypsin, Plasmin, Kallikreine oder Matriptase-2 katalysiert (GRÜNBERG et al. 1993; BECKER et al. 2003; OHLER et al. 2010; JÄCKLE et al. 2015); jedoch ist nicht jedes dieser Enzyme in der Lage, beide Proteasen zu aktivieren.

Ähnlich wie Meprin α kann auch Meprin β gesheddet werden. Es wird jedoch nicht wie Meprin α konstitutiv im ER gespalten und in sekretorische Vesikel sezerniert, sondern durch reguliertes Shedding erst im Golgi-Apparat oder an der Zelloberfläche losgelöst (PISCHITZIS et al. 1999). Die bisher identifizierten Meprin- β -Sheddasen sind Mitglieder der ADAMs, einer mit den Astacinen verwandten Metalloproteasefamilie: ADAM10 und ADAM17 (HAHN et al. 2003; HERZOG et al. 2014; JEFFERSON et al. 2013; SCHÜTTE et al. 2014; WICHERT et al. 2017; SCHARFENBERG et al. 2019). Die Spaltstelle befindet sich zwischen der EGF-like- und TRAF-Domäne, sodass nahezu die gesamte Ektodomäne durch das Shedding freigesetzt wird (Abb. 1.2A, B). Als lösliches Protein ist Meprin β weiterhin proteolytisch aktiv und kann Transmembranproteine sowie lösliche Substrate spalten. Shedding, Aktivierung und Inaktivierung der Meprine sind streng reguliert, um die proteolytische Aktivität räumlich und zeitlich begrenzt zu halten.

1.2.4. Spaltspezifität

Die Spaltspezifität einer Protease ist eine Eigenschaft, die ihr Substratrepertoire mitdefiniert. Meprine sind besonders in ihrer Spaltspezifität: es wurde beobachtet, dass viele Meprin-Substrate saure Aminosäuren, also Aspartat und Glutamat, in P1'-Position (Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER 1967) aufweisen (BERTENSHAW et al. 2001). Diese Beobachtung konnte mit zwei verschiedenen Methoden bestätigt werden: (1.) wurden Massenspektrometrie-basiert mittels *proteomic identification of cleavage sites* (PICS) (SCHILLING et al. 2011) und *terminal amine isotopic labeling of substrates* (TAILS) (KLEIFELD et al. 2010) die Spaltstellen und umliegenden Aminosäuresequenzen (P6 bis P6') mehrerer hundert humaner Peptid- und Proteinsubstrate identifiziert und statistisch

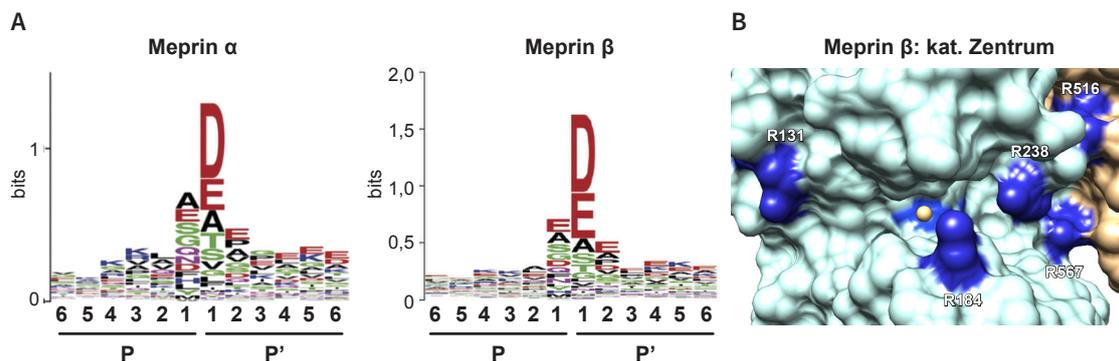


Abbildung 1.4.: Spaltspezifität von humanem Meprin β. (A) Relative Häufigkeit der präferierten Aminosäuren (AS) an den jeweiligen P- bzw. P'-Positionen nach der Nomenklatur von SCHECHTER und BERGER 1967. Die zugrundeliegenden Daten stammen aus einem *terminal amine isotopic labeling of substrates* (TAILS)-Experiment, repräsentieren massenspektrometrisch identifizierte Peptide von mehr als 450 nativen Proteinsubstraten für jede Protease und sind im *WebLogo*-Stil dargestellt (CROOKS et al. 2004): die Höhe der Buchstaben spiegelt ihre relative Häufigkeit wider. Saure AS sind in rot dargestellt, basische AS in blau, polare AS in grün und hydrophobe AS in schwarz. Beide Meprine bevorzugen bei nativen Proteinsubstraten saure Aminosäuren in P1'-Position. Abbildung übernommen aus BECKER-PAULY et al. 2011. (B) Das aktive Zentrum von Meprin β in der von GOMIS-RÜTH et al. 2012 vorgeschlagenen Standardorientierung für Metalloproteasen, d. h. passend zur Nomenklatur von SCHECHTER und BERGER 1967 befinden sich die S-Positionen links und die S'-Positionen rechts. Einige positiv geladene Arginine (dunkelblau) der Protease interagieren mit den sauren AS des Substrats und erklären so strukturell die Spaltspezifität von Meprin β. Das komplexierte Zn²⁺-Ion ist in gelb dargestellt. Abbildung modifiziert aus BRODER und BECKER-PAULY 2013.

ausgewertet (Abb. 1.4A) (BECKER-PAULY et al. 2011) und (2.) zeigte die Kristallstruktur von humanem Meprin β, dass das strukturelle Korrelat der beobachteten Spaltspezifität eine Interaktion der negativ geladenen Aminosäuren des Substrates mit positiv geladenen Argininen im aktiven Zentrum der Protease ist (Abb. 1.4B) (AROLAS et al. 2012).

1.2.5. Substrate und Funktionen

Neben der Expression in den Bürstensaumepithelien von Dünndarm und Niere konnten Meprine auch in Leukozyten (LOTTAZ et al. 1999; CRISMAN et al. 2004; SUN et al. 2009) und in der Haut (BECKER-PAULY et al. 2007; KRONENBERG et al. 2010) nachgewiesen werden. Außerdem wurden Dysregulationen der Meprin-Expression in Verbindung mit Krankheitsbildern wie pulmonaler Hypertonie (BIASIN et al. 2014), chronischer Entzündung, Nierenerkrankungen, Fibrose und Krebs (CARR et al. 2013; MAITRA et al. 2003; OUYANG et al. 2016; X. WANG et al. 2016; HERZOG et al. 2019; PETERS und BECKER-PAULY 2019; SCHÄFFLER et al. 2019) gebracht (BRODER und BECKER-PAULY 2013). Ein wichtiger Beitrag zur Entschlüsselung der biologischen Relevanz der Meprin-Expression *in vivo* ist die molekulare Untersuchung der zugrundeliegenden proteolytischen Prozesse. Wichtige Vorbedingung dafür ist die Kenntnis von Substraten. Lange waren lediglich Peptidsubstrate bekannt und die biologische Relevanz unklar (STERCHI et al. 2008). Völlig neue Perspektiven ergaben sich durch die Identifizierung von 151 humanen extrazellulären Proteinsubstraten für Meprin α und Meprin β mittels TAILS, darunter Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), andere Proteasen,

Wachstumsfaktoren, Inhibitoren etc. (JEFFERSON et al. 2013). So konnte aufgeklärt werden, dass Meprin-vermittelte Proteolyse eine Rolle beim Zusammenbau von Typ-I-Kollagenfibrillen durch Prokollagen-Spaltung spielt, außerdem bei der Prozessierung des *amyloid precursor protein* (APP) und bei der Ablösung des intestinalen Schleimteppichs durch MUC-2-Spaltung (BRODER et al. 2013; SCHÖNHERR et al. 2016; SCHÜTTE et al. 2014; WICHERT et al. 2017). Als weiteres Substrat wurde mit TAILS das Zelloberflächenprotein CD99 identifiziert.

1.3. CD99

1.3.1. Aufbau

CD99, oder auch „E2 antigen“ oder „MIC2“, ist ein stark O-glykosyliertes, ca. 32 kDa kleines Typ-I-Transmembranprotein. Das humane CD99-Gen befindet sich in der pseudoautosomalen Region (PAR) 1. Diese Region ist ein homologer Abschnitt am distalen Ende des kurzen Arms der Gonosomen, der die Paarung der ansonsten nicht-homologen X- und Y-Chromosomen ermöglicht und daher essenziell für die Meiose in männlichen Keimzellen ist. Es gibt im menschlichen Genom ca. 30 Gene, die in diesen PAR liegen und daher nicht gonosomal sondern (pseudo-)autosomal vererbt werden. Welche Rolle diese spezielle genomische Lokalisation für CD99 spielt, ist nicht bekannt. Das reife Protein besteht aus einer Ektodomäne, C-terminal gefolgt von einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen Region (Abb. 1.5). Die Proteinstruktur konnte bisher nicht gelöst werden. Es existiert eine Splice-Variante, CD99sh, die einen verkürzten intrazellulären Teil hat. Das murine CD99 ist kürzer als das humane und zu 45 % sequenzidentisch mit humanem CD99 (G. BIXEL et al. 2004).

1.3.2. Expressionsprofil

Unabhängig voneinander wurden in den 1970er und 1980er Jahren mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern folgende Antigene beschrieben: (1.) das „MIC2-Genprodukt“ als Antigen bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), (2.) das „E2-Antigen“ als T-Zell-Antigen und (3.) das

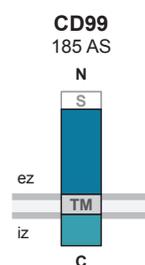


Abbildung 1.5.: Schema des Transmembranproteins CD99. Humanes CD99 ist ein 185 Aminosäuren (AS) langes Typ-I-Transmembranprotein, bestehend aus Signalpeptid (S, 22 AS), extrazellulärer Domäne (100 AS), Transmembrandomäne (TM, 25 AS) und intrazellulärem Teil (38 AS). ez: extrazellulär; iz: intrazellulär; C: C-Terminus; N: N-Terminus.

„HBA-71-Antigen“ als Ewing-Sarkom-Antigen (LEVY et al. 1979; BERNARD et al. 1988; HAMILTON et al. 1988). Es stellte sich heraus, dass es sich in allen drei Fällen um dasselbe Protein handelte; es wurde entsprechend der *cluster-of-differentiation* (CD)-Nomenklatur umbenannt in CD99. CD99 wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von heranreifenden und ausdifferenzierten Leukozyten sowie Endothelzellen an Interzellulärkontakten exprimiert (DWORZAK et al. 1994; SCHENKEL et al. 2002); weitere Expressionsorte sind die Sertoli-Zellen des Hodens, Granulosazellen der Ovarialfollikel, Inselzellen des Pankreas und Ependymzellen der inneren Liquorräume des zentralen Nervensystems (AMBROS et al. 1991).

1.3.3. Funktion

Aufgrund der Expression als Leukozyten-Oberflächenantigen fokussierte sich die CD99-Forschung auf immunologische Prozesse. Es wurde entdeckt, dass CD99 ein Schlüssel-molekül der Entzündungsantwort ist, indem es die transendotheliale Migration (TEM), oder: Diapedese, von Leukozyten kontrolliert (MULLER 2016). Dies konnte für Monozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sowohl *in vitro* (G. BIXEL et al. 2004; M. G. BIXEL et al. 2007; LOU et al. 2007; MANES und POBER 2011; SCHENKEL et al. 2002; WINGER et al. 2016) als auch *in vivo* im murinen Organismus (G. BIXEL et al. 2004; M. G. BIXEL et al. 2007; DUFOUR et al. 2009; SULLIVAN et al. 2016; WATSON et al. 2015; WINGER et al. 2016) gezeigt werden. In diesen Studien wurden blockierende Antikörper gegen CD99 verwendet, die die TEM um 60–80 % (*in vitro*) bzw. 40–70 % (*in vivo*) reduzierten. Bei der Verwendung humaner Zellen *in vitro* zeigte sich, dass CD99 sowohl auf Endothel- als auch auf Neutrophilenseite essentiell für die TEM ist (LOU et al. 2007). Erklärt wurde dieser Effekt durch eine homophile Interaktion endothel- und neutrophilenseitiger CD99-Moleküle (vgl. Abschn. 1.4.1). Im Gegensatz dazu wurde mit murinen Zellen *in vitro* gezeigt, dass CD99 nur auf Endothelzellseite essentiell für die TEM ist; eine homophile CD99-Interaktion schien in diesem Zusammenhang also irrelevant zu sein (M. G. BIXEL et al. 2007). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe einer CD99-*Knockout* (KO)-Mauslinie *in vivo* bestätigt werden (GOSWAMI et al. 2017). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die bekannten CD99-Interaktionspartner *paired immunoglobulin like type 2 receptor* (PILR)- α und - β (SHIRATORI et al. 2004; J. WANG et al. 2008) auf neutrophilen Granulozyten endotheliales CD99 binden können und dass diese heterophile Interaktion *in vitro* essentiell für die TEM im murinen System ist. Aufgrund dieser Rolle im Entzündungsprozess ist CD99 auch ein attraktives molekulares Ziel in der Entwicklung von Biopharmaka zur Therapie von entzündlichen Krankheiten im Menschen (MORICOLI et al. 2014; WINGER et al. 2016).

Neben dieser wichtigen immunologischen Funktion scheint CD99 auch pathologische Relevanz zu haben: die Dysregulation der CD99-Expression wurde mit mehreren Krebsarten in Verbindung gebracht. So gilt CD99 als spezifischer Tumormarker für das Ewing-Sarkom und wird routinemäßig in der histopathologischen Diagnostik dieses malignen Knochentumors des Jugendlichenalters ausgenutzt (FELLINGER et al. 1991; AMBROS et al. 1991). Auch hämatologische Neoplasien sind

Tabelle 1.1.: Mit TAILS identifizierte Meprin-Spaltstellen in CD99. Abbildung modifiziert aus JEFFERSON et al. 2013.

Zelllinie	Spaltstelle in CD99 (TAILS)
HaCaT	DADLA ₉₆ ↓ ^β ₉₇ DGVSG
U373	DADLA ₉₆ ↓ ^α ₉₇ D ₉₇ ↓ ^β ₉₈ GVSGGE
HEK	SFSDA ₉₃ ↓ ^β ₉₄ D ₉₄ ↓ ^α ₉₅ LADGV
Caco-2	SGSFS ₉₁ ↓ ^α ₉₂ DAD ₉₄ ↓ ^β ₉₅ LA ₉₆ ↓ ^β ₉₇ DGVSG

teilweise mit einer CD99-Überexpression assoziiert, weswegen eine anti-CD99-Therapie eine vielversprechende therapeutische Interventionsmöglichkeit darstellt (CHUNG et al. 2017; TAVAKKOLI et al. 2018). Andererseits ist die CD99-Expression in einigen Osteosarkom-Zelllinien im Vergleich zu gesunden Osteoblasten erniedrigt; in Zellkulturstudien wurde gezeigt, dass die Retransfektion von CD99 in diesen Zelllinien die Zellproliferation und -migration senkt und umgekehrt die Apoptoserate und Zelladhäsion steigert (MANARA et al. 2006). Außerdem bildeten Nacktmäuse, denen CD99-transfizierte Osteosarkom-Zellen xenotransplantiert wurden, weniger Tumoren und Metastasen als Kontrolltiere. Die für diesen zellulären Kontext propagierte Tumorsuppressorfunktion wurde teilweise auf eine CD99-vermittelte Reduzierung der Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src, Produkt des Protoonkogens *SRC*, zurückgeführt (SCOTLANDI et al. 2007).

1.3.4. CD99 als Substrat von Meprin β

In vier verschiedenen humanen Zelllinien (HaCaT, U373, HEK293, Caco-2) wurden in der CD99-Ektodomäne mit Hilfe von TAILS Spaltstellen für Meprin α und Meprin β identifiziert (JEFFERSON et al. 2013). Alle Spaltstellen befanden sich zwischen Ser91 und Gly98 (Dreibuchstabencode der Aminosäuren nach IUPAC-IUB JCBN 1984) und wiesen meist Aspartat in P1'-Position auf, was gut zur beschriebenen Meprin-Spaltspezifität passt (Tab. 1.1; vgl. Abb. 1.4).

Ein Verdau der rekombinanten CD99-Ektodomäne mit rekombinantem Meprin β und anschließendem Edman-Abbau zur Sequenzierung der Spaltprodukte validierte die Spaltung, jedoch an anderer Position, nämlich zwischen Gly56 und Asp57, also weiter N-terminal als die durch TAILS identifizierten Spaltstellen. Die Spaltung konnte weiterhin *in cellula* mittels Western-Blot-Analysen bestätigt werden und die Kollokalisierung von Protease und Substrat an der Zelloberfläche durch Immunfluoreszenz und Zelloberflächenproteinbiotinylierung nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, Dr. J. Prox, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel).

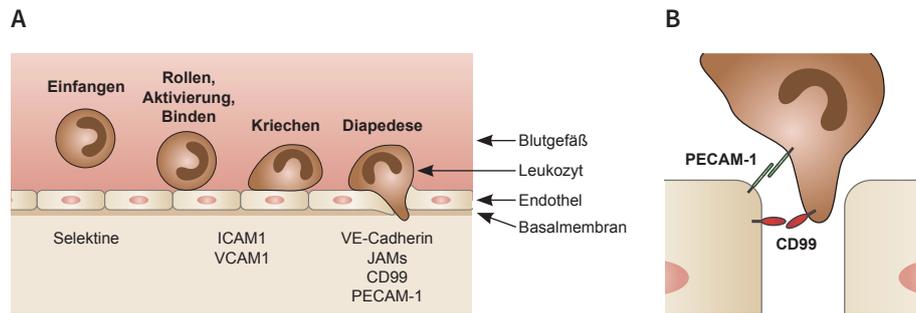


Abbildung 1.6.: Rolle von CD99 in der transendothelialen Migration (TEM) von Leukozyten. (A) Überblick über den Ablauf der Leukozytenextravasation. Ein inflammatorischer Stimulus sorgt dafür, dass in postkapillären Venolen vom Endothel Selektine exprimiert werden, die mit Liganden von Leukozyten interagieren, um diese aus dem Blutstrom abzufangen. Aufgrund von reversiblen Bindungen rollt der Leukozyt zunächst auf dem Endothel und wird langsamer bis er schließlich eine feste Bindung eingehen kann, um an geeigneter Stelle dann v. a. parazellulär durch die Endothelzellschicht nach extravasal zu migrieren. (B) Für die eigentliche TEM im humanen System ist die homophile Interaktion von *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) und CD99 auf Leukozyt und Endothel notwendig. Die CD99-Interaktion ist der PECAM-1-Interaktion nachgeschaltet. Beide Bindungen lösen intrazelluläre Signalwege aus, die dazu führen, dass sich die Fläche der seitlichen Endothelzellmembran vergrößern, wo Endothel und Leukozyt während der parazellulären TEM miteinander in Kontakt treten. Abbildungen modifiziert nach VESTWEBER 2015.

1.4. Transendotheliale Migration (TEM)

1.4.1. TEM von Leukozyten

Die Entzündung ist eine Abwehrreaktion des Körpers auf exogene oder endogene Noxen. Die makroskopischen Symptome der akuten Entzündung – *rubor, calor, tumor, dolor* und *functio laesa* – sind zurückzuführen auf zelluläre und molekulare Mechanismen, die darauf abzielen, die Integrität der betroffenen Körperregion wiederherzustellen. Lokal wird die Durchblutung durch Vasodilatation erhöht (*rubor, calor*) – so erreichen Entzündungsmediatoren und Leukozyten rasch den geschädigten Ort. Im Abschnitt der postkapillären Venolen wird die Endothelpermeabilität lokal gesteigert, sodass Flüssigkeit und Plasmaproteine das Gefäßsystem verlassen können (*tumor*). Für Leukozyten wird die Emigration in den Extravasalraum ermöglicht. Dazu exprimiert das durch Zytokine „aktivierte“ Endothel luminal Selektine und andere Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 und VCAM1, die Selektinliganden und Integrine auf Leukozytenseite binden und so zum „Rollen“ und letztendlich zur festen luminalen Adhäsion von Leukozyten auf dem Endothel führen (Abb. 1.6A) (LEY et al. 2007; VESTWEBER 2015). Der adhärente Leukozyt flacht ab, kriecht auf dem Endothel umher und sucht sich eine passende Emigrationsstelle, meist einen endothelialen Zell-Zell-Kontakt. Es folgt die TEM, oder Diapedese.

Im Gegensatz zu den frühen Schritten (Rollen, Adhäsion) ist die TEM irreversibel – ein Leukozyt, der einmal die Diapedese begonnen hat, kehrt nicht wieder um (MULLER 2016). Die TEM kann entweder para- oder transzellulär erfolgen, wobei die transzelluläre Migration bisher nur ansatzweise erforscht ist und auch die physiologisch viel weniger relevante zu sein scheint: es wird davon ausgegangen, dass nur 10–30 % der Leukozyten transzellulär das Blutgefäß verlassen (VESTWEBER 2015).

In beiden Fällen ist die TEM ein komplexer Prozess, in den mehrere Adhäsionsmoleküle involviert sind. Die beiden am besten charakterisierten Proteine sind *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) und CD99. Beide werden sowohl von Endothelzellen an Interzellulärkontakten als auch von Leukozyten exprimiert und müssen, zumindest im humanen System, mit ihrem jeweiligen Gegenstück Homodimere ausbilden, damit der Leukozyt transmigrieren kann (Abb. 1.6B) (MULLER 2011). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kann diese Interaktion mit blockierenden Antikörpern gegen PECAM-1 oder CD99 verhindert werden, was dazu führt, dass nur noch ein Bruchteil der Leukozyten das Endothel überwinden kann. Bei PECAM-1-Blockade verbleibt der Leukozyt auf der luminalen Seite des Endothels; bei CD99-Blockade stoppt die TEM, wenn der Leukozyt bereits zur Hälfte durch das Endothel migriert ist (SULLIVAN et al. 2016). Diese Beobachtung deutet auf einen sequenziellen Mechanismus hin, in dem die CD99-Interaktion einen späteren TEM-Schritt als PECAM-1 reguliert.

Erste zellbiologische und molekulare Mechanismen, die durch die Interaktion von PECAM-1 und CD99 ausgelöst werden, wurden in den letzten Jahren entdeckt: die PECAM-1-Interaktion führt zur Rekrutierung von zusätzlicher Zellmembran aus dem so genannten *lateral border recycling compartment* (LBRC) (SULLIVAN und MULLER 2014). Diese intrazellulären, vesikulären Membranreservoirs sind mit ähnlichen integralen Membranproteinen wie die laterale Endothelzellmembran ausgestattet (*junctional adhesion molecule* (JAM)-A, CD99; Ausnahme: das Verschlussmolekül *vascular endothelial* (VE)-Cadherin) und werden dort in die Zellmembran integriert, wo das Endothel Kontakt mit dem Leukozyten aufgenommen hat (Abb. 1.6B). Durch die anschließende homophile CD99-Interaktion wird (Proteinkinase A (PKA)) aktiviert (WATSON et al. 2015). Die PKA vermittelt dann die Rekrutierung eines zweiten Schubs aus dem LBRC. Die genaue Funktion der LBRC-Rekrutierung ist unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass die Vergrößerung der endothelialen Membranfläche mit TEM-assoziierten Proteinen die Passage des Leukozyten erleichtert. Wie genau die Proteininteraktionen wieder aufgehoben werden und der Leukozyt abluminal vom Endothel dissoziiert, ist unbekannt.

1.4.2. TEM von Krebszellen

Auch Krebszellen benutzen das Blut als Transportweg. Von Primärtumoren sondern sich einzelne Zellen ab, dringen in das Blutgefäßsystem ein (Intravasation) und verlassen es an geeigneter Stelle wieder (Extravasation), um eine Metastase zu bilden. Krebszellen stellen die entartete Form eines Zelltyps, z. B. Epithel, dar, der in der Regel nicht auf Migration und Invasion spezialisiert ist. Aus diesem Grund ist die Metastasierung ein so ineffizienter Prozess: weniger als 0,01 % der Krebszellen, die den Primärtumor verlassen, formen Metastasen (CHIANG und MASSAGUÉ 2008). Man geht davon aus, dass die Intravasation noch verhältnismäßig einfach zu bewerkstelligen ist, weil Krebszellen mit Hilfe von Proteasen EZM- und Basalmembran-Komponenten degradieren können und weil die kleinen Gefäße im Tumorgewebe häufig ungeordnet und leck sind und

nur schwache Zell-Zell-Kontakte ausbilden (MADSEN und SAHAI 2010). Schwieriger haben es die Zellen in den darauffolgenden Schritten. So überleben einige Zellen nicht einmal die im Blutgefäß herrschenden Scherkräfte, weil ihr Zytoskelett solchen mechanischen Beanspruchungen nicht gewachsen ist. Auch die Extravasation ist kein wohldefinierter Ablauf aus spezifischer Adhäsion und TEM wie bei Leukozyten. Häufig ist es allein ihre Zellgröße, die dafür sorgt, dass Krebszellen in kleinsten Kapillaren langsamer werden, dann „steckenbleiben“ und dann wenig spezifisch an das Endothel adhären (REYMOND et al. 2013). Die anschließende TEM kann auch in diesem Fall para- oder transzellulär erfolgen, jedoch wurden die genauen molekularen Mechanismen bisher nicht so genau definiert wie bei der TEM von Leukozyten. Die Heterogenität der Tumorzellen mit unterschiedlichsten Expressionsprofilen erschwert es, die Extravasation mit einem einheitlichen Modell zu beschreiben. Ob CD99 auch in der TEM von Tumorzellen eine Rolle spielt, wurde bisher nicht erforscht.

1.5. Ziele dieser Arbeit

Die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von 151 neuen Meprin-Substraten hat den Weg bereitet, die physiologische Funktion der Meprine besser zu verstehen. Neben APP, MUC-2 und Prokollagen 1 stellt auch CD99 ein interessantes Substrat dar, weil seine Funktion im Entzündungsprozess und bei Krebserkrankungen bereits in Grundzügen charakterisiert ist und Meprine von Leukozyten exprimiert werden, an Entzündungsprozessen beteiligt sind und auch in verschiedenen humanen Krebsarten dysreguliert sind.

CD99 wurde bereits ansatzweise *in vitro* und *in cellula* als Meprin-Substrat validiert. Ziel dieser Arbeit war es, diese Interaktion von Protease und Substrat *in vitro*, *in cellula* und *in vivo* weiter zu charakterisieren und die Rolle von Meprinen im Src-Signalweg sowie in der TEM aufzuklären. Außerdem sollte die Auswirkung von zwei CD99-Punktmutationen, die in humanen Lungentumoren identifiziert wurden, auf die Meprin-vermittelte Proteolyse von CD99 *in vitro* und *in cellula* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche (Mannheim) oder Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen.

Zelllinien

Tabelle 2.1.: Verwendete Zelllinien. Alle Zellen wurden über die DSMZ (Braunschweig) oder über das DKFZ (Heidelberg) bezogen.

Name	Spezies	Zelltyp
bEnd.3	Maus	Endothelium
COLO 320	Mensch	kolorektales Karzinom
COS-7	Grüne Meerkatze	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen
HeLa	Mensch	Zervixkarzinom-Epithelzellen
HEK 293	Mensch	embryonale Nierenzellen
LLC	Maus	<i>Lewis lung carcinoma</i>
N2a	Maus	Neuroblastom
NIH/3T3	Maus	Fibroblasten
U2-OS	Mensch	Osteosarkom

Plasmide

Tabelle 2.2.: Verwendete Plasmide.

Gen	tag	Variante	Vektor
<i>CD99</i>	myc/FLAG	WT	pCMV6
<i>CD99</i>	myc/FLAG	p.D92H	pCMV6
<i>CD99</i>	myc/FLAG	p.D92Y	pCMV6
<i>CD99</i>	myc/FLAG	CD99sh	pcDNA3.1(+)
<i>CD99L2</i>	myc/FLAG	WT	pCMV6
<i>MEP1B</i>	—	WT	pcDNA3.1(-)
<i>Mep1b</i>	—	WT	pcDNA3.1
<i>F11R (JAM-A)</i>	—	WT	pCMV6
Leervektor	myc/His	—	pcDNA3.1(-)

Antikörper

Tabelle 2.3.: Verwendete Primärantikörper (Western Blot und Immunfluoreszenz).

Spezifität	Klon	Spezies	Bezugsquelle	Produktnummer	Anwendung
Actin	polykl.	Kaninchen	Sigma-Aldrich	A2066	1:2500
FLAG	M2	Maus	Sigma-Aldrich	F1804	1:5000
GAPDH	14C10	Kaninchen	Cell Signaling	2118	1:5000
Grp78	C50B12	Kaninchen	Cell Signaling	3177	1:2500
Grp94	polykl.	Kaninchen	Cell Signaling	2104	1:1000
hCD99	12E7	Maus	Santa Cruz	53148	1:500
JAM-A	polykl.	Kaninchen	abcam	180821	1:2000
mCD99	polykl.	Ziege	R&D Systems	AF3905	1:2500
Meprin β (hEcto1)	polykl.	Kaninchen	Pineda	—	1:1000
Meprin β (Tier 2)	polykl.	Kaninchen	Pineda	—	1:2000
myc-tag	9B11	Maus	Cell Signaling	2276	1:2500
p-EIF2 α (Ser51)	D9G8	Kaninchen	Cell Signaling	3398	1:1000
p-PKA (Thr197)	polykl.	Kaninchen	Cell Signaling	4781	1:1000
p-Src (Tyr419)	polykl.	Kaninchen	Cell Signaling	2101	1:1000
PKA	polykl.	Kaninchen	Cell Signaling	4782	1:1000
polyubiquitinierte Konjugate	FK1	Maus	Enzo	BML-PW8805	1:1000
Src	polykl.	Kaninchen	Cell Signaling	2108	1:1000
Transferrin-Rezeptor	polykl.	Kaninchen	abcam	84036	1:1000
VE-Cadherin	polykl.	Ziege	R&D Systems	AF1002	1:1000

Tabelle 2.4.: Verwendete Primärantikörper (FACS).

Spezifität	Fluorophor	Klon	Spezies	Bezugsquelle	Produktnummer
hCD99	PE	HCD99	Maus	BioLegend	318008
IgG Isotyp	PE	poly	Ziege	R&D Systems	IC108P
IgG2a Isotyp	PE	MOPC-173	Maus	BioLegend	400213
mCD115	BV421	9-4D2-1E4	Ratte	BioLegend	347321
mCD11b	FITC	M1/70	Ratte	BioLegend	101207
mCD3ε	APC	145-2C11	Hamster	BioLegend	100311
mCD4	APC-Cy7	RM4-5	Ratte	BioLegend	100525
mCD45	BV510	30-F11	Ratte	BioLegend	103137
mCD8a	BV421	53-6.7	Ratte	BioLegend	100737
mCD99	PE	polykl.	Ziege	R&D Systems	FAB3905P
Meprin β (hEcto1)	—	polykl.	Kaninchen	Pineda	—
Meprin β (Tier2)	—	polykl.	Kaninchen	Pineda	—
mLy6C	APC-Cy7	HK1.4	Ratte	BioLegend	128025
mLy6G	PE-Cy7	1A8	Ratte	BioLegend	127617

Primer

Tabelle 2.5.: Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>CD99</i> (p.D92H) forward	CTA GTT CCT CCG GTA GCT TTT CAC ATG CTG ACC TTG CGG ATG GC
<i>CD99</i> (p.D92H) reverse	GCC ATC CGC AAG GTC AGC ATG TGA AAA GCT ACC GGA GGA ACT AG
<i>CD99</i> (p.D92Y) forward	CTA GTT CCT CCG GTA GCT TTT CAT ATG CTG ACC TTG CGG ATG GC
<i>CD99</i> (p.D92Y) reverse	GCC ATC CGC AAG GTC AGC ATA TGA AAA GCT ACC GGA GGA ACT AG
<i>CD99</i> (CD99sh) forward	GAT CAA GCT TGC CAT GGC CCG CGG GGC TGC
<i>CD99</i> (CD99sh) reverse 1	CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT CTG CTC GAG CGG CCG CGT ACG CGT GCC ATC ATT TTC TTT GAA GCA TAG CTT C
<i>CD99</i> (CD99sh) reverse 2	GAT CGG ATC CTT AAA CCT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT CCA GGA TAT CAT TTG CTG CCA GAT CCT CTT CTG AGA TGA G
<i>XBPI</i> forward	TTA CGA GAG AAA ACT CAT GGC C
<i>XBPI</i> reverse	GGG TCC AAG TTG TCC AGA ATG C

Rekombinante Proteine

Es wurde rekombinantes humanes Meprin β verwendet, das wie in BECKER et al. 2003 beschrieben mit Hilfe des Bac-to-Bac[®]-Expressionssystems (Thermo Fisher Scientific) produziert wurde. Zusammenfassend wurde zunächst die Meprin-β-cDNA in den pFastBac[™]-Vektor kloniert. Anschließend wurde der *E. coli*-Stamm DH10Bac[™] mit diesem Plasmid transformiert und durch Transposition zwischen dem Plasmid und einem Baculovirus-Shuttle-Vektor ein sog. Bacmid erzeugt. Mit dieser rekombinanten Bacmid-DNA wurden Insektenzellen transfiziert, die dann das gewünschte Protein

exprimierten. Anschließend wurde Meprin β mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Inhibitoren

Tabelle 2.6.: Verwendete Inhibitoren.

Name	Ziel	Referenz
Actinonin	Meprine	ARNOLD et al. 2017
DAPT	γ -Sekretase	DOVEY et al. 2001
MG132	26S-Proteasom	LEE und GOLDBERG 1998

Mausstämme

Tabelle 2.7.: Verwendete Mausstämme.

Genotyp	Linie	Referenz
WT	C57BL/6	—
<i>Mep1a</i> ^{-/-}	C57BL/6	BANERJEE et al. 2009
<i>Mep1b</i> ^{-/-}	C57BL/6	NORMAN et al. 2003
<i>Mep1a</i> ^{-/-} ; <i>Mep1b</i> ^{-/-}	C57BL/6	BANERJEE et al. 2011

2.2. Molekularbiochemische Methoden

Für sämtliche molekularbiologischen Reaktionsansätze wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet.

2.2.1. Klonierungs-PCR

Für die Herstellung eines Plasmids zur Expression der CD99-Isoform CD99sh wurde zuerst in zwei *polymerase chain reaction* (PCR)-Schritten aus dem CD99-pCMV6-Plasmid die relevante Sequenz herauskloniert und mit den *reverse*-Primern (Tab. 2.5) um einen myc/FLAG-*tag* und Restriktionsschnittstellen ergänzt. Dazu wurde die DreamTaq-DNA-Polymerase nach Herstellerangaben benutzt (#EP0701; Thermo Fisher Scientific). Sowohl die neu entstandene *insert*-DNA als auch ein leerer pcDNA3.1(+)-Vektor wurden dann mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI (#ER0051) und HindIII (#ER0501; beide Thermo Fisher Scientific) verdaut. Auch hierbei wurde nach Herstellerangaben und Ergebnissen des *DoubleDigest Calculator* (Thermo Fisher Scientific) vorgegangen. Die abschließende Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (#EL0014, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben.

Tabelle 2.8.: Reaktionsansätze für die gezielte Mutagenese.

Schritt	Reagenzien	Ablauf
Primer-Phosphorylierung	2 µl Primer	37 °C für 30 min
	2 µl 10X T4-Ligase-Puffer 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase 15 µl H ₂ O	75 °C für 10 min
PCR	30 µl H ₂ O	98 °C für 60 s
	10 µl 5X HF-Puffer	25x PCR-Zyklus:
	5 µl dNTPs 2 mM	98 °C für 30 s
	1 µl Primer <i>forward</i> (phosphoryliert)	56 °C für 10 s
	1 µl Primer <i>reverse</i> (phosphoryliert)	72 °C für 500 s
	1 µl DNA (50 ng)	72 °C für 1000 s
	1,5 µl DMSO 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase	
DpnI-Verdau	1 µl DpnI	37 °C für 3 h
Ligation	44 µl DNA aus Gelextraktion	RT für 2 h
	5 µl 10X T4-Ligase-Puffer	
	1 µl T4-Ligase	

2.2.2. Gezielte Mutagenese

Ausgehend von CD99 Wildtyp (WT), das als Plasmid mit *myc/FLAG-tag* in einem pCMV6-Vektor vorlag, wurden die beiden Varianten c. 274G>C (p.D92H) und c. 274G>T (p.D92Y) hergestellt. Dafür wurden die in Tab. 2.5 aufgelisteten Primer und die in Tab. 2.8 angegebenen Reaktionsansätze verwendet. Die Primer wurden zuerst phosphoryliert. Für den folgenden PCR-Schritt wurde die Phusion-DNA-Polymerase (#F530S; Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die methylierte Template-DNA wurde anschließend mit DpnI (#ER1701, Thermo Fisher Scientific) verdaut. Es erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Die amplifizierte DNA wurde aus dem entsprechenden Gelbereich wieder extrahiert. Zuletzt erfolgte die Ligation der linearen DNA mittels T4-DNA-Ligase (#EL0014, Thermo Fisher Scientific). Die so hergestellten mutierten Plasmide wurden vervielfältigt und sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurden DNA-Proben mit 6X-DNA-Probenpuffer versetzt (#R0611, Thermo Fisher Scientific) und parallel mit einem Größenstandard (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, #SM0312; Thermo Fisher Scientific) auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Das Gel wurde mit TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer bedeckt und es wurde für ca. 45 min eine Spannung von 110 V angelegt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe eines UV-Transilluminators ausgelesen und digitalisiert.

Tabelle 2.9.: Verwendete Medien zur Plasmidvervielfältigung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin

2.2.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Relevante DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Aus diesen Gelstücken wurde die DNA mit Hilfe eines Extraktionskits (*GeneJET Gel Extraction Kit*, #K0691; Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

2.2.5. Transformation von *E. coli XL1 blue* durch Elektroporation

Zur Plasmidvervielfältigung wurden elektrokompente *E. coli XL1 blue* verwendet. Die Herstellung der elektrokompenten Bakterien ist in (PROX 2012) beschrieben. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl der Bakteriensuspension wurden in sterile, gekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. Es wurde 1 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid (20 ng/µl) dazugegeben und die Transformation bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω an einem Elektroporator (*Gene Pulser*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Anschließend wurde ca. 200 µl *lysogeny broth* (LB)-Medium in die Elektroporationsküvette gegeben, die Bakterien resuspendiert, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Dann wurden die Bakterien auf einer LB-Platte mit passendem Selektionsantibiotikum (vgl. Tab. 2.9) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.6. Plasmidpräparation aus transformierten *E. coli XL1 blue*

Mini-Präparation

Eine Kolonie transformierter Bakterien wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von einer LB-Platte aufgenommen und in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe eines Isolationskits (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, #K0502; Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA photometrisch bestimmt.

Midi-Präparation

Für eine Plasmidvervielfältigung im größeren Maßstab wurde eine Kultur in 150 ml LB-Medium angelegt. Die Plasmidpräparation erfolgte auch hier mit einem Isolationskit (*NucleoBond® Xtra Midi*; MACHEREY-NAGEL, Düren) nach Herstellerangaben.

2.2.7. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen wurde ein Spektrophotometer benutzt (*NanoDrop 1000*, VWR). Durch Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Konzentration und durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit bestimmt.

2.2.8. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl DNA in einer Konzentration von 100 ng/µl in einem Mikroreaktionsgefäß eingesandt.

2.2.9. RNA-Isolierung und RT-PCR

Aus HeLa-Zellen wurde RNA mit dem *NucleoSpin® RNA isolation kit* (MACHEREY-NAGEL) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Im nächsten Schritt wurde eine *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) durchgeführt. Dazu wurde das *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* (#K1691; Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Relevante DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe der DreamTaq-DNA-Polymerase (#EP0701; Thermo Fisher Scientific) und entsprechenden Primern (Tab. 2.5) nach Herstellerangaben amplifiziert und auf einem Agarosegel (2,5 %) aufgetrennt und visualisiert.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Zellkultur

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank innerhalb eines S1-Labors durchgeführt. Alle benötigten Materialien, Geräte und Reagenzien wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert bzw. desinfiziert.

Sofern nicht anders angegeben, wurden Monolayerkulturen in 10-cm-Zellkulturschalen in 10 ml Vollmedium (bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % inaktiviertem *fetal bovine serum* (FBS) und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin) in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Partialdruck von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Tabelle 2.10.: Verwendete Zellkulturmaterialien.

Anwendung	Produkt
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco® DMEM 1X, <i>high glucose</i> + GlutaMAX™ + Pyruvat
Steriles <i>phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Gibco® DPBS 1X (ohne CaCl ₂ und MgCl ₂)
<i>Fetal bovine serum</i> (FBS)	Gibco® <i>Heat Inactivated FBS</i>
Antibiotikum	Gibco® Pen Strep
Trypsin-EDTA	Gibco® 0,5 % Trypsin-EDTA 10X

Die Zellvitalität und -morphologie wurde an einem Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung kontrolliert und das Zellkulturmedium routinemäßig alle 2–3 d erneuert. Sobald der Monolayer zu etwa 80–90 % konfluent war, wurden die Zellen subkultiviert, um die bevorstehende Kontakthemmung zu vermeiden und die Zellen im Stadium der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, mehrfach mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen, 2 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf die Zellen gegeben und dann 5–10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und für 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, um das Trypsin wieder zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in gewünschter Verdünnung auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt, in denen bereits Medium in entsprechender Menge vorgelegt worden war. Weniger stark adhärenzte Zelllinien wie HEK 293 konnten durch Resuspendieren in frischem Medium von der Zellkulturschale gelöst werden, sodass eine proteolytische Ablösung mittels Trypsin nicht nötig war.

Um Zellen über einen langen Zeitraum lagern zu können, wurden sie bei –150 °C eingefroren. Dazu wurde der Monolayer kurz vor Erreichen der Konfluenz wie bei der Subkultivierung mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (bestehend aus Vollmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Frostschutzmittel) aufgenommen und auf zwei 1,8-ml-Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese wurden in einem Einfriercontainer, der eine Abkühlrate von 1 °C/min gewährleistet, bei –80 °C eingefroren und nach 24 h wurde die Lagerung bei –150 °C fortgeführt, um sämtliche biochemischen Reaktionen zu unterbinden.

Das Auftauen von Zellen in Kryoröhrchen geschah zügig im warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in 9 ml Vollmedium aufgenommen und für 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 10 ml frischem Vollmedium aufgenommen und zur weiteren Kultivierung auf Zellkulturschalen ausgesät.

2.3.2. Transiente Transfektion von Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurden Zellen bei 50–70 % Konfluenz mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Ein Transfektionsansatz wurde hergestellt aus DMEM und 4 µg Plasmid-DNA pro 10-cm-Zellkulturschale. PEI wurde zugegeben im Verhältnis 3:1 (v:w) zur Plasmid-DNA. Dieser Ansatz wurde invertiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde abgenommen, 3 ml frisches Vollmedium vorgelegt und dann 200 µl des Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Schale verteilt. Die Zellen wurden für 4–6 h bei 37 °C inkubiert, dann wurde das Transfektionsmedium abgenommen, 10 ml frisches Vollmedium zugegeben und für weitere 36–48 h bei 37 °C inkubiert.

Für Knockdown-Experimente wurde ein Transfektionsansatz aus 500 µl DMEM, 30 µl *INTERFERin* (Polyplus-transfection, Illkirch, Frankreich) und 5 nM siRNA pro 10-cm-Zellkulturschale verwendet. Dabei wurden folgende siRNAs verwendet: *Silencer Select CD99 siRNA* (#4392420 s8770) und *Silencer Select Negative Control siRNA* (#4390843, Thermo Fisher Scientific). U2-OS-Zellen wurden zwei Mal mit diesem Ansatz transfiziert.

2.3.3. Behandlung von Zellen mit rekombinantem Meprin β

Für Behandlungen von Zellen mit rekombinantem humanem Meprin β wurden die Zellen vor der Zellernte mit PBS gewaschen, um FBS-haltiges Medium zu entfernen. Es wurde DMEM zu den Zellen gegeben sowie Meprin β in der gewünschten Konzentration. Anschließend wurden die Zellen für die gewünschte Zeit bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Für Versuche mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin wurde Meprin β mit Actinonin vor der Applikation in DMEM für 15 min bei Raumtemperatur (RT) präinkubiert.

2.3.4. Zellernte

Zellen aus konfluent bewachsenen Zellkulturschalen wurden zur Ernte vorbereitet, indem sie mehrfach mit PBS gewaschen wurden. Schließlich wurde 1 ml PBS auf die Zellen gegeben und diese dann bei 4 °C für 5 min abgekühlt. Mit einem sterilen Zellschaber wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, dann in der PBS-Lösung resuspendiert und anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.3.5. Immunfluoreszenz-Analysen

Die direkte Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit als Methode zur Analyse der zellulären Lokalisation von Proteinen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper herangezogen.

Zellen wurden in *Six-Well*-Platten auf Deckgläschen ausgesät. Zur Transfektion wurde ein Transfektionsansatz aus DMEM, 1 µg DNA pro *Well* und dem Transfektionsreagenz *X-tremeGENE HP DNA* (Roche) hergestellt. Von diesem Ansatz wurden 100 µl tropfenweise auf jedes *Well* gegeben,

Tabelle 2.11.: Verwendete Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Analysen.

Schritt	Bezeichnung	Zusammensetzung
1. Fixieren	Fixierlösung	steriles PBS 4 % Paraformaldehyd (PFA)
2. Blockieren	Blockierungslösung	steriles PBS 0,12 % Glycin
3. Färben	Antikörperlösung	steriles PBS 10 % (v/v) FBS 0,2 % Saponin Primär-/Sekundärantikörper in jeweiliger Konzentration
4. Waschen	Waschpuffer	steriles PBS 0,2 % Saponin
5. Einbetten	Einbettungslösung	1 ml Mowiol 100 µl 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) 1 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung
	DAPI-Lösung	ddH ₂ O 1 mg/ml DAPI

in denen jeweils 1 ml Vollmedium vorgelegt war. Nach 4–6 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 3 ml frischem Vollmedium und die Zellen wurden für 36–48 h bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden dann mehrfach mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert (Tab. 2.11). Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und mit Glycin-haltiger Blockierungs- bzw. Permeabilisierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur blockiert, um übrig gebliebene Aldehydgruppen des Paraformaldehyd (PFA) abzusättigen. Es wurden 60 µl Primärantikörperlösung in einer dunklen Feuchtkammer als Tropfen vorgelegt und die Deckgläschen mit den fixierten Zellen vorsichtig in diese Tropfen hineingelegt und für 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen und dann in einen weiteren Tropfen aus Sekundärantikörperlösung gelegt und erneut für 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen wieder fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zwei Mal in ddH₂O gewaschen.

Anschließend wurde eine Einbettungslösung hergestellt, die außerdem den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur spezifischen Markierung von DNA (und damit: der Zellkerne) enthielt. Die Lösung wurde auf 50 °C erhitzt, 15 µl davon als Tropfen auf einem Objektträger vorgelegt und die gewaschenen Deckgläschen vorsichtig darin eingebettet. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur und Dunkelheit getrocknet und gelagert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte schließlich an einem *confocal laser scanning microscope* (CLSM).

2.3.6. Durchflusszytometrie

Zellen wurden in 10-cm-Zellkulturschalen kultiviert und je nach Fragestellung behandelt, z. B. transfiziert oder mit rekombinanter Protease stimuliert. Bei ca. 50–70 % Konfluenz wurde das Medium

Tabelle 2.12.: Verwendete Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie-Experimente.

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Bezugsquelle
Accutase	<i>Innovative Cell Technologies</i> , San Diego, USA
FACS-Puffer	steriles PBS 1 % (w/v) <i>bovine serum albumin</i> (BSA)
Antikörperlösung	steriles PBS Antikörper (Konzentration nach Herstellerprotokoll)

abgenommen, 2 ml Accutase auf die Zellen gegeben und für 5–10 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen, bei 300 g für 2 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Zellsuspensionsvolumen, das 500 000 Zellen entsprach, wurde zur weiteren Aufbereitung behalten. Die Zellen wurden für 1 h bei 4 °C in Antikörperlösung inkubiert und anschließend drei Mal mit *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Puffer gewaschen (2 min abzentrifugieren bei 300 g, Überstand abnehmen), um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und dann am Durchflusszytometer vermessen.

2.3.7. Transmigrationsassay

Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von 8 µm (MCEP12H48; Merck Millipore, Billerica, USA) wurden in 12-Well-Zellkulturplatten platziert. Im basalen Kompartiment wurde 1 ml DMEM-Vollmedium vorgelegt; in die apikale Kammer wurden 500 000 bEnd.3-Zellen in 400 µl DMEM-Vollmedium gegeben. Die Zellen wurden für 24 h bis zur Konfluenz kultiviert. Die Integrität des Monolayers wurde mikroskopisch in einem Well ohne Zellkultureinsatz überprüft. Dann wurden *Lewis lung carcinoma* (LLC)-Zellen abgelöst, mit 10 µM *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) (eBioscience, Frankfurt am Main) nach Herstellerprotokoll gefärbt, gezählt und in DMEM aufgenommen. Aus den Zellkultureinsätzen wurde das Medium abgenommen und der Monolayer vorsichtig drei Mal mit PBS gespült. Die Einsätze wurden in neue Wells platziert, in deren basales Kompartiment 1 ml DMEM vorgelegt wurde. Dann wurden 50 000 LLC-Zellen pro Well in 400 µl DMEM in das apikale Kompartiment gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. In manchen Ansätzen wurde nach 1 h rekombinantes Meprin β in einer Konzentration von 15 nM zugegeben. Nach insgesamt 5 h wurde das Medium im apikalen Kompartiment aspiriert und die Zellen auf der oberen Seite der Membran wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran wurden mit Hilfe eines Inversions-Fluoreszenz-Mikroskops (DMi8; Leica Microsystems, Wetzlar) detektiert. Als Positivkontrolle diente ein Well, in dessen Zellkultureinsatz keine bEnd.3-Zellen ausgesät worden waren. Ein 42,25 mm² großes Areal in der Mitte der Membran wurde mit der Software ImageJ ausgewertet.

Tabelle 2.13.: Verwendete Lysepuffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	1 mM EGTA 5 mM TRIS 250 mM Saccharose 1% Triton X-100 pH 7,4
EBC-Lysepuffer	120 mM NaCl 50 mM TRIS 0,5% NP-40 cOmplete™ Protease-Inhibitor (Roche) pH 7,4
Phospho-Lysepuffer	137 mM NaCl 20 mM TRIS 1 mM Na ₃ VO ₄ 1% NP-40 cOmplete™ Protease-Inhibitor (Roche) PhosSTOP™ Phosphatase-Inhibitor (Roche) pH 8
Biotinylierungs-Lysepuffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0,1% SDS 1% Triton X-100 cOmplete™ Protease-Inhibitor (Roche)

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung

Geerntete Zellen wurden 1 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Lysepuffer (Tab. 2.13) resuspendiert und anschließend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Für Experimente mit Phosphoproteinen wurde der Phospho-Lysepuffer genutzt. Es folgte eine zweimalige Behandlung im Ultraschallbad für jeweils 15 s und ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13 200 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Zur Proteinbestimmung der fertigen Lysate wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.2. Elektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-PAGE)

Für die *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) wurden Zelllysate mit 5X-SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und die Proteine bei 95 °C für 10 min denaturiert. Gleiche Proteinmengen wurden auf ein 10%- oder 12%-Polyacrylamidgel (Tab. 2.14) aufgetragen und die SDS-PAGE wurde bei 120 V für 60–90 min mit den in Tab. 2.15 angegebenen Puffern durchgeführt.

Tabelle 2.14.: Verwendete Puffer für die Herstellung von Polyacrylamidgelen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS 0,4 % (w/v) <i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
10-%-Trenngel	2 ml Trenngelpuffer 3,214 ml ddH ₂ O 2,666 ml Acrylamid (30 %) 60 µl TEMED (10 %) 60 µl APS (10 %)
12-%-Trenngel	2 ml Trenngelpuffer 2,68 ml ddH ₂ O 3,2 ml Acrylamid (30 %) 60 µl TEMED (10 %) 60 µl APS (10 %)
3,8-%-Sammelgel	1 ml Sammelgelpuffer 2,44 ml ddH ₂ O 0,506 ml Acrylamid (30 %) 50 µl TEMED (10 %) 50 µl APS (10 %)

Tabelle 2.15.: Verwendete Puffer für die SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung
5X SDS-PAGE Probenpuffer	2,5 ml TRIS 1 g SDS 2,5 ml ddH ₂ O 0,05 g Bromphenolblau 5 ml Glycerol 100–200 mM Dithiothreitol (DTT), denaturierend
10X SDS-PAGE Laufpuffer	1,92 M Glycin 250 mM TRIS 35 mM SDS
1X SDS-PAGE Laufpuffer	ddH ₂ O 10 % (v/v) 10X SDS-PAGE Laufpuffer

Tabelle 2.16.: Verwendete Lösungen für Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,5 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R-250 45 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	10 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

2.4.3. Coomassie-Färbung

Das Polyacrylamid-Gel wurde nach der SDS-PAGE zum Einfärben über Nacht in Coomassie-Lösung gelegt (Tab. 2.16). Anschließend wurde das Gel so lange in einer Entfärbelösung inkubiert, bis die Hintergrundfärbung verschwunden war. Das so gefärbte Gel wurde mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

2.4.4. Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Dazu wurde ein Sandwich geschichtet aus Whatman-Filterpapier, in Puffer aktivierter Nitrozellulosemembran, Gel, Whatman-Filterpapier. Im Tank-Blot-Verfahren wurden dann bei konstanter Stromstärke (je nach verwendeter Kammer 350 bzw. 800 mA) und 4 °C die Proteine für 2 h mit den in Tab. 2.17 angegebenen Puffern transferiert. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT blockiert (für Experimente mit Phosphoproteinen mit *bovine serum albumin* (BSA), sonst Milchpulver). Über Nacht wurde die Membran mit dem Primärantikörper in der Blockierungslösung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit *TRIS-buffered saline* (TBS)-T gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit einem passenden, an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proteine unter Benutzung eines Peroxidase-Substrats (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, #34095; Thermo Fisher Scientific) an einem Bildanalysegerät (*LAS-3000 mini*; Fujifilm, Tokio, Japan) detektiert.

2.4.5. Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Zellen wurden mehrfach mit eiskaltem PBS-CM (Tab. 2.18) gewaschen und für 5 min mit 5 ml PBS-CM in den Zellkulturschalen inkubiert bzw. auf 4 °C abgekühlt. Das PBS-CM wurde abgenommen und es wurde 3 ml Biotin-Lösung pro 10-cm-Zellkulturschale auf die Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Biotin-Lösung abgenommen und 10 ml eiskalter *Quenching*-Puffer für 10 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde erneut mehrfach mit PBS-CM gewaschen und zuletzt 1 ml PBS-CM auf die Zellen gegeben. Mit einem Schaber wurden die Zellen

Tabelle 2.17.: Verwendete Puffer für Western-Blot-Experimente.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10X <i>Tank-Blot</i> -Puffer	250 mM TRIS 2 M Glycin pH 8,3
1X <i>Tank-Blot</i> -Arbeitspuffer	ddH ₂ O 10 % (v/v) 10X <i>Tank-Blot</i> -Puffer 20 % (v/v) Methanol
TBS-T	20 mM TRIS 150 mM NaCl 0,1 % Tween® 20 pH 7,5
<i>Stripping</i> -Puffer	100 mM Glycin 20 mM MgAc pH 2,2
Blockierungslösung	TBS-T 5 % (w/v) Milchpulver bzw. BSA

Tabelle 2.18.: Verwendete Puffer und Lösungen für die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Biotin-Lösung	PBS-CM 1 mg/ml Biotin
PBS-CM	PBS 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂
<i>Quenching</i> -Puffer	PBS-CM 50 mM TRIS pH 8

geerntet und in PBS-CM gelöst in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellyse erfolgte wie beschrieben, jedoch mit Biotinylierungs-Lysepuffer (Tab. 2.13). Nach der Proteinbestimmung wurde eine ausreichende Menge Protein als Lysatkontrolle abgenommen. Die restlichen Proben wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und mit mehrfach in Lysepuffer gewaschenen Streptavidin-Beads (*Pierce High Capacity Streptavidin Agarose*, #20357; Thermo Fisher Scientific) für 1 h bei 4 °C an einem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden anschließend erneut mehrfach mit Lysepuffer gewaschen, dann mit 80 µl 1X-SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die vollständigen Kontrolllysate und die präzipitierten Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

2.4.6. Peptidspaltungsanalyse mittels Umkehrphasen-Chromatografie (RP-HPLC)

Für *in-vitro*-Experimente wurden 18 Aminosäure (AS) lange synthetische CD99-Peptide verwendet, die die vorhergesagte Meprin-β-Spaltstelle beinhalten und CD99 WT bzw. die CD99-Varianten

D92H und D92Y repräsentieren (Genosphere Biotechnologies, Paris, Frankreich). Die *full-length* (FL)-Peptide wurden mittels *reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC) mit einem Gradienten von 2 % Acetonitril (ACN)/0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in H₂O bis 60 % ACN/0,1 % TFA und einer Detektion bei 214 nm analysiert. Für Spaltungsanalysen wurden 100 µl der 500 µM Peptidlösung mit 15 nM rekombinantem Meprin β für 1 h bei RT inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1,9 ml 0,1 % TFA beendet. Anschließend wurde die RP-HPLC für 65 min durchgeführt und die einzelnen Peptidfragmente wurden in Reaktionsgefäßen für die weitere Analyse gesammelt. Es wurden folgende Geräte verwendet: LC-20AD Pumpe, FRC-10A Fraktionssammler, SPD-M20A Detektor (alle Shimadzu, Kyōto, Japan).

2.4.7. Identifizierung von Peptidspaltstellen

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden vom Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomics und Bioanalytik der Christian-Albrechts-Universität Kiel unter der Leitung von Prof. A. Tholey durchgeführt. Die aufgefangenen *high-performance liquid chromatography* (HPLC)-Fraktionen wurden mittels Vakuumentrifugation konzentriert und in 25 µl Puffer (3 % ACN in 0,1 % TFA) rekonstituiert. Davon wurde 1 µl in Duplikaten auf einen *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI)-Probenträger aufgebracht und getrocknet. Auf die getrockneten Punkte wurde eine MALDI-Matrix (3 mg/dl α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in 70 % ACN/0,1 % TFA) aufgebracht. Es folgte eine MALDI-*tandem-mass-spectrometry* (MS/MS)-Analyse mit einem MALDI-*time of flight* (TOF)-Massenspektrometer (*TOF/TOF 5800 System*, Sciex, Darmstadt). Eine genaue Methodenbeschreibung der Massenspektrometrie (MS)-Analyse ist in BEDAU et al. 2017a nachzulesen.

2.4.8. Identifizierung von Spaltstellen *in cellula*

HeLa-Zellen wurden mit C-terminal myc/FLAG-markiertem CD99 und Meprin β transfiziert. Mit einem anti-FLAG-Antikörper wurden aus den Lysaten CD99-C-Termini immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und wie beschrieben mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (vgl. Abschn. 2.4.3). Die genaue Beschreibung der weiteren Probenaufbereitung und -analyse mittels *liquid chromatography-electrospray ionization* (LC-ESI)-MS/MS ist nachzulesen in BEDAU et al. 2017a.

2.5. *In-vivo*-Versuche

2.5.1. Tierhaltung

Alle für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in *individually ventilated cages* (IVC) bei einer Temperatur von 19–22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % gehalten. Dabei wurde ein Tages-

rhythmus von 12 h Helligkeit und 12 h Dunkelheit eingehalten. Die Versorgung mit Trockenfutter und Wasser erfolgte *ad libitum*. Der Umgang mit den Mäusen erfolgte gemäß den Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Durchführung von Tierexperimenten wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt.

2.5.2. Behandlung von Mäusen mit Actinonin

Zehn C57BL/6-Mäuse im Alter von neun Wochen wurden randomisiert in zwei Gruppen mit ähnlichem Körpergewicht (KG). Der Meprin-Inhibitor Actinonin wurde der einen Hälfte der Tiere in einer Konzentration von 0,5 mg/kg KG zwei Mal täglich intraperitoneal für eine Woche verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt nach demselben Schema 0,9 % NaCl-Lösung mit 5 % Ethanol. Nach Ablauf der Woche wurden die Mäuse mit 800 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Medetomidin betäubt und dann getötet. Allen Tieren wurden postmortal die Lungen entnommen. Der Tierversuch wurde durch das Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. C. Pietrzik durchgeführt. Die Mäuselungen wurden homogenisiert (*Precellys*[®], VWR, Erlangen), lysiert und weitergehend mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.5.3. Air-pouch-Mausmodell

Mäusen im Alter von neun bis elf Wochen wurde 6 ml sterile Luft dorsal subkutan injiziert. Der so entstandene Pouch wurde drei Tage später mit 4 ml steriler Luft reinjiziert. Am Tag sechs wurde 1 ml PBS (1 % Carrageen) in den Pouch injiziert, um eine akute Entzündungsreaktion hervorzurufen. Nach 24 h wurde den Mäusen submandibulär Blut entnommen. Dann wurden die Mäuse durch einen Genickbruch getötet und die Pouches mit je 3 ml PBS (2 mM EDTA) gespült. Die Spülflüssigkeit wurde sofort auf Eis gelagert und die Zellen wurden gezählt (Cellometer, Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA). Das entnommene Blut, verdünnt mit PBS (40 mM EDTA), und jeweils 500 000 Zellen aus den Pouches wurden für die durchflusszytometrische Analyse verwendet. Dazu wurden zunächst die Fc-Rezeptoren blockiert und die Zellen anschließend mit Antikörpern (Konzentration 1:100) gefärbt (Tab. 2.4).

3. Ergebnisse

3.1. CD99 als Substrat der Metalloprotease Meprin β

Grundlegend wurde CD99 bereits als Substrat der Metalloprotease Meprin β sowohl *in vitro* als auch *in cellula* validiert. Als Erweiterung dieser Erkenntnisse werden in dieser Arbeit zusammenfassend die Ergebnisse aus BEDAU et al. 2017a und BEDAU et al. 2017b sowie bisher unveröffentlichte Daten präsentiert.

3.1.1. Zellkulturexperimente zur Analyse der Spaltung von CD99

3.1.1.1. Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle in der CD99-Ektodomäne

Mit Hilfe der TAILS-Analyse wurden bereits in vier verschiedenen humanen Zelllinien mehrere potenzielle Spaltstellen für Meprin α und Meprin β zwischen den Aminosäuren Ser91 und Gly98 in der CD99-Ektodomäne identifiziert (vgl. Tab. 1.1). Die Aminosäure in P1'-Position war dabei meist Aspartat, was gut zur Spaltstellenpräferenz von Meprinen für saure Aminosäurereste passt. Durch einen *in-vitro*-Verdau der rekombinanten CD99-Ektodomäne durch rekombinantes Meprin β konnte mit Hilfe eines anschließenden Edman-Abbaus eine Spaltstelle identifiziert werden: diese lag, weiter N-terminal als durch die TAILS-Analyse bestimmt, zwischen Gly56 und Asp57.

Es sollten nun mittels MS die Spaltstellen in CD99 identifiziert werden, die im zellulären System durch Meprin β bedient werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit humanem CD99 und Meprin β kotransfiziert. CD99 bzw. die CD99-Spaltprodukte wurden über einen C-terminalen FLAG-tag immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (Abb. 3.1A). Die Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot verifiziert (Abb. 3.1B). Die Gelbereiche, die das FL Protein und die Spaltprodukte enthielten, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (Prof. A. Tholey, Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomics und Bioanalytik, Christian-Albrechts-Universität Kiel). Alle primären Aminogruppen wurden chemisch markiert. Dann wurden die Proteine mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut und die Peptide mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. In allen Gelausschnitten konnte mindestens ein Peptid identifiziert werden, wobei in den Bereichen 1, 2 und 3 keine neuen N-Termini gefunden wurden (Abb. 3.1C). Lediglich in Bereich 4, was dem C-terminalen Fragment (CTF) II entspricht, wurde ein Peptid mit neuem N-Terminus identifiziert. Die N-terminale Aminosäure dieses Peptids war Asp94, was auf eine Spaltung zwischen Ala93 und Asp94 schließen lässt. In einer manuellen

Analyse der MS-Spektren wurde weiterhin ein kleinerer Peak analysiert: hier war die N-terminale Aminosäure Asp92, was eine Spaltung zwischen Ser91 und Asp92 bedeutet. Die Position dieser beiden Spaltstellen bestätigt also die Ergebnisse der TAILS-Analyse.

3.1.1.2. Konservierung der Meprin-Spaltstellen

Es wurde bereits in anderen Studien berichtet, dass die Primärstruktur von CD99 fünf Regionen aufweist, die hochgradig konserviert sind (SUH et al. 2003; PARK et al. 2005). Ein Vergleich der jeweils homologen CD99-Aminosäuresequenzen von zehn verschiedenen Vertebraten verdeutlicht diese Beobachtung (Abb. 3.2). Die hochkonservierte Region IV ist die Transmembranregion, Region V eine intrazelluläre, membrannahe, lysinreiche Region, die in Signaltransduktionsprozessen involviert ist (WATSON et al. 2015); die restlichen Regionen I-III befinden sich in der Ektodomäne und zeigen eine ähnliche Sequenz, die stets mehrere Aspartat-Aminosäurereste beinhaltet, z. B. (F/I) xDxDLxD für Region III, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Über die biologische Relevanz dieser Regionen ist bisher nichts bekannt. Interessanterweise befinden sich die für Meprin β identifizierten Spaltstellen genau innerhalb dieser hochkonservierten Motive, nämlich in Region II (*in-vitro*-Identifikation per Edman-Abbau) und Region III (*in-cellula*-Identifikation per MS, vgl. Abschn. 3.1.1.1). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich das in Abb. 3.3 gezeigte Modell: Meprin β spaltet CD99 an mindestens zwei Stellen der Ektodomäne, die beide stark konserviert sind (Pfeilspitzen). Durch Spaltung in Region II entsteht das CTF I, durch Spaltung in Region III entsteht das CTF II. Das CTF II kann daraufhin durch eine Intramembranprotease, die γ -Sekretase, weiter prozessiert werden, sodass eine lösliche intrazelluläre Domäne (IZD) sowie ein weiteres extrazelluläres N-terminales Fragment (NTF) entstehen.

3.1.1.3. Spaltung von CD99L2 durch Meprin β

CD99 antigen-like protein 2 (CD99L2) ist ein Protein, das mit CD99 verwandt ist. Es wird von einem eigenen Gen kodiert, jedoch wird angenommen, dass die beiden Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind (SUH et al. 2003). Die Aminosäuresequenz ist zwar nur zu ca. 33 % identisch, die fünf beschriebenen hochkonservierten Motive finden sich jedoch auch in CD99L2 wieder. Deswegen wurde auch die Spaltung von CD99L2 durch Meprin β in HeLa-Zellen analysiert (Abb. 3.4). FL-CD99L2 besteht aus 237 Aminosäuren, ist damit 74 Aminosäuren länger als FL-CD99 und ist im Western Blot deswegen bei einem höheren Molekulargewicht von ca. 55 kDa detektierbar. Bei Kotransfektion mit Meprin β ließ sich mit einem myc-Antikörper, der den C-terminalen myc-tag des verwendeten CD99L2-Konstruktes bindet, ein CTF bei ca. 20 kDa detektieren. Durch Zugabe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT akkumulierte ein weiteres, kleineres CTF bei ca. 18 kDa.

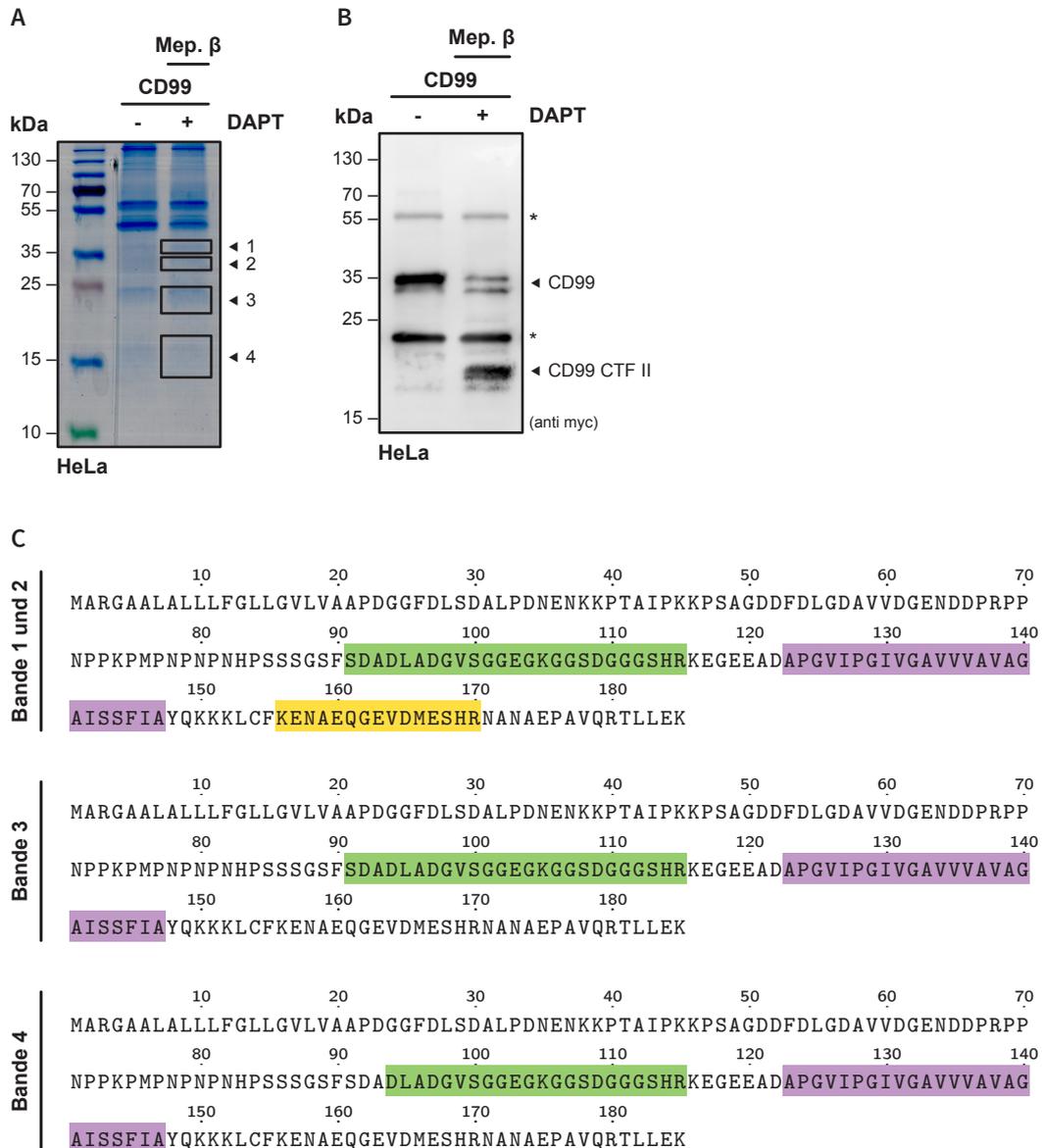


Abbildung 3.1.: Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle in CD99 Wildtyp (WT) in HeLa-Zellen. (A) Coomassie-gefärbtes Gel nach SDS-PAGE. HeLa-Zellen wurden mit CD99 und Meprin β transfiziert, mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt und CD99-Fragmente wurden über einen C-terminalen FLAG-*tag* immunpräzipitiert. Die vier eingerahmten Felder stellen Bereiche des Gels dar, die für die massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten wurden. Bereiche 1 und 2 repräsentieren *full-length* (FL)-CD99, Bereich 3 das putative CTF I und Bereich 4 das putative CTF II. **(B)** Western Blot derselben Proben aus (A) zur Kontrolle der Immunpräzipitation (IP). Die CD99-CTF wurden via *myc-tag* detektiert. Die mit Sternchen gekennzeichneten Banden spiegeln die *heavy chain* bzw. *light chain* der anti-FLAG-Antikörper der IP wider. **(C)** Identifizierte Peptide aus den Proben aus (A). Es wurde die CD99-Referenzamino-säuresequenz NP_002405.1 des NCBI zugrundegelegt (O'LEARY et al. 2016). Die Proteine aus den Gelbereichen aus (A) wurden isoliert und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Sequenzen der Peptide, die mit hoher (*false discovery rate* (FDR) <1%) bzw. mittlerer (FDR <5%) Konfidenz identifiziert wurden, sind grün bzw. gelb hinterlegt. Die putative Transmembranregion (nach Eintrag P14209 in UniProt, UNIPROT CONSORTIUM 2019) ist in violett dargestellt. In den Bereichen 1–3 wurden keine N-terminal dimethylierten Peptide identifiziert. Der N-Terminus des in Bereich 4 identifizierten Peptids entspricht Asp94 und war dimethyliert, was für eine vorher stattgefundenene Spaltung an dieser Position spricht.

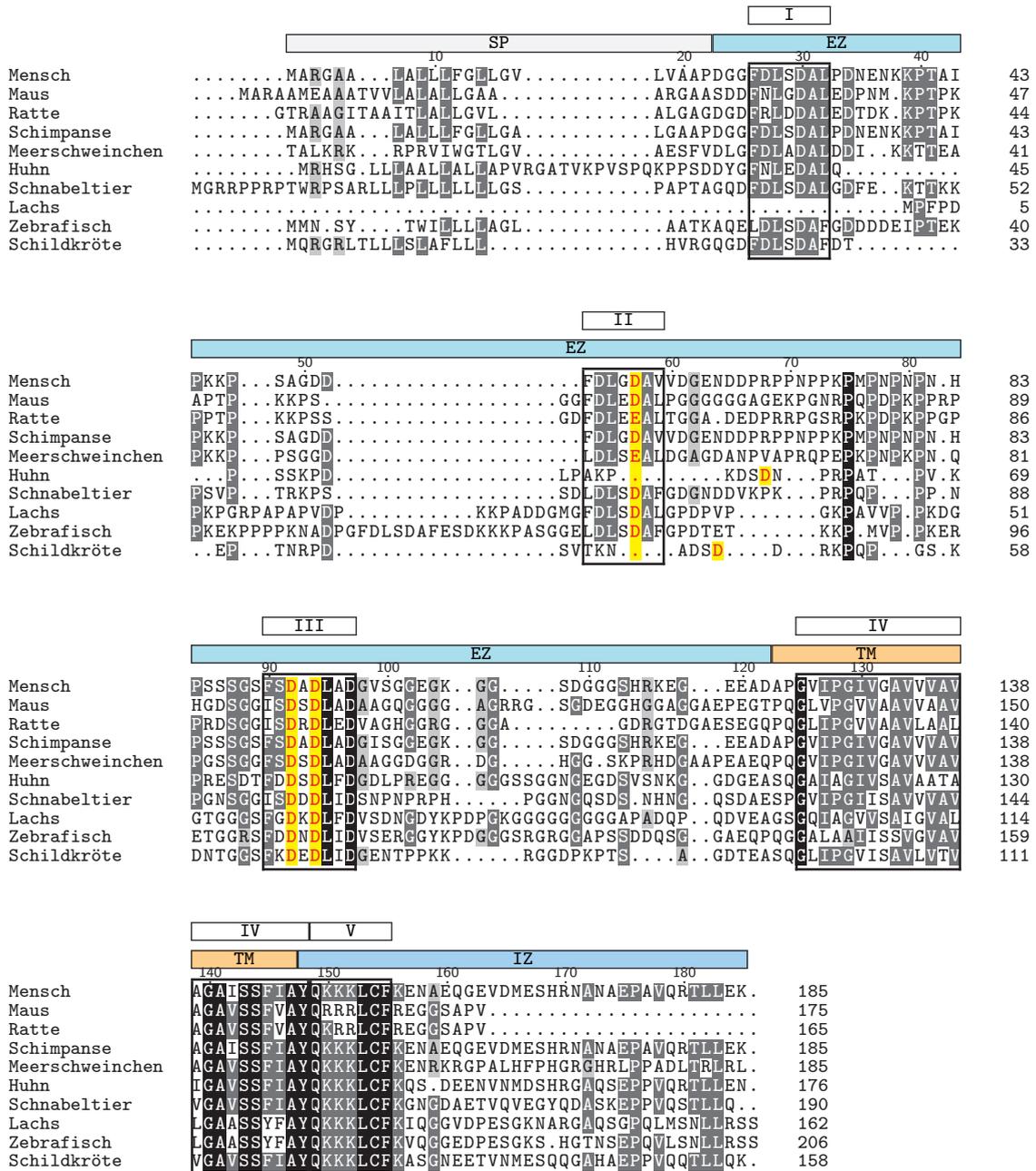


Abbildung 3.2.: Die Meprin-Spaltstellen befinden sich in konservierten Regionen der CD99-Ektodomäne. Alignment der CD99-Aminosäuresequenzen zehn verschiedener Vertebraten. Die hochgradig konservierten Regionen I-V (s. Text) sind mit römischen Ziffern beschriftet. Alle identifizierten Meprin-β-Spaltstellen sind in roter Schrift auf gelbem Hintergrund dargestellt. Die Rohdaten stammen aus der UniProt-Datenbank (UNIProt CONSORTIUM 2019): P14209 (Mensch), Q8VCN6 (Maus), Q4L2A2 (Ratte), H2R4U1 (Schimpanse), HOVWC1 (Meerschweinchen), E1BR1 (Huhn), F6V1J7 (Schnabeltier), B5X3Y9 (Lachs), B8A4U1 (Zebrafisch), und K7F472 (Schildkröte). Das Alignment wurde mit Clustal Omega erstellt (MADEIRA et al. 2019). SP: Signalpeptid; EZ: extrazellulär; TM: Transmembranregion; IZ: intrazellulär.

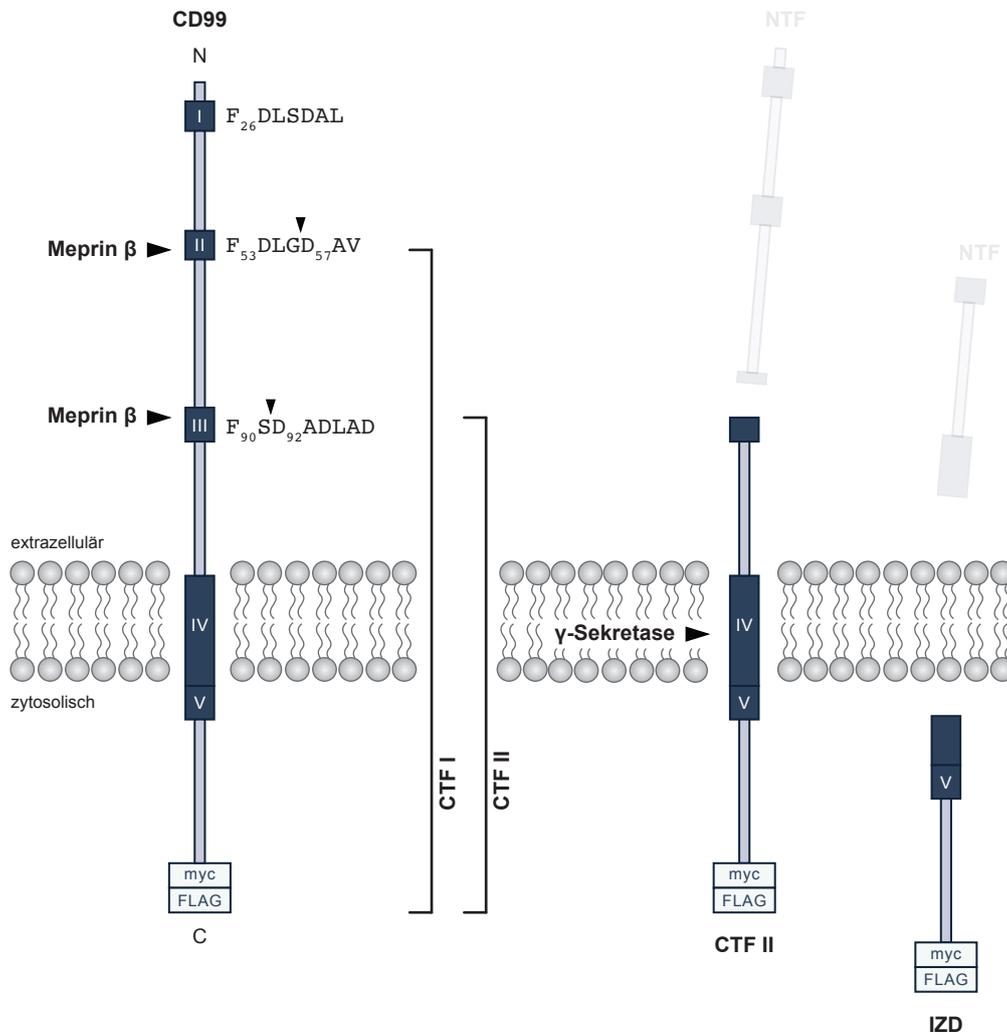


Abbildung 3.3.: Modell der CD99-Prozessierung an der Zelloberfläche. Meprin β spaltet das Typ-I-Transmembranprotein CD99 *in vitro* zwischen Gly56 und Asp57 und *in cellula* zwischen Ser91 und Asp92. Die Spaltstellen liegen in den hochgradig konservierten Regionen II und III. Sämtliche dieser Regionen aus Abb. 3.2 sind in dunkelblau mit römischen Ziffern dargestellt. Durch die Spaltung entsteht ein C-terminales Fragment (CTF) I und ein CTF II. Auf das *ectodomain shedding* folgt die *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) des CTF II durch die γ -Sekretase. Dadurch entsteht eine intrazelluläre Domäne (IZD).

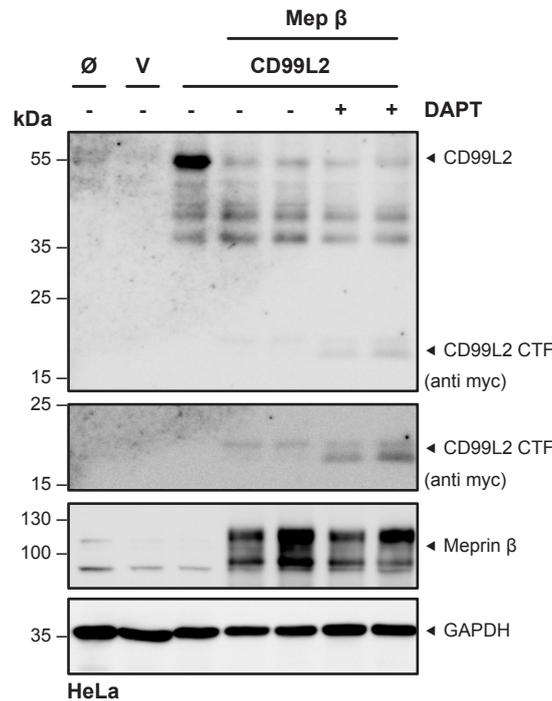


Abbildung 3.4.: Spaltung von CD99L2 durch Meprin β in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit CD99L2-myc/FLAG alleine bzw. zusammen mit Meprin β transfiziert. Vor der Ernte wurden zwei Ansätze für 18 h mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (0,6 μ M) behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot mit einem anti-myc-Antikörper und einem spezifischen Meprin- β -Antikörper analysiert. Der untere myc-Blot ist ein länger belichteter Ausschnitt des oberen Blots. Es ist zu erkennen, dass bei Koexpression von Meprin β ein C-terminales Fragment (CTF) bei ca. 20 kDa entstand. Unter DAPT-Zugabe akkumulierte ein weiteres CTF mit etwas niedrigerem Molekulargewicht. Die Analyse der GAPDH-Expression diente als Ladekontrolle. V: Leervektor.

3.1.1.4. Kinetik der CD99-Prozessierung durch Meprin β an der Zelloberfläche

Durch Immunfluoreszenz-Analysen und Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen konnte bereits gezeigt werden, dass Meprin β und CD99 an der Zellmembran kolokalisieren und dass die proteolytische Interaktion dort stattfindet (vgl. dazu Abschn. 3.2.3.4 und Abschn. 3.2.3.5). Weiterhin sollte die Spaltung von membrangebundenem CD99 durch lösliches Meprin β im zeitlichen Verlauf analysiert werden. Dazu wurden sowohl untransfizierte als auch mit CD99 transient transfizierte HeLa-Zellen für definierte Zeiträume mit rekombinantem Meprin β behandelt und anschließend die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt und quantifiziert (Abb. 3.5A, B). Es konnte gezeigt werden, dass die CD99-Oberflächenexpression durch Transfektion im Vergleich zu untransfizierten HeLa-Zellen ansteigt. Durch rekombinantes Meprin β nahm das mit dem Antikörper detektierbare FL-CD99 stetig ab und bereits nach fünf Minuten war das Signal niedriger als das endogene Level. Nach 60 min war der Großteil von CD99 von der Zelloberfläche abgespalten.

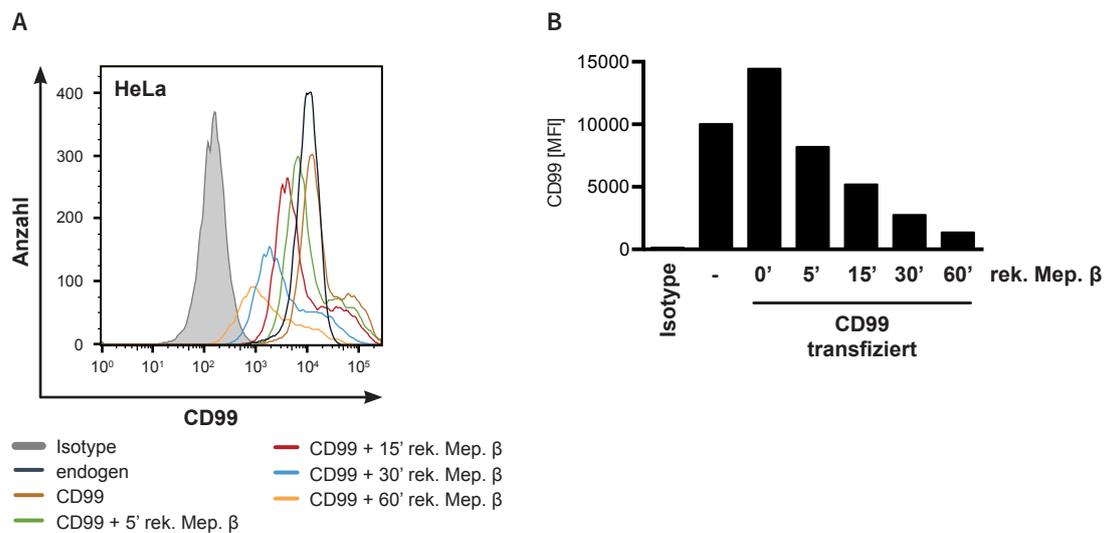


Abbildung 3.5.: Spaltung von CD99 durch lösliches Meprin β an der Zelloberfläche. (A) HeLa-Zellen wurden mit CD99-myc/FLAG transfiziert und vor der Ernte für 5 min, 15 min, 30 min bzw. 60 min mit rekombinantem humanem Meprin β (25 nM) behandelt. Die geernteten Zellen wurden mit einem anti-CD99-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Kontrolle wurde ein mit CD99 transfizierter Ansatz mit einem Antikörper gleichen Isotyps (IgG2a-PE) gefärbt. Es zeigte sich eine zeitabhängige Abnahme des CD99-Signals an der Zelloberfläche. (B) Quantifizierung des CD99-Signals aus (A) mittels *median fluorescence intensity* (MFI) im zeitlichen Verlauf. Es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme unter endogene CD99-Level durch die Zugabe von rekombinantem humanem Meprin β .

3.1.1.5. Einfluss von Meprin β auf die transendotheliale Migration (TEM)

Die homophile Interaktion von CD99 auf Leukozyt und Endothelzelle ist ein essenzieller Schritt während der Diapedese von Leukozyten in den Extravasalraum. Die Signalwege, die durch diese Interaktion ausgelöst werden sowie die molekularen Grundlagen für die Aufhebung dieser Interaktion wurden bisher nur ansatzweise erforscht. Daher sollte die Rolle von Meprin β in diesem Vorgang untersucht werden. Vorexperimente haben gezeigt, dass rekombinantes Meprin β eine Endothelzellschicht durchlässiger für einen Fluoreszenzfarbstoff machen kann (Dr. J. Prox, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel). Als nächstes wurde ein physiologischeres Modell angewandt, um die TEM von Zellen in Abhängigkeit von Meprin β zu analysieren. Dazu wurden murine Endothelzellen (bEnd.3) und murine Lungenkarzinom-Zellen (LLC) benutzt (Abb. 3.6A). Die bEnd.3-Zellen wurden in Zellkultureinsätze mit permeabler Membran für 12-Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die LLC-Zellen wurden dann mit einem intrazellulären Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und dieselbe Anzahl an Zellen wurde jeweils in das apikale Kompartiment der Zellkultureinsätze auf die Endothelzellschicht gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um mit dem Endothel zu interagieren. Dann wurde rekombinantes Meprin β zugegeben und die Zellen wurden für vier weitere Stunden bei 37 °C inkubiert, in denen die TEM stattfinden konnte. Anschließend wurden sämtliche Zellen im apikalen Kompartiment entfernt und die migrierten Zellen an der Unterseite des Zellkultureinsatzes mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Abb. 3.6B) und mit der Software ImageJ quantifiziert (Abb. 3.6C). Als Positivkontrolle

wurde ein Ansatz gewählt, in dem keine bEnd.3-Zellen ausgesät wurden. Hier sind verhältnismäßig die meisten LLC-Zellen durch die permeable Membran migriert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit bEnd.3-Zellen aber ohne Meprin β ; hier erreichten nur noch 10 % der Zellen der Positivkontrolle die Unterseite der Membran. In den Versuchsansätzen, in denen Meprin β zugegeben wurde, sind ca. zweieinhalb Mal mehr Zellen durch die Endothelzellschicht migriert als in der Negativkontrolle. Weiterhin konnte in diesen Proben eine erhöhte Aggregation der Zellen im Vergleich zu den anderen Ansätzen beobachtet werden.

3.1.1.6. Rolle von CD99 und Meprin β im Src-Signalweg

Die Tyrosinkinase c-Src ist das Produkt des Protoonkogens *SRC*. Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert und initiiert selbst durch Phosphorylierung weiterer Proteine eine Signalkaskade, die sich auf Zellmotilität, -adhäsion, -invasion und -proliferation auswirkt. Dementsprechend korreliert eine erhöhte Src-Kinase-Aktivität mit erhöhtem Metastasierungspotenzial in vorangeschrittenen Tumoren. In einer Studie wurde gezeigt, dass in einer humanen Osteosarkom-Zelllinie (U2-OS), die erniedrigte CD99-Proteinmengen exprimiert, Src konstitutiv aktiv ist. Nach (Re-)Transfektion von CD99 verringerte sich die Src-Aktivität und damit einhergehend konnte das maligne Verhalten der Zellen teilweise umgekehrt werden (MANARA et al. 2006). Um den Einfluss von Meprin β auf diese propagierte Tumorsuppressorfunktion von CD99 zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit CD99 transfiziert und mit rekombinantem Meprin β behandelt (Abb. 3.7A). Durch CD99-Überexpression allein zeigte sich kein Effekt auf die Src-Phosphorylierung. Stattdessen lag Src bei Zugabe von Meprin β vermehrt in phosphorylierter Form (Position Tyr419) vor. Ein Effekt von CD99 oder Meprin β auf die Phosphorylierung von Proteinkinase A, die mit CD99 in Zusammenhang gebracht wurde (WATSON et al. 2015), konnte in diesem System nicht gezeigt werden. Es wurden als nächstes U2-OS-Zellen verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den bereits publizierten Daten zu verbessern. Dieses Mal wurde rekombinantes Meprin β nicht nur zu dem mit CD99 transfizierten Ansatz gegeben, sondern auch zu U2-OS-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert worden waren, um abschätzen zu können, ob der beobachtete Effekt der Src-Aktivierung durch Meprin β abhängig von der CD99-Proteolyse ist (Abb. 3.7B). In diesem Experiment konnte zum einen gezeigt werden, dass das Phospho-Src-Signal (p-Src) nicht nur bei CD99-Überexpression abnimmt, sondern auch durch Transfektion des Kontrollvektors und zum anderen, dass die Phosphorylierung von Src durch Meprin β unabhängig von der Proteolyse von CD99 zu sein scheint.

Da der Transfektionsprozess an sich einen Effekt auf das p-Src-Signal zu haben schien, wurde ein anderes Transfektionsreagenz ausprobiert, um auszuschließen, dass der Effekt durch das verwendete PEI vermittelt wurde. Beim Vergleich der beiden Transfektionsreagenzien PEI und X-tremeGENE zeigte sich jedoch das gleiche Bild: sobald U2-OS-Zellen transfiziert wurden, sei es mit Kontrollvektor oder CD99, verringerte sich die Intensität des p-Src-Signals (Abb. 3.7C, D). Auch die Überexpression der CD99-Isoform CD99sh, die durch alternatives Splicing der CD99-mRNA

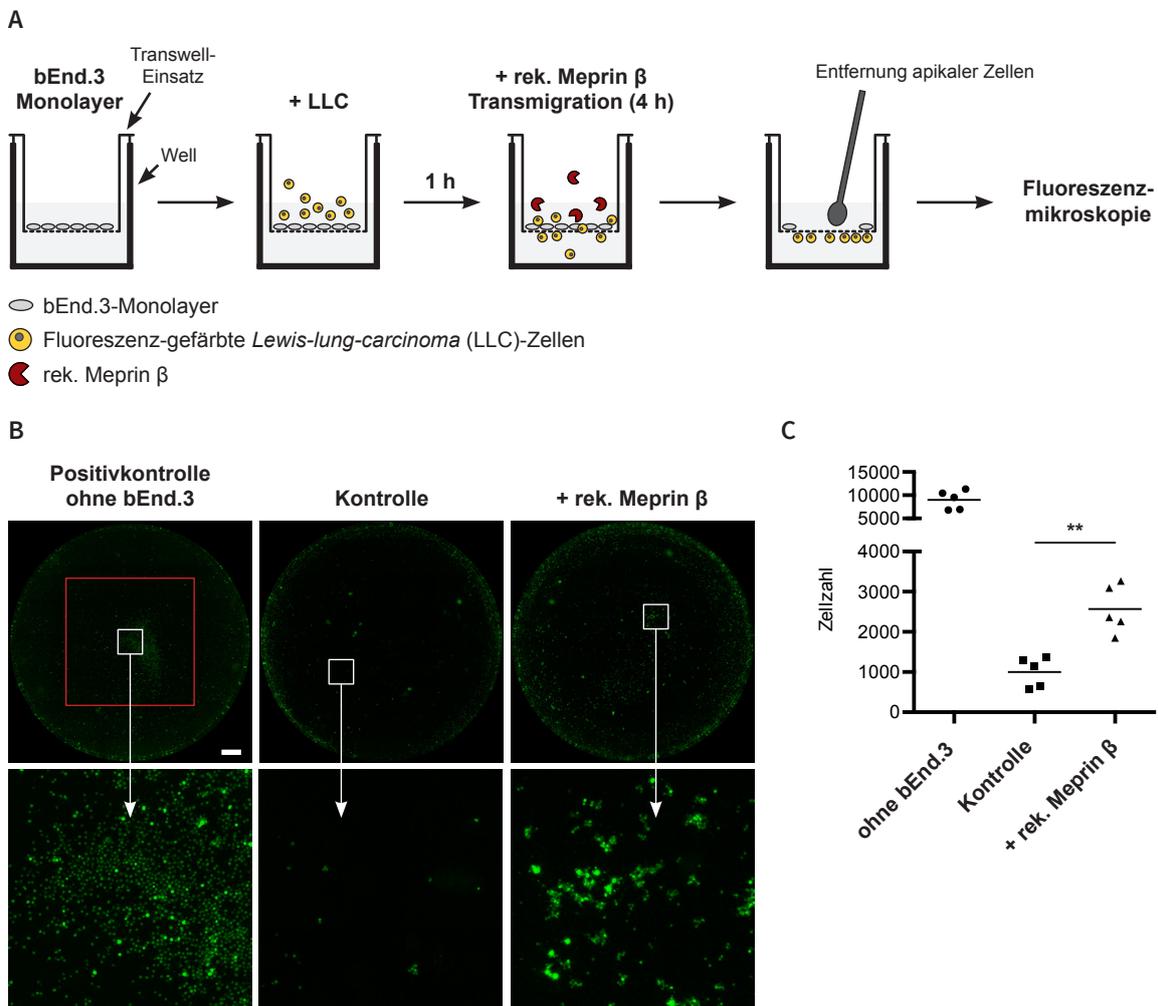


Abbildung 3.6.: Migration von LLC-Zellen durch einen bEnd.3-Monolayer in Abhängigkeit von löslichem Meprin β . (A) Schema des Versuchsablaufs. Murine Endothelzellen (bEnd.3) wurden in Zellkultureinsätzen mit poröser Membran bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden angefärbte *Lewis lung carcinoma* (LLC)-Zellen hinzugegeben. In den Versuchsansätzen wurde nach 1 h rekombinantes humanes Meprin β (15 nm) zugegeben. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen auf der apikalen Seite der Membran entfernt und die migrierten Zellen auf der unteren Membranseite mit Hilfe eines Inversions-Fluoreszenz-Mikroskops detektiert. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz ohne bEnd.3-Zellen. (B) Obere Reihe: repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der gesamten Unterseite der Zellkultureinsatzmembran. Die gefärbten LLC-Zellen erscheinen grün. Rot begrenzt ist die 42,25 mm² große, zentral gelegene Fläche der Membran, die zur Quantifizierung verwendet wurde. So flossen die Randbereiche, in denen Zellen möglicherweise nur unvollständig entfernt wurden, nicht mit in die weitere Analyse ein. Weißer Balken: 1 mm. Untere Reihe: repräsentative Vergrößerungen der weiß begrenzten Flächen der jeweiligen Gesamtaufnahmen der oberen Reihe. Hier zeigen sich Unterschiede in der Zellzahl und -aggregation. (C) Quantifizierung des Transmigrationsassays. Es wurde die absolute Zellzahl in den in (B) gezeigten rot begrenzten Flächen mit ImageJ bestimmt. In Ansätzen, die mit Meprin β behandelt wurden, migrierten mehr Zellen durch die Membran. Gezeigt sind jeweils fünf biologische Replikate aus einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. *t*-Test, ** *p* < 0,01.

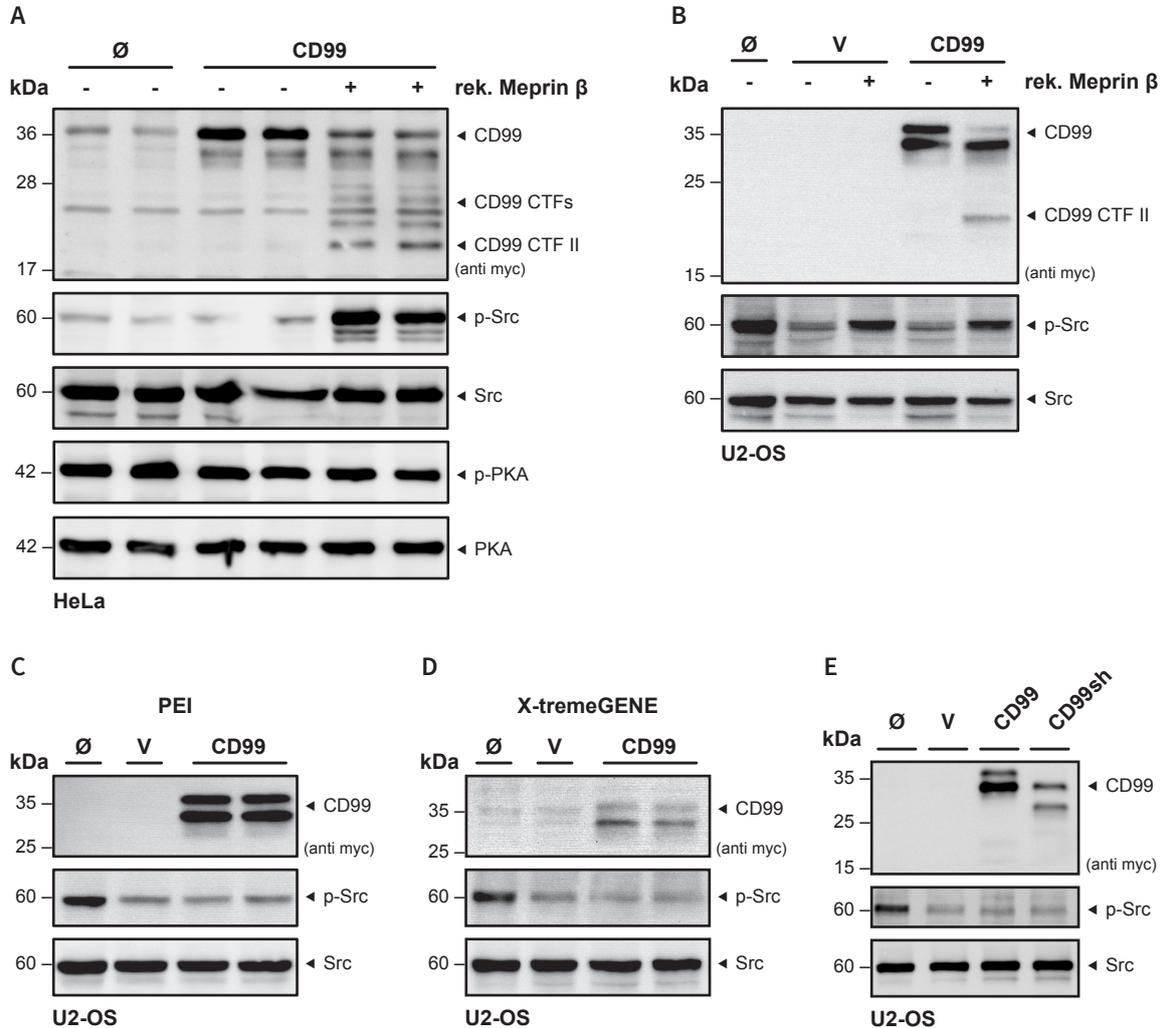


Abbildung 3.7.: Einfluss von Meprin β und CD99 auf die Phosphorylierung von Src. (A) Western Blot von HeLa-Zelllysaten, die mit CD99-myc transfiziert und mit rekombinantem Meprin β (15 nM) behandelt wurden. Die Überexpression von CD99 führte zu keiner Zunahme des Signals von phosphoryliertem Src (p-Src), die Zugabe von Meprin β jedoch schon. Die Analyse von Proteinkinase A (PKA)/p-PKA diente als Negativkontrolle. Die Analyse von Src diente in allen Unterabbildungen als Ladekontrolle. (B) Western Blot von U2-OS-Zelllysaten, die mit Leervektor (V) oder CD99-myc transfiziert und mit rekombinantem Meprin β (15 nM) behandelt wurden. Src ist in U2-OS-Zellen konstitutiv phosphoryliert. Die Transfektion mit CD99, jedoch auch mit einem Leervektor (V), führte zur Abnahme des p-Src-Signals. In beiden Fällen bewirkte die Behandlung mit Meprin β eine Zunahme von p-Src. (C) U2-OS wurden mit CD99-myc bzw. Leervektor (V) mit Hilfe des Transfektionsreagens Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Das konstitutive p-Src-Signal wurde durch beide Transfektionen verringert und ist damit unspezifisch. (D) Selber Versuch wie in (C), jedoch unter Verwendung von X-tremeGENE anstatt PEI. Das Ergebnis war unverändert. (E) Auch die Transfektion der CD99-Variante CD99sh-myc führte zur Abnahme des p-Src-Signals.

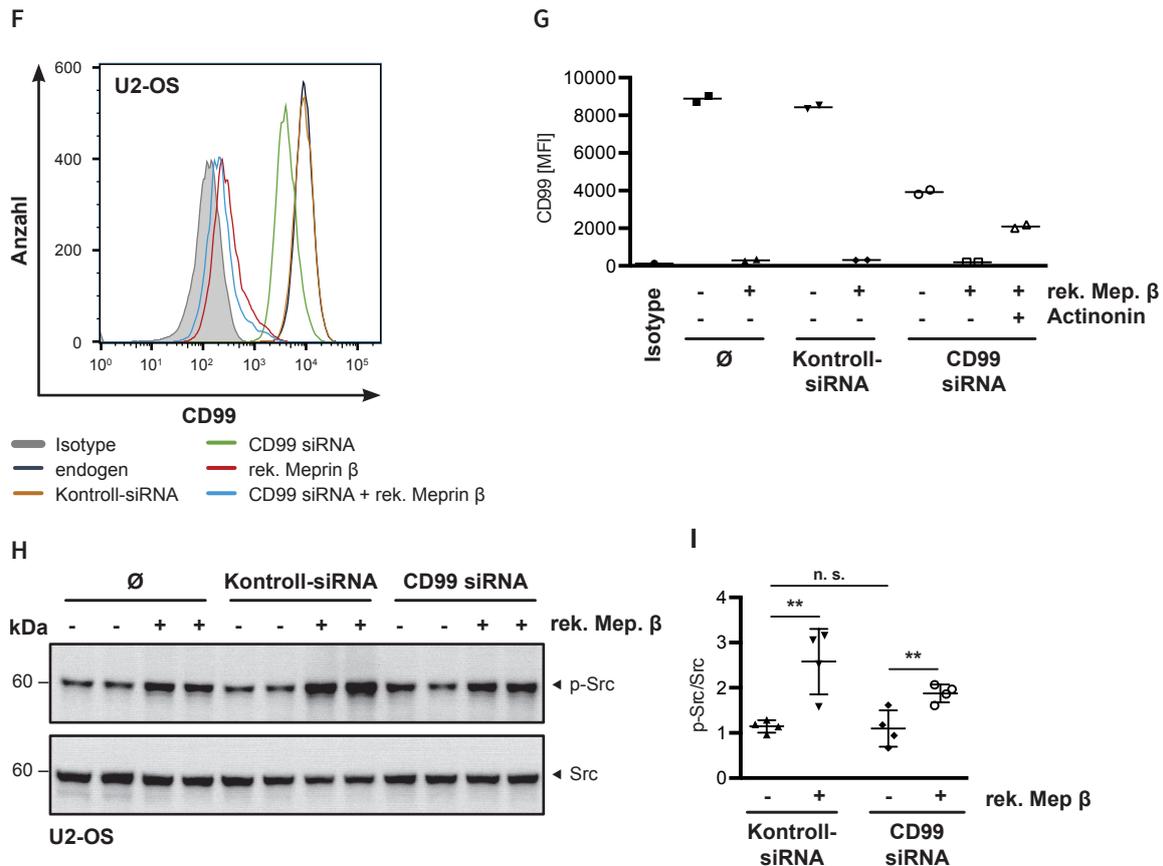


Abbildung 3.7.: Einfluss von Meprin β und CD99 auf die Phosphorylierung von Src (fortgeführt). (F) U2-OS-Zellen wurden mit CD99- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die CD99-Knockdown-Effizienz wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe eines CD99-Antikörpers und eines Kontrollantikörpers gleichen Isotyps validiert. Die Transfektion mit CD99-siRNA führte zur Abnahme der Fluoreszenz. Eine weitere Abnahme konnte durch die Behandlung mit rekombinantem Meprin β (15 nm) erreicht werden. (G) Quantifizierung der *median fluorescence intensity* (MFI) der Proben aus (F). Durchschnitt aus zwei biologischen Replikaten aus einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. (H) p-Src-Western Blot derselben Proben aus (F) und (G). (I) Quantifizierung der siRNA-Proben des Western Blots aus (H). Die Daten repräsentieren das Verhältnis des p-Src- zum Src-Monomer-Signal sowie zum Src-Dimer-Signal (nicht in (H) gezeigt); anschließend wurden die Daten normalisiert (unbehandelte Probe = 1). ANOVA, ** $p < 0,01$. n. s.: nicht signifikant.

entsteht und einen verkürzten intrazellulären Bereich hat, zeigte keinen spezifischen Effekt auf die Src-Phosphorylierung (Abb. 3.7E).

Um auszuschließen, dass sich endogene CD99-Proteinlevel oder die Überexpression an sich störend auf diese Ergebnisse auswirken und deswegen die publizierten Daten nicht reproduziert werden konnten, wurde ein CD99-Knockdown durchgeführt. Dazu wurden U2-OS-Zellen mit Kontroll-siRNA und mit CD99-spezifischer siRNA transfiziert. Die Effizienz des Knockdowns wurde zunächst validiert, indem die CD99-Zelloberflächenproteinexpression per Durchflusszytometrie verglichen wurde (Abb. 3.7F, G). Unbehandelte und mit CD99-spezifischem Antikörper gefärbte U2-OS-Zellen zeigten ein deutliches Signal im Vergleich zu Zellen, die mit einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps gefärbt worden waren. Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt

worden waren, zeigten keine Reduktion des CD99-Signals, wohingegen das Signal bei den Ansätzen, die mit CD99-spezifischer siRNA transfiziert wurden, auf ca. 40–50 % des Ausgangsniveaus sank. Außerdem wurden die jeweiligen Ansätze mit rekombinantem Meprin β behandelt, um auch in diesem Zellsystem zu zeigen, dass Meprin β in der Lage ist, membrangebundenes CD99 zu shedden. In diesen Ansätzen geht das CD99-Signal gegen Null, was zeigt, dass Meprin β in dieser Konzentration in der Lage ist, sämtliches endogen detektierbares CD99 an der Zelloberfläche zu spalten. Dass diese Signalreduktion in der Tat auf proteolytische Spaltung zurückzuführen ist, legt ein Ansatz nahe, der mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin behandelt wurde. Hier konnte die Reduktion der Oberflächenexpression größtenteils inhibiert werden. Dieselben Proben wurden dann im Hinblick auf Src und p-Src mittels Western Blot untersucht und anschließend densitometrisch analysiert (Abb. 3.7H, I). Auch hier bestätigt sich, dass die CD99-Proteinmenge keinen Einfluss auf das p-Src Signal hat. Die Behandlung durch Meprin β führte jedoch stets zu einem signifikanten Anstieg des p-Src-Signals, unabhängig von CD99.

3.1.1.7. Analyse der Spaltung von JAM-A und VE-Cadherin durch Meprin β

Bei der TEM von Leukozyten sind neben CD99 viele andere Zelladhäsionsproteine beteiligt. Zwei dieser Moleküle, JAM-A und VE-Cadherin, wurden untersucht im Hinblick auf Meprin- β -vermittelte Proteolyse, weil für beide in der Literatur bereits Berichte über Shedding durch ADAM-Proteasen vorliegen (KOENEN et al. 2009; SCHULZ et al. 2008). JAM-A wurde außerdem im TAILS-Screen als potenzielles Meprin-Substrat identifiziert. HeLa-Zellen wurden mit CD99 als Positivkontrolle bzw. mit JAM-A transfiziert und die Prozessierung anschließend per Western Blot analysiert (Abb. 3.8A). Die Spaltung von CD99 konnte erneut demonstriert werden, wohingegen JAM-A nicht prozessiert wurde. Sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Meprin β war ausschließlich das FL-Protein bei ca. 37 kDa detektierbar.

Für die Analyse der VE-Cadherin-Prozessierung wurden murine Endothelzellen (bEnd.3) verwendet, die endogen VE-Cadherin exprimieren (Abb. 3.8B). Die bEnd.3-Zellen wurden mit rekombinantem Meprin β behandelt und auch hier war nur das FL-Protein bei ca. 125 kDa detektierbar. Als Positiv- und Ladekontrolle diente p-Src bzw. Src; auch in dieser Zelllinie konnte gezeigt werden, dass das p-Src-Signal nach Behandlung mit rekombinantem Meprin β verstärkt ist.

3.1.2. *In-vivo*-Experimente

3.1.2.1. CD99-Prozessierung in Inhibitor-behandelten Mäusen

Im Rahmen einer Machbarkeitsstudie wurden C57BL/6-Mäuse für sieben Tage zwei Mal täglich mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin bzw. als Kontrolle mit einer Salzlösung behandelt (Prof. C. Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) (Abb. 3.9A). Es sollte untersucht werden, ob die intraperitoneale Inhibitorgabe einen Einfluss auf die Meprin-Aktivität

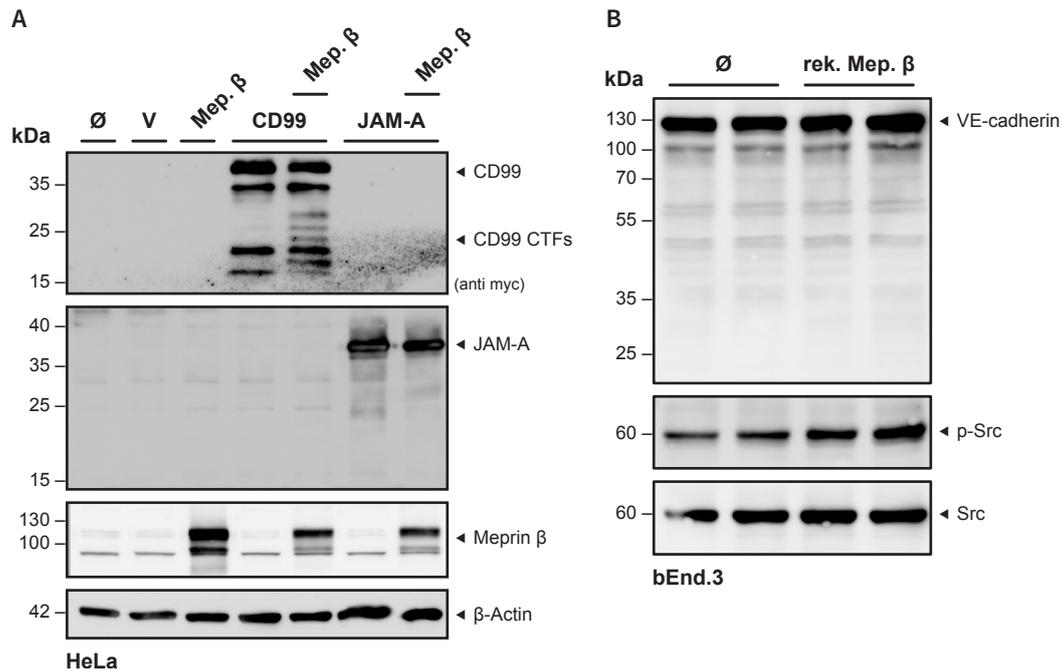


Abbildung 3.8.: Analyse der Spaltung von JAM-A und VE-Cadherin durch Meprin β . (A) Western Blot von HeLa-Zelllysaten nach Transfektion von CD99-myc bzw. *junctional adhesion molecule* (JAM)-A und Meprin β . Im Gegensatz zu CD99 wurde JAM-A nicht durch Meprin β gespalten. β -Actin diente als Ladekontrolle. (B) Western Blot von Zelllysaten muriner bEnd.3-Zellen nach Behandlung mit rekombinantem Meprin β (15 nM). Es entstanden keine proteolytischen Spaltprodukte von *vascular endothelial* (VE)-Cadherin. Auch in dieser Zelllinie führte die Zugabe von Meprin β zu einer Zunahme des p-Src-Signals (vgl. Abb. 3.7). Src diente als Ladekontrolle.

und damit auf die Spaltung von Substraten *in vivo* hat – schließlich könnte die Verabreichung eines spezifischen Meprin-Inhibitors in Zukunft auch für den Menschen eine therapeutische Strategie darstellen. Nach der Behandlung wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen und die CD99-Proteinlevel mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.9B). In den Actinonin-behandelten Mäusen akkumulierte CD99 im Vergleich zu den Kontrolltieren, was auf eine endogene Rolle von Meprinen in der Aufrechterhaltung physiologischer CD99-Proteinlevel schließen lässt. Das Western-Blot-Ergebnis wurde densitometrisch ausgewertet und zeigte statistische Signifikanz (Abb. 3.9C).

3.1.2.2. Meprin- β -Expression in Leukozyten und Endothelzellen

Ausgehend von dem Wissen, dass CD99 ein Schlüsselmolekül der TEM von Leukozyten ist und der Erkenntnis, dass Meprin β in einem Transmigrationsassay die TEM von murinen Krebszellen verstärkte (vgl. Abschn. 3.1.1.5), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Spaltung von CD99 durch Meprin β auch *in vivo* eine Rolle bei der Leukozyten-Extravasation während einer Entzündungsantwort spielt. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurde zuerst analysiert, ob Meprin β endogen in Leukozyten und Endothelzellen exprimiert wird.

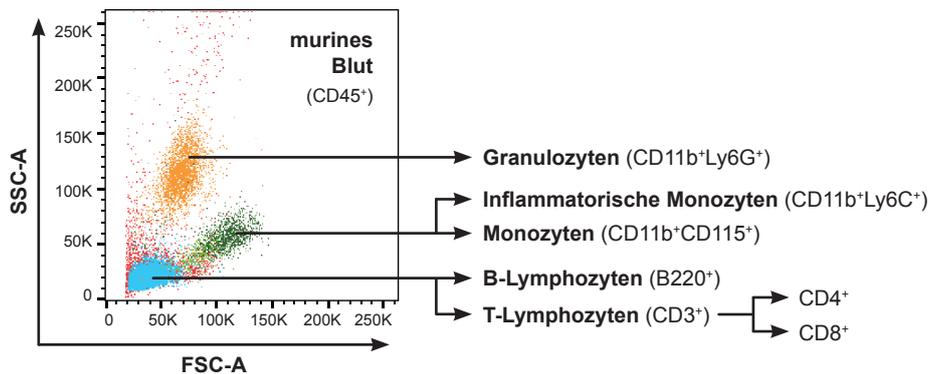


Abbildung 3.11.: Gating-Strategie für die Analyse von Leukozytenpopulationen murinen Blutes. Backgating CD45-positiver Zellen im FSC-A/SSC-A-Plot zur Validierung der Gating-Strategie. Es ist jeweils angegeben, welche Marker für die Identifizierung der einzelnen Leukozytenpopulationen aus murinem Blut verwendet wurden.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenexpression von Meprin β wurde zur Detektion ein Kaninchen-Blutserum mit polyklonalen Meprin- β -Antikörpern verwendet. Die Kaninchen waren zuvor mit der rekombinanten humanen Meprin- β -Ektodomäne immunisiert worden; der Antikörper wurde daher „hEcto1“ genannt. Zunächst wurde die Spezifität des Antikörpers validiert, indem NIH/3T3-Zellen (murine Fibroblasten) mit murinem Meprin β transfiziert wurden. Im Vergleich zu den untransfizierten Zellen konnte die verstärkte Meprin- β -Expression in den überexprimierenden Zellen mit dem hEcto1-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.10A). Weiterhin konnte in N2a-Zellen (murine Neuroblastom-Zelllinie) endogenes Meprin β nachgewiesen werden (Abb. 3.10B). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde hier als Primärantikörper das Präimmunserum desselben Tieres verwendet. Zwar bewirkte das Präimmunserum bereits eine Verstärkung des Signals im Vergleich zum Ansatz, in dem die Zellen nur mit Sekundärantikörper angefärbt wurden; doch war der Signalanstieg mit dem Immunserum nochmals deutlicher. Der hEcto1-Antikörper erlaubt also eine spezifische Detektion von murinem Meprin β , sofern das Präimmunserum als Negativkontrolle eingesetzt wird.

Es wurde dann murines Blut analysiert. Submandibulär wurde jeweils drei Mäusen der folgenden Genotypen Blut entnommen: Meprin α WT (*Mep1a*^{+/+}), Meprin α KO (*Mep1a*^{-/-}), Meprin β KO (*Mep1b*^{-/-}), Meprin α/β Doppel-KO (*Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}). Die mit Immunzellmarkern angefärbten Leukozyten wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie immunophänotypisiert (Abb. 3.11). Es wurde zwischen Granulozyten, Monozyten, inflammatorischen Monozyten, T-Lymphozyten (CD4⁺ sowie CD8⁺) und B-Lymphozyten unterschieden und sowohl die Meprin- β - als auch CD99-Expression sowie die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen quantifiziert (Abb. 3.12). Was die Meprin- β -Expression angeht, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt (Abb. 3.12, linke Spalte). Auf Granulozyten war eine Tendenz zu beobachten, dass in *Mep1b*^{-/-}-Mäusen tatsächlich weniger Meprin β zu finden ist – allerdings sind die Proteinlevel in *Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}-Mäusen wiederum vergleichbar mit denen der WT-Mäuse (*Mep1a*^{+/+}), obwohl

auch hier Meprin β fehlen sollte. Außerdem waren, mit Ausnahme der CD8⁺-T-Lymphozyten, keine deutlichen Signalunterschiede zwischen Präimmunserum- und hEcto1-gefärbten Zellen sichtbar, was entweder für eine geringe endogene Meprin- β -Expression spricht oder für eine nicht ausreichend sensitive Detektion mit dem hEcto1-Antikörper, der eigentlich gegen das humane Protein gerichtet ist. Die CD99-Expression war besser detektierbar: alle Populationen waren positiv für CD99, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 3.12, mittlere Spalte). In der Verteilung der Immunzellpopulationen zeigten sich folgende Zufallsbefunde: tendenziell hatten die *Mep1a*^{+/+}- und *Mep1b*^{-/-}-Mäuse sowie die *Mep1a*^{-/-}- und *Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}-Mäuse einen ähnlichen Immunzellphänotyp (Abb. 3.12, rechte Spalte). Bei der Stichprobengröße von $n = 3$ konnten zumeist nur Tendenzen ausgemacht werden; jedoch hatten *Mep1a*^{-/-}-Mäuse prozentual signifikant mehr B-Zellen und weniger inflammatorische Monozyten im peripheren Blut als *Mep1a*^{+/+}- und *Mep1b*^{-/-}-Mäuse. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf Meprin β , weswegen dieser Phänotyp nicht weiterverfolgt wurde.

3.1.2.3. Expressionsanalyse von Meprin β auf murinen Endothelzellen

Da unter *steady-state*-Konditionen nur wenig bis kein Meprin β und keine Unterschiede in der CD99-Expression auf Leukozyten detektiert werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Meprin β auf Endothelzellen, also der anderen an der TEM beteiligten Zellpopulation, exprimiert ist. Daher wurde die Expression von Meprin β auf bEnd.3-Zellen (murine Endothelzellen) bestimmt (Abb. 3.13A). Hier konnte endogene Meprin- β -Expression mit dem hEcto1-Antikörper nachgewiesen werden.

Um *in vivo* auf anderem Wege Unterschiede in der CD99-Expression zwischen den verschiedenen oben beschriebenen Mauslinien zu detektieren, wurden Mäusen die Lungen entnommen, daraus Organhomogenate hergestellt, murines CD99 mittels Western Blot detektiert und die Proteinlevel densitometrisch analysiert (Abb. 3.13B, C). Es wurde dabei davon ausgegangen, dass das detektierbare CD99 in diesem Fall nicht seinen Ursprung auf Leukozyten hat, sondern vor allem auf Endothelzellen der Lunge. Es zeigte sich tatsächlich eine signifikante Akkumulation von CD99 in den Lungen von *Mep1b*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *Mep1a*^{+/+}-Mäusen und eine noch stärkere Akkumulation in *Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}-Mäusen.

3.1.2.4. *Air-pouch*-Mausmodell als Simulation der akuten Entzündung

Um beurteilen zu können, ob Meprin β *in vivo* einen Einfluss auf die TEM von Leukozyten hat, wurde das *air-pouch*-Modell als Mausmodell einer akuten Entzündung herangezogen (Abb. 3.14). Mäusen wurde dorsal subkutan sterile Luft injiziert, sodass sich ein *air pouch* bildete. Dieser Pouch wurde nach drei Tagen mit steriler Luft reinjiziert. Am sechsten Tag wurde Carrageen in den Pouch gespritzt, das als Irritans eine Entzündungsreaktion und damit eine Einwanderung von Immunzellen hervorruft. Der Pouch wurde 24 h später eröffnet, mit sterilem PBS gespült und die

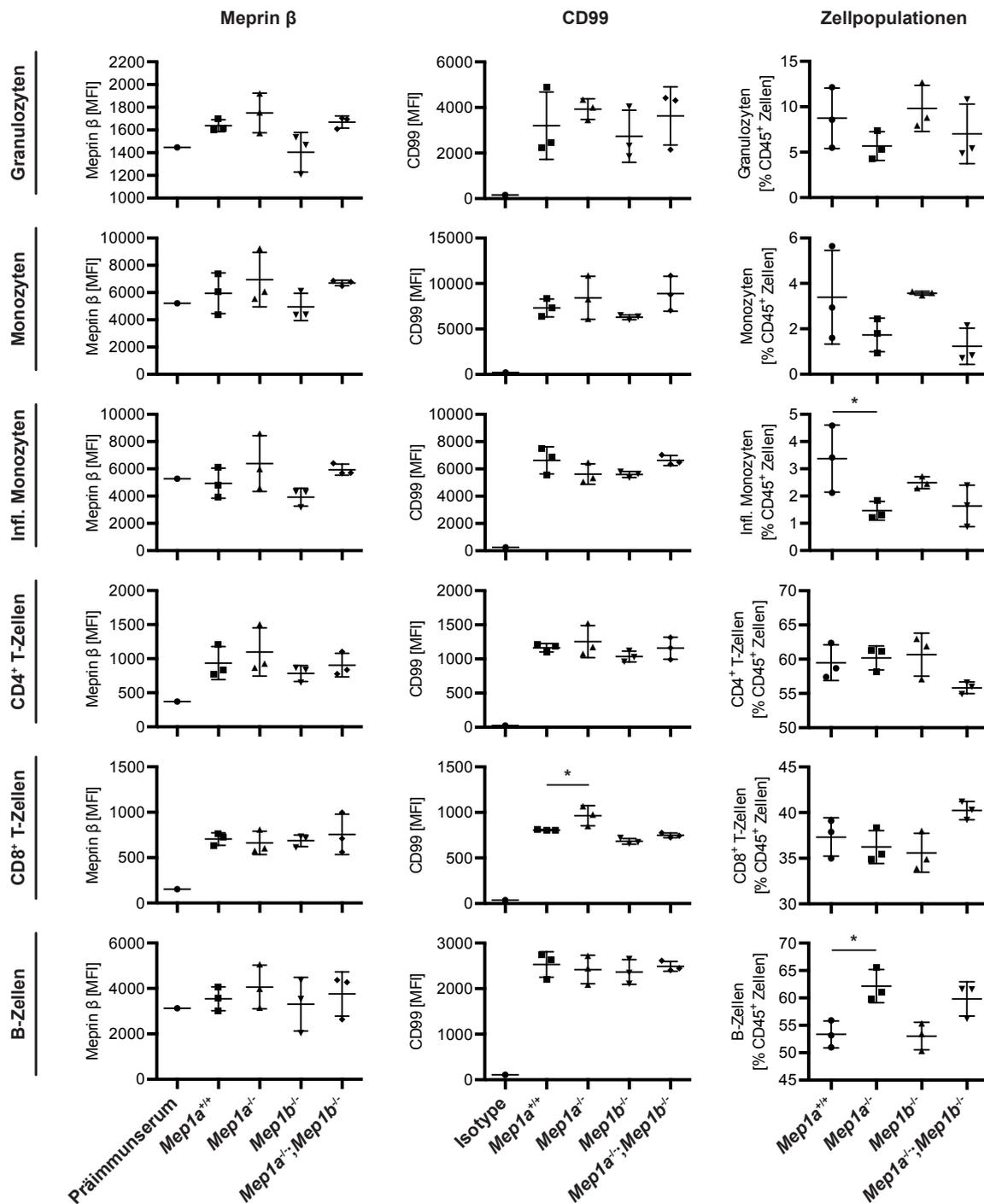


Abbildung 3.12.: Analyse der Meprin- β - und CD99-Expression verschiedener Leukozytenpopulationen im Blut von WT-, *Mep1a*^{-/-}-, *Mep1b*^{-/-}- und *Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}-Mäusen. Die endogene Meprin- β - sowie CD99-Expression wurde in den in Abb. 3.11 definierten Zellpopulationen des peripheren Blutes von jeweils drei Mäusen der angegebenen Genotypen durchflusszytometrisch analysiert und anhand der *median fluorescence intensity* (MFI) quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten jeweils Zellen, die als Primärantikörper mit dem entsprechenden Präimmunsersum inkubiert wurden. Ein spezifischer Nachweis endogener Meprin- β -Expression im entsprechenden Genotypenvergleich gelang mit dem hEcto1-Antikörper nicht. CD99-Expression war auf allen Populationen detektierbar, jedoch ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (Ausnahme: CD99-Akkumulation in CD8⁺-T-Zellen in *Mep1a*^{-/-}-Mäusen). ANOVA, * $p < 0,05$.

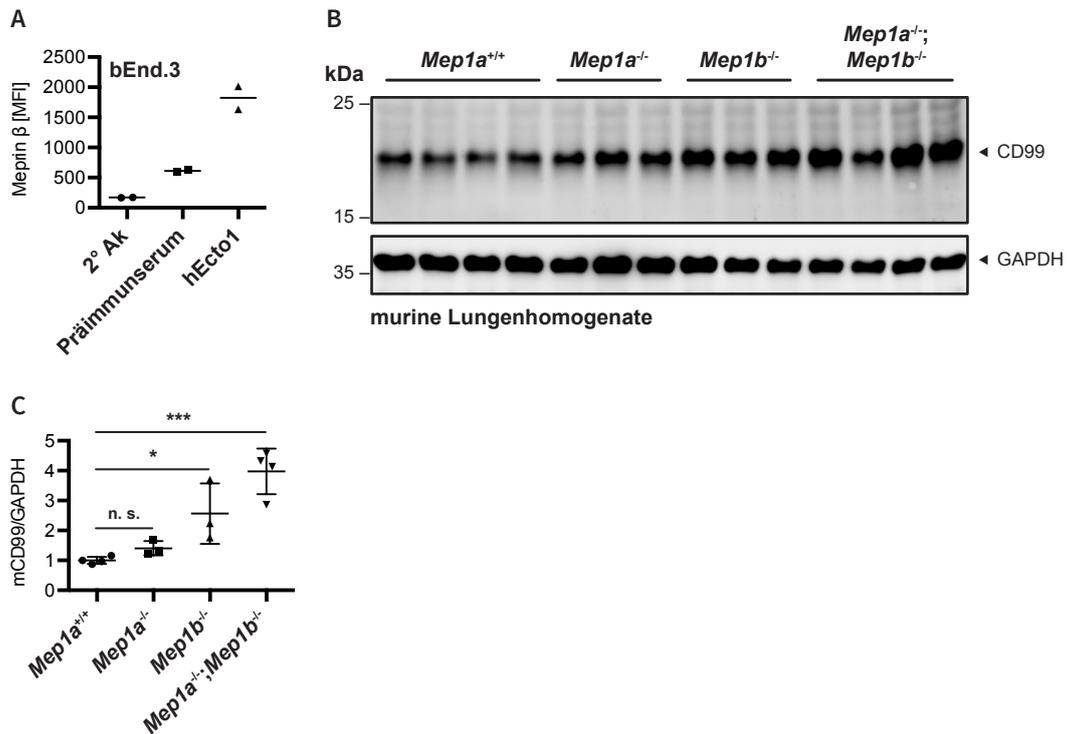


Abbildung 3.13.: Meprin β ist auf murinen Endothelzellen exprimiert und akkumuliert in den Lungen von Mäusen mit *Mep1b*^{-/-}- und *Mep1a*^{-/-}; *Mep1b*^{-/-}-Genotyp. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Meprin-β-Expression muriner bEnd.3-Zellen. Es konnte eine endogene Expression von Meprin β mit dem polyklonalen hEcto1-Antikörper nachgewiesen werden. Färbungen mit dem Sekundärantikörper allein sowie mit dem entsprechenden Präimmunserum dienen als Negativkontrollen. Die Daten zeigen den Durchschnitt der *median fluorescence intensity* (MFI) zweier biologischer Replikate aus einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Western Blot muriner Lungenhomogenate von drei bzw. vier Tieren der angegebenen Genotypen mit spezifischer Detektion von murinem CD99. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(C)** Quantifizierung des Western Blots aus (B). Die Bandenintensitäten wurden mit ImageJ quantifiziert und sind im Verhältnis zur Ladekontrolle (GAPDH), normalisiert auf die Proben des *Mep1a*^{+/+}-Genotyps, angegeben. Es zeigte sich eine Akkumulation von CD99 in den Lungen der Genotypen *Mep1b*^{-/-} und *Mep1a*^{-/-}; *Mep1b*^{-/-}. ANOVA, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Spülflüssigkeit wurde zur weiteren Analyse gewonnen. Den Mäusen wurde außerdem submandibulär Blut entnommen. Die in den Pouch eingewanderten Zellen wurden gezählt und anschließend, ebenso wie die Blutzellen, mit Immunzellmarkern gefärbt, um eine spätere Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie zu ermöglichen. So konnten Granulozyten, Monozyten und inflammatorische Monozyten differenziert werden.

Es wurden *Mep1b*^{+/+}- und *Mep1b*^{-/-}-Mäuse verglichen (Abb. 3.15). In *Mep1b*^{-/-}-Mäusen war die Zahl der eingewanderten Zellen signifikant geringer als in *Mep1b*^{+/+}-Mäusen (Abb. 3.15A). Dementsprechend waren auch die Granulozyten im Pouch der *Mep1b*^{-/-}-Mäuse signifikant erniedrigt, die Monozyten tendenziell erniedrigt, die Zahl der inflammatorischen Monozyten war vergleichbar mit der der *Mep1b*^{+/+}-Mäuse (Abb. 3.15B). Die Zellpopulationen im Blut waren unverändert (Abb. 3.15C). Die CD99-Level waren stets vergleichbar zwischen den Genotypen mit zwei Ausnahmen: im Pouch gab es eine signifikante CD99-Akkumulation auf Monozyten in *Mep1b*^{-/-}-Tieren, im Blut gab es

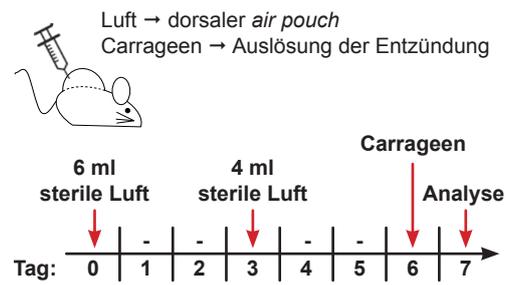


Abbildung 3.14.: Versuchsdesign des *Air-pouch*-Mausmodells. Mäusen der Genotypen *Mep1b*^{+/+} und *Mep1b*^{-/-} wurde an Tag 0 dorsal sterile Luft injiziert und somit ein *air pouch* generiert. Dieser wurde an Tag 3 erneut mit steriler Luft befüllt und an Tag 6 wurde Carrageen als Entzündungsinduktor injiziert. An Tag 7 wurden die Mäuse getötet und peripheres Blut sowie Pouchflüssigkeit zur weiteren Analyse entnommen.

eine signifikante Reduktion von CD99 auf inflammatorischen Monozyten in *Mep1b*^{-/-}-Tieren.

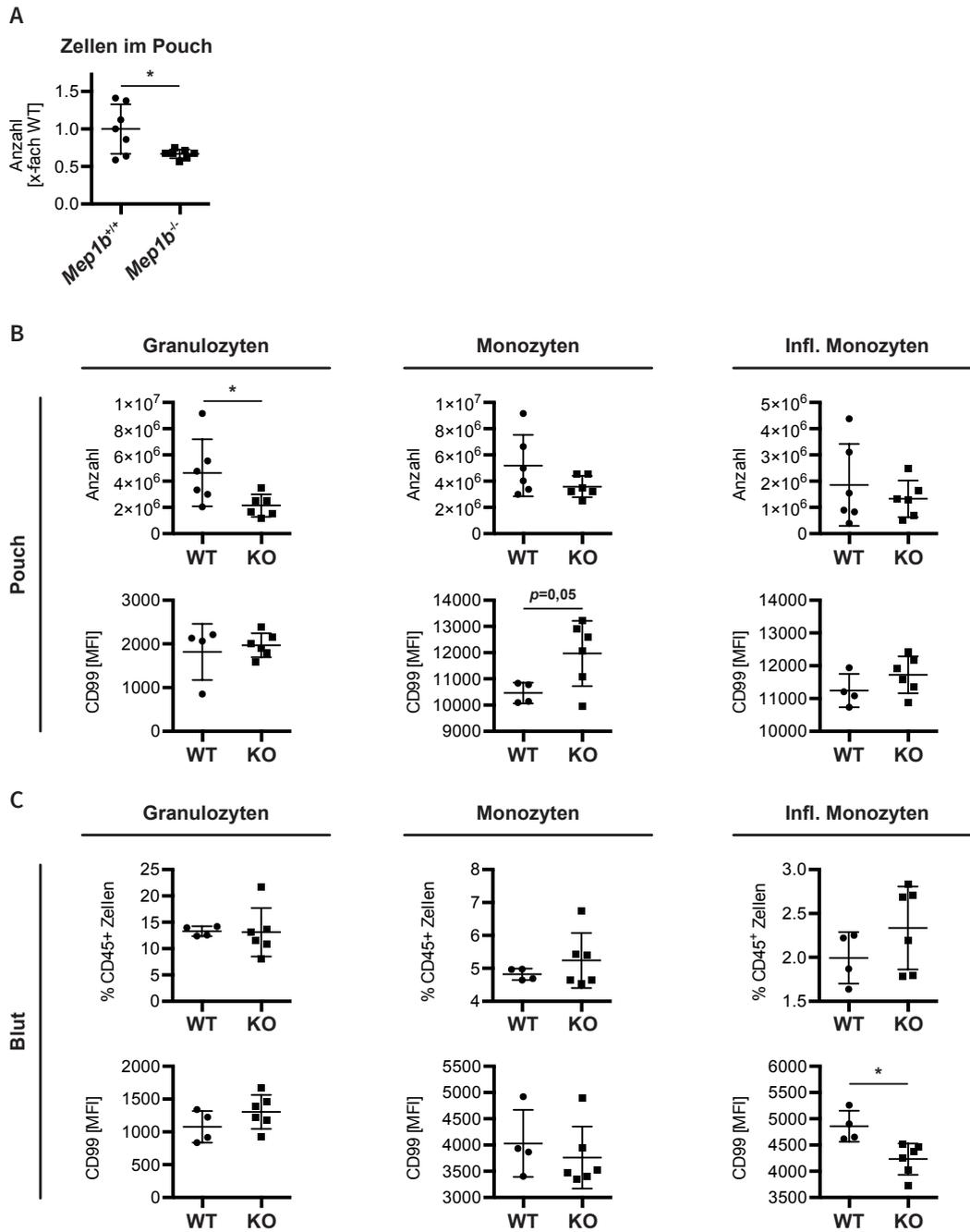


Abbildung 3.15.: Verminderte Zellinvasion in *Mep1b*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *Mep1b*^{+/+}-Mäusen im *air-pouch*-Mausmodell. (A) Vergleich der Gesamtzellzahl im Pouch 24 h nach Entzündungsinduktion, normalisiert auf den *Mep1b*^{+/+} (Wildtyp (WT))-Genotyp. Mäuse mit *Mep1b*^{-/-} (Knockout (KO))-Genotyp hatten eine verminderte Gesamtzellzahl im Pouch. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt \pm Standardabweichung von jeweils insgesamt sieben Versuchstieren der angegebenen Genotypen, gesammelt aus zwei unabhängigen Versuchen. *t*-Test; * $p < 0,05$. (B) Durchflusszytometrische Analyse der in den Pouch eingewanderten Zellen nach Subpopulation (obere Reihe) und Analyse der CD99-Oberflächenexpression auf den jeweiligen Subpopulationen (untere Reihe). Im Vergleich zur Pouchflüssigkeit der WT-Tiere sind in den Pouch der KO-Tiere weniger Granulozyten eingewandert, während die Anzahl der Monozyten und inflammatorischen Monozyten sich nicht unterschied. CD99 akkumulierte in den KO-Tieren auf Monozyten tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant. MFI: *median fluorescence intensity*. (C) Gleiche Analyse wie in (B), jedoch im peripheren Blut. Als einzig statistisch signifikante Veränderung wurde eine Verminderung des CD99-Expressionsniveaus in inflammatorischen Monozyten in den KO-Tieren festgestellt.

3.2. Charakterisierung von zwei Krebs-assoziierten CD99-Varianten

3.2.1. Identifizierung von zwei Krebs-assoziierten Mutationen im CD99-Gen

Der *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC) ist eine Online-Datenbank (cancer.sanger.ac.uk), in der somatische Mutationen aus sequenzierten humanen Tumorbiosaten hinterlegt sind (FORBES et al. 2015). Für *CD99* lassen sich dort 145 Mutationen finden, für *MEP1B* 305 (Stand: 04.04.2020). Von besonderem Interesse waren jedoch zwei Punktmutationen im *CD99*-Gen, nämlich c. 274G>C (#COSM756418) und c. 274G>T (#COSM6118228): diese beiden Punktmutationen in Exon 6 sind nicht-synonym und führen zu einem Aminosäureaustausch von Asp92 zu His92 (D92H) bzw. zu Tyr92 (D92Y) und betreffen damit genau die Aminosäure, an der Meprin β CD99 spaltet, um das CTF II zu generieren (Abb. 3.16). Beide Mutationen wurden in Lungenkarzinombiosaten, genauer in einem Plattenepithelkarzinom eines 66-jährigen männlichen Patienten (D92H) sowie in einem Adenokarzinom eines 70-jährigen männlichen Patienten (D92Y), identifiziert. Vor dem Hintergrund, dass Meprine ihre Substrate präferenziell N-terminal von sauren Aminosäuren und insbesondere Aspartat spalten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust des Asp92 die Prozessierung von CD99 durch Meprin β und dadurch auch die weitere Prozessierung durch die γ -Sekretase verändert. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine nicht-synonyme Mutation einen Effekt auf die Struktur bzw. Funktion eines Proteins hat, kann mit Hilfe des PolyPhen-2-Scores objektiviert werden (ADZHUBEI et al. 2010). Für beide Varianten ergab sich mit dieser bioinformatischen Methode ein Score von 0,999 und damit eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation eine funktionelle Konsequenz hat.

3.2.2. *In-vitro*-Analyse der Spaltung der CD99-Varianten

3.2.2.1. Peptidverdau durch rekombinantes Meprin β und Bestimmung der Spaltstelle

Es wurde mit einem *in-vitro*-Verdau von CD99 durch Meprin β begonnen, um den Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Spaltung exakt ermitteln zu können. Dazu wurden synthetisch hergestellte Peptide mit einer Länge von 18 Aminosäuren benutzt, die die Region um die Spaltstelle Asp92 herum repräsentieren (Ser86-Glu103) und entweder die WT-Aminosäure oder die mutierte Aminosäure in Position 92 enthielten (Abb. 3.17A). Jedes Peptid wurde für eine Stunde mit rekombinantem Meprin β verdaut und die Peptidlösung anschließend im Vergleich mit einem Kontrollansatz ohne Proteasezugabe mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. Im Kontrollansatz eluierten dabei als einzige Fraktion die FL-Peptide (Abb. 3.17A, roter Graph). In den Meprin- β -behandelten Ansätzen eluierten mehrere Fraktionen (Abb. 3.17A, schwarzer Graph). Diese Fraktionen repräsentieren Peptidfragmente und zeigen, dass alle drei Peptide von Meprin β gespalten wurden. Für jedes Peptid war eine deutliche Reduktion des Ursprungspeaks erkennbar, während unter den neu entstandenen Peaks jeweils einer prominent herausstand und damit die Verwendung einer bevorzugten Spaltstelle

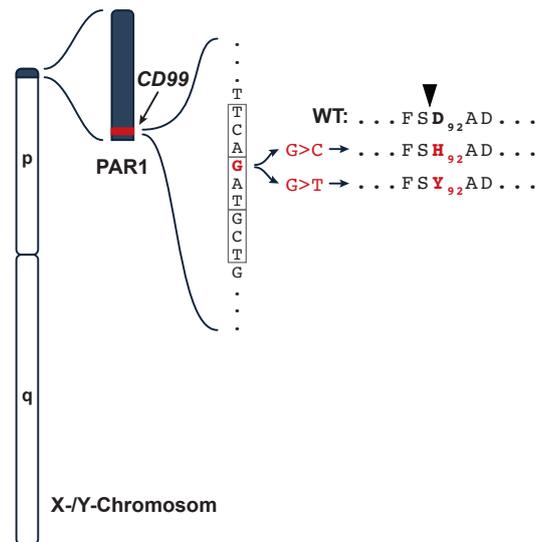
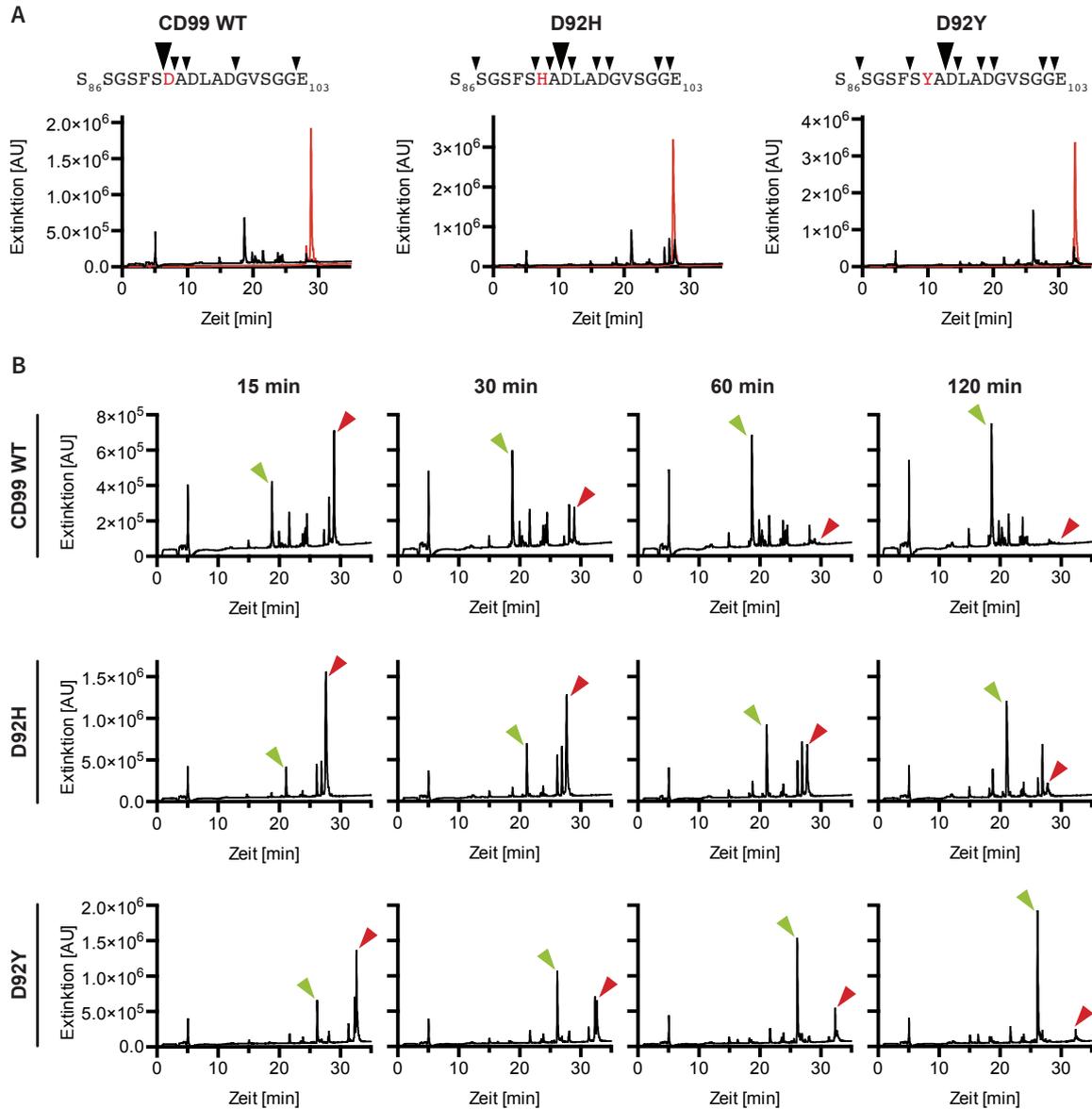


Abbildung 3.16.: Zwei Krebs-assoziierte Mutationen im CD99-Gen führen zum Aminosäureaustausch an Position Asp92. Das humane CD99-Gen ist in der pseudoautosomalen Region (PAR) 1 des distalen Endes des kurzen Arms der Gonosomen lokalisiert. Die Mutationen c. 274G>C und c. 274G>T im *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC) aus Lungenkarzinombiopsaten führen zu den Proteinvarianten p.D92H und p.D92Y und damit zur Veränderung der Meprin- β -Spaltstelle (Pfeilspitze) mit Asp92 in P1'-Position (Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER 1967). p: kurzer Arm; q: langer Arm; WT: Wildtyp.

innerhalb der Peptidsequenz anzeigt (vgl. Abb. 3.17B, grüne Pfeilspitzen). Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden in separaten Gefäßen aufgefangen für eine anschließende Identifizierung der neu entstandenen N-Termini mittels MALDI-TOF MS (Prof. A. Tholey, Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomics und Bioanalytik, Christian-Albrechts-Universität Kiel; Abb. 3.18). Für das WT-Peptid wurden in der Fraktion, die dem prominenten Peak entspricht, Peptide gefunden, die einer Spaltung an Asp92 entsprechen (Tab. A.1; Abb. 3.17A, große Pfeilspitze). In den anderen Fraktionen wurden weitere Peptide gefunden, die durch Spaltung an anderen Aminosäuren, meist Asp oder Glu, entstanden sind (Abb. 3.17A, kleine Pfeilspitzen). Das D92H-Peptid wurde zwar noch an His92 gespalten, hier deuteten die Peptide in der prominenten Elutionsfraktion und die anschließende MALDI-Analyse jedoch auf eine Verschiebung der bevorzugten Spaltstelle von His92 zu Asp94 hin (Tab. A.2). Insgesamt wurden hier mehr Spaltstellen identifiziert als beim WT-Peptid. Beim D92Y-Peptid wurde die Spaltstelle Tyr92 nicht mehr genutzt. Wie beim D92H-Peptid wurde hier bevorzugt an einem anderen Asp-Aminosäurerest an Position 94, also zwei Aminosäuren weiter C-terminal, gespalten (Tab. A.3).

3.2.2.2. Reaktionskinetik der Peptidspaltung durch rekombinantes Meprin β

Darüber hinaus wurde der zeitliche Verlauf der Peptidspaltung untersucht (Abb. 3.17B). Die Peptide wurden wieder mit rekombinantem Meprin β inkubiert; die Enzymreaktion wurde nach 15 min, 30 min, 60 min bzw. 120 min durch Zugabe von 0,1 % Trifluoressigsäure gestoppt und die Peptid-



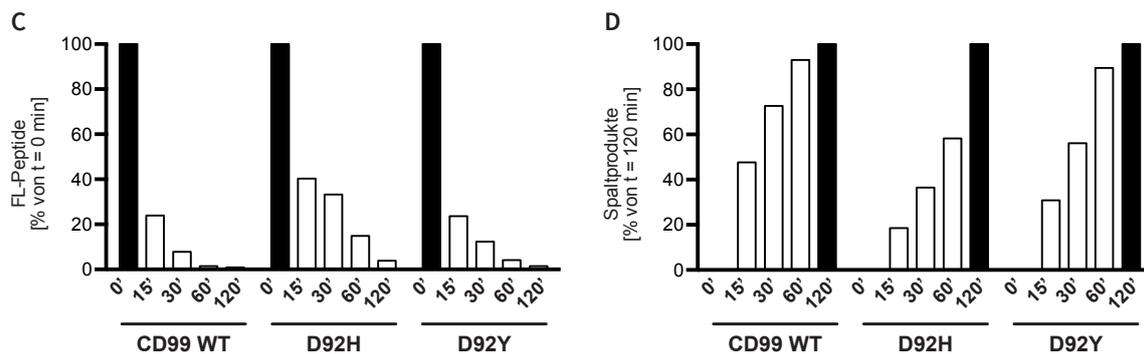


Abbildung 3.17.: Peptidverdau von CD99 und der CD99-Varianten durch rekombinantes Mepriin β *in vitro* (fortgeführt). (C) Quantifizierung der in (B) mit roter Pfeilspitze angezeigten Fraktionen. Gezeigt ist die jeweilige *area under the curve* (AUC), jeweils normalisiert auf den Zeitpunkt $t = 0$. Das D92H-Peptid wurde langsamer prozessiert als das Wildtyp (WT)- und D92Y-Peptid. (D) Quantifizierung der mit grüner Pfeilspitze markierten Fraktionen aus (B), analog zu (C) und normalisiert auf den Zeitpunkt $t = 120$ min.

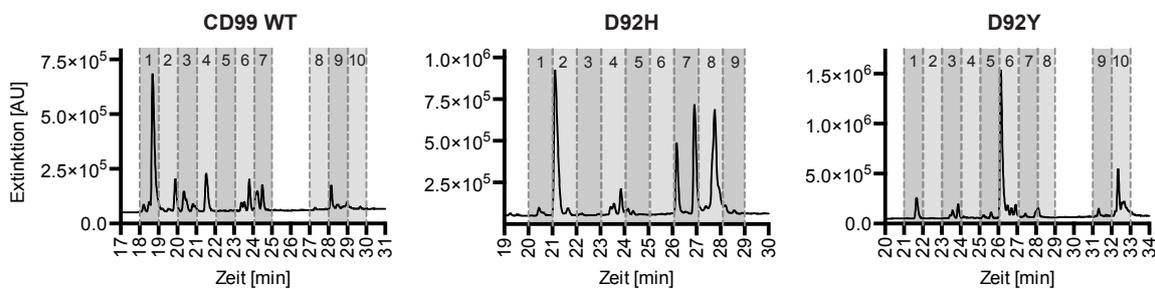


Abbildung 3.18.: Probengewinnung zur Bestimmung der CD99-Peptidspaltstellen *in vitro*. *high-performance liquid chromatography* (HPLC)-Chromatogramme analog zu Abb. 3.17A (schwarze Linie). Bei diesem Versuch wurden jedoch die einzelnen den Peaks entsprechenden Elutionsfraktionen (grau hinterlegt und nummeriert) aufgesammelt zur weiteren massenspektrometischen Peptidanalyse (s. Daten in Tab. A.1, Tab. A.2 und Tab. A.3). AU: *arbitrary unit*.

lösung dann erneut chromatographisch untersucht. In dieser Kinetik war deutlich zu erkennen, dass die Peaks im Chromatogramm, die das FL-Peptid repräsentieren, allmählich abnahmen (rote Pfeilspitzen); auf der anderen Seite nahmen die Peaks, die die Hauptspaltprodukte repräsentieren, mit der Zeit zu (grüne Pfeilspitzen). Das Integral dieser Peaks wurde zur Quantifizierung benutzt, um die zeitabhängige Abnahme des FL-Peaks (Abb. 3.17C) bzw. die zeitabhängige Zunahme des Spaltproduktpeaks (Abb. 3.17D) darzustellen. Interessanterweise führte der Aminosäureaustausch von Asp zu His im D92H-Peptid zu einer veränderten Kinetik. Das Peptid wurde langsamer prozessiert als das WT-Peptid; nach 15 min betrug das Peptid-Integral noch 40 % vom Ausgangswert, während das Integral des WT-Peptides schon auf 24 % reduziert war (Abb. 3.17C). Nach 30 min war der Unterschied noch markanter: 33 % (D92H) im Vergleich zu 8 % (WT). Die Quantifizierung des Anstiegs des Spaltprodukt-Peaks zeigt ebenfalls die langsamere Prozessierung des D92H-Peptides (Abb. 3.17D). Das D92Y-Peptid zeigte eine ähnliche Reaktionskinetik wie das WT-Peptid.

3.2.3. *In-cellula*-Analyse der Spaltung der CD99-Varianten

3.2.3.1. Prozessierung durch Meprin β

Nach der *in-vitro*-Analyse der Peptidspaltung sollte die Prozessierung der CD99-Varianten durch Meprin β im Vergleich zu CD99 WT in einem zellulären System untersucht werden. Für jede CD99-Variante wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt. Dabei wurde in das Plasmid am 3'-Ende von der CD99 *coding DNA sequence* (CDS) ein myc/FLAG-tag inkloniert, um die Detektion der durch die Spaltung entstehenden CTF zu erleichtern.

HeLa-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert, teilweise in Kotransfektion mit Meprin β , und die Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.19). Im Zellysate wurden stets zwei CD99-Formen detektiert, die zwei distinkten Banden im Western Blot entsprachen: eine kräftige obere Bande bei ca. 36 kDa und eine schwächere untere Bande bei ca. 32 kDa. Es wurde davon ausgegangen, dass die obere Bande dem vollständig glykosylierten, korrekt gefalteten, membranständigen Protein entspricht und die untere Bande einer intrazellulären, nicht- oder teilweise glykosylierten Form auf dem sekretorischen Weg. Bei Überexpression der beiden Varianten ergab sich jedoch ein anderes Muster: im Fall der D92H-Variante erschien eine weitere Bande bei ca. 29 kDa, im Fall der D92Y-Variante erschien eine zusätzliche Bande bei ca. 28 kDa. Außerdem war nicht mehr die oberste Bande die mit der höchsten Signalintensität, sondern die mittlere. Bei ca. 25 kDa war ein CTF detektierbar, genannt CTF I. Die Zugabe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT führte bereits in den Einzeltransfektionsansätzen zu Akkumulation eines CTFs bei ca. 18 kDa. Diese beiden CTFs deuten also bereits auf endogene Spaltung von CD99 in HeLa-Zellen hin. Bei Kotransfektion von Meprin β war in allen drei Fällen eine Zunahme der Signalintensität von CTF I zu beobachten und außerdem das Hinzukommen eines neuen CTFs bei ca. 20 kDa, genannt CTF II. Dieses akkumulierte in allen Fällen bei Zugabe von DAPT. CTF I zeigte diese Akkumulation nicht. Bei beiden Varianten waren die beiden kleineren CTFs bei ca. 18 kDa und 20 kDa in der Einzeltransfektion deutlicher zu erkennen als das CTF I bei ca. 25 kDa, womit sie sich von CD99 WT unterscheiden. Außerdem unterschieden sich die Banden des CTF I bei Kotransfektion mit Meprin β deutlich: während dieses CTF bei CD99 WT als scharfe Bande bei ca. 25 kDa zu detektieren war, zeigte sich bei den Varianten, für D92H noch stärker ausgeprägt als für D92Y, ein unscharfes Signal über einen breiteren Molekulargewichtsbereich von ca. 22–26 kDa.

3.2.3.2. Bestimmung der Spaltstelle

Die *in vitro* identifizierte Verschiebung der Spaltstelle im Fall der beiden Varianten um zwei Aminosäuren sorgt theoretisch für eine Erniedrigung des Molekulargewichtes von CTF II, welche jedoch zu gering für eine Detektion im Western Blot ist. Es wurde daher die genaue Spaltstelle auch *in cellula* identifiziert. HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und mit DAPT behandelt, um eine Akkumulation des CTF II zu erreichen. Aus dem Zellysate wurden sämtliche CD99-Fragmente

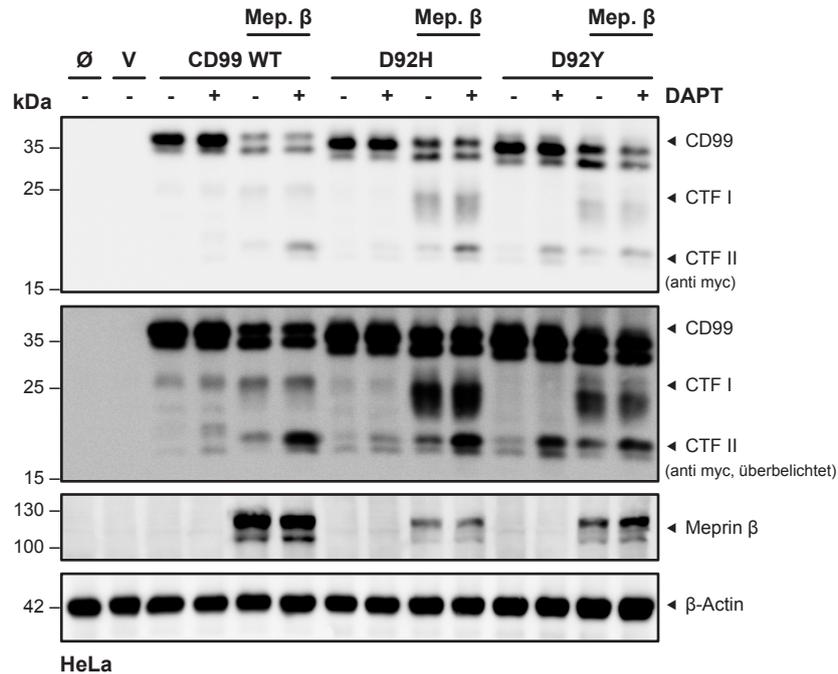


Abbildung 3.19.: Spaltung von CD99 WT, D92H und D92Y durch Mep. β *in cellula*. Western Blot von HeLa-Zelllysaten nach Transfektion mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- bzw. D92Y-myc/FLAG und Mep. β. Die Varianten D92H und D92Y zeigten in der Einzeltransfektion ein verändertes Bandenmuster. Alle drei Proteinvarianten wurden von Mep. β gespalten unter Entstehung der C-terminalen Fragmente (CTF) I und II. Durch Zugabe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT akkumulierte das CTF II mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa. β -Actin diente als Ladekontrolle. V: Leervektor.

über das C-terminale FLAG-Epitop immunpräzipitiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt und die CTF II ausgeschnitten zur anschließenden LC-ESI Tandem-MS (Abb. 3.20A). Die erfolgreiche Immunpräzipitation wurde per Western Blot kontrolliert (Abb. 3.20B). Es konnten keine an Position Asp92 dimethylierten Peptide identifiziert werden, was gegen eine Spaltung an dieser Stelle spricht (Abb. 3.20C). Jedoch konnte durch manuelle Analyse der massenspektrometrischen Daten das Peptid 93A .D*LADGVSGGEGK*GGSDGGGSHR identifiziert werden, wobei der Punkt für die Spaltstelle und die Sternchen für dimethylierte Aminosäuren stehen (Tandem-MS-Daten nicht gezeigt). Dies spricht analog zu CD99 WT für eine Mep. β-vermittelte Spaltung von D92H und D92Y zwischen Ala93 und Asp94.

3.2.3.3. Prozessierung durch endogenes Mep. β in COLO-320-Zellen

Die Zelllinie COLO 320 ist aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom isoliert worden und weist eine hohe endogene Expression von Mep. β auf. Diese Zelllinie wurde benutzt, um die Spaltung der CD99-Varianten durch endogenes Mep. β zu analysieren. So werden mögliche Unterschiede in der Spaltung nicht durch Mep. β-Überexpressionsartefakte verzerrt. Die Zellen wurden mit den CD99-Konstrukten transfiziert, mit dem Mep. β-Inhibitor Actinonin behandelt und die Zelllysate wurden dann per Western Blot analysiert (Abb. 3.21A). Auch in dieser Zell-

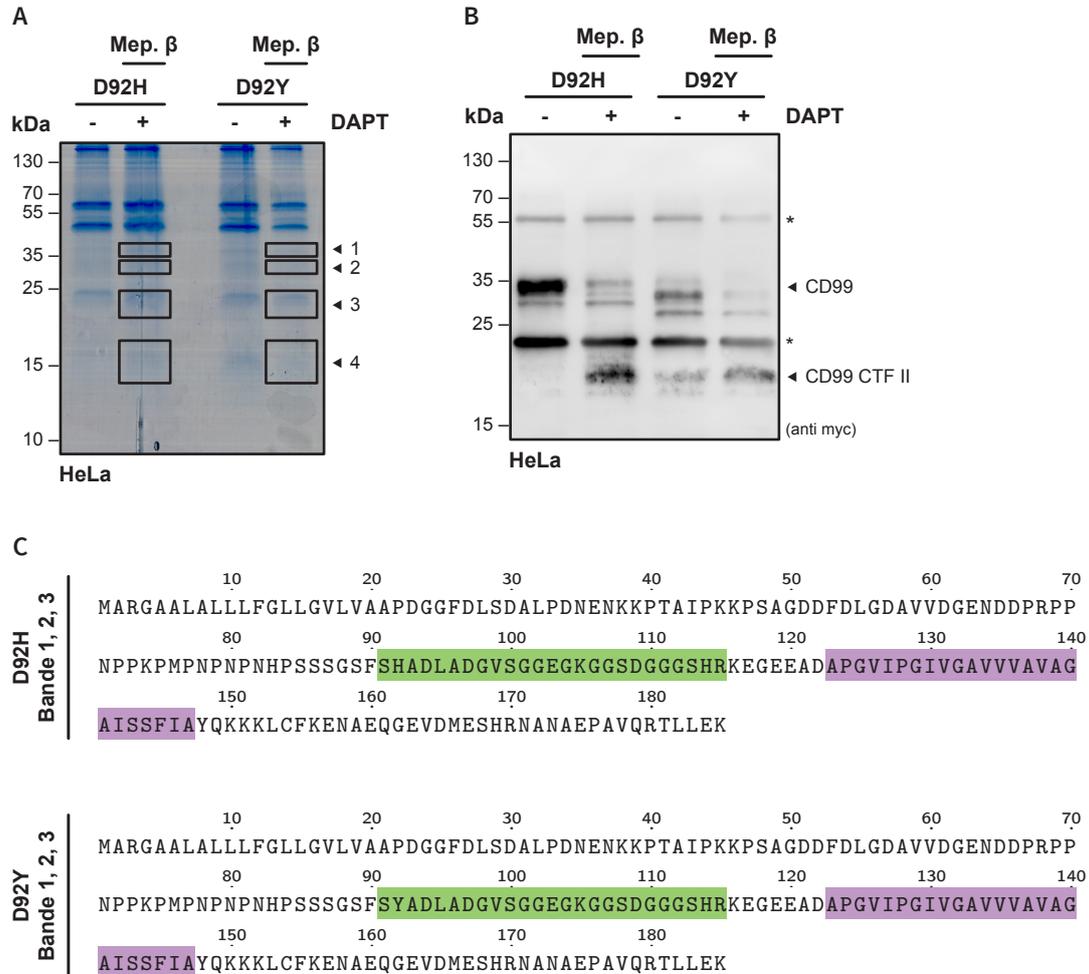


Abbildung 3.20.: Bestimmung der Meprin- β -Spaltstelle der CD99-Varianten D92H und D92Y *in cellula*. (A) Coomassie-gefärbtes Gel nach SDS-PAGE analog zu Abb. 3.1A. (B) Western Blot derselben Proben aus (A) zur Kontrolle der Immunpräzipitation analog zu Abb. 3.1B. (C) Identifizierte Peptide aus den Proben aus (A) analog zu Abb. 3.1C. In den Bereichen 1–3 wurden keine N-terminal dimethylierten Peptide identifiziert, d. h. eine Spaltung an Position Asp92 fand nicht statt. Eine manuelle Analyse der massenspektrometrischen Daten der Peptide aus Gelbereich 4 konnte jedoch eine Spaltung zwischen Ala93 und Asp94 nachweisen (Tandem-Massenspektrometrie (MS)-Daten nicht gezeigt; vgl. Text).

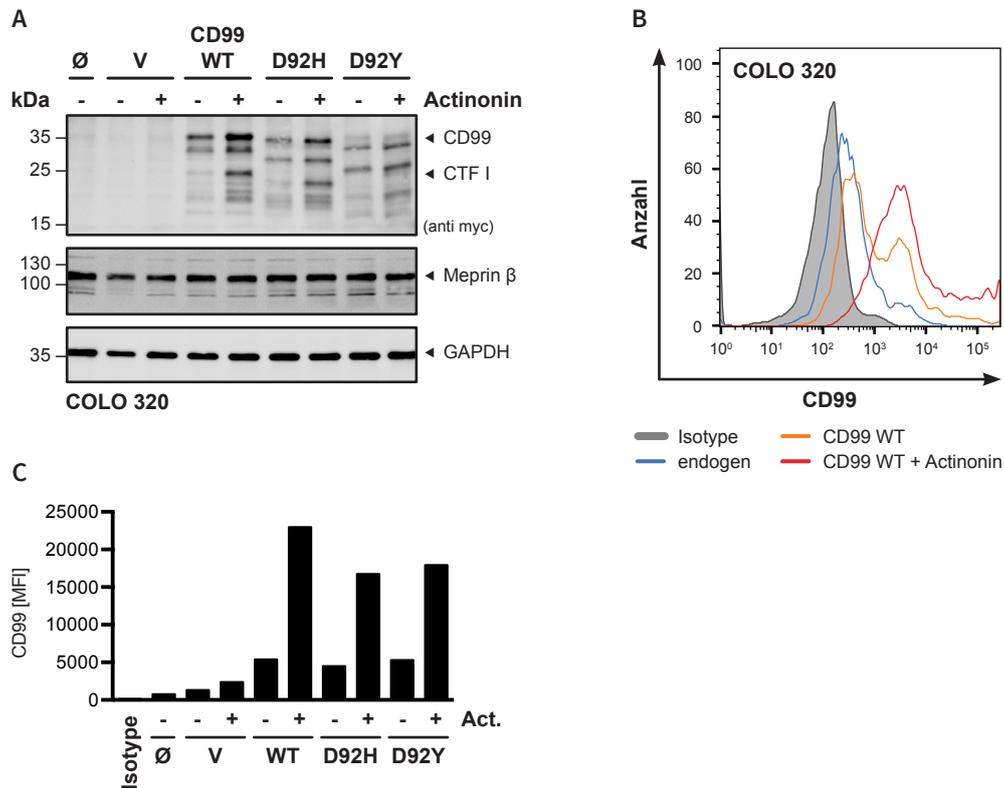


Abbildung 3.21.: Spaltung der CD99-Varianten durch endogenes Meprin β in COLO-320-Zellen. (A) Western Blot von COLO-320-Zelllysaten nach Transfektion mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- und D92Y-myc/FLAG und Behandlung mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin (50 μ M). Die Inhibitor-Applikation führte zu einer Akkumulation von CD99. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Durchflusszytometrie der Proben aus (A). Gezeigt sind exemplarisch die Daten für CD99 WT. Die Zugabe von Actinonin führte zum Anstieg der CD99-Oberflächenexpression (rote Linie) im Vergleich zur unbehandelten Probe (orange Linie). Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit einem Antikörper gleichen Isotyps (IgG2a; grau hinterlegt). (C) Quantifikation von (B) mittels *median fluorescence intensity* (MFI). Auch für die Varianten D92H und D92Y wurde ein Anstieg des Signals durch Gabe von Actinonin beobachtet, was für eine endogene Meprin- β -Spaltung spricht.

linie war das veränderte Bandenmuster der beiden Varianten erkennbar. Die Behandlung mit Actinonin führte dazu, dass das FL-Protein akkumulierte. Auch das CTF I akkumulierte. Beide Akkumulationen sind bei CD99 WT am besten erkennbar. Um die Akkumulation, und damit die endogene Spaltung, auch für die beiden Varianten zu demonstrieren und zu quantifizieren, wurde die CD99-Oberflächenexpression von transfizierten und Actinonin-behandelten COLO-320-Zellen auch mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.21B, C). Im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen zeigten Zellen, die mit CD99 transfiziert worden waren, ein stärkeres Signal. Dieses konnte nochmals deutlich gesteigert werden durch die Zugabe von Actinonin. Die Akkumulation konnte so für alle drei Proteinvarianten gezeigt werden, auch wenn sie für CD99 WT am ausgeprägtesten war (Abb. 3.21C).

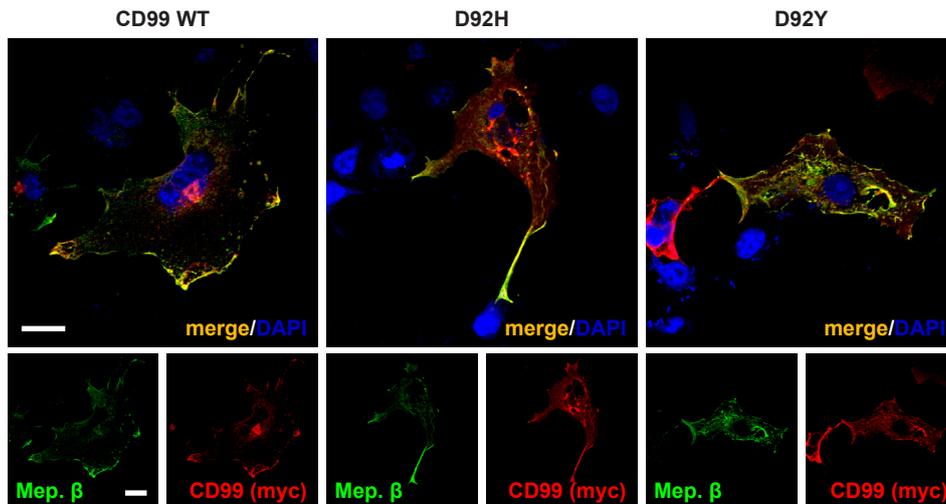


Abbildung 3.22.: Kolokalisation der CD99-Varianten mit Meprin β . Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von COS-7-Zellen, die zuvor mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- und D92Y-myc/FLAG und Meprin β transfiziert wurden. Das obere Bild entspricht jeweils der Fusion der beiden unteren Einzelfärbungen mit Kernfärbung mittels DAPI. Alle Varianten kolokalisierten mit Meprin β an der Zelloberfläche. Weißer Balken: 20 μ m.

3.2.3.4. Analyse der subzellulären Lokalisation

CD99 und Meprin β wurden in COS-7-Zellen transient überexprimiert, mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert und ihre subzelluläre Lokalisation mikroskopisch untersucht, um eine genauere Aussage über den Ort der Interaktion treffen zu können (Abb. 3.22). Sowohl CD99 WT als auch beide Varianten kolokalisierten mit Meprin β und zeigten die stärkste Kolokalisation an der Zelloberfläche.

3.2.3.5. Zelloberflächenproteinbiotinylierung

Um das Ergebnis der Fluoreszenz-Mikroskopie zu bestätigen und um weiterhin zu untersuchen, ob auch die Proteolyse von CD99 durch Meprin β an der Zelloberfläche stattfindet, wurde eine Zelloberflächenproteinbiotinylierung durchgeführt (Abb. 3.23). COS-7-Zellen wurden transient transfiziert und vor der Ernte wurden alle Zelloberflächenproteine bei 4 °C mit Biotin markiert. Nach der Zellernte und -lyse wurde eine Transfektionskontrolle abgenommen (Abb. 3.23, oberer Teil) und aus dem restlichen Lysat wurden die markierten Zelloberflächenproteine mit Hilfe von Streptavidin-Beads präzipitiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschschriffe entfernt und die präzipitierten Proteine wurden mittels Western Blot analysiert. Meprin β konnte wie erwartet an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Auch das FL-CD99-Protein war in der präzipitierten Fraktion detektierbar. Interessanterweise wurden die CD99-Banden zwischen 25 und 34 kDa, die in der Lysatkontrolle zu erkennen sind, im Fall von CD99 WT und D92H nicht detektiert. Das deutet darauf hin, dass diese Banden intrazelluläre Vorläufer-Proteinformen repräsentieren und dass tatsächlich nur die oberste Bande zellmembranständig ist. Im Fall der D92Y-Variante war eine

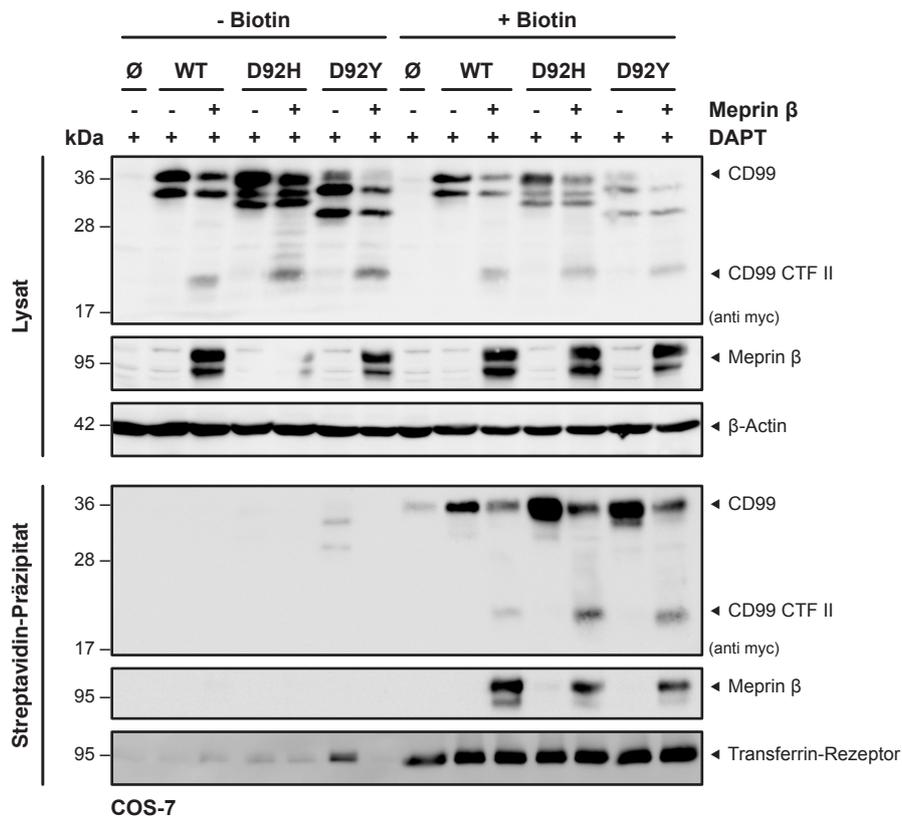


Abbildung 3.23.: Die Spaltung der CD99-Varianten durch Meprin β findet an der Zelloberfläche statt. Western Blot von COS-7-Zelllysaten. Die Zellen wurden mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- und D92Y-myc/FLAG und Meprin β transfiziert und mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt. Nach Inkubation der Zellen mit Biotin (rechte Hälfte) wurden die Zellen lysiert. Ein Teil der Proben diente als Kontrolle (obere drei Blots), in den restlichen Lysaten wurden die Zelloberflächenproteine vor der Western-Blot-Analyse mittels Streptavidin präzipitiert (untere drei Blots). Als Negativkontrolle diente ein Teil der Zellen, der vorher nicht mit Biotin inkubiert worden war (linke Hälfte). β -Actin diente als Ladekontrolle. Der Transferrin-Rezeptor diente dem Nachweis der erfolgreichen Streptavidin-Präzipitation. Für alle drei CD99-Varianten wurde eine *full-length* (FL)-Proteinform sowie das C-terminale Fragment (CTF) II an der Zelloberfläche nachgewiesen.

weitere Bande bei ca. 32 kDa an der Zelloberfläche detektierbar. Im Gegensatz zur Lysatkontrolle war die Intensität dieser obersten Bande in der präzipitierten Fraktion im Fall der beiden Varianten vergleichbar oder sogar stärker als bei CD99 WT. Bei Kotransfektion mit Meprin β konnte auch das durch DAPT-Zugabe akkumulierte CTF II an der Oberfläche nachgewiesen werden, was verdeutlicht, dass die Proteolyse von CD99 durch Meprin β an der Zelloberfläche stattfindet.

3.2.3.6. Kinetik der Spaltung durch rekombinantes Meprin β

Analog zu der Reaktionskinetik *in vitro* (vgl. Abschn. 3.2.2.2) wurde auch *in cellula* untersucht, ob und wie schnell lösliches Meprin β CD99 spaltet. HeLa-Zellen wurden mit CD99 transfiziert und mit rekombinantischem Meprin β für 5 min, 15 min, 30 min und 60 min behandelt. Anschließend wurde CD99 auf der Zelloberfläche angefärbt, durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.24A) und

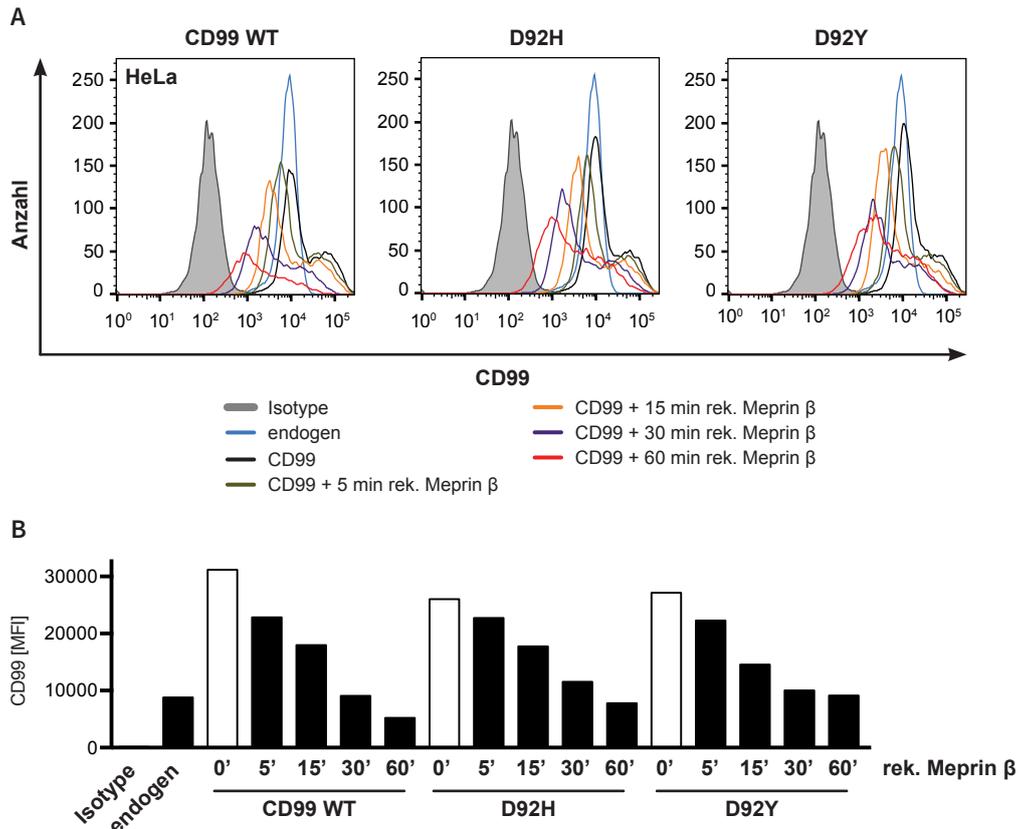


Abbildung 3.24.: Spaltungskinetik der CD99-Varianten *in cellula*. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD99-Oberflächenexpression in HeLa-Zellen nach Überexpression und Spaltung durch rekombinantes Meprin β im zeitlichen Verlauf. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit einem Antikörper gleichen Isotyps (IgG2a-PE) gefärbt (grau hinterlegt). (B) Quantifizierung von (A) mittels *median fluorescence intensity* (MFI). Alle CD99-Varianten wurden zeitabhängig durch Meprin β von der Oberfläche abgespalten bis zum Erreichen endogener Level.

die PE *median fluorescence intensity* (MFI) als Wert zur Quantifizierung der Oberflächenexpression herangezogen (Abb. 3.24B). Es konnte gezeigt werden, dass auch HeLa-Zellen endogen CD99 exprimieren. Durch die Überexpression konnte das Level noch einmal deutlich gehoben werden. Durch Zugabe von Meprin β nahmen die Level kontinuierlich ab; nach ca. 30 min war bereits so viel Protein prozessiert, dass wieder endogene Level erreicht waren. Es waren keine Unterschiede zwischen der Spaltung von CD99 WT und der Spaltung der Varianten zu erkennen, auch wenn sich eine ähnliche Tendenz wie in den *in vitro* Versuchen zeigte, nämlich dass die D92H-Variante langsamer prozessiert wird.

3.2.3.7. Analyse der Induktion von intrazellulären Stressmechanismen

Im Gegensatz zu limitierter Proteolyse, die einen spezifischen Spaltmechanismus darstellt, dient die proteolytische Spaltung von Proteinen durch das Proteasom der Degradation, also dem unspezifischen Abbau von unnötigen oder fehlgefalteten Proteinen zu Peptidfragmenten. Es wurde

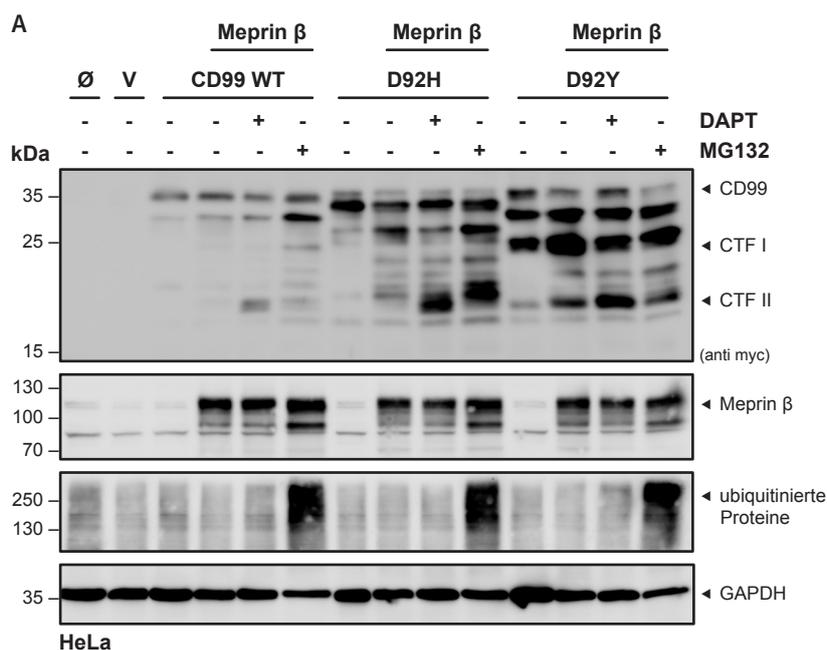


Abbildung 3.25.: Untersuchung der Induktion intrazellulärer Stressmechanismen durch die CD99-Varianten. (A) Western-Blot-Analyse der proteasomalen Degradation. HeLa-Zellen wurden mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- und D92Y-myc/FLAG und Meprin β transfiziert und mit DAPT und dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Die erfolgreiche Inhibition des Proteasoms wurde durch die Detektion ubiquitiniertes Peptide validiert. Im Fall der D92H-Variante akkumulierte ein Peptid, das etwas größer als das bekannte C-terminale Fragment (CTF) II war. GAPDH diente als Ladekontrolle.

untersucht, ob die CD99-CTF, die durch Meprin- β -vermittelte Spaltung entstehen, und die Proteinvarianten, die im Falle von D92H und D92Y den zusätzlichen Banden im Western Blot entsprechen, möglicherweise schädlich für die Zelle sind, Stress induzieren und daher proteasomal abgebaut werden. Dazu wurden transient transfizierte HeLa-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.25A). Es war nur eine geringfügige Akkumulation von CTF bei CD99 WT zu beobachten. Auch hier war die D92H-Variante jedoch auffällig: es akkumulierte ein CTF, das im Western Blot knapp oberhalb von CTF II detektierbar war und darauf hindeutet, dass die D92H-Variante in verschiedenen Bereichen prozessiert wird, weil die ursprüngliche Spaltstelle verloren geht.

Zellulärer Stress kann auch schon ko- und posttranslational durch fehlgefaltete Proteine im ER induziert werden. Die fehlgefalteten Proteine werden erkannt, ins Zytosol exportiert und dort proteasomal abgebaut. Dieser Prozess heißt *unfolded protein response* (UPR) oder ER-Stress. Da die CD99-Varianten im Western Blot ein verändertes Bandenmuster im Vergleich zu CD99 WT zeigten, wurde untersucht, ob eine mögliche Fehlfaltung dieser Proteine, induziert durch den Aminosäureaustausch, eine ER-Stress-Induktion hervorruft. Es wurden HeLa-Zellen transfiziert und sowohl das Zelllysate als auch isolierte mRNA auf einige ER-Stress-Marker untersucht: Grp78, p-eIF2 α , Grp94, *XBP1 splicing* (Abb. 3.25B). Es konnte mit keinem Marker eine ER-Stress-Induktion

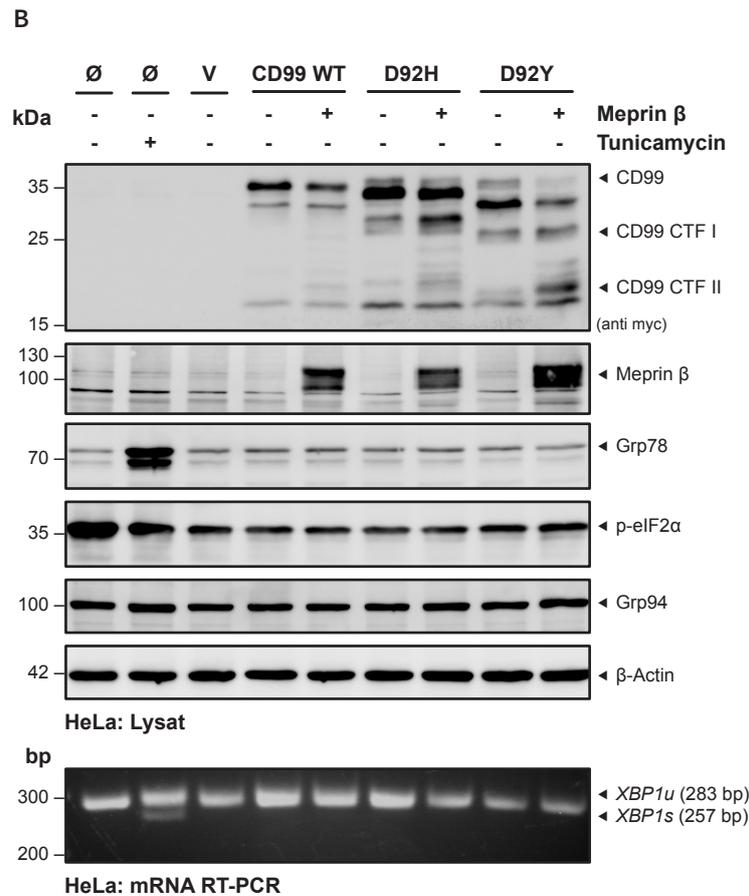


Abbildung 3.25.: Untersuchung der Induktion intrazellulärer Stressmechanismen durch die CD99-Varianten (fortgeführt). (B) Western-Blot- und RT-PCR-Analyse der Induktion von ER-Stress. HeLa-Zellen wurden mit CD99 WT-, D92H- und D92Y-myc/FLAG und Meprin β transfiziert. Anschließend wurden die ER-Stress-Marker Grp78, p-eIF2α, Grp94 (oben) und das *XBP1* splicing (unten) untersucht. Es wurde keine Induktion von ER-Stress durch die CD99-Varianten nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit Tunicamycin behandelt. β-Actin diente als Ladekontrolle. V: Leervektor; *XBP1u*: *unspliced XBP1*; *XBP1s*: *spliced XBP1*; bp: Basenpaare.

nachgewiesen werden, weder für CD99 WT noch für die Varianten und unabhängig davon, ob Meprin β kotransfiziert worden war oder nicht. Als Positivkontrolle wurde Tunicamycin benutzt, wodurch eine Induktion von Grp78 sowie *XBP1* splicing evident war.

3.2.3.8. Beeinflussung des Zellmigrationsverhaltens

Es konnte mit biochemischer Methodik gezeigt werden, dass die Meprin-β-vermittelte Spaltung durch die Punktmutationen nicht außerordentlich beeinträchtigt ist. Daher wurde untersucht, ob die Varianten an sich einen Einfluss auf funktionelle Parameter wie Zellmigration haben. Da keine CD99-defiziente Zelllinie zur Verfügung stand (vgl. dazu auch Abb. 3.5, Abb. 3.7, Abb. 3.21 und Abb. 3.24), wurden erneut HeLa-Zellen transient mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert. Für die Migrationsmessung wurden die Zellen in Multiwell-Platten ausgesät, die mit einer porösen

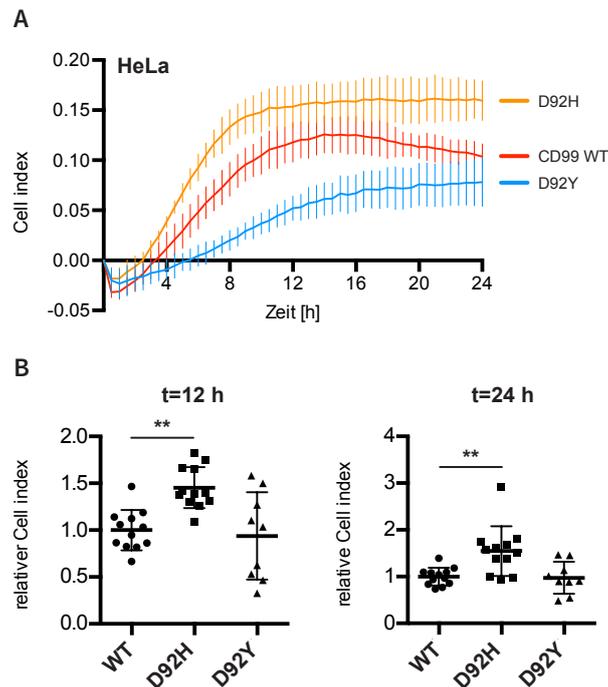


Abbildung 3.26.: Einfluss der CD99-Varianten auf die Zellmigration *in vitro*. (A) Migrationsassay der CD99-Varianten im zeitlichen Verlauf. HeLa-Zellen wurden mit CD99 Wildtyp (WT)-, D92H- und D92Y-myc/FLAG transfiziert und konnten anschließend über 24 h durch eine poröse Membran migrieren. Der *cell index* (CI) spiegelt als arbiträre Einheit die Widerstandsänderung einer Elektrode an der Unterseite der Wells als Surrogatparameter für die Zellmigration wider. Es sind die Mittelwerte als Linien \pm Standardabweichung als Fehlerbalken aus drei biologischen Replikaten eines repräsentativen Experimentes dargestellt. (B) Quantifizierung des CI als Maß für die Migration zu den Zeitpunkten $t = 12$ h und $t = 24$ h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier (Wildtyp (WT) und D92H) bzw. drei (D92Y) unabhängigen Experimenten mit jeweils drei biologischen Replikaten, normalisiert auf die WT-Variante. Zu beiden Zeitpunkten wurde für die D92H-Variante eine erhöhte Migration beobachtet. ANOVA; ** $p < 0,01$.

Membran, an deren Unterseite Elektroden zur Bestimmung des elektrischen Widerstandes angebracht sind, ausgestattet waren. Die Zellen konnten für 24 h bei 37 °C durch die Poren migrieren. Änderungen des elektrischen Widerstands durch migrierte Zellen wurden während dieser Zeit aufgezeichnet und in einer arbiträren Einheit, dem *cell index* (CI), ausgegeben (Abb. 3.26A). Die CI-Werte zu den Zeitpunkten $t = 12$ h und $t = 24$ h wurden zur Quantifizierung der Migration genutzt (Abb. 3.26B). Im Vergleich zu den mit CD99 WT transfizierten Zellen migrierten die D92H-überexprimierenden Zellen zu beiden analysierten Zeitpunkten schneller durch die poröse Membran. Das Migrationsverhalten der D92Y-überexprimierenden Zellen war im Vergleich zu CD99 WT nicht verändert.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von CD99 und Meprin β näher zu charakterisieren und mögliche Mechanismen, die klinisch relevanten Krankheitsbildern zugrunde liegen, zu untersuchen. Es können auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse im Wesentlichen vier Aussagen getroffen werden:

- Meprin β ist die erste bekannte Sheddase von CD99. Die Spaltung erfolgt in hochgradig konservierten Regionen der Ektodomäne, die einen hohen Anteil der negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Aspartat aufweisen. In einem zweiten Schritt wird das entstandene CTF durch die γ -Sekretase, eine Intramembranprotease, prozessiert.
- Meprin β sorgt für eine gesteigerte Leukozytenmigration bei einer akuten Entzündung *in vivo*. Ob diese proinflammatorische Funktion unmittelbar mit der Proteolyse von CD99 durch Meprin β zusammenhängt, bleibt unklar.
- Meprin β führt zur Phosphorylierung (Tyr419) und damit Aktivierung der Tyrosinkinase Src, Genprodukt des Protoonkogens *SRC*. Dieser Effekt ist unabhängig von der Proteolyse von CD99. CD99 selbst scheint – im Widerspruch zu publizierten Daten – keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Src zu haben.
- Die CD99-Varianten D92H und D92Y weisen im Gegensatz zu CD99 WT eine veränderte Glykosylierung auf. Dennoch können die Varianten durch Meprin β innerhalb der hochgradig konservierten Region III bzw. durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembranregion gespalten werden. D92H-überexprimierende Zellen haben im Vergleich eine erhöhte Migrationsfähigkeit.

Es folgt eine detaillierte Diskussion dieser Ergebnisse.

4.1. Limitierte Proteolyse von CD99 durch Meprin β an konservierten Spaltstellen

In Proteomanalysen zur Identifizierung neuer Substrate (TAILS) hat sich gezeigt, dass Meprin β CD99 nicht unselektiv degradiert, sondern durch gezieltes Shedding eine kontrollierte posttranslationale Modifikation herbeiführt. Mittels TAILS wurden bereits in vier verschiedenen humanen

Zelllinien (HaCaT, U373, HEK293, Caco-2) Spaltstellen im Bereich Ser91 bis Gly98 identifiziert, meist vor Asp und damit passend zur Spaltstellenpräferenz von Meprin β . Im Rahmen dieser Arbeit wurde als weiteres humanes Zellkulturmodell die HeLa-Zelllinie genutzt. Es konnten in einem Überexpressionsmodell zwei Spaltstellen mittels MS-Analytik identifiziert werden, und zwar zwischen Ser91 und Asp92 und zwischen Ala93 und Asp94. Diese Spaltstellen sind gut vereinbar mit den TAILS-Spaltstellen und entsprechen der im Western Blot detektierten Bande bei ca. 18 kDa, genannt CTF II. In einem *in-vitro*-Experiment mit rekombinanten Proteinen wurde bereits in einem anderen Bereich mit ähnlicher Aminosäuresequenz eine weitere Spaltstelle zwischen Gly56 und Asp57 identifiziert. Diese Spaltstelle wurde im zellbasierten Experiment nicht bedient. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass diese Stelle weiter N-terminal liegt und daher von der membranannähenden katalytischen Domäne der Protease nicht erreicht werden kann (vgl. Abb. 1.2B).

Eine erweiterte Analyse der Primärstruktur von zehn homologen CD99-Sequenzen verschiedener Wirbeltiere zeigte, dass die P1'-Positionen der oben beschriebenen Spaltstellen streng konserviert sind. Für die Spaltstelle Gly56/Asp57 fiel auf, dass das saure Aspartat in acht von zehn Organismen konserviert ist. Nur in der Sequenz von Ratte und Meerschweinchen findet sich Glutamat, eine ebenfalls saure Aminosäure. Drei Positionen weiter N-terminal findet sich Aspartat, das in allen zehn Sequenzen konserviert ist. Für die Spaltstellen Ser91/Asp92 und Ala93/Asp94 ist jeweils das Aspartat in P1'-Position in zehn von zehn Organismen konserviert und es gibt ein weiteres konserviertes Aspartat drei Positionen weiter C-terminal. Die Proteolyse von extrazellulären Substraten mit den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat in P1'-Position ist nach jetzigem Kenntnisstand charakteristisch für Proteasen der Astacin-Familie wie Meprin β und BMP-1. Daher könnte die strenge Konservierung der Meprin- β -Spaltstelle für eine Koevolution von Substrat und Protease sprechen. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Studie von Suh et al.: es wurden im Rahmen der Erstbeschreibung von CD99L2, einem mit CD99 verwandten Protein, fünf in CD99 und CD99L2 konservierte Regionen beschrieben (SUH et al. 2003). Drei davon befinden sich in der Ektodomäne und zwei davon stimmen mit den hier identifizierten Spaltstellen überein. Die dritte Region enthält ebenfalls zwei konservierte Aspartate (sechs bzw. acht von zehn Übereinstimmungen zwischen den CD99-Wirbeltiersequenzen) und könnte eine weitere potenzielle Spaltstelle von Meprinen darstellen, die durch ihre weit N-terminale Lage in einem anderen Kontext bedient werden könnte. Die Identifizierung der Meprin- β -Spaltstellen innerhalb dieser Regionen ist ein Baustein, der dabei helfen kann, die bisher unbekannt funktionelle Relevanz dieser konservierten Motive aufzuklären.

Auch CD99L2 konnte in einem ersten Versuch als Substrat von zellmembranständigem Meprin β *in cellula* validiert werden. Diese Interaktion sollte in Zukunft jedoch ebenfalls genauer untersucht werden; denn wie CD99 spielt auch CD99L2 eine wichtige Rolle bei der TEM von Leukozyten *in vivo* (RUTLEDGE et al. 2015; SAMUS et al. 2018).

Meprin β ist zwar die erste bekannte Protease, die CD99 spaltet, jedoch sind weitere proteolytische

Interaktionen denkbar. Meprin α , ebenfalls aus der Familie der Astacine (vgl. Abb. 1.1) ist zu 44 % sequenzidentisch mit Meprin β und wurde ebenfalls mittels TAILS als mögliche Sheddase von CD99 identifiziert. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse der Interaktion von Meprin β mit CD99, jedoch wäre es ebenfalls nützlich zu wissen, ob das konstitutiv sezernierte Meprin α CD99 *in vitro* und *in vivo* spaltet. Bisher wurden mehrere Substrate entdeckt, die von beiden Proteasen gespalten werden können, z. B. Prokollagen I, Interleukin (IL)-6 oder der IL-6-Rezeptor (ARNOLD et al. 2017). Vor allem im Hinblick auf eine mögliche Kompensation eines Ausfalls der einen Protease durch die andere Protease, z. B. durch eine inaktivierende Mutation oder im Einzel-KO-Mausmodell, ist die genaue Kenntnis darüber relevant.

Analog zu APP, ebenfalls ein Meprin- β -Substrat, oder Notch konnte auch für CD99 eine mehrstufige proteolytische Prozessierung aufgezeigt werden. Nach der extrazellulären Spaltung durch Meprin β wird das übrigbleibende CTF durch die γ -Sekretase nochmals gespalten. Die γ -Sekretase ist ein Proteinkomplex aus vier Transmembranproteinen und gehört zu den *intramembrane cleaving proteases* (i-CLiPs). Die auf das *ectodomain shedding* folgende Intramembranproteolyse durch i-CLiPs wird auch *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) genannt (JURISCH-YAKSI et al. 2013). Im Gegensatz zu APP ist im Fall von CD99 bisher sowohl die exakte Lokalisation der γ -Sekretase-Spaltstelle innerhalb der Transmembranregion als auch die Funktion der durch RIP entstehenden IZD unbekannt. Im Fall von APP können durch RIP krankheitsassoziierte Peptide entstehen; im Fall von Notch kann die IZD dagegen als Transkriptionsfaktor eine physiologische Signalgeberfunktion haben. Ob die CD99-IZD eher physiologisch oder pathologisch relevant ist, könnte man, analog zur Notch-V1744G-Mutation, mit Hilfe einer Mutation aufklären, die CD99 ungeeignet als RIP-Substrat macht bei gleichzeitig erhaltener Spaltfähigkeit durch Meprin β .

4.2. Interaktion von Meprin β und CD99 im Hinblick auf Entzündung

Eine Entzündungsreaktion muss präzise kontrolliert sein, um einerseits überschießende und andererseits unzureichende Immunantworten und damit potenzielle Schädigungen des Organismus zu vermeiden. Einen frühen und damit wegweisenden Schritt der Immunantwort stellt die TEM von Leukozyten in postkapillären Venolen dar. In diesem Prozess spielt CD99 als Adaptermolekül zwischen Endothel und Leukozyten eine Schlüsselrolle. Auch Proteasen, z. B. ADAMs, sind am Prozess der Diapedese beteiligt, indem sie andere Adhäsionsmoleküle wie JAM-A oder VE-Cadherin spalten (DREYMUELLER et al. 2015; SCHULZ et al. 2008). So können sie die Endothelbarriere modulieren und damit die Ausprägung der Entzündungsreaktion beeinflussen. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass auch die limitierte Proteolyse innerhalb der Ektodomäne von CD99 durch Meprin β die TEM von Leukozyten beeinflusst.

Für eine erste zellbasierte *in-vitro*-Projektstudie wurden Zellkultureinsätze mit semipermeabler Membran benutzt, um die TEM von Zellen in Abhängigkeit von Meprin β experimentell zu

untersuchen. Es wurde gemessen, wie gut eine murine Endothelzellschicht (bEnd.3-Zelllinie) von murinen Lungenkarzinom-Zellen (LLC-Zelllinie) innerhalb von vier Stunden überwunden werden kann. In diesem Ansatz konnte die TEM durch Zugabe von aktivem rekombinantem humanem Meprin β auf ungefähr das Zweieinhalbfache gesteigert werden im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Proteasezusatz. Dieses Experiment zeigt, dass Meprin β prinzipiell die Endothelbarriere modulieren und sie durchlässiger für Zellen machen kann. Die Aussage des Experiments ist in zwei Aspekten jedoch limitiert. Erstens ist anhand der Ergebnisse nicht auszuschließen, dass die erhöhte Endothelpermeabilität auf CD99-unspezifische Mechanismen zurückzuführen ist. So ist es vorstellbar, dass andere Substrate beteiligt sind oder dass gar nichtproteolytische, regulatorische Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen. Zudem können angesichts der Inkubationszeit von vier Stunden auch transkriptionelle Auswirkungen ins Gewicht fallen. Zweitens können sich die aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit verwendeten LLC-Krebszellen bei der TEM anders verhalten als Leukozyten. Dieses Ergebnis ist daher nicht unmittelbar auf die Diapedese im Rahmen einer Immunantwort übertragbar und besitzt dahingehend eine nur eingeschränkte externe Validität.

Der erste Aspekt, also die Frage nach der CD99-Spezifität, ist experimentell nicht einfach zu adressieren und konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es wurde zwar gezeigt, dass die endothelialen Adhäsionsmoleküle JAM-A und VE-Cadherin, nicht durch Meprin β gespalten werden. Um aber den Anteil des CD99-Sheddings an den beobachteten Effekten exakter zu quantifizieren, bedarf es weitergehender Untersuchungen. Zielführend könnte dabei eine CD99-Variante sein, die nicht durch Meprin β gespalten wird; beispielsweise herbeigeführt durch Austausch der drei sauren Aminosäuren (Asp92, Asp94 und Asp97) innerhalb der hochgradig konservierten Region III der Ektodomäne. Für das murine System konnte gezeigt werden, dass die CD99-Expression nur auf Endothelzelleseite entscheidend für den Ablauf der TEM ist (GOSWAMI et al. 2017). In einem TEM-Assay mit murinen neutrophilen Granulozyten und murinen Endothelzellen (z. B. nach dem Protokoll von MULLER und LUSCINSKAS 2008), die anstatt CD99 WT eine solche Variante mit Resistenz gegenüber Meprin- β -vermittelter Proteolyse exprimieren, könnten dann Daten mit höherer Aussagekraft generiert werden.

Der zweite Aspekt, also die Limitation des TEM-Experiments hinsichtlich der Übertragbarkeit auf eine physiologische Entzündungsantwort, wurde in einem weiteren Versuch adressiert. Es wurde ein murines *air-pouch*-Modell herangezogen, um ein erstes Bild davon zu bekommen, ob Meprin β einen Einfluss auf die Extravasation von Leukozyten während einer akuten Entzündung *in vivo* hat. Das *air-pouch*-Modell ist ein etabliertes Mausmodell zur Untersuchung einer akuten Entzündungsreaktion (DUARTE et al. 2016). In Einklang mit den Vorergebnissen zeigte sich, dass sich in *Mep1b*^{-/-}-Mäusen 24 h nach Induktion der Entzündung weniger Zellen im Pouch befanden als in WT-Mäusen. Durch Immunophänotypisierung der migrierten Zellen wurde weiterhin aufgeschlüsselt, dass statistisch signifikant weniger Granulozyten und tendenziell, aber nicht signifikant, weniger Monozyten in den Pouch der *Mep1b*^{-/-}-Mäuse migrierten. Dieser Phänotyp war jedoch

nicht mit einer Akkumulation von CD99 durch ausbleibende Proteolyse auf den entsprechenden Zellpopulationen vergesellschaftet. Diese *in-vivo*-Ergebnisse passen zu veröffentlichten Daten, die auf eine proinflammatorische Aktivität von Meprin β hinweisen (ARNOLD et al. 2017). Es ergibt sich die Frage, welche Zelltypen dabei für die Expression, Aktivierung und ggf. Sekretion von Meprin β verantwortlich sind und daran anschließend, welche Substrate welcher Zielzellen prozessiert werden.

Für CD99 ist bereits bekannt, dass es sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten exprimiert ist. Für Meprin β sind die bisher veröffentlichten Daten nicht sehr aussagekräftig. Sun et al. konnten allerdings Meprin- β -mRNA in murinen und humanen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) nachweisen (SUN et al. 2009). Mittels Durchflusszytometrie wurde im Rahmen dieser Arbeit daher die Proteinexpression von membranständigem Meprin β in verschiedenen murinen Leukozytenpopulationen gemessen. Es war ein gewisses Expressionslevel, am ehesten auf Granulozyten und Lymphozyten, nachweisbar; jedoch ist die Aussagekraft der Resultate limitiert und zwar einerseits durch die geringe Stichprobengröße von $n = 3$ Mäusen pro Genotyp und andererseits durch die fragliche Spezifität des polyklonalen hEcto1-Antikörperserums. Dieses Serum wurde durch Immunisierung mit der humanen Meprin- β -Ektodomäne gewonnen. Hier sind weitere Experimente notwendig, vorzugsweise mit einem spezifischen Antikörper gegen das nativ gefaltete murine Meprin β . Denkbar ist, dass die Protease nicht konstitutiv an der Zellmembran exprimiert ist, sondern dass der Translation oder der Integration möglicher zytoplasmatischer Vorratsvesikel in die Plasmamembran spezifische Stimuli vorausgehen müssen, die für eine lediglich kurzfristige Hochregulation der Konzentration an der Zellmembran sorgen. Einmal dort angekommen, kann Meprin β auch durch andere Sheddase wie ADAM10 und ADAM17 von der Zelle losgelöst werden (HAHN et al. 2003; JEFFERSON et al. 2013; HERZOG et al. 2014), um als lösliche Protease Substrate in der erweiterten Umgebung zu erreichen. Membranständiges Meprin β könnte auch zügig wieder internalisiert werden, um eine zu potente proteolytische Aktivität zu unterbinden, die schädlich sein kann. Solche bisher nicht vollständig erforschten Mechanismen können die durchflusszytometrische Detektion erschweren und ggf. falsch-niedrige Expressionslevel vortäuschen. Parallel kann man das hEcto1-Antikörperserum gut dazu nutzen, die Expression von Meprin β zunächst auf Leukozyten einer gesunden menschlichen Population zu quantifizieren. Über die Expression von Meprin β in Endothelzellen liegen bisher keine zuverlässigen Daten vor. Auch hier wäre eine nur transiente Expression während der TEM mit zügig folgendem Shedding oder Abbau denkbar, die beispielsweise einen histologischen Nachweis erschweren würde. Trotz der angesprochenen Limitationen wurden murine Endothelzellen (bEnd.3) mittels Durchflusszytometrie mit dem hEcto1-Antikörperserum untersucht. In diesen Zellen konnte ein deutliches Signal gemessen werden.

Die diskutierten Versuche liefern demnach Hinweise auf Meprin- β -Expression auf Leukozyten und Endothelzellen und sollten in Folgeversuchen genauer untersucht werden. Hilfreich kann

dabei die *Mep1b*_{ROSA26}-Mauslinie sein, die nach Abschluss dieser Arbeit neu etabliert wurde. Es wurde die Meprin- β -cDNA in den *reverse orientation splice acceptor* (ROSA)26-Genlokus eingebracht. Mittels flankierender *loxP*-Sequenzen kann durch Cre-Rekombinase-Aktivität eine gewebespezifische Meprin- β -(Über-)Expression erreicht werden. Durch initiale Verpaarung dieser Mauslinie mit *Mep1a*^{-/-};*Mep1b*^{-/-}-Doppel-KO-Mäusen und anschließende Verpaarung mit Tamoxifen-induzierbaren LysM-Cre- bzw. Tek-Cre-Mauslinien kann in Zukunft eine selektive Meprin- β -Expression in myeloischen Zellen bzw. in Endothelzellen erreicht werden bei gleichzeitigem KO der verwandten Protease Meprin α . Experimente mit Tieren dieser Genotypen könnten letztendlich die Frage aufklären, welcher Zelltyp für die proinflammatorische Aktivität verantwortlich ist.

Die CD99-Expression auf Leukozyten im peripheren Blut und im Pouch war in diesem Modell in den verschiedenen Genotypen gleich. Daher wurde zunächst ein Inhibitor-Experiment ohne pathologische Bedingungen durchgeführt, um festzustellen, ob die Meprin- β -vermittelte Proteolyse von CD99 *in vivo* überhaupt eine physiologische Relevanz hat. Für diesen Versuch wurde die CD99-Proteinmenge in der Lunge ausgewertet, weil bereits bekannt ist, dass Meprin β in der Lunge exprimiert ist (BIASIN et al. 2014; BIASIN et al. 2017). In der Tat akkumulierte CD99 in den Lungen der WT-Mäuse, die mit dem Meprin-Inhibitor Actinonin behandelt wurden. Es wurden weiterhin die Lungen von WT- und *Mep1b*^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die CD99-Proteinlevel verglichen. Auch in diesem experimentellen Ansatz konnte eine Akkumulation von CD99 in den Meprin- β -defizienten Mäusen festgestellt werden. Diese Experimente lassen zwar keinen Rückschluss darauf zu, in welchen Zelltypen CD99 akkumuliert. Sie zeigen jedoch, dass Meprin β *in vivo* unter physiologischen Baseline-Bedingungen eine Funktion in der CD99-Homöostase der Lunge zu haben scheint. Eine genauere histologische und biochemische Charakterisierung dieses Phänotyps wird in Zukunft zeigen, welchen Anteil das vom pulmonalen Endothel exprimierte CD99 am akkumulierten CD99 hat.

Es bleibt unklar, ob die Proteolyse von CD99 während der TEM mit der proinflammatorischen Aktivität von Meprin β kausal zusammenhängt oder ob die proinflammatorische Aktivität beispielsweise durch Zytokin-induzierte Signalkaskaden zu erklären ist. Es wurde beschrieben, dass Meprin β den IL-6-Rezeptor spalten und dadurch das proinflammatorische IL-6-Trans-Signaling auslösen kann, was ebenfalls zu einer gesteigerten Leukozytenmigration in den Pouch führen kann (CHALARIS et al. 2007; RABE et al. 2008). Wegweisend können auch zur Klärung dieser Fragen die oben angesprochenen, selektiv Meprin- β -exprimierenden Mauslinien sein, ggf. in Kombination mit intravitaler Mikroskopie zur Visualisierung des Endothels (vgl. SULLIVAN et al. 2016). Langfristig wird sich durch ein besseres Verständnis der Interaktion von Meprin β und CD99 zeigen lassen, ob oder in welchem Kontext Meprin β eher zu Infektanfälligkeit oder zu einem Schutz gegenüber überschießenden Immunreaktionen führt und ob einerseits die medikamentöse Applikation eines Proteaseinhibitors oder eine Enzymersatztherapie erwägenswerte Therapieoptionen sind.

4.3. CD99 und Meprin β im Src-Signalweg

In der Literatur finden sich Veröffentlichungen, die CD99 eine Tumorsuppressorfunktion in der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2-OS zuschreiben: durch den Verlust der CD99-Expression in dieser Zelllinie komme es zur Aktivierung der Tyrosinkinase Src; im Umkehrschluss deaktiviere eine Re-Expression von CD99 wiederum Src und habe dadurch antitumorale Effekte (MANARA et al. 2006).

Diese Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Es konnte zwar eine Reduktion der Src-Phosphorylierung beobachtet werden, jedoch war diese unabhängig von CD99 und eher als Artefakt durch den Transfektionsprozess an sich anzusehen. In der entsprechenden Publikation wurde der relevante Kontrollansatz ausgelassen. Denkt man den in den publizierten Daten propagierten Mechanismus weiter, könnte man umgekehrt durch eine Reduktion der CD99-Expression eine weitere Steigerung der Phosphorylierung von Src erwarten. Auch diese Hypothese wurde durch ein kontrolliertes CD99-Knockdown-Experiment verworfen. Es erscheint daher fragwürdig, ob die publizierten Effekte tatsächlich auf eine spezifische Interaktion von CD99 und Src zurückzuführen sind.

Zufällig haben diese Experimente jedoch konsequent gezeigt, dass rekombinantes Meprin β sowohl in HeLa- als auch in U2-OS-Zellen zu einer Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src an Position Tyr419 führt. Im Knockdown-Versuch konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von CD99, jedoch abhängig von der proteolytischen Aktivität von Meprin β ist. Src besitzt zwei wichtige Phosphorylierungsstellen: Tyr419 und Tyr530 (human). Ist Tyr530 phosphoryliert, ist die Kinase inaktiv. Durch Dephosphorylierung an Tyr530 und Autophosphorylierung an Tyr419 kann die Aktivität hochreguliert werden (YEATMAN 2004). Ein beschriebener Mechanismus, der letztendlich zur Tyr419-Phosphorylierung führen kann, ist die Tyr530-Dephosphorylierung durch Phosphatasen wie z. B. die zytosolischen Proteine PTP1B, Shp1 und Shp2 oder die Transmembranproteine CD45, PTP α , PTP ϵ und PTP λ (ROSKOSKI 2015). Da die Spaltung von CD99 durch Meprin β im Hinblick auf die Src-Aktivierung irrelevant zu sein scheint, stellt die Untersuchung der Interaktion von Meprin β mit diesen Phosphatasen bzw. deren Interaktionspartnern einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Untersuchungen dar, um den Signalweg, der zur Hochregulierung der Kinase-Aktivität führt, aufzuschlüsseln.

Eine erhöhte Src-Aktivierung findet sich in vielen Tumorentitäten, u. a. bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (CHEN et al. 2014). Da Meprine im Gastrointestinaltrakt und beispielsweise in der verwendeten COLO-320-Zelllinie besonders exprimiert sind, stellt dieses Ergebnis einen interessanten Ausgangsbefund dar für die weitere Analyse einer Korrelation zwischen Meprin- β -Expression und Src-Aktivierung. Beim kolorektalen Karzinom wurde bereits eine erhöhte Meprin- α -Expression beschrieben (LOTTAZ et al. 2011; MINDER et al. 2012; X. WANG et al. 2016; PETERS und BECKER-PAULY 2019). Die Möglichkeit einer Src-Aktivierung durch Meprin α sollte daher auch erwogen und überprüft werden.

4.4. Krebs-assoziierte CD99-Varianten D92H und D92Y

Im Rahmen großer *cancer-genome-sequencing*-Studien wurden für *CD99* und *MEP1B* somatische Mutationen erfasst. Beide Proteine waren bereits mehrfach mit Karzinogenese in Verbindung gebracht worden, jedoch lagen zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit noch keine Studien über deren funktionelle Relevanz vor. Meprin β spaltet CD99 vor Asp92 in einer hochgradig konservierten Region. Die Bedeutung dieser Spaltung *in vivo* war weiter unklar. Es sollte daher untersucht werden, ob die in der COSMIC-Datenbank annotierten Mutationen p.D92H und p.D92Y den Spaltprozess und hierdurch die Zellbiologie entscheidend beeinflussen, insbesondere im Hinblick auf Karzinogenese.

Es zeigte sich, dass die CD99-Varianten sowohl in einem peptidbasierten *in-vitro*-Ansatz als auch im Überexpressions-Zellkulturmodell weiterhin von Meprin β gespalten werden. Mehrere Ergebnisse veranschaulichen jedoch, dass der Verlust des sauren Asp92 nicht ganz ohne Konsequenz bleibt.

Während *in vitro* für CD99 WT eine Hauptspaltstelle und lediglich vier Nebenspaltstellen identifiziert wurden, waren es bei den Varianten neben der zu Position 94 verschobenen Hauptspaltstelle acht (D92H) bzw. sieben (D92Y) Nebenspaltstellen. Im Fall der D92Y-Variante wurde die Spaltstelle an Position 92 gar nicht mehr bedient. Auch die Kinetik der Prozessierung veränderte sich dahingehend, dass die D92H-Variante langsamer gespalten wurde. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Austausch des Aspartats die Affinität der CD99-Spaltstellenregion zum katalytischen Zentrum von Meprin β mit den basischen Argininresten verringert. Insbesondere bei der D92H-Variante können die positiven Ladungen der Arginine und des Histidins sich gegenseitig sogar abstoßen und so möglicherweise die langsamere Prozessierung des Peptids erklären. Der Tyrosin-Rest der D92Y-Variante ist größer als der Aspartat- oder Histidin-Rest, möglicherweise zu groß für die Substrattasche und deswegen auch ungeeignet für eine Spaltung an Position 92. Interessanterweise scheint die Spaltung trotz der ausgeprägten Spaltspezifität von Meprin β nicht auf einen bestimmten Aminosäurerest festgelegt zu sein. Die hochgradig konservierte Region III enthält insgesamt drei konservierte Aspartat-Reste, an den Positionen 92, 94 und 97. Bei beiden CD99-Varianten wurde Asp94 zur Hauptspaltstelle und Asp97 zu einer Nebenspaltstelle. Es ist denkbar, dass diese konservierte Redundanz sicherstellen soll, dass CD99 *in vivo* auch bei potenziell vorliegenden Mutationen wie in diesem experimentellen Ansatz im Bereich der hochgradig konservierten Region III von Meprin β gespalten werden kann.

Auch die Experimente im Überexpressions-Zellkulturmodell zeigen Auswirkungen durch die Punktmutationen. Das veränderte Bandenmuster der Varianten im Western Blot (Verschiebung zu niedrigerem Molekulargewicht; Hinzukommen neuer, schwächerer Banden) spricht dafür, dass der Austausch des Aspartat-Restes zu Histidin bzw. Tyrosin die intrazelluläre Prozessierung maßgeblich beeinflusst. Es gilt als allgemein anerkannt, dass die oberste kräftige CD99-Bande im Western Blot das vollständig glykosylierte, korrekt gefaltete, membranständige Protein widerspiegelt. Auf die darunterliegende Bande wird in der Literatur oft nicht eingegangen, weil es

zwei Deutungsmöglichkeiten gibt: einerseits ist bekannt, dass Molekulargewichtsunterschiede von CD99 auf Unterschiede in der Glykosylierung zurückgeführt werden können (AUBRIT et al. 1989). CD99 ist stark O-glykosyliert; 14 kDa, also etwa die Hälfte des Molekulargewichts, macht die O-Glykosylierung aus, 4 kDa davon Sialinsäuren. Andererseits kann eine bekannte Splice-Variante von CD99, genannt CD99sh, das niedrigere Molekulargewicht erklären. CD99sh ist ebenfalls zellmembranständig, jedoch ist der zytoplasmatische Teil um 25 Aminosäuren verkürzt. Je nach Zellart und Differenzierungsgrad wird entweder nur die lange Form oder es werden beide Isoformen exprimiert, was unterschiedliche funktionelle Auswirkungen haben kann (ALBERTI et al. 2002; SCOTLANDI et al. 2007; MAHIDDINE et al. 2016).

Das Biotinylierungsexperiment zeigt, dass die meisten Banden keine zellmembranständigen Proteine widerspiegeln. Nur die oberste Bande wird konsequent zellmembranständig detektiert und im Fall von D92Y eine weitere Bande etwas darunter. Es ist daher in Einklang mit AUBRIT et al. 1989 anzunehmen, dass alle anderen Banden im ähnlichen Molekulargewichtsbereich tatsächlich intrazelluläre Formen ein und desselben Aminosäuregerüsts, jedoch mit unterschiedlicher Glykosylierung, darstellen. Die Frage, auf welche Art und Weise der Histidin- bzw. Tyrosin-Rest die posttranslationale Glykosylierung im Golgi-Apparat so entscheidend verändert, bleibt offen. Die Aufklärung der Proteinstruktur von CD99 könnte zur Erklärung dieses Mechanismus beitragen. Die Bande bei D92Y könnte CD99sh sein oder eine anders glykosylierte Variante von CD99 WT, die trotzdem die Zellmembran erreicht. Auch die Unterschiede in der Glykosylierung könnten funktionelle Auswirkungen haben. Wang et al. konnten zeigen, dass die Fähigkeit von CD99, die Interaktionspartner PILR α und PILR β zu binden, vom CD99-O-Glykosylierungsmuster abhängig ist (J. WANG et al. 2008). Die Interaktion mit PILRs wiederum scheint essentiell für den Ablauf der TEM im murinen System zu sein (GOSWAMI et al. 2017). Durch ihr verändertes Glykosylierungsmuster könnten die CD99-Varianten daher auch einen Einfluss auf die PILR-Interaktion haben.

Die sequenzielle Prozessierung von CD99 an der Zelloberfläche durch Meprin β und die γ -Sekretase scheint durch den Aminosäureaustausch nicht entscheidend beeinträchtigt zu sein. Das CTF II, das im Fall von CD99 WT durch Spaltung an den Stellen Ser91/Asp92 und Ala93/Asp94 entsteht, wird anschließend durch Intramembranproteolyse von der γ -Sekretase weiter prozessiert. Mit Blick auf die Experimente *in vitro* ist es nicht überraschend, dass auch die beiden Varianten durch Meprin β zu einem CTF II gespalten werden können. Allerdings zeigen die MS-Daten, dass hier die Spaltstelle an Position 92, also Ser91/His92 bzw. Ser91/Tyr92, nicht mehr bedient wird und das CTF II ausschließlich durch Spaltung an Position 94, also Ala93/Asp94, entsteht. Möglicherweise erlaubte die Konformation der 18 Aminosäuren langen Peptide noch Zugang zum katalytischen Zentrum *in vitro*, wohingegen die vollständigen Proteine an den mutierten Stellen *in cellula* nicht mehr gespalten werden konnten, weil durch die Tertiärstrukturen andere räumliche Gegebenheiten herrschen. Interessanterweise wird die Prozessierung durch die γ -Sekretase nicht beeinträchtigt. Es scheint also unerheblich für die Intramembranprotease zu sein, ob das vorausgehende *ectodomain*

shedding an Position 92 oder 94 stattgefunden hat.

Das andere sog. CTF I erscheint im Western Blot bei D92H und D92Y nicht als klar abgegrenzte Bande wie bei CD99 WT. Das unscharfe Signal spricht für eine unselektive Spaltung weiter N-terminal. Die korrelierenden Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Ein Erklärungsansatz ist jedoch, dass durch die Mutationen die Affinität von Meprin β zu den Spaltstellen in der hochgradig konservierten Region III verringert ist und dadurch auch andere Spaltstellen – weniger selektiv – bedient werden. Interessanterweise nimmt die Oberflächenexpression der beiden Varianten analog zu CD99 WT bei Inkubation mit rekombinantem Meprin β etwa gleich schnell ab bzw. bei Meprin β endogen exprimierenden Zellen (COLO 320) nach Applikation des Meprin-Inhibitors Actinonin auf ähnliche Level zu. Die Lokalisation der Varianten an der Zelloberfläche sowie deren Spaltung durch Meprin β ebendort konnte also mit mehreren Experimenten gezeigt werden. Das Immunogen für den monoklonalen anti-CD99-Antikörper, der für die Durchflusszytometrie verwendet wurde, war jedoch das FL-CD99-Protein. Es ist also nicht sicher, an welchen Teil der CD99-Ektodomäne er bindet. Es kann daher sein, dass ein Signalverlust in der Durchflusszytometrie auf einen Epitopverlust durch Shedding zurückzuführen ist oder auch auf einen Epitopverlust durch Internalisierung des (Rest-)Proteins nach RIP. Mit dieser Methodik können das FL-Protein und die CTF nicht sicher voneinander unterschieden werden. Eine genauere Aufklärung dieser Details wäre in Zukunft von großem Interesse, um ein besseres Verständnis für die Verwendung der verschiedenen Spaltstellen und die Bedeutung der verschiedenen CTF zu bekommen.

Die Biotinylierung hat gezeigt, dass fast ausschließlich die FL-Proteine an der Zelloberfläche zu finden sind. Von großem Interesse ist daher auch, welche Funktion bzw. welchen potenziellen Schaden die zahlreichen intrazellulären Proteinformen und Proteinformen ausüben. Es konnte gezeigt werden, dass kotranslational, also im ER, durch die Mutationen kein zellulärer Stress entsteht. Im Gegensatz dazu akkumulierte posttranslational unter Blockade des Proteasoms jedoch im Fall der D92H-Variante ein CTF mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa, das damit etwas größer als das CTF II ist. Dies könnte ein Fragment sein, das durch eine weiter N-terminal gelegene Spaltstelle entsteht und von den HeLa-Zellen nicht weiter prozessiert werden kann und daher proteasomal degradiert werden muss. Interessanterweise ist auch in Abb. 3.24B eine Tendenz abzulesen, dass die D92H-Variante etwas langsamer prozessiert wird – möglicherweise eben, weil das genannte CTF nicht adäquat weiterverarbeitet werden kann und aufwendig abgebaut werden muss.

Zusätzlich zu der rein biochemischen Charakterisierung konnte auch gezeigt werden, dass die D92H-Variante eine funktionelle Auswirkung auf das Migrationsverhalten von HeLa-Zellen hat. D92H-überexprimierende Zellen hatten im Vergleich zu CD99 WT eine gesteigerte Migrationsfähigkeit. Eine Limitation des verwendeten Assays ist, dass als Surrogatparameter für die Anzahl der migrierten Zellen die Änderung des elektrischen Widerstandes herangezogen wird. Daraus ergibt

sich, dass eine Änderung nicht notwendigerweise mit der Zellzahl korrelieren muss, sondern auch durch die Zellgröße beeinflusst werden kann. Außerdem kann eine veränderte Zellproliferation die Ergebnisse verfälschen. Dieses Problem wurde in einem MTT-Assay adressiert, wobei sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen den drei Varianten ergab (Daten (nicht gezeigt) von Dr. F. Wilkens, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel). Das Migrationsexperiment hat daher eher den Charakter einer *proof-of-concept*-Studie und stellt einen Ausblick dar. Nichtsdestoweniger sind die Unterschiede zwischen CD99 WT und D92H offensichtlich – unabhängig davon, ob sie auf Proliferation, Migration, Zellgröße oder eine Kombination daraus zurückzuführen sind. Vielversprechend wäre es, eine Lungenkarzinom-Zelllinie zu etablieren, die CD99-WT-defizient ist und die in den Krebspatienten identifizierten D92H- bzw. D92Y-Varianten stabil exprimiert. In solchen Zelllinien können dann zunächst im Zellkulturmodell die Proliferations-, Invasions- und Migrationsfähigkeit oder andere krebserlevante Parameter untersucht werden. In einem nächsten Schritt könnten diese Zellen in immundefiziente Mäuse xenotransplantiert werden, um den Einfluss auf die Tumorentstehung *in vivo* zu analysieren. In einem nächsten Schritt kann in einem solchen experimentellen Ansatz auch die funktionelle Relevanz der Spaltung der Varianten durch Meprin β im Hinblick auf die Tumorentstehung *in vivo* untersucht werden, etwa durch die gleichzeitige Applikation von spezifischen Meprin- β -Inhibitoren.

Im Rahmen von *cancer genomics* werden immer mehr Neoplasien genetisch untersucht, um der biologischen Variabilität von Krebs in der Forschung Rechnung zu tragen. In Einzelfällen konnten bereits durch die Beschreibung von Keimbahnmutationen oder somatischen Mutationen mögliche Therapieziele identifiziert und Patienten dementsprechend therapiert werden; z. B. Panitumumab gegen den mutierten und überexprimierten EGF-Rezeptor beim kolorektalen Karzinom. Ziel der sog. Präzisionsmedizin ist es, immer mehr Tumoren entsprechend ihres individuellen genetischen Fingerabdrucks behandeln zu können. Die Untersuchungen zu den beiden somatischen Mutationen von Lungenkrebspatienten im Rahmen dieser Arbeit stellen die initiale Charakterisierung dieser beiden CD99-Varianten dar. Die weitere Untersuchung wird zeigen, ob auch CD99 oder Meprin β bzw. von den jeweiligen Proteinen abhängige Signalwege sinnvolle molekulare Ziele in der Krebstherapie darstellen können.

5. Zusammenfassung

Die Metalloprotease Meprin β spaltet extrazelluläre Proteine mit hoher Spezifität. Die sog. limitierte Proteolyse stellt eine irreversible posttranslationale Modifikation ihrer Substrate dar. In einem Screeningverfahren wurden *in vitro* ca. 150 potenzielle Proteinsubstrate identifiziert, darunter CD99. Das Typ-I-Transmembranprotein CD99 ist zum einen als Leukozyten-Oberflächenantigen ein Schlüsselprotein der transendothelialen Migration (TEM) von Leukozyten und ist so an der Regulation der Entzündungsantwort des Immunsystems beteiligt. Zum anderen besteht eine Assoziation zwischen einer dysregulierten CD99-Expression und dem Auftreten von bestimmten malignen Neoplasien.

Ziel dieser Arbeit war es, (1.) die proteolytische Interaktion von Meprin β und CD99 mit proteinbiochemischer Methodik zu validieren und näher zu charakterisieren und (2.) einen möglichen Einfluss dieser Interaktion auf entzündliche und neoplastische Prozesse zu untersuchen.

Es konnte *in vitro* und *in cellula* gezeigt werden, dass die CD99-Ektodomäne von löslichem und membranständigem Meprin β an spezifischen Stellen gespalten bzw. gesheddet werden kann. Das entstehende membrangebundene C-terminale Fragment wird von der γ -Sekretase, einer Intramembranprotease, weiter prozessiert. CD99 unterliegt damit der sog. *regulated intramembrane proteolysis*, ausgelöst durch die extrazelluläre limitierte Proteolyse. Alle Spaltstellen befinden sich jeweils in Aminosäureabschnitten, die über mehrere Vertebratenspezies hochgradig konserviert sind. Auch im Mausmodell scheint CD99 durch Meprin β prozessiert zu werden. Es bleibt zu klären, von welchen Zelltypen die Proteolyse ausgeht und in welchem pathophysiologischen Kontext sie stattfindet.

In einem murinen Entzündungsmodell hatte die Reduktion von Meprin- β -Aktivität keinen Einfluss auf die CD99-Oberflächenexpression von Leukozyten. Unabhängig davon zeigten *Mep1b*^{-/-}-Mäuse jedoch eine verminderte Einwanderung von Leukozyten an den Entzündungsort, was für eine proinflammatorische Rolle von Meprin β *in vivo* spricht.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität von Meprin β zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src führt, jedoch ebenfalls unabhängig von der CD99-Spaltung. Da eine erhöhte Src-Aktivität mit vielen Tumorentitäten assoziiert ist, kann dieser Mechanismus der Src-Aktivierung durch Meprin β eine Grundlage zur Erforschung einiger Meprin- β -assoziierter Tumoren sein.

Bei den Tumor-assoziierten CD99-Varianten p.D92H und p.D92Y führen nicht-synonyme Punktmutationen zum Verlust des Aspartats an der Meprin- β -Spaltstelle der Ektodomäne. Die Prozessie-

rung *in cellula* wurde dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt, da redundante Aspartatreste in der konservierten Region um die Spaltstelle als Ausweichspaltstelle dienen konnten. Jedoch förderte die D92H-Variante in einem zellbasierten Assay ein erhöhtes Migrationspotenzial.

Zusammengefasst ist Meprin β die erste bekannte sog. Sheddase von CD99. Die evolutionäre Konservierung der Spaltstelle impliziert die funktionelle Bedeutung der proteolytischen Interaktion. Perspektivisch können spezifischere Expressions- und Detektionsmethoden zur Aufklärung der beteiligten Zellen und damit der (patho-)physiologischen Relevanz beitragen. Auch für die Beantwortung der Frage nach der Relevanz von Meprin β in Prozessen wie Entzündung und Tumorentstehung liefern die vorliegenden Ergebnisse weitere Hinweise auf eine eher nachteilige Auswirkung erhöhter Meprin- β -Expression.

Literaturverzeichnis

- ADZHUBEI, I. A., SCHMIDT, S., PESHKIN, L., RAMENSKY, V. E., GERASIMOVA, A., BORK, P., KONDRASHOV, A. S. und SUNYAEV, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248–249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248 (zitiert auf S. 50).
- ALBERTI, I., BERNARD, G., ROUQUETTE-JAZDANIAN, A. K., PELASSY, C., POURTEIN, M., AUSSEL, C. und BERNARD, A. (2002). CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB J* 16: 1946–1948. DOI: 10.1096/fj.02-0049fje (zitiert auf S. 72).
- AMBROS, I. M., AMBROS, P. F., STREHL, S., KOVAR, H., GADNER, H. und SALZER-KUNTSCHIK, M. (1991). MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67: 1886–1893. DOI: 10.1002/1097-0142(19910401)67:7<1886::aid-cncr2820670712>3.0.co;2-u (zitiert auf S. 8).
- ARNOLD, P., OTTE, A. und BECKER-PAULY, C. (2017). Meprin metalloproteases: Molecular regulation and function in inflammation and fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 2096–2104. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.011 (zitiert auf S. 16, 66, 68).
- AROLAS, J. L., BRODER, C., JEFFERSON, T., GUEVARA, T., STERCHI, E. E., BODE, W., STÖCKER, W., BECKER-PAULY, C. und GOMIS-RÜTH, F. X. (2012). Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16131–16136. DOI: 10.1073/pnas.1211076109 (zitiert auf S. 3, 5, 6).
- AUBRIT, F., GELIN, C., PHAM, D., RAYNAL, B. und BERNARD, A. (1989). The biochemical characterization of E2, a T cell surface molecule involved in rosettes. *Eur J Immunol* 19: 1431–1436. DOI: 10.1002/eji.1830190813 (zitiert auf S. 72).
- 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. und BOND, J. S. (2009). *MEP1A* allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2: 220–231. DOI: 10.1038/mi.2009.3 (zitiert auf S. 16).
- BANERJEE, S., JIN, G., BRADLEY, S. G., MATTERS, G. L., GAILEY, R. D., CRISMAN, J. M. und BOND, J. S. (2011). Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G273–82. DOI: 10.1152/ajpgi.00504.2009 (zitiert auf S. 16).
- BECKER, C., KRUSE, M.-N., SLOTTY, K. A., KÖHLER, D., HARRIS, J. R., RÖSMANN, S., STERCHI, E. E. und STÖCKER, W. (2003). Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 384: 825–831. DOI: 10.1515/BC.2003.092 (zitiert auf S. 3, 5, 15).

- BECKER-PAULY, C., BARRÉ, O., SCHILLING, O., AUF DEM KELLER, U., OHLER, A., BRODER, C., SCHÜTTE, A., KAPPELHOFF, R., STÖCKER, W. und OVERALL, C. M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics* 10: M111.009233. DOI: 10.1074/mcp.M111.009233 (zitiert auf S. 6).
- BECKER-PAULY, C., HÖWEL, M., WALKER, T., VLAD, A., AUFENVENNE, K., OJI, V., LOTTAZ, D., STERCHI, E. E., DEBELA, M., MAGDOLEN, V., TRAUPE, H. und STÖCKER, W. (2007). The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 127: 1115–1125. DOI: 10.1038/sj.jid.5700675 (zitiert auf S. 6).
- BEDAU, T., PETERS, F., PROX, J., ARNOLD, P., SCHMIDT, F., FINKERNAGEL, M., KÖLLMANN, S., WICHERT, R., OTTE, A., OHLER, A., STIRNBERG, M., LUCIUS, R., KOUDELKA, T., THOLEY, A., BIASIN, V., PIETRZIK, C. U., KWAPISZEWSKA, G. und BECKER-PAULY, C. (2017a). Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J* 31: 1226–1237. DOI: 10.1096/fj.201601113R (zitiert auf S. 28, 30).
- BEDAU, T., SCHUMACHER, N., PETERS, F., PROX, J., ARNOLD, P., KOUDELKA, T., HELM, O., SCHMIDT, F., RABE, B., JENTZSCH, M., ROSENSTIEL, P., SEBENS, S., THOLEY, A., ROSE-JOHN, S. und BECKER-PAULY, C. (2017b). Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin β but alter cell migration in vitro. *Oncotarget* 8: 54873–54888. DOI: 10.18632/oncotarget.18966 (zitiert auf S. 30).
- BERNARD, A., AUBRIT, F., RAYNAL, B., PHAM, D. und BOUMSELL, L. (1988). A T cell surface molecule different from CD2 is involved in spontaneous rosette formation with erythrocytes. *J Immunol* 140: 1802–1807 (zitiert auf S. 8).
- BERTENSHAW, G. P., TURK, B. E., HUBBARD, S. J., MATTERS, G. L., BYLANDER, J. E., CRISMAN, J. M., CANTLEY, L. C. und BOND, J. S. (2001). Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J Biol Chem* 276: 13248–13255. DOI: 10.1074/jbc.M011414200 (zitiert auf S. 5).
- BEYNON, R. J. und BOND, J. S. (1983). Deficiency of a kidney metalloproteinase activity in inbred mouse strains. *Science* 219: 1351–1353. DOI: 10.1126/science.6338590 (zitiert auf S. 2).
- BEYNON, R. J., SHANNON, J. D. und BOND, J. S. (1981). Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J* 199: 591–598. DOI: 10.1042/bj1990591 (zitiert auf S. 2).
- BIASIN, V., WYGRECKA, M., MARSH, L. M., BECKER-PAULY, C., BRCIC, L., GHANIM, B., KLEPETKO, W., OLSCHIEWSKI, A. und KWAPISZEWSKA, G. (2017). Meprin β contributes to collagen deposition in lung fibrosis. *Sci Rep* 7: 39969. DOI: 10.1038/srep39969 (zitiert auf S. 69).
- BIASIN, V., MARSH, L. M., EGEMNAZAROV, B., WILHELM, J., GHANIM, B., KLEPETKO, W., WYGRECKA, M., OLSCHIEWSKI, H., EFERL, R., OLSCHIEWSKI, A. und KWAPISZEWSKA, G. (2014). Meprin β , a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol* 233: 7–17. DOI: 10.1002/path.4303 (zitiert auf S. 6, 69).

- BIXEL, G., KLOEP, S., BUTZ, S., PETRI, B., ENGELHARDT, B. und VESTWEBER, D. (2004). Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood* 104: 3205–3213. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1184 (zitiert auf S. 7, 8).
- BIXEL, M. G., PETRI, B., KHANDOGA, A. G., KHANDOGA, A., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., WOLBURG, H., MÄRZ, S., KROMBACH, F. und VESTWEBER, D. (2007). A CD99-related antigen on endothelial cells mediates neutrophil but not lymphocyte extravasation in vivo. *Blood* 109: 5327–5336. DOI: 10.1182/blood-2006-08-043109 (zitiert auf S. 8).
- BOND, J. S., SHANNON, J. D. und BEYNON, R. J. (1983). Certain mouse strains are deficient in a kidney brush-border metallo-endopeptidase activity. *Biochem J* 209: 251–255. DOI: 10.1042/bj2090251 (zitiert auf S. 2).
- BRODER, C., ARNOLD, P., VADON-LE GOFF, S., KONERDING, M. A., BAHR, K., MÜLLER, S., OVERALL, C. M., BOND, J. S., KOUDELKA, T., THOLEY, A., HULMES, D. J. S., MOALI, C. und BECKER-PAULY, C. (2013). Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14219–14224. DOI: 10.1073/pnas.1305464110 (zitiert auf S. 7).
- BRODER, C. und BECKER-PAULY, C. (2013). The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J* 450: 253–264. DOI: 10.1042/BJ20121751 (zitiert auf S. 6).
- BUTLER, P. E. und BOND, J. S. (1988). A latent proteinase in mouse kidney membranes. Characterization and relationship to meprin. *J Biol Chem* 263: 13419–13426 (zitiert auf S. 2).
- CARR, J. C., SHERMAN, S. K., WANG, D., DAHDALEH, F. S., BELLIZZI, A. M., O'DORISIO, M. S., O'DORISIO, T. M. und HOWE, J. R. (2013). Overexpression of membrane proteins in primary and metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Ann Surg Oncol* 20 Suppl 3: S739–S746. DOI: 10.1245/s10434-013-3318-6 (zitiert auf S. 6).
- CHALARIS, A., RABE, B., PALIGA, K., LANGE, H., LASKAY, T., FIELDING, C. A., JONES, S. A., ROSE-JOHN, S. und 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. DOI: 10.1182/blood-2007-01-067918 (zitiert auf S. 69).
- CHEN, J., ELFIKY, A., HAN, M., CHEN, C. und SAIF, M. W. (2014). The Role of Src in Colon Cancer and Its Therapeutic Implications. *Clin Colorectal Cancer* 13: 5–13. DOI: 10.1016/j.clcc.2013.10.003 (zitiert auf S. 70).
- CHIANG, A. C. und MASSAGUÉ, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med* 359: 2814–2823. DOI: 10.1056/NEJMra0805239 (zitiert auf S. 11).
- CHUNG, S. S., ENG, W. S., HU, W., KHALAJ, M., GARRETT-BAKELMAN, F. E., TAVAKKOLI, M., LEVINE, R. L., CARROLL, M., KLIMEK, V. M., MELNICK, A. M. und PARK, C. Y. (2017). CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in myeloid malignancies. *Sci Transl Med* 9: eaaj2025. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaj2025 (zitiert auf S. 9).

- CRISMAN, J. M., ZHANG, B., NORMAN, L. P. und BOND, J. S. (2004). Deletion of the Mouse Meprin β Metalloprotease Gene Diminishes the Ability of Leukocytes to Disseminate through Extracellular Matrix. *J Immunol* 172: 4510–4519. DOI: 10.4049/jimmunol.172.7.4510 (zitiert auf S. 6).
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J.-M. und BRENNER, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188–1190. DOI: 10.1101/gr.849004 (zitiert auf S. 6).
- DOVEY, H. F., JOHN, V., ANDERSON, J. P., CHEN, L. Z., SAINT ANDRIEU, P. DE, FANG, L. Y., FREEDMAN, S. B., FOLMER, B., GOLDBACH, E., HOLSZTYNSKA, E. J., HU, K. L., JOHNSON-WOOD, K. L., KENNEDY, S. L., KHOLODENKO, D., KNOPS, J. E., LATIMER, L. H., LEE, M., LIAO, Z., LIEBERBURG, I. M., MOTTER, R. N., MUTTER, L. C., NIETZ, J., QUINN, K. P., SACCHI, K. L., SEUBERT, P. A., SHOPP, G. M., THORSETT, E. D., TUNG, J. S., WU, J., YANG, S., YIN, C. T., SCHENK, D. B., MAY, P. C., ALTSTIEL, L. D., BENDER, M. H., BOGGS, L. N., BRITTON, T. C., CLEMENS, J. C., CZILLI, D. L., DIECKMAN-MCGINTY, D. K., DROSTE, J. J., FUSON, K. S., GITTER, B. D., HYSLOP, P. A., JOHNSTONE, E. M., LI, W. Y., LITTLE, S. P., MABRY, T. E., MILLER, F. D. und AUDIA, J. E. (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76: 173–181. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00012.x (zitiert auf S. 16).
- DREYMUELLER, D., UHLIG, S. und LUDWIG, A. (2015). ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308: L325–L343. DOI: 10.1152/ajplung.00294.2014 (zitiert auf S. 66).
- DUARTE, D. B., VASKO, M. R. und FEHRENBACHER, J. C. (2016). Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. *Curr Protoc Pharmacol* 72: 3009. DOI: 10.1002/0471141755.ph0506s72 (zitiert auf S. 67).
- DUFOUR, E. M., DEROCHE, A., BAE, Y. und MULLER, W. A. (2009). CD99 Is Essential for Leukocyte Diapedesis In Vivo. *Cell Commun Adhes* 15: 351–363. DOI: 10.1080/15419060802442191 (zitiert auf S. 8).
- DUMERMUTH, E., ELDERING, J. A., GRÜNBERG, J., JIANG, W. und STERCHI, E. E. (1993). Cloning of the PABA peptide hydrolase alpha subunit (PPH α) from human small intestine and its expression in COS-1 cells. *FEBS Lett* 335: 367–375. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80421-p (zitiert auf S. 3).
- DUMERMUTH, E., STERCHI, E. E., JIANG, W. P., WOLZ, R. L., BOND, J. S., FLANNERY, A. V. und BEYNON, R. J. (1991). The astacin family of metalloendopeptidases. *J Biol Chem* 266: 21381–21385 (zitiert auf S. 3).
- DWORZAK, M. N., FRITSCH, G., BUCHINGER, P., FLEISCHER, C., PRINTZ, D., ZELLNER, A., SCHÖLLHAMMER, A., STEINER, G., AMBROS, P. F. und GADNER, H. (1994). Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* 83: 415–425 (zitiert auf S. 8).
- ELDERING, J. A., GRÜNBERG, J., HAHN, D., CROES, H. J., FRANSEN, J. A. und STERCHI, E. E. (1997). Polarised expression of human intestinal *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin) α and β subunits in Madin-Darby canine kidney cells. *Eur J Biochem* 247: 920–932. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00920.x (zitiert auf S. 3).

- FELLINGER, E. J., GARIN-CHESA, P., TRICHE, T. J., HUVOS, A. G. und RETTIG, W. J. (1991). Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *Am J Pathol* 139: 317–325 (zitiert auf S. 8).
- FORBES, S. A., BEARE, D., GUNASEKARAN, P., LEUNG, K., BINDAL, N., BOUTSELAKIS, H., DING, M., BAMFORD, S., COLE, C., WARD, S., KOK, C. Y., JIA, M., DE, T., TEAGUE, J. W., STRATTON, M. R., McDERMOTT, U. und CAMPBELL, P. J. (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 43: D805–11. DOI: 10.1093/nar/gku1075 (zitiert auf S. 50).
- GOMIS-RÜTH, F. X., BOTELHO, T. O. und BODE, W. (2012). A standard orientation for metallopeptidases. *Biochim Biophys Acta* 1824: 157–163. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.04.014 (zitiert auf S. 6).
- GOOZ, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 146–169. DOI: 10.3109/10409231003628015 (zitiert auf S. 2).
- GORBEA, C. M., FLANNERY, A. V. und BOND, J. S. (1991). Homo- and heterotetrameric forms of the membrane-bound metalloendopeptidases meprin A and B. *Arch Biochem Biophys* 290: 549–553. DOI: 10.1016/0003-9861(91)90580-c (zitiert auf S. 3).
- GORBEA, C. M., MARCHAND, P., JIANG, W., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. und BOND, J. S. (1993). Cloning, expression, and chromosomal localization of the mouse Meprin β subunit. *J Biol Chem* 268: 21035–21043 (zitiert auf S. 3).
- GOSWAMI, D., MÄRZ, S., LI, Y.-T., ARTZ, A., SCHÄFER, K., SEELIGE, R., PACHECO-BLANCO, M., JING, D., BIXEL, M. G., ARAKI, M., ARAKI, K., YAMAMURA, K.-I. und VESTWEBER, D. (2017). Endothelial CD99 supports arrest of mouse neutrophils in venules and binds to neutrophil PILRs. *Blood* 129: 1811–1822. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733394 (zitiert auf S. 8, 67, 72).
- GRÜNBERG, J., DUMERMUTH, E., ELDERING, J. A. und STERCHI, E. E. (1993). Expression of the alpha subunit of PABA peptide hydrolase (EC 3.4.24.18) in MDCK cells. Synthesis and secretion of an enzymatically inactive homodimer. *FEBS Lett* 335: 376–379. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80422-q (zitiert auf S. 5).
- HAHN, D., PISCHITZIS, A., ROESMANN, S., HANSEN, M. K., LEUENBERGER, B., LUGINBUEHL, U. und 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. DOI: 10.1074/jbc.M211169200 (zitiert auf S. 5, 68).
- HAMILTON, G., FELLINGER, E. J., SCHRATTER, I. und FRITSCH, A. (1988). Characterization of a human endocrine tissue and tumor-associated Ewing's sarcoma antigen. *Cancer Res* 48: 6127–6131 (zitiert auf S. 8).
- HERZOG, C., HAUN, R. S. und KAUSHAL, G. P. (2019). Role of meprin metalloproteinases in cytokine processing and inflammation. *Cytokine* 114: 18–25. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.11.032 (zitiert auf S. 6).

- HERZOG, C., HAUN, R. S., LUDWIG, A., SHAH, S. V. und KAUSHAL, G. P. (2014). ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J Biol Chem* 289: 13308–13322. DOI: 10.1074/jbc.M114.559088 (zitiert auf S. 5, 68).
- IUPAC-IUB JCBN (1984). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* 138: 9–37. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb07877.x (zitiert auf S. 3, 9).
- 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. und BECKER-PAULY, C. (2015). Metalloprotease meprin β is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem J* 470: 91–103. DOI: 10.1042/BJ20141417 (zitiert auf S. 5).
- 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. und BECKER-PAULY, C. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 70: 309–333. DOI: 10.1007/s00018-012-1106-2 (zitiert auf S. 5, 7, 9, 68).
- JIANG, W., GORBEA, C. M., FLANNERY, A. V., BEYNON, R. J., GRANT, G. A. und BOND, J. S. (1992). The alpha subunit of meprin A. Molecular cloning and sequencing, differential expression in inbred mouse strains, and evidence for divergent evolution of the alpha and beta subunits. *J Biol Chem* 267: 9185–9193 (zitiert auf S. 3).
- JURISCH-YAKSI, N., SANNERUD, R. und ANNAERT, W. (2013). A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta* 1828: 2815–2827. DOI: 10.1016/j.bbame.2013.04.016 (zitiert auf S. 66).
- KLEIFELD, O., DOUCET, A., AUF DEM KELLER, U., PRUDOVA, A., SCHILLING, O., KAINTHAN, R. K., STARR, A. E., FOSTER, L. J., KIZHAKKEDATHU, J. N. und 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. DOI: 10.1038/nbt.1611 (zitiert auf S. 5).
- KOENEN, R. R., PRUESSMEYER, J., SOEHNLEIN, O., FRAEMOHS, L., ZERNECKE, A., SCHWARZ, N., REISS, K., SARABI, A., LINDBOM, L., HACKENG, T. M., WEBER, C. und LUDWIG, A. (2009). Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113: 4799–4809. DOI: 10.1182/blood-2008-04-152330 (zitiert auf S. 41).
- KOUNNAS, M. Z., WOLZ, R. L., GORBEA, C. M. und BOND, J. S. (1991). Meprin-A and -B. Cell surface endopeptidases of the mouse kidney. *J Biol Chem* 266: 17350–17357 (zitiert auf S. 3).
- KRONENBERG, D., BRUNS, B. C., MOALI, C., VADON-LE GOFF, S., STERCHI, E. E., TRAUPE, H., BÖHM, M., HULMES, D. J. S., STÖCKER, W. und BECKER-PAULY, C. (2010). Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol* 130: 2727–2735. DOI: 10.1038/jid.2010.202 (zitiert auf S. 6).

- LEE, D. H. und GOLDBERG, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8: 397–403. DOI: 10.1016/s0962-8924(98)01346-4 (zitiert auf S. 16).
- LEVY, R., DILLEY, J., FOX, R. I. und WARNKE, R. (1979). A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6552–6556. DOI: 10.1073/pnas.76.12.6552 (zitiert auf S. 8).
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. und NOURSHARGH, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689. DOI: 10.1038/nri2156 (zitiert auf S. 10).
- LÓPEZ-OTÍN, C. (2015). *The Mammalian Degradome Database*. <http://degradome.uniovi.es/dindex.html>. [abgerufen am 27. Februar 2020] (zitiert auf S. 1).
- LOTTAZ, D., HAHN, D., MÜLLER, S., MÜLLER, C. und STERCHI, E. E. (1999). Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the alpha and beta subunits. *Eur J Biochem* 259: 496–504. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00071.x (zitiert auf S. 6).
- LOTTAZ, D., MAURER, C. A., NOËL, A., BLACHER, S., HUGUENIN, M., NIEVERGELT, A., NIGGLI, V., KERN, A., MÜLLER, S., SEIBOLD, F., FRIESS, H., BECKER-PAULY, C., STÖCKER, W. und STERCHI, E. E. (2011). Enhanced activity of meprin- α , a pro-migratory and pro-angiogenic protease, in colorectal cancer. *PLoS One* 6: e26450. DOI: 10.1371/journal.pone.0026450 (zitiert auf S. 70).
- LOU, O., ALCAIDE, P., LUSCINSKAS, F. W. und MULLER, W. A. (2007). CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol* 178: 1136–1143. DOI: 10.4049/jimmunol.178.2.1136 (zitiert auf S. 8).
- MACADAM, G. C., BEYNON, R. J. und BOND, J. S. (1990). A cryptic meprin-like proteolytic activity in mouse kidney brush border membranes. *Int J Biochem* 22: 989–996. DOI: 10.1016/0020-711x(90)90205-h (zitiert auf S. 3).
- MADEIRA, F., PARK, Y. M., LEE, J., BUSO, N., GUR, T., MADHUSOODANAN, N., BASUTKAR, P., TIVEY, A. R. N., POTTER, S. C., FINN, R. D. und LOPEZ, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47: W636–W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268 (zitiert auf S. 33).
- MADSEN, C. D. und SAHAI, E. (2010). Cancer dissemination—lessons from leukocytes. *Dev Cell* 19: 13–26. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.06.013 (zitiert auf S. 12).
- MAHIDDINE, K., MALLAVIALLE, A., BZIOUECH, H., LARBRET, F., BERNARD, A. und BERNARD, G. (2016). CD99 isoforms regulate CD1a expression in human monocyte-derived DCs through ATF-2/CREB-1 phosphorylation. *Eur J Immunol* 46: 1460–1471. DOI: 10.1002/eji.201546143 (zitiert auf S. 72).
- MAITRA, A., HANSEL, D. E., ARGANI, P., ASHFAQ, R., RAHMAN, A., NAJI, A., DENG, S., GERADTS, J., HAWTHORNE, L., HOUSE, M. G. und YEO, C. J. (2003). Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res* 9: 5988–5995 (zitiert auf S. 6).

- MANARA, M. C., BERNARD, G., LOLLINI, P.-L., NANNI, P., ZUNTINI, M., LANDUZZI, L., BENINI, S., LATTANZI, G., SCIANDRA, M., SERRA, M., COLOMBO, M. P., BERNARD, A., PICCI, P. und SCOTLANDI, K. (2006). CD99 acts as an oncosuppressor in osteosarcoma. *Mol Biol Cell* 17: 1910–1921. DOI: 10.1091/mbc.e05-10-0971 (zitiert auf S. 9, 37, 70).
- MANES, T. D. und POBER, J. S. (2011). Identification of endothelial cell junctional proteins and lymphocyte receptors involved in transendothelial migration of human effector memory CD4+ T cells. *J Immunol* 186: 1763–1768. DOI: 10.4049/jimmunol.1002835 (zitiert auf S. 8).
- MARCHAND, P., TANG, J., JOHNSON, G. D. und 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. DOI: 10.1074/jbc.270.10.5449 (zitiert auf S. 3).
- MINDER, P., BAYHA, E., BECKER-PAULY, C. und STERCHI, E. E. (2012). Meprin α transactivates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via ligand shedding, thereby enhancing colorectal cancer cell proliferation and migration. *J Biol Chem* 287: 35201–35211. DOI: 10.1074/jbc.M112.368910 (zitiert auf S. 70).
- MORICOLI, D., MULLER, W. A., CARBONELLA, D. C., BALDUCCI, M. C., DOMINICI, S., WATSON, R., FIORI, V., WEBER, E., CIANFRIGLIA, M., SCOTLANDI, K. und MAGNANI, M. (2014). Blocking monocyte transmigration in in vitro system by a human antibody scFv anti-CD99. Efficient large scale purification from periplasmic inclusion bodies in E. coli expression system. *J Immunol Methods* 408: 35–45. DOI: 10.1016/j.jim.2014.04.012 (zitiert auf S. 8).
- MULLER, W. A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* 6: 323–344. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130224 (zitiert auf S. 11).
- (2016). Localized signals that regulate transendothelial migration. *Curr Opin Immunol* 38: 24–29. DOI: 10.1016/j.coi.2015.10.006 (zitiert auf S. 8, 10).
- MULLER, W. A. und LUSCINSKAS, F. W. (2008). Assays of transendothelial migration in vitro. *Methods Enzymol* 443: 155–176. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02009-0 (zitiert auf S. 67).
- NORMAN, L. P., JIANG, W., HAN, X., SAUNDERS, T. L. und BOND, J. S. (2003). Targeted disruption of the meprin β gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 23: 1221–1230. DOI: 10.1128/mcb.23.4.1221-1230.2003 (zitiert auf S. 16).
- O’LEARY, N. A., WRIGHT, M. W., BRISTER, J. R., CIUFO, S., HADDAD, D., McVEIGH, R., RAJPUT, B., ROBERTSE, B., SMITH-WHITE, B., AKO-ADJEI, D., ASTASHYN, A., BADRETDIN, A., BAO, Y., BLINKOVA, O., BROVER, V., CHETVERNIN, V., CHOI, J., COX, E., ERMOLAEVA, O., FARRELL, C. M., GOLDFARB, T., GUPTA, T., HAFT, D., HATCHER, E., HLAVINA, W., JOARDAR, V. S., KODALI, V. K., LI, W., MAGLOTT, D., MASTERSON, P., MCGARVEY, K. M., MURPHY, M. R., O’NEILL, K., PUJAR, S., RANGWALA, S. H., RAUSCH, D., RIDDICK, L. D., SCHOCH, C., SHKEDA, A., STORZ, S. S., SUN, H., THIBAUD-NISSEN, F., TOLSTOY, I., TULLY, R. E., VATSAN, A. R., WALLIN, C., WEBB, D., WU, W., LANDRUM, M. J., KIMCHI, A., TATUSOVA, T., DiCUCCIO, M., KITTS, P., MURPHY, T. D. und PRUITT, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion,

- and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 44: D733–45. DOI: 10.1093/nar/gkv1189 (zitiert auf S. 32).
- OHLER, A., DEBELA, M., WAGNER, S., MAGDOLEN, V. und BECKER-PAULY, C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem* 391: 455–460. DOI: 10.1515/BC.2010.023 (zitiert auf S. 5).
- OUYANG, H.-Y., XU, J., LUO, J., ZOU, R.-H., CHEN, K., LE, Y., ZHANG, Y.-F., WEI, W., GUO, R.-P. und SHI, M. (2016). MEP1A contributes to tumor progression and predicts poor clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 63: 1227–1239. DOI: 10.1002/hep.28397 (zitiert auf S. 6).
- PARK, S. H., SHIN, Y. K., SUH, Y. H., PARK, W. S., BAN, Y. L., CHOI, H.-S., PARK, H. J. und JUNG, K. C. (2005). Rapid divergency of rodent CD99 orthologs: implications for the evolution of the pseudoautosomal region. *Gene* 353: 177–188. DOI: 10.1016/j.gene.2005.04.023 (zitiert auf S. 31).
- PÉREZ-SILVA, J. G., ESPAÑOL, Y., VELASCO, G. und QUESADA, V. (2016). The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease. *Nucleic Acids Res* 44: D351–5. DOI: 10.1093/nar/gkv1201 (zitiert auf S. 1, 2).
- PETERS, F. und BECKER-PAULY, C. (2019). Role of meprin metalloproteases in metastasis and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 38: 347–356. DOI: 10.1007/s10555-019-09805-5 (zitiert auf S. 6, 70).
- PETERS, F., SCHARFENBERG, F., COLMORGEN, C., ARMBRUST, F., WICHERT, R., ARNOLD, P., POTEMPA, B., POTEMPA, J., PIETRZIK, C. U., HÄSLER, R., ROSENSTIEL, P. und BECKER-PAULY, C. (2019). Tethering soluble meprin α in an enzyme complex to the cell surface affects IBD-associated genes. *FASEB J* 33: 7490–7504. DOI: 10.1096/fj.201802391R (zitiert auf S. 3).
- PISCHITZIS, A., HAHN, D., LEUENBERGER, B. und STERCHI, E. E. (1999). *N*-Benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid hydrolase β (human Meprin β). A 13-amino-acid sequence is required for proteolytic processing and subsequent secretion. *Eur J Biochem* 261: 421–429. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00268.x (zitiert auf S. 5).
- PROX, J. (2012). „Funktions- und Regulationsanalyse der zinkabhängigen Metalloprotease ADAM10, der bei der Alzheimer Demenz beteiligten α -Sekretase“. Diss. Kiel (zitiert auf S. 18).
- RABE, B., CHALARIS, A., MAY, U., WAETZIG, G. H., SEEGERT, D., WILLIAMS, A. S., JONES, S. A., ROSE-JOHN, S. und SCHELLER, J. (2008). Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood* 111: 1021–1028. DOI: 10.1182/blood-2007-07-102137 (zitiert auf S. 69).
- RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J. und FINN, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 44: D343–50. DOI: 10.1093/nar/gkv1118 (zitiert auf S. 2).
- REYMOND, N., D'ÁGUA, B. B. und RIDLEY, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13: 858–870. DOI: 10.1038/nrc3628 (zitiert auf S. 12).

- ROSKOSKI, R. (2015). Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94: 9–25. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.01.003 (zitiert auf S. 70).
- RUTLEDGE, N. S., WEBER, E. W., WINGER, R., TOURTELLOTTE, W. G., PARK, S. H. und MULLER, W. A. (2015). CD99-like 2 (CD99L2)-deficient mice are defective in the acute inflammatory response. *Exp Mol Pathol* 99: 455–459. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.08.011 (zitiert auf S. 65).
- SAMUS, M., SEELIGE, R., SCHÄFER, K., SOROKIN, L. und VESTWEBER, D. (2018). CD99L2 deficiency inhibits leukocyte entry into the central nervous system and ameliorates neuroinflammation. *J Leukoc Biol* 104: 787–797. DOI: 10.1002/JLB.1A0617-228R (zitiert auf S. 65).
- SCHÄFFLER, H., LI, W., HELM, O., KRÜGER, S., BÖGER, C., PETERS, F., RÖCKEN, C., SEBENS, S., LUCIUS, R., BECKER-PAULY, C. und ARNOLD, P. (2019). The cancer-associated meprin β variant G32R provides an additional activation site and promotes cancer cell invasion. *J Cell Sci* 132: jcs220665. DOI: 10.1242/jcs.220665 (zitiert auf S. 6).
- SCHARFENBERG, F., ARMBRUST, F., MARENGO, L., PIETRZIK, C. und BECKER-PAULY, C. (2019). Regulation of the alternative β -secretase meprin β by ADAM-mediated shedding. *Cell Mol Life Sci* 76: 3193–3206. DOI: 10.1007/s00018-019-03179-1 (zitiert auf S. 5).
- SCHECHTER, I. und BERGER, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157–162. DOI: 10.1016/s0006-291x(67)80055-x (zitiert auf S. 5, 6, 51).
- SCHENKEL, A. R., MAMDOUH, Z., CHEN, X., LIEBMAN, R. M. und MULLER, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 3: 143–150. DOI: 10.1038/ni749 (zitiert auf S. 8).
- SCHILLING, O., HUESGEN, P. F., BARRÉ, O., AUF DEM KELLER, U. und 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. DOI: 10.1038/nprot.2010.178 (zitiert auf S. 5).
- SCHÖNHERR, C., BIEN, J., ISBERT, S., WICHERT, R., PROX, J., ALTMIEPPEN, H., KUMAR, S., WALTER, J., LICHTENTHALER, S. F., WEGGEN, S., GLATZEL, M., BECKER-PAULY, C. und PIETRZIK, C. U. (2016). Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegener* 11: 19. DOI: 10.1186/s13024-016-0084-5 (zitiert auf S. 7).
- SCHULZ, B., PRUESSMEYER, J., MARETZKY, T., LUDWIG, A., BLOBEL, C. P., SAFTIG, P. und REISS, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102: 1192–1201. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805 (zitiert auf S. 41, 66).
- SCHÜTTE, A., ERMUND, A., BECKER-PAULY, C., JOHANSSON, M. E. V., RODRIGUEZ-PINEIRO, A. M., BÄCKHED, F., MÜLLER, S., LOTTAZ, D., BOND, J. S. und HANSSON, G. C. (2014). Microbial-induced meprin β 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. DOI: 10.1073/pnas.1407597111 (zitiert auf S. 5, 7).

- SCOTLANDI, K., ZUNTINI, M., MANARA, M. C., SCIANDRA, M., ROCCHI, A., BENINI, S., NICOLETTI, G., BERNARD, G., NANNI, P., LOLLINI, P.-L., BERNARD, A. und PICCI, P. (2007). CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene* 26: 6604–6618. DOI: 10.1038/sj.onc.1210481 (zitiert auf S. 9, 72).
- SHIRATORI, I., OGASAWARA, K., SAITO, T., LANIER, L. L. und ARASE, H. (2004). Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J Exp Med* 199: 525–533. DOI: 10.1084/jem.20031885 (zitiert auf S. 8).
- STERCHI, E. E., GREEN, J. R. und 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. DOI: 10.1042/cs0620557 (zitiert auf S. 2).
- (1983). Nonpancreatic hydrolysis of *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid (PABA peptide) in the rat small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2: 539–547. DOI: 10.1097/00005176-198302030-00024 (zitiert auf S. 2).
- STERCHI, E. E., STÖCKER, W. und BOND, J. S. (2008). Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: 309–328. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.002 (zitiert auf S. 2, 3, 6).
- SUH, Y. H., SHIN, Y. K., KOOK, M.-C., OH, K. I., PARK, W. S., KIM, S. H., LEE, I.-S., PARK, H. J., HUH, T.-L. und PARK, S. H. (2003). Cloning, genomic organization, alternative transcripts and expression analysis of CD99L2, a novel paralog of human CD99, and identification of evolutionary conserved motifs. *Gene* 307: 63–76. DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00401-3 (zitiert auf S. 31, 65).
- SULLIVAN, D. P. und MULLER, W. A. (2014). Neutrophil and monocyte recruitment by PECAM, CD99, and other molecules via the LBRC. *Semin Immunopathol* 36: 193–209. DOI: 10.1007/s00281-013-0412-6 (zitiert auf S. 11).
- SULLIVAN, D. P., WATSON, R. L. und MULLER, W. A. (2016). 4D intravital microscopy uncovers critical strain differences for the roles of PECAM and CD99 in leukocyte diapedesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311: H621–32. DOI: 10.1152/ajpheart.00289.2016 (zitiert auf S. 8, 11, 69).
- SUN, Q., JIN, H.-J. und BOND, J. S. (2009). Disruption of the meprin α and β genes in mice alters homeostasis of monocytes and natural killer cells. *Exp Hematol* 37: 346–356. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.10.016 (zitiert auf S. 6, 68).
- TANG, J. und BOND, J. S. (1998). Maturation of secreted meprin α during biosynthesis: role of the furin site and identification of the COOH-terminal amino acids of the mouse kidney metalloprotease subunit. *Arch Biochem Biophys* 349: 192–200. DOI: 10.1006/abbi.1997.0453 (zitiert auf S. 3).
- TAVAKKOLI, M., CHUNG, S. S. und PARK, C. Y. (2018). Do preclinical studies suggest that CD99 is a potential therapeutic target in acute myeloid leukemia and the myelodysplastic syndromes? *Expert Opin Ther Targets* 22: 381–383. DOI: 10.1080/14728222.2018.1464140 (zitiert auf S. 9).
- TURK, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5: 785–799. DOI: 10.1038/nrd2092 (zitiert auf S. 1).

- UHLÉN, M., FAGERBERG, L., HALLSTRÖM, B. M., LINDSKOG, C., OKSVOLD, P., MARDINOGLU, A., SILVERTSSON, Å., KAMPF, C., SJÖSTEDT, E., ASPLUND, A., OLSSON, I., EDLUND, K., LUNDBERG, E., NAVANI, S., SZIGYARTO, C. A.-K., ODEBERG, J., DJUREINOVIC, D., TAKANEN, J. O., HOBER, S., ALM, T., EDQVIST, P.-H., BERLING, H., TEGEL, H., MULDER, J., ROCKBERG, J., NILSSON, P., SCHWENK, J. M., HAMSTEN, M., FEILITZEN, K. VON, FORSBERG, M., PERSSON, L., JOHANSSON, F., ZWAHLEN, M., HEIJNE, G. VON, NIELSEN, J. und PONTÉN, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347: 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419 (zitiert auf S. 1).
- UNIPROT CONSORTIUM (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47: D506–D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049 (zitiert auf S. 32, 33).
- VESTWEBER, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 15: 692–704. DOI: 10.1038/nri3908 (zitiert auf S. 10).
- WANG, J., SHIRATORI, I., SATOH, T., LANIER, L. L. und ARASE, H. (2008). An essential role of sialylated O-linked sugar chains in the recognition of mouse CD99 by paired Ig-like type 2 receptor (PILR). *J Immunol* 180: 1686–1693. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1686 (zitiert auf S. 8, 72).
- WANG, X., CHEN, J., WANG, J., YU, F., ZHAO, S., ZHANG, Y., TANG, H. und PENG, Z. (2016). Metalloproteases meprin- α (MEP1A) is a prognostic biomarker and promotes proliferation and invasion of colorectal cancer. *BMC Cancer* 16: 383. DOI: 10.1186/s12885-016-2460-5 (zitiert auf S. 6, 70).
- WATSON, R. L., BUCK, J., LEVIN, L. R., WINGER, R. C., WANG, J., ARASE, H. und MULLER, W. A. (2015). Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. *J Exp Med* 212: 1021–1041. DOI: 10.1084/jem.20150354 (zitiert auf S. 8, 11, 31, 37).
- WICHERT, R., ERMUND, A., SCHMIDT, S., SCHWEINLIN, M., KSIAZEK, M., ARNOLD, P., KNITTLER, K., WILKENS, F., POTEMPA, B., RABE, B., STIRNBERG, M., LUCIUS, R., BARTSCH, J. W., NIKOLAUS, S., FALK-PAULSEN, M., ROSENSTIEL, P., METZGER, M., ROSE-JOHN, S., POTEMPA, J., HANSSON, G. C., DEMPSEY, P. J. und BECKER-PAULY, C. (2017). Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Rep* 21: 2090–2103. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.087 (zitiert auf S. 5, 7).
- WINGER, R. C., HARP, C. T., CHIANG, M.-Y., SULLIVAN, D. P., WATSON, R. L., WEBER, E. W., PODOJIL, J. R., MILLER, S. D. und MULLER, W. A. (2016). Cutting Edge: CD99 Is a Novel Therapeutic Target for Control of T Cell-Mediated Central Nervous System Autoimmune Disease. *J Immunol* 196: 1443–1448. DOI: 10.4049/jimmunol.1501634 (zitiert auf S. 8).
- YEATMAN, T. J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4: 470–480. DOI: 10.1038/nrc1366 (zitiert auf S. 70).

A. Anhang

A.1. Massenspektrometrie-Daten

Tabelle A.1.: Identifizierte Peptide für WT-Peptid. Vgl. dazu Abb. 3.18

Fraktion	AS	Sequenz	Masse (Na-H) ⁺		Abweichung (Da)
			gemessen	theoretisch	
CD99 WT (SSGSFSDADLADGVSGGE)					
1	1-6	SSGSFS . D	593,207	593,2183	0,0113
2	1-7	SSGSFSD . A	708,234	708,2453	0,0113
	7-12	S . DADLAD . G	641,23	641,2395	0,0095
3	7-11	S . DADLA . D	526,199	526,2125	0,0135
	8-12	D . ADLAD . G			
4	1-8	SSGSFSDA . D	779,275	779,2824	0,0074
5	—	-	—	—	—
6	9-17	A . DLADGVSGG . E	812,341	812,3402	0,0008
	9-18	A . DLADGVSGGE	941,380	941,3828	0,0028
7	7-17	S . DADLADGVSGG . E	998,397	998,4043	0,0073
	7-18	S . DADLADGVSGGE	1127,440	1127,4469	0,0069
8	1-12	SSGSFSDADLAD . G	1193,438	1193,4574	0,0194
9	1-11	SSGSFSDADLA . D	1078,420	1078,4305	0,0105
	1-17	SSGSFSDADLADGVSGG . E	1550,605	1550,6223	0,0173
	1-18	SSGSFSDADLADGVSGGE	1679,649	1679,6649	0,0159
10	1-18	SSGSFSDADLADGVSGGE	1679,646	1679,6649	0,0189

Tabelle A.2.: Identifizierte Peptide für D92H-Peptid. Vgl. dazu Abb. 3.18

Fraktion	AS	Sequenz	Masse *H ⁺ oder (Na-H) ⁺		Abweichung (Da)
			gemessen	theoretisch	
CD99 D92H (SSGSFSHADLADGVSGGE)					
1	1-9	SSGSFHAD . L	894,351*	894,3593	0,0083
2	1-8	SSGSFHA . D	779,328*	779,3324	0,0044
	2-8	S . SGSFHA . D	692,290	692,3004	0,0104
3	—	-	—	—	—
4	9-16	A . DLADGVSG . G	755,308	755,3188	0,0108
	9-18	A . DLADGVSGE	941,376	941,3828	0,0068
	6-17	F . SHADLADGVSGG . E	1085,484	1085,4863	0,0023
5	8-18	H . ADLADGVSGG . E	1012,410	1012,4199	0,0099
	6-18	F . SHADLADGVSGGE	1214,525	1214,5289	0,0039
6	—	-	—	—	—
7	1-11	SSGSFHADLA . D	1078,472*	1078,4805	0,0085
	1-11	SSGSFHADLAD . G	1193,498*	1193,5075	0,0095
8	1-17	SSGSFSHADLADGVSGG . E	1550,537*	1550,6723	0,1353
	1-18	SSGSFSHADLADGVSGGE	1679,574*	1679,7149	0,1409
9	1-18	SSGSFSHADLADGVSGGE	1679,714*	1679,7149	0,0009

Tabelle A.3.: Identifizierte Peptide für D92Y-Peptid. Vgl. dazu Abb. 3.18

Fraktion	AS	Sequenz	Masse (Na-H) ⁺		Abweichung (Da)
			gemessen	theoretisch	
CD99 D92Y (SSGSFSYADLADGVSGGE)					
1	1-5	SSGSF.S	506,176	506,1863	0,0103
2	—	-	—	—	—
3	9-16	A.DLADGVSG.G	755,310	755,3188	0,0088
	9-17	A.DLADGVSGG.E	812,331	812,3402	0,0092
	6-18	A.DLADGVSGGE	941,373	941,3828	0,0098
4	—	-	—	—	—
5	6-12	F.SYADLAD.G	776,299	776,3079	0,0089
	1-8	SSGSFSYA.D	827,312	827,3188	0,0068
	1-9	SSGSFSYAD.L	942,337	942,3457	0,0087
6	6-11	F.SYADLA.D	661,276	661,2809	0,0049
	2-8	S.SGSFSYA.D	740,284	740,2867	0,0027
	1-8	SSGSFSYA.D	827,317	827,3188	0,0018
7	6-17	F.SYADLADGVSGG.E	1133,458	1133,4727	0,0147
	6-18	F.SYADLADGVSGGE	1262,501	1262,5153	0,0143
8	6-18	F.SYADLADGVSGGE	1262,503	1262,5153	0,0123
9	1-12	SSGSFSYADLAD.G	1241,484	1214,4938	0,0098
10	1-11	SSGSFSYADLA.D	1126,453	1126,4669	0,0139
	1-18	SSGSFSYADLADGVSGGE	1727,680	1727,7013	0,0213

Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit unterstützt haben.

- Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly für das Vertrauen und die Möglichkeit, dieses Projekt bearbeiten zu dürfen, sowie für die konstruktive Unterstützung in allen großen und kleinen Anliegen des Laboralltags und darüber hinaus.
- Ich danke Hannes für seine großartige Betreuung. Seine fachliche und menschliche Kompetenz gepaart mit ständiger Präsenz und Motivation haben die Phase der Einarbeitung sehr einfach gemacht. Nachhaltig geprägt hat mich seine kritische, aber stets konstruktive Art.
- Es ist keine Selbstverständlichkeit, die Möglichkeit zu bekommen, als Medizinstudent an einem naturwissenschaftlichen Institut kollegial eingebunden zu sein. Dem Einsatz vieler Menschen ist es zu verdanken, dass so etwas im Rahmen eines strukturierten und geförderten Doktorandenprogramms möglich ist. Stellvertretend möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Rose-John dafür bedanken. Sein Engagement für den SFB 877 hat mir gezeigt, wie wissenschaftliches Arbeiten interdisziplinär und grenzüberschreitend funktionieren kann.
- Der ganzen AG Becker-Pauly danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Frederike, Philipp, Flo und Rielana gebührt Dank für die geduldige Beantwortung sämtlicher Fragen und die lebhaften Diskussionen, auch über nicht streng naturwissenschaftliche Themen.
- Bei allen Kooperationspartnern bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit: bei Dr. Neele Schumacher und Dr. Stefan Düsterhöft vom Biochemischen Institut für die Zusammenarbeit beim *air-pouch*-Versuch und die exzellente Unterstützung am FACS-Gerät bzw. mit der HPLC; bei Prof. Dr. Susanne Sebens und Dr. Ole Helm vom Institut für Experimentelle Tumorforschung für die freundliche und reibungslose Kooperation im Rahmen der Zellmigrationsexperimente; bei Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Tomas Koudelka vom Institut für Experimentelle Medizin für die Kooperation bei allen massenspektrometrischen Fragestellungen; beim Team von Prof. Dr. Claus Pietrzik vom Institut für Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Durchführung des Inhibitorversuches.
- Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Meiner Familie dafür, dass sie mir immer den nötigen Raum und das Vertrauen eingeräumt hat, frei meiner Neugierde zu folgen; meinen Freunden für unzählige Stunden voller Entdeckungen, Gespräche, Albernheiten, Unterstützung und Inspiration.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name Tillmann Bedau
Geburtsdatum 13. Juni 1993
Geburtsort Krefeld
E-Mail tillmann@bedau.de

AUSBILDUNG

10/2012–05/2020 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Medizinische Fakultät**
Studium der Humanmedizin

- 1. Staatsexamen (09/2014): *gut*
- 2. Staatsexamen (05/2019): *sehr gut*
- 3. Staatsexamen (05/2020): *gut*

09/2003–06/2012 **Arndt-Gymnasium Krefeld**
Allgemeine Hochschulreife

PRAKTISCHES JAHR

12/2019–04/2020 **Städtisches Krankenhaus Kiel**
Pflichttertial Chirurgie

- Chirurgische Klinik
- Chefärztin: Prof. Dr. I. Vogel

09/2019–12/2019 **Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Virchow-Klinikum**
Pflichttertial Innere Medizin

- Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin
- Direktor: Prof. Dr. K.-U. Eckardt

05/2019–09/2019 **Universitätsklinikum Köln**
Wahltertial Neurologie

- Klinik und Poliklinik für Neurologie
- Direktor: Prof. Dr. G. Fink

PROMOTION

- 04/2015–06/2016 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Biochemie**
Promotionsstipendium
- Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 877: „Proteolyse als regulatorisches Ereignis in der Pathophysiologie“
 - Doktorvater: Prof. Dr. C. Becker-Pauly
 - Thema: „Interaktion der Metalloprotease Meprin β mit dem Zelloberflächenprotein CD99 und den CD99-Varianten D92H und D92Y“

TAGUNGSBEITRÄGE

- 02/2016 **Winter School „Proteinases and inhibitors“, Tiers (Italien)**
Vortrag: „Biochemical and functional characterization of two CD99 cancer-associated mutations with regard to proteolysis by metalloprotease meprin β “
- 09/2015 **Summer School „Proteases and pathophysiology“, Kiel**
Poster: „Regulated intramembrane proteolysis (RIP) of CD99 initiated by meprin β as a regulatory event in oncogenesis“

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 07/2017 **BEDAU, T., SCHUMACHER, N., PETERS, F., PROX, J., ARNOLD, P., KOUDELKA, T., HELM, O., SCHMIDT, F., RABE, B., JENTZSCH, M., ROSENSTIEL, P., SEBENS, S., THOLEY, A., ROSE-JOHN, S. und BECKER-PAULY, C. (2017b).** Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin β but alter cell migration in vitro. *Oncotarget* 8: 54873–54888. DOI: 10.18632/oncotarget.18966.
- 03/2017 **BEDAU*, T., PETERS*, F., PROX*, J., ARNOLD, P., SCHMIDT, F., FINKERNAGEL, M., KÖLLMANN, S., WICHERT, R., OTTE, A., OHLER, A., STIRNBERG, M., LUCIUS, R., KOUDELKA, T., THOLEY, A., BIASIN, V., PIETRZIK, C. U., KWAPISZEWSKA, G. und BECKER-PAULY, C. (2017a).** Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J* 31: 1226–1237. DOI: 10.1096/fj.201601113R.
* geteilte Erstautorenschaft

Hamburg, den 12. April 2021