

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

Funktionelle Charakterisierung der krebsassoziierten Meprin β Varianten D47A und G32R

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von

Henning Paul Schäffler

aus

Filderstadt

Kiel, 2020

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, Biochemisches Institut

2. Berichterstatter/in Prof. Dr. Thilo Wedel, Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.03.2022

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

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionelle Charakterisierung der krebsassoziierten Meprin β Varianten D47A und G32R" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Kiel, den

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Proteasen/Meprin Metalloproteasen	1
1.2 Struktur und Aktivierung von Meprin β	2
1.3 Funktion und Substrate	4
1.4 Meprine und Krebs	7
1.5 Die Meprin β Varianten D47A und G32R	9
1.6 Ziele der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Verwendetes Material	12
2.2 Verwendete Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
2.2.2 Zellernte	20
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl	20
2.2.4 Herstellung von Zelllysaten	20
2.2.5 Transiente Transfektion	20
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung	21
2.2.7 Oberflächenbiotinylierung	22
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	22
2.2.9 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	23
2.2.10 Western-Blot	24
2.2.11 Coomassie-Färbung	24
2.2.12 Immunpräzipitation	24
2.2.13 Concanavalin A Fällung	25
2.2.14 Gezielte/ortsspezifische Mutagenese	25
2.2.15 Transformation von elektrokompetenten <i>E.Coli XL1 Blue</i>	28
2.2.16 Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten <i>E.Coli XL1 Blue</i>	28
2.2.17 Midi-Plasmidpräparation	28
2.2.18 Peptid basierter Oberflächenaktivitätsassay	28
2.2.19 Zellproliferation und Zellmigration/Invasion (xCELLigence System)	30

2.2.20	Immunhistochemische Meprin β Färbungen im gesunden und neoplastischen humanen Endometriumgewebe	32
2.2.21	Immunhistochemische Meprin β Färbungen im Kolonkarzinom	33
2.2.22	Probenvorbereitung Massenspektrometrie/ In-Gel Verdau	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Generierung der Meprin β Varianten D47A und G32R	36
3.2	Die Meprin β Varianten D47A und G32R zeigen eine typische Oberflächenexpression	37
3.2.1	Oberflächenbiotinylierung	37
3.2.2	Immunfluoreszenz	38
3.2.3	Meprin β Variante G32R zeigte erhöhte Oberflächenaktivität	39
3.2.4	Relativ verminderte Aktivierung der hyperaktiven G32R Variante durch Mariprase-2	40
3.3	Vermindert <i>Shedding</i> der hyperaktiven Meprin β G32R Variante durch ADAM17	42
3.3.1	Hyperaktive G32R Variante spaltet vermehrt membrangebunden IL-6-Rezeptor	44
3.4	Meprin β G32R_R61S Variante	45
3.5	Massenspektrometrie	48
3.6	Einfluss von Meprin β WT und den Varianten G32R und D47A auf Zellproliferation und Zellmigration	50
3.7	Meprin β Färbungen in humanem Gewebe	52
3.8	Meprin β im Kolonkarzinom	53
4	Diskussion	58
4.1	Hyperaktive Meprin β Variante G32R	58
4.2	Meprin β Expression im Endometrium.	61
4.3	Meprin β Expression im Endometriumkarzinom	62
4.4	Zellmigration und -proliferation	63
4.5	Meprin β im Kolonkarzinom	64
4.6	Meprin β als tumorassoziierte Protease	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literatur	69
7	Anhang	77
7.1	Ethik Antrag	77
8	Danksagung	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturmodell von Meprin β	3
Abbildung 1.2: Interaktion zwischen Meprin β , ADAM Proteasen und Matriptase 2:	4
Abbildung 1.3: Kombiniertes Strukturmodell der Meprin β Varianten G32R und D47A:.....	10
Abbildung 2.1: Funktionsprinzip des Peptid-Schneide-Assay:	29
Abbildung 2.2: Echtzeit Zellanalyse zur Messung der Zellmigration:	31
Abbildung 2.3: Echtzeit-Zellanalyse zur Messung der Zellinvasion.	32
Abbildung 3.1: Auszug der Aminosäuresequenz sequenzierter Konstrukte von Meprin β	36
Abbildung 3.2: Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis von Meprin β	37
Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Meprin β	38
Abbildung 3.4: Meprin β G32R Variante zeigt erhöhte Oberflächenaktivität:	40
Abbildung 3.5: Aktivitätssteigerung von Meprin β durch Matriptase 2	41
Abbildung 3.6: <i>Shedding</i> von Meprin β durch ADAM17	43
Abbildung 3.7: <i>Shedding</i> des IL-6R durch Meprin β	45
Abbildung 3.8: Aminosäuresequenz der G32R_R61S Variante.....	46
Abbildung 3.9: Analyse der Meprin β G32R_R61S Variante	47
Abbildung 3.10: Sequenzabdeckungen der Meprin β Varianten in der Massenspektrometrie	49
Abbildung 3.11: Proliferationsanalyse von Meprin β -transfizierten HeLa Zellen	51
Abbildung 3.12: Migrationsanalyse von Meprin β -transfizierten HeLa Zellen.....	52
Abbildung 3.13: Meprin β Expression in humanem Endometrium-Gewebe	53
Abbildung 3.14: Referenzstanzen der Meprin β Expression aus neoplastisch verändertem Kolongewebe	54
Abbildung 3.15: Einfluss der Meprin β Expression im Kolonkarzinom auf das Patientenüberleben	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen und Puffer	12
Tabelle 2: verwendete Kits	13
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Proteine	13
Tabelle 4: primäre Antikörper	15
Tabelle 5: sekundäre Antikörper	15
Tabelle 6: Laborgeräte.....	16
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 8: Computersoftware.....	18
Tabelle 9: verwendete Zelllinien	19
Tabelle 10: verwendete Plasmide	21
Tabelle 11: Puffer der SDS-Gelelektrophorese	23
Tabelle 12: Pipettierschema ortsspezifische Mutagenese.....	26
Tabelle 13: PCR Programm ortsspezifische Mutagenese.....	26
Tabelle 14: verwendete Primer	27
Tabelle 15: Statistische Auswertung der Meprin β Expression im Kolonkarzinom.....	56

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
biot.	biotinyliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
ConA	Concanavalin A
COS	von engl. <i>CV-1 in Origin, carrying SV40</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
Da	<i>Dalton</i> [1,660 538 782 (83) · 10 ⁻²⁷ kg]
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (Millipore Wasser)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylidcarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fetales bovines Kälberserum
g	Erdbeschleunigung g
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HeLa	von Henrietta Lacks
HPDE	<i>Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Line</i>

HRP	<i>horseradish</i>
ICD-O	Internationale Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie
Ig	Immunglobulin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
LB	lysogeni broth
MAM	<i>Meprin A5 protein receptor tyrosine phosphatase μ</i>
mca	(7-methoxycoumarin-4-yl)-acetyl
Meprin	<i>metalloprotease from renal tissue</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDIA6	<i>Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6</i>
PEI	Polyethylenimin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFU	<i>relative fluorescent units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Realtime Cell Analysis</i>
S1	Schutzstufe 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFM	<i>Serum free Medium</i>
Tab	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TRAF	<i>TNF-receptor associated factors</i>
Triton	<i>Octylphenoethoxylat</i>
Tween	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>(volume/volume)</i>
w/v	<i>(weight/volume)</i>
WT	Wildtyp
X	Beliebige Aminosäure

1 Einleitung

1.1 Proteasen/Meprin Metalloproteasen

Proteasen sind Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Lange hielt man Proteasen für Enzyme, die hauptsächlich für den Proteinverdau, also die (unspezifische) Degradation von extra- und intrazellulären Proteinen zuständig sind (Turk, 2006). Tatsächlich sind allerdings zwei Arten von Proteolyse zu unterscheiden. Neben der Proteindegredation, die zum Funktionsverlust und letztlich zum Abbau zu einzelnen Aminosäuren führt, sind Proteasen ebenso in der Lage, im Sinne einer posttranslationalen Modifikation, durch gezielte, limitierte Proteolyse die Proteinstruktur und Funktion ihrer Substrate zu verändern (Fortelny et al., 2014). Durch den enormen Erkenntnisgewinn der letzten Jahrzehnte sehen wir Proteasen heute daher vielmehr als „*master regulators*“ der Zelle (Ehrmann und Clausen, 2004), die entscheidend zur funktionellen Vielfalt des Proteoms beitragen. Das Proteom, definiert als die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt, ist ständigen Veränderungen unterworfen und damit in der Lage, sich wechselnden physiologischen sowie pathologischen Prozessen anzupassen (Wilkins et al., 2007). Verschiedene Proteasen spielen dabei Schlüsselrollen bei wichtigen physiologischen Prozessen wie der Kontrolle von Zellzyklus, Zellwachstum, Hämostase, Wundheilung, Immunität, Angiogenese, Umbau der Extrazellulärmatrix (EZM) und Apoptose (López-Otín und Bond, 2008; Turk et al., 2012). Eine Fehlregulation proteolytischer Aktivität ist folglich mit zahlreichen Pathologien, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Neurodegeneration, Entzündung oder Krebserkrankungen assoziiert. Hieraus ergibt sich folglich eine hohe Relevanz der Proteine und Proteasen für die medizinischen Forschung, sowohl als prognostische Biomarker als auch als therapeutische Targets (Dudani et al., 2018; Turk, 2006).

Für die mindestens 588 beschriebenen Proteasen des menschlichen Körpers (Pérez-Silva et al., 2016) existieren diverse Einteilungsmöglichkeiten. Als Exopeptidasen bezeichnet man Proteasen, die ihre Substrate vom COOH- bzw. NH₂-Terminus her prozessieren. Proteasen, die Substrate innerhalb der Polypeptidkette spalten, werden Endopeptidasen genannt. Kernstück einer Peptidase stellt dabei das aktive Zentrum dar, welches die Hydrolyse von Peptidbindungen ermöglicht. Durch die Addition eines Wassermoleküls an eine Peptidbindung wird dabei die Verknüpfung zweier Aminosäuren, die sogenannte Amidbindung, gespalten. Da die für die Katalyse beteiligten Aminosäuren von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität der Peptidase sind, werden Peptidasen in der MEROPS Datenbank in sechs Gruppen eingeteilt (Rawlings et al., 2018). Am häufigsten vertreten sind die Serin- und Metalloproteasen, gefolgt von Cystein-, Aspartat-, Threonin- und Glutamat-Proteasen.

Diese sechs Klassen wiederum können anhand ihrer Aminosäuresequenz verschiedenen Familien, und anhand ihrer dreidimensionalen Struktur diversen Clans zugeordnet werden (Rawlings et al., 2018).

Meprin α und Meprin β sind Zink-abhängige Endopeptidasen, gehören zur Klasse der Metalloproteasen und können der Superfamilie der Metzinkine im weiteren Sinne sowie der Familie der Astacine im engeren Sinne zugeordnet werden (Bond und Beynon, 1995). Die Familie der Astacine zeichnet sich durch ein Zink bindendes Motiv (HExxHxxGxxHxxxRxDR) und einen sogenannten *Met-Turn* aus, der durch seine Nähe zum aktiven Zentrum und einem konservierten Tyrosin-Rest (Tyr149) für die Koordination des zentralen Zink-Ions entscheidend ist (Chen et al., 1998; Gomis-Rüth et al., 2012). Als Mitglieder der Metzinkin Superfamilie sind Meprine eng verwandt mit MMPs (*matrix metalloproteinases*) und ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease domain*).

1.2 Struktur und Aktivierung von Meprin β

Meprin α und Meprin β sind vielfach glykosylierte Typ-I-Transmembranproteine. Sie werden als sogenannte Zymogene exprimiert und benötigen daher posttranslationale Modifikationen, um katalytisch aktiv zu werden (Jäckle et al., 2015; Johnson und Bond, 1997; Ohler et al., 2010). Ihre Multidomänen-Struktur setzt sich zusammen aus einem inhibierenden, N-terminalen Propeptid, der katalytischen Domäne, einer MAM (*meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ*)-Domäne (Beckmann und Bork, 1993), einer TRAF (*tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor*)-Domäne (Uren und Vaux, 1996), einer EGF (*epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne und einer Transmembran-Domäne mit einem kurzen zytosolischen Schwanz (Broder und Becker-Pauly, 2013).

Erst nach Abspaltung des N-terminalen Propeptids durch lösliche oder membrangebundene Serinproteasen entfaltet Meprin β seine proteolytische Aktivität. Abbildung 1.1 zeigt die Abschirmung des aktiven Zentrums durch das in orange dargestellte, inhibitorisch wirkende Propeptid. Die Protease Trypsin und *kallikrein related peptidases* (KLK 4,5,8) wurden als lösliche Aktivatoren (Ohler et al., 2010), die Serinprotease Matriptase-2 als membrangebundener Aktivator für Meprin β beschrieben (Jäckle et al., 2015). Die gemeinsame Schnittstelle liegt dabei zwischen den Aminosäuren Arginin-61 und Asparagin-62 (Jäckle et al., 2015).

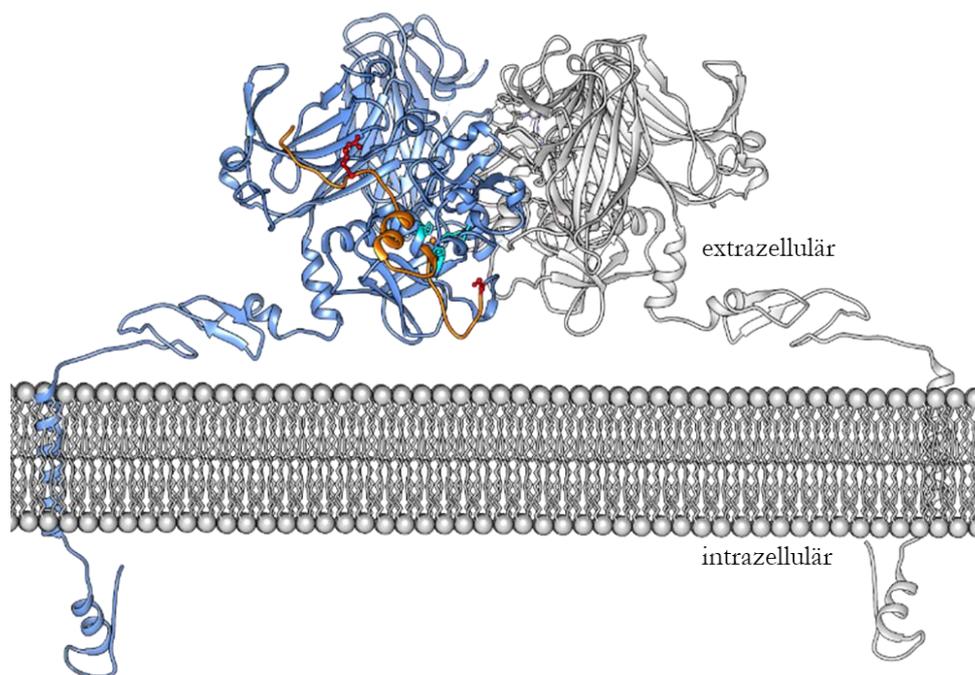


Abbildung 1.1: Strukturmodell von Meprin β

Modell des Zymogens von Meprin β als membrangebundenes Homodimer basierend auf der Röntgenkristallstruktur der Ektodomäne (PDB ID: 4GWN). Das abgebildete Modell wurde von Arolas et al. entwickelt. Zur EGF-like Domäne, der Transmembranregion und dem zytosolischen Schwanz liegen keine Strukturdaten vor, diese wurden am Computer modelliert (Arolas et al., 2012). Ein Monomer ist in blau, das zweite in grau dargestellt. Das Propeptid (orange) schirmt das aktive Zentrum mit den drei Histidin-Resten (cyan), die das zentrale Zink Ion koordinieren (gold), ab. Die Aminosäurereste der Varianten D47A und G32R innerhalb des Propeptides sind in rot dargestellt (verändert nach Arolas et al., 2012, PNAS).

Während Meprin β , über eine zwischen den MAM-Domänen gelegene Disulfidbrücke, Homodimere bildet und primär auf der Zelloberfläche verankert bleibt (Arolas et al., 2012; Becker et al., 2003), wird Meprin α über eine zusätzliche, der TRAF- und EGF-Domäne zwischengeschalteten Sequenz (*inserted (I)-domain*) im Golgi-Apparat gespalten und anschließend sezerniert. Im Extrazellulärraum bildet lösliches Meprin α Disulfid-verbrückte Homooligomere aus und oligomerisiert weiter zu riesigen, bis zu 6.4 MDa großen, nicht-kovalent verknüpften Komplexen (Bertenshaw et al., 2003). Zudem konnten Heterooligomere aus Meprin β und Meprin α identifiziert werden (Peters et al., 2019).

Auch Meprin β kann sekundär von der Zelloberfläche abgespalten werden. Hierfür bekannte Proteasen sind die membranständigen ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 (Herzog et al., 2014; Jefferson et al., 2013). Damit ergeben sich für Meprin β mindestens zwei verschiedene Wirkungsräume - membrangebunden an der Oberfläche von Zellen bzw. in abgespaltener, löslicher Form im Extrazellulärraum. Entscheidend hierbei ist, dass nur das inaktive Pro-Meprin β von der Zelloberfläche gespalten werden kann (Wichert et al., 2017). Aktivatoren wie die Matriptase-2 (Jäckle et al., 2015) nehmen somit Einfluss sowohl auf die Aktivität als auch den Wirkungsraum der Protease, indem sie durch Aktivierung der membrangebundenen Form eine Abspaltung verhindern. Dies ist von

besonderer Bedeutung, da sich die Substratspektren der membrangebundenen und der löslichen Form in Teilen unterscheiden (Bien et al., 2012; Schutte et al., 2014). Membrangebundenes, aktives Meprin β ist darüber hinaus seinerseits in der Lage, ADAM10 zu aktivieren (Jefferson et al., 2013; Wichert et al., 2019), was auf eine vielschichtige Regulation der Aktivität, Lokalisation und Substratspezifität der Protease schließen lässt.

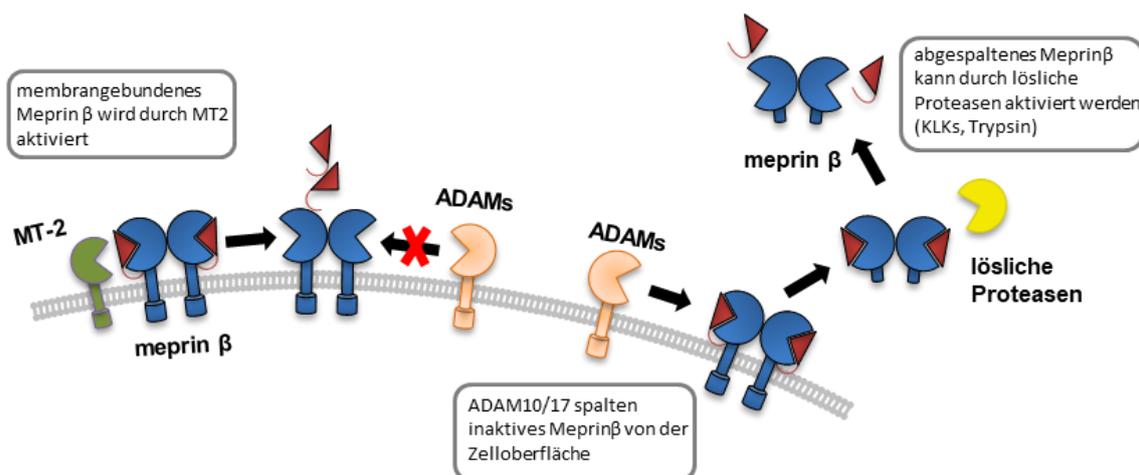


Abbildung 1.2: Interaktion zwischen Meprin β , ADAM Proteasen und Matriptase 2:

ADAM10 und ADAM17 spalten Meprin β von der Zelloberfläche und setzen die Ektodomäne als lösliches Meprin β frei. Diese kann im Extrazellulärraum durch lösliche Proteasen aktiviert werden (KLKs: *kallikrein related peptidases*). Matriptase 2 (MT2) aktiviert als ein membrangebundener Aktivator Meprin β direkt an der Zelloberfläche. Aktiviertes membrangebundenes Meprin β kann nicht durch die ADAM Proteasen gespalten werden. (Modifiziert nach Wichert et al., 2017).

1.3 Funktion und Substrate

Die Funktion einer Protease wird maßgeblich durch ihre Lokalisation innerhalb eines Organismus, sowohl auf Organebene als auch auf subzellulärer Ebene bestimmt. Entdeckt wurden Meprine Mitte der 80er Jahre in der Niere von Mäusen (Beynon et al., 1981) und durch die Beobachtung proteolytischer Aktivität im Dünndarm von Patientinnen und Patienten im Z.n. Pankreatektomie (Sterchi et al., 1982). „Meprin“ steht hierbei als Akronym für *metalloendopeptidase from renal tissue*. Im Verlauf konnten Meprine in weiteren Teilen des Gastrointestinaltraktes, der Haut, der Lunge, Leukozyten und verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Becker-Pauly et al., 2007; Kronenberg et al., 2010; Prox et al., 2015; Sterchi et al., 2009). Auf subzellulärer Ebene konnte für Meprin β die apikale Expression in Tubuluszellen der Niere und in Enterozyten des Dünndarms nachgewiesen werden (Beynon et al., 1981; Butler et al., 1987; Sterchi et al., 1982; Wichert et al., 2017). Cisplatin induziertes akutes Nierenversagen führte in Mäusen interessanterweise zu einer Verschiebung der Meprin β Expression von apikal nach basolateral (Herzog et al., 2015).

Der zweite Schlüssel zum Verständnis einer Protease ist die Kenntnis des jeweiligen Substratspektrums einer Protease. Durch die Kombination verschiedener massenspektrometrischer Methoden, wie *PICS* (*Proteomic Identification of protease Cleavage Sites* (Schilling et al., 2011)) und *TAILS* (*Terminal Amine Isotopic Labelling of Substrates* (Kleifeld et al., 2010)) eröffneten sich dahingehend neue Perspektiven und es konnten zahlreiche *in vitro* Substrate für Meprine identifiziert werden. Darunter Proteine der EZM, Wachstumsfaktoren, Zytokine und ihre Rezeptoren, Adhäsionsproteine, Proteasen und verschiedene Inhibitoren (Becker-Pauly et al., 2011; Jefferson et al., 2013). Die festgestellte Spaltungspräferenz von Meprin α und Meprin β für negativ geladene Aminosäuren in der P1'-Position ist dabei einzigartig unter den extrazellulären Proteasen (Bertenshaw et al., 2001).

Seit den 80er Jahren wurde Meprin β mit verschiedenen physiologischen sowie pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht. Da sich diese Arbeit vornehmlich mit Meprin β Aktivität und deren Beteiligung und Auswirkungen im Kontext von Entzündungs- und Tumorerkrankungen beschäftigt, beschränkt sich diese Einleitung auf diesen Bereich.

Als extrazelluläre Protease ist Meprin β über die Spaltung verschiedener Proteine der EZM wie Prokollagen Typ I und III, Kollagen Typ IV, Nidogen-1, Tenascin-C und Fibronectin am Umbau der EZM beteiligt (Ambort et al., 2008, 2010; Kruse et al., 2004; Walker et al., 1998). Die EZM ist der nicht-zelluläre Anteil eines dynamischen, dreidimensionalen Raumes, der in allen Gewebetypen existiert und wichtige Funktionen in der Kontrolle und Homöostase des jeweiligen Gewebes besitzt (Hynes, 2009). Die Prozessierung verschiedener Komponenten der EZM durch diverse Proteasen ist entscheidend für ihre Struktur und Zusammensetzung. Proteolytisch freigesetzte, bioaktive Moleküle der EZM nehmen darüber hinaus regulierenden Einfluss auf biologische Prozesse wie die Angiogenese oder die Migration von Immun- und Tumorzellen (Bonnans et al., 2014). Chronische oder schwere Gewebsverletzungen führen über entzündliche Prozesse zu exzessiver EZM Produktion und können letztlich eine Fibrose auslösen.

In der Haut induziert Meprin β die Assemblierung von Prokollagen I und III und wurde hier in Zusammenhang mit Fibrose und Keloid-Tumoren gebracht (Becker-Pauly et al., 2007; Kronenberg et al., 2010). Meprin β defiziente Mäuse zeigten umgekehrt eine geringe Kollagendichte der Haut mit verminderter Zugfestigkeit (Broder et al., 2013). Im Hinblick auf fibrotische Erkrankungen ist jedoch noch nicht klar, ob Meprin β ausschließlich am EZM-Umbau beteiligt ist, der die Krankheitssymptome auslöst, oder aber am vorangehenden entzündlichen Schritt, der den Beginn einer Fibrose induziert (Arnold, Otte, et al., 2017).

Neben EZM Komponenten werden auch einige Transmembranproteine durch limitierte Proteolyse von Meprin β von der Zelloberfläche gelöst. Dieser Vorgang wird allgemein als *Ectodomain Shedding* oder einfach *Shedding* bezeichnet (Arribas und Merlos-Suárez, 2003), beteiligte Proteasen werden

Sheddase genannt. Auch Meprin β agiert als *Sheddase* (Arolas et al., 2012) und ist z.B. in der Lage, membranständigen Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) zu spalten und durch sogenanntes IL-6R *Trans-signaling* proinflammatorische Stimuli in Zielzellen zu setzen (Arnold, Boll, et al., 2017).

Für die Verknüpfung einer Meprin Aktivität mit entzündlichen Prozessen sprechen die Ergebnisse einiger weiterer Experimente und Veröffentlichungen. So konnte für Meprin α eine Beteiligung an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Banerjee et al., 2009, 2011) und für Meprin β eine Beteiligung an entzündlichen Erkrankungen der Niere nachgewiesen werden (Oneda et al., 2008). Neben dem IL-6R konnten Interleukin-18 und CD99 als weitere proinflammatorisch wirkende Substrate von Meprin β beschrieben werden. IL-18 ist ein Schlüssel-Zytokin der Entzündungsreaktion von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Sivakumar et al., 2002). *Banerjee und Bond* konnten zeigen, dass neben Caspase-1 und Proteinase-3 (PR-3) auch Meprin β biologisch aktives IL-18 generiert (Banerjee und Bond, 2008). CD99 ist ein Typ-I-Transmembranprotein und ein Schlüsselmolekül während der Leukozytenmigration (Muller, 2016). Durch Spaltung von CD99 förderte rekombinantes Meprin β *in vitro* die transendotheliale Migration von *Lewis lung carcinoma cells* durch eine bEnd.3 Zellschicht, was eine Beteiligung von Meprin β bei der Extravasation von Zellen und damit einem essentiellen Schritt bei Entzündungsprozessen nahe legt (Bedau, Peters, et al., 2017). Die proinflammatorische Aktivität von Meprin β konnte von selbigem Autor im Maus-Modell bestätigt werden. Meprin β *knock-out* Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant verminderte Anzahl an infiltrierten Immunzellen im mittels *Air-pouch* Modell und Injektion des Irritans Carrageen simulierten Entzündungsherd.

Neben der Förderung von Zellmigration, Entzündung und Fibrose besitzt Meprin β gleichzeitig aber auch anti-inflammatorische Eigenschaften. Durch Degradation pathogener Typ 1 Pili stört Meprin β die Adhäsion und Invasion adhären-invasiver *E.coli* Stämme (AIEC) in Patientinnen und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Dabei korreliert die intestinale Expression von Meprin β in CED Patientinnen und Patienten mit der Schwere ihrer Entzündung (Vazeille et al., 2011). Durch die Spaltung von Mucin-2, einem wichtigen Strukturprotein der intestinalen Schleimhautbarriere, trägt Meprin β außerdem zur regelmäßigen Ablösung und Erneuerung der Muzinschicht im Intestinum bei und verhindert damit eine bakterielle Überwucherung (Schutte et al., 2014; Wichert et al., 2017).

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Substratspektren der löslichen und der membrangebundenen Form in Teilen. Während einige Substrate beiden Formen zugänglich sind, wird z.B. der IL-6-R nur von membrangebundenem Meprin β gespalten (Arnold, Boll, et al., 2017), wohingegen MUC 2 exklusiv von der löslichen Form der Protease prozessiert wird (Schutte et al., 2014).

1.4 Meprine und Krebs

Seit Langem wird vermutet, dass zwischen einer chronischen Entzündung und der Progression maligner Tumore eine enge Beziehung besteht (Balkwill und Mantovani, 2001). Schon Virchow sah in der Entzündung aufgrund ihrer proliferationsfördernden Effekte eine mögliche Ursache von Tumoren und tatsächlich werden heute einige Tumorentitäten vorangehenden Infektionen und chronischen Entzündungen zugeschrieben (Kuper et al., 2000). Auch für fibrotische Erkrankungen z.B. der Leberzirrhose, denen i.d.R eine chronische Entzündung vorangeht, konnte ein Zusammenhang mit der Ausbildung maligner Tumore, im Falle der Leberzirrhose dem Hepatozellulären-Karzinom, hergestellt werden (El-Serag, 2011). Ein Tumor nutzt dabei die ihm zugutekommenden Eigenschaften einer Entzündung, wie die von Entzündungszellen ausgeschütteten Wachstumsfaktoren, lympho-angiogenetische Faktoren und Proteasen, um zu wachsen und Metastasen auszubilden (Coussens und Werb, 2002). Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 nehmen als Bestandteil komplexer krebsassoziierter Zytokinnetzwerke Einfluss auf systemische paraneoplastische Immunreaktionen und die Mikroumgebung des Tumors (Lippitz, 2013). Den Tumor umgebende Entzündungszellen, Krebs-assoziierte Fibroblasten und deren Signalmoleküle, Prozesse in der EZM und angiogenetische Vorgänge werden unter anderem zum sogenannten Tumormikromilieu (engl. *tumor microenvironment*) gezählt, welches die Karzinogenese, sowie den Erfolg einer Tumorthapie entscheidend beeinflussen kann (Balkwill et al., 2012; Binnewies et al., 2018).

Proteasen sind Teil dieses *microenvironments* und spielen sowohl bei Entzündungsprozessen als solches, als auch in der Tumorbiologie eine wichtige Rolle. Einige wesentliche Kennzeichen aggressiver Tumore, wie die Invasion von Tumorzellen, tumorassoziierte Angiogenese, Metastasierungsprozesse und verschiedene Signalwege, sind direkt auf proteolytische Aktivität zurückzuführen (Joyce und Pollard, 2009; Mason und Joyce, 2011). Für die mit Meprineng verwandte Gruppe der MMPs, eine der wohl am intensivsten untersuchten Proteasen in diesem Kontext, konnte eine Überexpression in zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden (Kessenbrock et al., 2010).

Auch Meprinen wird durch ihre Beteiligung an Entzündungsprozessen (Herzog et al., 2019), dem Gewebeumbau und ihrem Substratspektrum eine mögliche Rolle in der Tumorentwicklung und Progression zugeschrieben (Arnold, Otte, et al., 2017; Peters und Becker-Pauly, 2019).

Meprin α konnte in den letzten Jahren mit verschiedenen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom, dem Nierenzellkarzinom und dem hepatozellulären Karzinom in Zusammenhang gebracht werden (Breig et al., 2017; Chinello et al., 2014; Lottaz et al., 1999; OuYang et al., 2016; Peters und Becker-Pauly, 2019; Wang et al., 2016).

Erstmals assoziiert mit Krebserkrankungen wurde Meprin α durch die Identifizierung im kolorektalen Karzinom und der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (Lottaz et al., 1999). Im Unterschied zu der apikalen

Meprin α Expression in gesundem Gewebe, zeigte sich eine basolaterale Umverteilung und stromale Akkumulation von Meprin α . In einer weiteren Arbeit konnten in Proben von Kolonkarzinom-Patientinnen und Patienten ebenfalls erhöhte mRNA- und Protein-Level für Meprin α nachgewiesen werden. Die Expression von Meprin α zeigte dabei eine positive Korrelation mit Tumorparametern wie Tumorgröße, Tumorstadium und dem Überleben der Patientinnen und Patienten (Wang et al., 2016). Meprin α vermittelte pro-migratorische Effekte, mit abnehmender Invasivität der Zellen nach Behandlung mit dem Meprin α Inhibitor Actinonin, konnten in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 beobachtet werden (Matters et al., 2005). Darüber hinaus konnten Meprin α in verschiedenen *in vitro* Experimenten pro-angiogenetische-, pro-proliferative und weitere pro-migratorische Effekte zugeschrieben werden (Schütte et al., 2010; Lottaz et al., 2011; Minder et al., 2012).

Die Überexpression von Meprin α im hepatozellulären Karzinom zeigte eine Korrelation mit verschiedenen, prognostisch ungünstigen Parametern (OuYang et al., 2016). Eine andere Arbeit identifizierte das im HCC überexprimierte Oncoprotein Reptin (Raymond et al., 2015) als ein Regulatorprotein der Meprin α Expression und zeigte die signifikant positive Korrelation von Reptin- und Meprin α Expression im HCC (Breig et al., 2017).

Trotz der strukturellen Verwandtschaft zu Meprin α konnten für Meprin β bislang deutlich weniger Erkenntnisse gewonnen werden, welche die Protease in direkten Zusammenhang mit spezifischen Tumoren bringt. In neuroendokrinen Tumoren des Pankreas wurde eine Expression von Meprin β zwar beschrieben, die funktionelle Bedeutung allerdings ist weiterhin unklar (Carr et al., 2013). Nach aktuellem Kenntnisstand steht in diesem Kontext der Einfluss von Meprin β auf Inflammation, Zellmigration und Extravasation im Vordergrund. Die Meprin β spezifische Spaltung von E-Cadherin, einem Transmembranprotein und wichtigem Bestandteil von Adhärenzverbindungen epithelialer Zellen führte *in vitro* zu einer verminderten interzellulären Adhärenz von Meprin β überexprimierenden epithelialen Zellen (Huguenin et al., 2008). Weiter konnte, wie oben beschrieben, das Adhäsionsmolekül CD99 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Substrat von Meprin β identifiziert werden (Bedau, Peters, et al., 2017; Bedau, Schumacher, et al., 2017). Auch das Substratspektrum der Metalloprotease Meprin β , zu dem unter anderem eine Reihe extrazellulärer Proteine (Kronenberg et al., 2010) und Proteine der Basallamina epithelialer Zellverbände (Fibronektin, Kollagen IV (Kruse et al., 2004), Nidogen-I (Walker et al., 1998)) gehören, deutet auf einen möglichen, die Zellmigration fördernden Effekt hin. Zusammenfassend bleiben allerdings bezüglich der Rolle von Meprin β in der Entwicklung und Progression bösartiger Tumore noch viele Fragen offen.

1.5 Die Meprin β Varianten D47A und G32R

Die massenhafte Genotypisierung verschiedener solider Tumore konnte in den letzten Jahren etliche tumorrelevante Mutationen aufdecken und ist zu einem wichtigen diagnostischen und prognostischen Werkzeug maligner Tumore geworden (Bauer et al., 2016). Sie ist fester Bestandteil einer personalisierten Therapie maligner Tumore, durch die signifikante Therapie- und Überlebens-Vorteile für Patientinnen und Patienten erreicht werden können (Schwaederle et al., 2015). Neben Mutationen bekannter Schlüsselproteine, die das Überleben, die Teilung und die Proliferation von Zellen kontrollieren, konnten Mutationen in zahlreichen weiteren Proteinen und Proteasen identifiziert werden. Die Analyse solcher tumorassoziierter Mutationen ermöglicht einerseits die Einordnung der Mutationen in unauffällige „*silent bystander mutations*“ oder in aktive, die Tumorgenese/Metastasierung fördernde „*driving mutations*“, und kann darüber hinaus zum tieferen Verständnis funktioneller und struktureller Mechanismen der jeweiligen Protease beitragen.

Auf verschiedenen Online-Datenbanken werden die gesammelten Daten groß angelegter Sequenzierungsansätze zusammengeführt und sind öffentlich zugänglich. Die COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (Forbes et al., 2017)) Datenbank listet 464 Mutationen (Stand 26.09.2020) im Gen von Meprin β auf, die in Tumoren verschiedener Gewebe identifiziert wurden.

Bereits in der Vergangenheit konnte über die Generierung artifizieller Meprin β Varianten zum funktionellen Verständnis der Metalloprotease Meprin β beigetragen werden (Arnold et al., 2015; Jäckle et al., 2015; Wichert et al., 2017).

Die Auswahl der in dieser Arbeit charakterisierten Varianten erfolgte dabei nicht zufällig. Anhand der Kristallstruktur von Meprin β (Arolas et al., 2012) wurde gezielt nach Mutationen mit potentiell Einfluss auf die Funktion der Protease gesucht. Die Mutationen D47A (Aspartat an Position 47 zu Alanin) und G32R (Glycin an Position 32 zu Arginin) liegen beide innerhalb des inhibierenden Propeptids der Protease. Die G32R Variante wurde gewählt, da das eingefügte Arginin eine potentielle Spaltungsstelle für tryptische Proteasen darstellt, was zu einer zusätzlichen Aktivierungsstelle innerhalb des Propeptids führen könnte. Bei der D47A Variante wurde eine geladene Aminosäure gegen eine ungeladene Aminosäure ausgetauscht, wodurch sich Beeinträchtigungen der korrekten Proteinfaltung ergeben könnten.

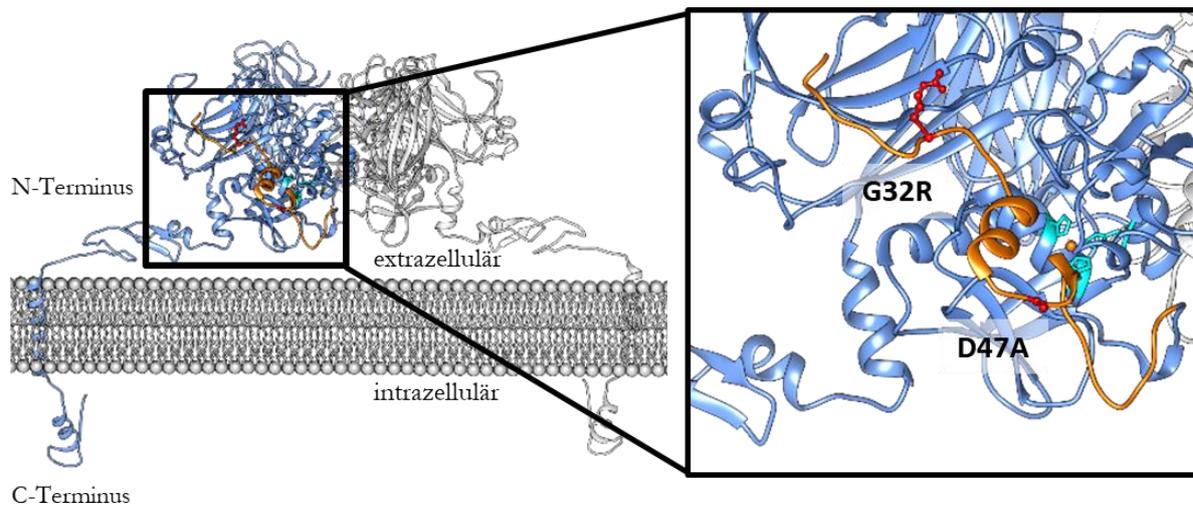


Abbildung 1.3: Kombiniertes Strukturmodell der Meprin β Varianten G32R und D47A:

Molekulares Strukturmodell von Meprin β an der Membranoberfläche. Ein Monomer ist in blau, das zweite in grau dargestellt. Der Ausschnitt zeigt das Propeptid (orange) und die drei Histidin-Reste (cyan) des Aktiven Zentrums, die das zentrale Zink Ion koordinieren (gold). Die Aminosäurereste der Varianten G32R (Glycin zu Arginin) und D47A (Aspartat zu Alanin) innerhalb des Propeptides sind in rot dargestellt (verändert nach Arolas et al., 2012, PNAS).

1.6 Ziele der Arbeit

Aufgrund der Beteiligung von Meprin β an einer Vielzahl physiologischer wie pathologischer Prozesse, kommt dem Verständnis der Metalloprotease Meprin β , auch im Sinne eines Verständnisses zusammenhängender Protease-Netzwerke, eine besondere Bedeutung zu. Entscheidende Fragen betreffen dabei die Aktivität, die Regulation durch Interaktionspartner und die organspezifische Expression der Protease. Hauptziel dieser Arbeit war es, mithilfe von tumorassoziierten Mutationen zum molekularen Verständnis der Protease beizutragen und die Rolle von Meprin β im neoplastischen Kontext weiter zu untersuchen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten dazu die beiden Meprin β Varianten D47A (Aspartat an Position 47 zu Alanin) und G32R (Glycin an Position 32 zu Arginin) durch gezielte Mutagenese erstellt und anschließend biochemisch charakterisiert werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Aktivität der Protease und ihre Regulation durch Interaktionspartner gelegt. Weiter sollte durch transiente Transfektion verschiedener Zelllinien der Einfluss von Meprin β , respektive der Varianten, auf wichtige Charakteristika der Karzinogenese wie Zelladhäsion, -proliferation und -migration analysiert werden.

Wie viele andere Mutationen wurden auch die in dieser Arbeit untersuchten Meprin β Varianten D47A und G32R im Rahmen der in den letzten Jahren zunehmenden und massenhaft durchgeführten Genotypisierung solider Tumore identifiziert. Eine Expression von Meprin β im humanen Endometrium ist bis dato nicht beschrieben. Folglich gibt es auch keine Kenntnis über mögliche physiologische wie pathologische Funktionen der Protease im Endometrium. In einem ersten Schritt sollte daher im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Meprin β im gesunden humanen Endometrium geprüft werden. Mögliche Veränderungen des Expressionsmusters von Meprin β in neoplastisch verändertem Gewebe sollten anschließend an Operationspräparaten von Patientinnen mit Endometriumkarzinom untersucht werden.

Anders als im Endometrium, ist eine Expression von Meprin β im menschlichen Gastrointestinaltrakt bereits bekannt. Die Kooperation mit dem Pathologischen Institut in Kiel ermöglichte die immunhistochemische Färbung von Meprin β in Gewebeproben eines repräsentativen Kolonkarzinom Kollektivs. Ziel hierbei war es, mögliche Einflüsse der Meprin β Expression auf die Tumorbilogie und das Überleben der Kolonkarzinom Patientinnen und Patienten zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

Tabelle 1: Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Biotin-Lösung	PBS-CM, 1 mg/ml Biotin
Blockierungspuffer	3 % (w/v) BSA oder 5 % (w/v) Magermilchpulver, TBS
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Isopropanol, 7.5 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0.15 M Aluminiumsulfathydrat, 10 % (v/v) Ethanol, 242 µM Coomassie G250, 20 ‰ (v/v) o-Phosphorsäure
DAPI-Lösung	1 mg/ml DAPI, PBS
DEMEM 10%FBS, Pen/Strep	DEMEM, 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
EBC-Lysepuffer	120 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5 % NP-40 (v/v), 1xComplete +EDTA Tablette, pH 7.4
EBC-Lyse-Puffer	120 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5 % NP-40, 1x cComplete Protease Inhibitor cocktail +EDTA(Roche), pH 7.4 in 50 ml ddH ₂ O
Kathoden Puffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8.0
LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl
Lysepuffer, Biotinylierung	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X 100, 0,1 % SDS, 1x cComplete ultra Tablette ohne EDTA
Lysepuffer ¹	PBS, +1 % Triton X100, +Complete EDTA free Tablette pH 7.4, Roche, Basel, Schweiz
PBS	135 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 9.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBS-CM	PBS pH 7.4, 0.1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂
Probenpuffer (5x)	2.5 ml Tris-HCL pH 6.8, 1 g SDS, 2.5 ml ddH ₂ O, 0.05 g Bromophenol blau, 5 ml Glycerol, 100-200 mM DTT
Quenching-Puffer	PBS-CM, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
SDS-HCL Lösung	10 ml 0.01 M HCL, 1 g SDS
Semidry Anodenpuffer	300 mM Tris, pH 10.4
Semidry Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8.0
SOB-Medium (Super Optimal Broth)	Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l), Trypton 2 % (w/v) (20 g/l), Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l), Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l), Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM, pH 6.8
SOC-Medium	SOB-Medium + 20 mM Glucose

Puffer	Zusammensetzung
TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.5
TBS-T	20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20, 0.2 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5

Tabelle 2: verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
<i>NucleoBond Xtra Midi Prep</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>SuperSignal West Femto Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
<i>Polymere Refine Detection Kit</i>	Leica Biosystems, Nussloch
<i>QuikChange II XL Site -Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies, Santa Clara
<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Proteine

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Aceton	Fluka Biochemika, Buchs ,
Actinonin	Sigma Aldrich, St. Louis
Agar	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Complete</i> Tablette	Roche, Basel
Coomassie Blau G 250	Carl Roth, Karlsruhe
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis
DEMEM+ GlutaMAX™	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
DPBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham
EDTA	Boehringer, Mannheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Ethanol (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>High Capacity</i> Streptavidin Agarose Beads	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham
Isopropanol	Walter CMP, Kiel
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagen IV (human)	Abcam, Cambridge
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Warrington
Protein G Agarose Beads	Sigma-Aldrich, St. Louis
S2 Peptidsubstrat (mca)-EDEDED-(K-ε-dnp)	Genosphere Biotechnologies, Paris
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfo-NHS-SS Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin-ETDA 0,5% (10x)	Gibco, Thermo Tisher Scientific, Waltham
<i>Tween 20</i>	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 4: primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Verdünnung	Hersteller
F1804	Meprin β Flag-tag	Maus	1:1000 (WB, IF)	Sigma.Aldrich, St. Louis
Tier 2	Meprin β	Kaninchen	1:1000 (WB)	Pineda, Berlin
B1 (Brösmeli)	Meprin β	Kaninchen	1:1000 (DAB)	Eigenherstellung
Ab84036	Transferrin-Rezeptor 1	Kaninchen	1:1000 (WB)	Abcam, Cambridge
14C11	GAPDH	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling, Danvers
4/11	IL-6 Rezeptor	Maus	1:500 (WB)	Eigenherstellung
anti-myc(9B11)	IL-11 Rezeptor	Maus	1:1000 (WB)	Millipore, Billerica
anti-myc(9B11)	Matriptase 2	Maus	1:2000 (WB) 1:750 (IF)	Cell Signaling, Danvers
10/1	ADAM17	Kaninchen	1:1000 (WB)	Eigenherstellung
Anti-PDIA6, (ab11432)	PDIA6	Maus	1:750 (IF)	Abcam, Cambridge

Tabelle 5: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse igG (H+L)_HRP (515-035-062)	Schaf	1:20.000 (WB)	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire
Anti-rabbit igG (H+L)_HRP (111-035-144)	Ziege	1:20.000 (WB)	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire
AlexaFluor®488 goat-anti rabbit- IgG (H+L) (A21206)	Ziege	1:300 (IF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
AlexaFluor®594 goat-anti mouse IgG (H+L), (A11032)	Ziege	1:300 (IF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
AlexaFluor®488 goat-anti mouse IgM (H+L) (A10680)	Ziege	1:300 (IF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Tabelle 6: Laborgeräte

Gerät	Gerätbezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Bakterieninkubator	-	Heraeus Instruments, Hanau
Blot Roller	rollermixer SRT1	Stuart®, Staffordshire
Blotting Gerät	Trans-Blot® Turbo™	BIORAD, Hemel Hempstead
Brutschrank	WTB	Binder, Tuttlingen
Echtzeit Zell-Analyse	xCELLigence DP real time cell analyzer	ACEA, Biosciences Vertrieb OLS OMNI Life Science, Bremen
Eismaschine		Manitowoc, Manitowoc
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPack Basic Power Supply	BIORAD, Hemel Hempstead
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BIORAD, Hemel Hempstead
Färbeautomat	Bondmax	Leica Biosystems, Nussloch
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)	FV 1000	Olympus, Hamburg
Kühlzentrifuge	Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Waltham
Lumineszenzkamera	LAS-3000 mini	Fujifilm, Düsseldorf
Magnetrührer	MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikroplattenleser	Infinite F200 Pro	Tecan, Männedorf
Mikroplattenleser (BCA-Test)	Spectra Rainbow	Tecan, Männedorf
Mikrozentrifuge	Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham
pH Meter	SevenEasy	Mettler Toledo, Schwerzbach
Pipettierhilfe	Accu-jet-pro	Brand, Wertheim
Reagenzglasschüttler	VortexGenie2	Bender & Hobein AG, Zürich
Rotationsrad	Rotator SB2	Stuart, Staffordshire
Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	Nanodrop	peqLab, Erlangen
Sterilbank	Herasafe HS18 Herasafe KS	Thermo Scientific, Waltham
Tischzentrifuge	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen

Gerät	Gerätbezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Ultrazentrifuge	Optima TLX	Beckman, Krefeld
Wärmeblock	Thermostat5320 Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitungssystem	MilliQ Plus	Merck Millipore, Darmstadt
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Zellinkubator	Heracell 150	Heraeus Instruments, Hanau
Zellkulturmikroskop	Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 2.0R	Thermo Scientific, Waltham
Zellzählgerät	Cellometer AutoT4	Nexcelom Bio-science, Lawrence
Zellzählgerät	Nucleo-Counter NC-200	Chemometec, Allerød
Zentrifugen	5417R 5415R 5415D	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amershan Protran Nitrocellulose-Membran, 0,2 µm	GE Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Blotting-Papier	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläschen(13mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön
Elektroporationsküvetten	peqLab, Erlangen
Falcons 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Objekträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CoKG
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran 0.45 µm	Millipore, Darmstadt
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht

Bezeichnung	Hersteller
Zellschaber, 25cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 1.5, 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 8: Computersoftware

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Cellometer Auto 3.3.3	Nexelom, Lawrence
Microsoft Office 2016	Microsoft Cooperation, Redmond
Prism 6	GraphPad Software, La Jolla
Mendeley	Elsevier, New York
<i>Realtime Cell Analysis (RTCA)</i>	ACEA Bioscience, San Diego
ImageJ	Wayne Rasband
UCSF Chimera	RBVI, San Francisco
Adobe Acrobat Pro X	Adobe Systems, San Jose
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose
Olympus Fluoview 4.0	Olympus, Tokio
Magellan V7.1	Tecan Trading AG, Männedorf
ND-100 V3.5.2 (NanoDrop)	peqLab, Erlangen
Western blot imaging Programme	Fujifilm, Düsseldorf
SPSS Version 24.0	IBM Corp., Armonk, New York

2.2 Verwendete Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Arbeiten an der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen in einem zertifizierten S1 Labor. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 9 aufgeführt. Sofern im Folgenden nicht weiter spezifiziert, wurden die Zellen in DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + GlutaMAX™ (Gibco, Thermo Fisher Scientific) mit 10 % (v/v) fetalem bovines Serum (FBS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in 10 cm Schalen kultiviert. Bei einer optischen Zellkonfluenz zwischen 80 % und 90 % wurden die Zellen - mit dem Ziel, die Apoptose und den Eintritt der Zellen in die G0 Phase zu verhindern - passagiert. Dazu wurden die Zellen mit DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) gewaschen und zur Ablösung für 5 Minuten mit 1x Trypsin-EDTA/PBS im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 min., RT) erneut gewaschen und in neue 10 cm Zellschalen ausgesät.

Zur Analyse der Oberflächenaktivität von Meprin β , der Aktivierung von Meprin β durch Matriptase 2 und des Oberflächen-*Sheddings* durch ADAM17 wurden HEK Zellen (*Human Embryonic Kidney*) verwendet. Zur Vermeidung eines endogenen Meprin β *Sheddings* durch die endogenen Proteasen ADAM10 und ADAM17 wurden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen eingesetzt. Die Doppeldefizienz für die beiden Proteasen ADAM10 und ADAM 17 wurde hierbei mithilfe des CRISPR-CAS-9 Systems erreicht (Franke et al., 2016). Um eine Inhibition der Proteasen durch Serumbestandteile zu vermeiden, wurden die HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen für Aktivitätsanalysen nach erfolgreicher Transfektion ohne Serumsupplemente kultiviert. Oberflächenbiotinylierungen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden in COS-7 Zellen (von engl. *CV-1 in Origin, carrying SV40*), Experimente zur Zellproliferation und Zellmigration in HeLa Zellen (von Henrietta Lacks) durchgeführt.

Tabelle 9: verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen
HEK293T ADAM10/17 ^{-/-}	Humane embryonale Nierenzellen defizient für die Proteasen ADAM10/17 (Franke et al., 2016)
COS-7	Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze
HeLa	Humane Epithelzellen aus dem Zervixkarzinom

2.2.2 Zellernte

Zu erntende Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt, altes Medium abgenommen und die Zellen 2x in eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Mittels eines Zellschabers wurden adhärent wachsende Zellen in 5-10 ml eiskaltem PBS behutsam vom Boden der Zellkulturschalen gelöst und in 15 ml Falcons überführt. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets dreimal in 5 ml eiskaltem PBS gewaschen.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Geerntete Zellen wurden unter dem Mikroskop unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden hierfür 1:10 in PBS verdünnt. Für Aktivitäts-, Zellproliferations-, und Zellmigrationsmessungen wurde die Zellzahl mithilfe eines Zellzählers (NucleoCounter NC-200, Chemometec) automatisiert und entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Gewertet wurde die Anzahl der vom Gerät als vital eingestuften Zellen.

2.2.4 Herstellung von Zelllysaten

24-48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, 3x mit sterilem PBS gewaschen und für 60 Minuten mit Lysepuffer¹ bei 4 °C inkubiert. Die eingesetzte Menge an Lysepuffer wurde hierbei der Größe der Zellpellets angepasst (100-300 µl). Für Aktivitätsmessungen wurde Lysepuffer ohne den Zusatz von EDTA eingesetzt. Jede Probe wurde 2x für 15 Sekunden sonifiziert, wobei die Reaktionsgefäße zwischen den beiden Durchläufen auf Eis inkubiert wurden. Weiter wurden die Proben für 30 Minuten bei 16.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Gewonnene Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, verbleibende Zelltrümmer verworfen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.8) wurden die Proben im Verhältnis 1:5 (v/v) mit Probenpuffer (5x) versetzt, mittels Reagenzglasschüttler durchmischt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.2.5 Transiente Transfektion

Ziel der transienten Transfektion ist die temporäre Aufnahme von Fremd-DNA bzw. einem Plasmid in eukaryotische Zellen. Zellen wurden dazu bis zu einer Konfluenz von 60-80 % unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden in einem Reaktionsgefäß 200 µl DEMEM vorgelegt und 2-6 µg cDNA zugefügt. Hierbei wurden Transfektionsreagenz und DNA in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Zur transienten Transfektion von HEK-, COS- und HeLa-Zellen wurde PEI (Polyethylenimin; 1 mg/ml in ddH₂O, *Polyciences*) als Transfektionsreagenz verwendet. Der Ansatz wurde mittels Reagenzglasschüttler durchgemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Zur Transfektion in 10 cm Schalen wurden 3 ml DEMEM (10 % (v/v) FCBS, 1 % (v/v) Pen/Strep) vorgelegt, in 6-well Platten wurde 1 ml DEMEM (10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Pen/Strep) zur Transfektion vorgelegt. 5-6 Stunden nach Zugabe des Transfektionsansatzes erfolgte ein Mediumwechsel. Transient transfizierte Zellen wurden 24-48 Stunden nach Transfektion in Folgeversuchen eingesetzt.

Tabelle 10: verwendete Plasmide

Gen	Tag	Vektor	Resistenz	Spezies
Leervektor		pcDNA4/TO	Ampicillin	
Meprin β WT	Flag	pcDNA4/TO	Ampicillin	Human
Meprin β D47A	Flag	pcDNA4/TO	Ampicillin	Human
Meprin β G32R	Flag	pcDNA4/TO	Ampicillin	Human
Meprin β R61S	Flag	pcDNA	Ampicillin	Human
Meprin β G32R_R61S	Flag	pcDNA4/TO	Ampicillin	Human
ADAM17		pcDNA3.1	Ampicillin	Human
IL-6 Rezeptor		pcDNA3.1	Ampicillin	Human
Matriptase 2	Myc/ His	pcDNA4	Ampicillin	Human

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen wurden in transient transfizierten COS-7 Zellen durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden dazu auf dünnen Deckgläschen (13 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) ausgesät, die in einer 6-well Platte ausgelegt wurden. Nach 24-stündiger Kultivierung im Brutschrank wurden die Deckgläschen 3x in PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch 10-minütige Inkubation in 4 % Para-Formaldehyd/PBS fixiert. Die Deckgläschen wurden erneut 3x in PBS gewaschen, permeabilisiert [PBS, 0.2 % (v/v) Saponin, 0.12 % (w/v) Glycin; 10 Minuten, RT] und blockiert [PBS, 10 % (v/v) FBS, 0.2 % (w/v) Saponin; 30 Minuten, RT]. Zwischen den Schritten wurden die Deckgläschen jeweils gewaschen. In einer Dunkelfeuchtkammer wurden die Deckgläschen dann zunächst eine Stunde mit dem Primär-Antikörper [in PBS, 10 % (v/v) FBS] inkubiert, 5 x in 0.2 % (w/v)

Saponin/PBS gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Nochmals wurde 5x in 0.2 % (w/v) Saponin/PBS und 2 x in ddH₂O gewaschen bevor die Deckgläschen in 15 µl Matrixlösung [17 % (w/v) Mowiol, 33 % (v/v) Glycerol, 50 mg/ml DABCO (1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane), 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)] auf Objektträgern fixiert wurden. Nach Aushärtung der Matrixlösung wurden die Färbungen am CLSM (*confocal laser scanning microscope*, FV1000, Olympus) ausgewertet.

2.2.7 Oberflächenbiotinylierung

Die Oberflächenbiotinylierung dient der Detektion von auf der Zelloberfläche gebundener Proteine. Über die NHS-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid) bildet Sulfo-NHS-SS Biotin hierbei kovalente Bindungen mit primären Aminen der Oberflächenproteine. Durch die hohe Affinität von Streptavidin gegenüber Biotin können im Folgenden die mit Biotin markierten Oberflächenproteine mittels Streptavidin beschichteter Beads isoliert werden.

Die Proteinexpression erfolgte in transient transfizierten COS-7 Zellen. Folgende Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen und 30 Minuten mit 1 mg/ml Biotinlösung (Sulfo-NHS-SS-Biotin) inkubiert. Eiskalter *Quenching*-Puffer wurde für 15 Minuten auf den Zellen inkubiert und diese anschließend erneut dreimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen. Die Zellen wurden in PBS-CM mittels Zellschaber geerntet und lysiert. Zur Lysatkontrolle wurden 75 µl abgenommen und mit 5x Probenpuffer bei 95 °C 10 Minuten aufgekocht. Für den Streptavidin-Pulldown wurden die Konzentrationen der Proben entsprechend den Ergebnissen der BCA-Analyse (Bicinchoninsäure) angepasst. Streptavidin-Beads wurden mehrfach in Lyse-Puffer gewaschen und 75 µl der gewaschenen Beads mit dem Restlysat für eine Stunde bei 4 °C am Drehrad inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Beads in PBS-CM wurden die Proben mit 80 µl 1xProbenpuffer für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. SDS-PAGE und Western Blot Analysen folgten zur weiteren Analyse der gebundenen Proteine.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

Cu²⁺-Ionen-Komplexe werden im alkalischen Milieu durch Peptidbindungen und Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan zu Cu⁺-Ionen reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) violette Farbkomplexe (Smith et al., 1985). Über einen BSA-Proteinstandard konnte somit die Proteinkonzentration der Proben anhand der zur Proteinkonzentration proportionalen Färbungsintensität mittels Spektrophotometer bestimmt werden.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Analyse und Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen aus Zelllysaten und Überständen wurde die Gelelektrophorese angewandt. Unter reduzierenden Bedingungen bindet das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat in einem konstanten Ladung zu Masse Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS Lösung) an die Proteine, sodass durch die Aufhebung von deren Eigenladung eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgt. Durch vorheriges Aufkochen in Probenpuffer für 10 Minuten bei 95 °C werden die Wasserstoffbrücken der Sekundär- und Tertiärstruktur, durch Zugabe von Dithiothreitol [DTT, (0.5 M)] die Disulfidbrücken gelöst. Je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wurden Gele mit verschiedenen Porengrößen gegossen. Die Porengröße ist abhängig von der totalen eingesetzten Acrylamid Konzentration und dem Vernetzungsgrad. Genutzt wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin Puffern bestehend aus einem Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8; 3,8 % Acrylamid) und einem aufgelagerten Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8; 10-14 %). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 Volt über 60-110 Minuten durchgeführt.

Tabelle 11: Puffer der SDS-Gelelektrophorese

Puffer/ Gel	Zusammensetzung
Sammelgel Puffer	0.5 M Tris, 0.4 % (w/v) SDS, pH 6.8
Sammelgel (3.8%, 2 Gele, 0.75 mm)	1 ml Sammelgel Puffer, 2.44 ml ddH ₂ O, 0.51 ml Acrylamid [30 % (v/v)], 50 µl APS [10 % (v/v)], 50 µl TEMED [10 % (v/v)]
Trenngel Puffer	1.5 M Tris, 0.4 % (w/v) SDS, pH 8.8
Trenngel (10%, 2 Gele, 0.75 mm)	2 ml Trenngel Puffer, 3.21 ml ddH ₂ O, 2.67 ml Acrylamid [30 % (v/v)], 80 µl APS [10 % (v/v)], 80 µl TEMED [10 % (v/v)]
Trenngel (12%, 2 Gele, 0.75 mm)	2 ml Trenngel Puffer, 2.68 ml ddH ₂ O, 3.2 ml Acrylamid [30 % (v/v)], 80 µl APS [10 % (v/v)], 80 µl TEMED [10 % (v/v)]
Trenngel (14%, 2 Gele, 0.75 mm)	2 ml Trenngel Puffer, 2.15 ml ddH ₂ O, 3.73 ml Acrylamid [30 % (v/v)], 80 µl APS [10 % (v/v)], 80 µl TEMED [10 % (v/v)]
Elektrophorese Puffer	25 mM Tris, 1.92 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.3

2.2.10 Western-Blot

Durch das sogenannte Western-Blotting werden Proteine aus dem SDS-Gel auf eine adsorbierende Membran übertragen, um dann mittels indirekter Immundetektion sichtbar gemacht werden zu können. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (0,2 µm Amershan Protran, GE Life Sciences) nach dem *Semidry* Verfahren geblottet (Towbin et al., 1979). Dazu wurde zunächst die Membran in 99 % Ethanol aktiviert, in Puffer getränkt und auf drei in Puffer getränkte *Whatman* Filterpapiere aufgelegt. Das SDS-Gel wurde in Puffer gelegt und auf der Membran blasenfrei ausgestrichen. Drei in Puffer getränkte Filterpapiere wurden aufgelegt und für 30 Minuten eine Spannung von 25 Volt angelegt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen wurden die Proteine auf der Membran immobilisiert. Da nur die Proteine nicht aber das SDS auf die Membran übertragen werden, können die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen wieder ausbilden.

Um die direkte Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfer mit 5 % Magermilchpulver in TBS (*Tris-buffered saline*) für eine Stunde blockiert. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4 °C. Durch dreimaliges, 10-minütiges Waschen in TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween* (Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat)) und einmaliges, 10-minütiges Waschen in TBS wurde die Membran von ungebundenem primär Antikörper gereinigt. Der an Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärkörper wurde in einer 1:20.000 Verdünnung in TBS-T eingesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Durch die von der an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von Luminol und die entstehende Chemilumineszenz konnten gebundene Proteine mit einer Chemilumineszenz Kamera (LAS-3000 mini imager, Fujifilm) auf der Membran sichtbar gemacht werden. Verwendet wurde das *SuperSignal West Femto kit* (Thermo Fisher Scientific).

2.2.11 Coomassie-Färbung

Zur direkten Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen wurde der Farbstoff Coomassie *Brilliant Blue* verwendet. Zur Beschleunigung der Färbung und Erhöhung der Spezifität wurde der Färbelösung Aluminiumsulfathydrat zugesetzt. Die Färbung fand auf dem Schüttler bei Raumtemperatur statt. Entfärbt wurde mittels Coomassie-Entfärbelösung [20 % (v/v) Isopropanol, 7.5 % (v/v) Essigsäure].

2.2.12 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation kann mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner (dem Antikörper) aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert werden. Über einen, den C-Terminus angehängten FLAG-Tag bindenden, anti-Flag Antikörper (F1804, Sigma-Aldrich)

konnte Meprin β somit aus Zellysaten isoliert werden. HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden dazu mit wildtypischem Meprin β und den Meprin β Varianten G32R und G32R_R61S transient transfiziert. Geerntete Zellen wurden mit EBC-Lysepuffer lysiert und für 10 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Proteinkonzentrationsbestimmungen und Lysat-Kontrollblots durchgeführt. Je Probe wurden 5 μ l Antikörper zu-pipettiert und auf dem Rotationsrad über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 50 μ l mehrfach gewaschener Protein-G-Agarose Beads (Sigma-Aldrich) zugegeben und die Proben erneut für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert, Überstände verworfen und die Beads mehrfach mit EBC-Lysepuffer gewaschen. Nach der Zugabe von reduzierendem 5x Probenpuffer wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

2.2.13 Concanavalin A Fällung

Das Protein Concanavalin A stammt aus der Jackbohne, gehört zur Gruppe der Lektine und ist in der Lage bestimmte Zuckerreste wie α -Mannose und α -Galaktose in Glykoproteinen und Glypolipiden zu binden. Um löslichen IL-6R aus gewonnenen Überständen anzureichern und weiter zu analysieren wurden die Überstände mit Concanavalin A Beads (ConA, C9017, Sigma Aldrich) gefällt. Überstände wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und die Volumina entsprechend den jeweiligen Lysat-Proteinkonzentrationen angepasst. Die Beads wurden 3x in PBS gewaschen, je 40 μ l Beads auf 1 ml Probe gegeben und bei 4 °C über Nacht auf dem Rotationsrad mit 15 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden die Beads abzentrifugiert, abermals 3x in PBS gewaschen, weiter in 60 μ l 3x Probenpuffer resuspendiert und auf dem Heizblock für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Um keine Beads auf das SDS-Gel aufzutragen wurden die Proben vor der Beladung des Gels kurz abzentrifugiert.

2.2.14 Gezielte/ortsspezifische Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch gezielte Mutagenese die Meprin β Varianten D47A, G32R und G32R_R61S hergestellt. Hierbei wurde ein *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) nach einem modifizierten Protokoll eingesetzt. Durch die eingefügte Punktmutation unterscheiden sich die beiden tumorassoziierten Meprin β Varianten D47A und G32R von der Meprin β WT Form, lediglich in einer einzelnen Aminosäure (Aspartat zu Alanin (D47A), Glycin zu Arginin (G32R)). Beide Varianten wurden in Endometriumkarzinom-Geweben identifiziert und sind in der COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) Datenbank aufgeführt. Als Matrize diente ein Meprin β WT pcDNA4/TO-Konstrukt mit C-terminalem FLAG-Tag. Zur Herstellung der G32R_R61S

Doppelmutante wurde eine zweite Punktmutation (R61S) in das Meprin β G32R pcDNA4/TO-Konstrukt eingefügt.

Entsprechende Primer wurden designt und bestellt. Zur Phosphorylierung der Primer wurden je 2 μ l der Primer (100 μ M) mit 1 μ l T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l), 2 μ l 10x T4-Ligase Puffer und 15 μ l DECP H₂O für 30 Minuten bei 37 °C, und anschließend für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert. Phosphorylierte Primern wurden im Folgenden mit der cDNA in einer PCR (*Polymerase Chain Reaction*) eingesetzt.

Tabelle 12: Pipettierschema ortsspezifische Mutagenese

Reagenz	Menge
5x <i>Phusion</i> HF Puffer	10 μ l
dNTPs (2 mM)	5 μ l
Phosphorylierte Primer	1 μ l
cDNA (hMeprin β /pcDNA4/TO)	50 ng
DMSO	1.5 μ l
<i>Phusion DNA Polymerase</i> (2 U/ μ l)	0.5 μ l
DEPC Wasser	30 μ l

Tabelle 13: PCR Programm ortsspezifische Mutagenese

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	
Initiale Denaturierung	98	60	
Denaturierung	98	30	} 25x
Primer <i>Annealing</i>	56	10	
Elongation	72	500	
Finale Elongation	72	1000	
Kühlen	4	∞	

Gewonnene PCR Produkte wurden mittels *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt und in 30 µl DEPC (Diethyldicarbonat)- Wasser eluiert. Durch Addition von 1 µl DpnI (10 U/µl) und Inkubation bei 37 °C für 3 Stunden, wurden die PCR Produkte verdaut. Zur Inaktivierung von DpnI folgte die 20-minütige Inkubation bei 80 °C. Erneut wurden die PCR Produkte aufgereinigt (*GeneJET Gel Extraction Kit*, Thermo Fisher Scientific) und mit 30 µl DEPC-Wasser eluiert. Zur anschließenden Ligation wurden Je 25 µl der Proben für 2 Stunden bei 22 °C und 10 Minuten bei 65 °C mit 2 µl T4 DNA Ligase (200 CEU/µl), 3 µl T4 DNA Ligase Puffer und 2 µl ddH₂O inkubiert.

Durch Transformation elektrokompenter *E.Coli XL1 Blue* Bakterien (Agilent Technologies) und einer entsprechend den Herstellerangaben durchgeführten Plasmidpräparation (*GeneJet Extraction kit*, Thermo Fisher Scientific), wurden die Konstrukte vervielfältigt und aufgereinigt. Resultierende DNA Konzentrationen wurden bestimmt und die Korrektheit von Amplifikation und Mutagenese der gewonnenen PCR Produkte in der Gelelektrophorese und einer extern durchgeführten Sanger Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz) überprüft. Die verwendeten Primer sind in

Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: verwendete Primer

Primer	Sequenz 5' - 3'
D47A-forward	tatcaatgaaggtttgggactggctcttttgagggtgacatcag
D47A-reverse	ctgatgtcaccctcaaaaagagccagtcctcaaaccttcattgata
G32R-forward	cagaaaactttgatgtagatggcagaatggaccaggacatattga
G32R-reverse	tcaaatatgtcctgtccattctgccatctacatcaaagtttctg
R61S-forward	cagacttgatagggcacaattagcaattccatcattggagaaaagtata
R61S-reverse	gtctgaactatcccgtgttaacgtaaggtagtaacctctttcatat
CMV-forward	cgcaaatgggcggtaggcgtg
Mepβ-2	aacacctatagtgac
Mepβ-3	catgtaacattgaaa
Mepβ-4	tctcacctcaactct

2.2.15 Transformation von elektrokompetenten *E.Coli XL1 Blue*

Ziel der Transformation ist es, über das Einschleusen von Plasmid-DNA in die Bakterienzellen, durch deren Vermehrung gleichwohl eine Vermehrung der eingebrachten Plasmid-DNA zu erreichen. Hierfür wurden die elektrokompetenten *E.Coli XL 1 Blue* Bakterienzellen (Agilent Technologies) auf Eis aufgetaut. Zu 80 µl Bakteriensuspension wurde 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zugegeben und in eine gereinigte Elektroporationsküvette pipettiert. Um die Plasmamembran kurzzeitig zu permeabilisieren wurde ein Stromschlag von 2,5 kV abgegeben. Anschließend wurden die Bakterien in 200 µl LB-Medium suspendiert und 30 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator und 400 rpm inkubiert. Im Folgenden wurde die Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen mittels Drigalskispatel auf einer 10 cm LB-Agar Platte ausplaniert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.16 Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten *E.Coli XL1 Blue*

Es wurden 30 µl chemisch kompetente *E.Coli XL1 Blue* Bakterien (Agilent Technologies) auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden 5 µl Plasmid-DNA zupipettiert und die Bakterien für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch eine Inkubation von 42 Sekunden bei 45 °C. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 900 µl, auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 2-3 Stunden bei 37 °C und 600 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 100 µl der Suspension wurden an der Flamme auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplaniert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.17 Midi-Plasmidpräparation

Die Midi-Präparation dient der Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen eine einzelne Bakterienkolonie mittels Pipetten Spitze gepickt und über Nacht im Erlenmeyerkolben in 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Am Folgetag wurde die Bakteriensuspension für 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Isolierung der DNA wurde das *NucleoBond Xtra Midi kit* (Macherey-Nagel) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Verbleibende Pellets wurden in 30 µl DEPC-Wasser durch 30-minütige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gelöst. Die DNA Konzentration wurde mittels NanoDrop Photospektrometer bestimmt.

2.2.18 Peptid basierter Oberflächenaktivitätsassay

Zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität von Meprin β , wurde auf bereits beschriebene *in vitro* Peptid-Schneide-Assays zurückgegriffen (Arnold et al., 2015). Zusammenfassend kommt es hierbei,

durch die Spaltung eines für Meprin β spezifischen, fluorogenen S2 Peptidsubstrates [(mca)-EDEDED-(K- ϵ -dnp)], mca = 7-methoxycoumarin-4-yl, dnp = 2,4-dinitrophenyl, (Genosphere Biotechnologies,)) zu einem proportionalen Anstieg eines Fluoreszenz Signals, welches bei 320 nM im Spektrophotometer (Tecan, Infinite F200Pro) gemessen werden kann.

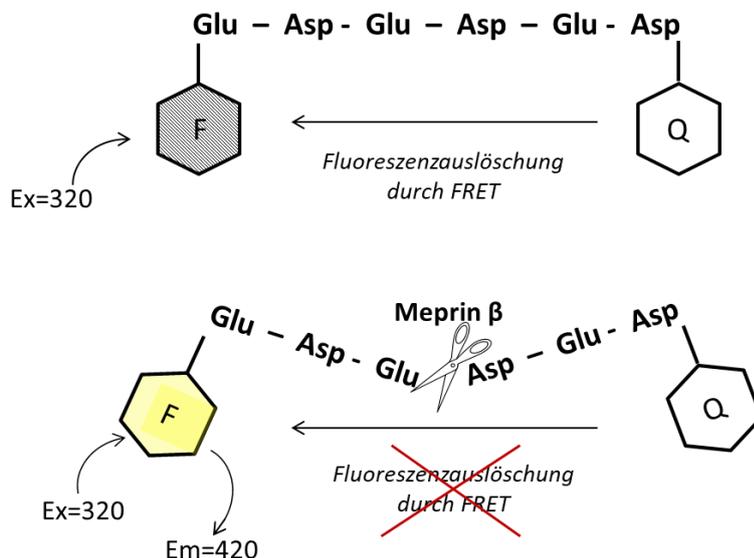


Abbildung 2.1: Funktionsprinzip des Peptid-Schneide-Assay:

Die Peptidsequenz des S2 Substrates ist zugeschnitten auf die Spaltungspräferenz von Meprin β für saure Aminosäuren an der P1'-Position (Becker-Pauly et al., 2011). Über eine Oligopeptidkette sind ein Quencher [2,4-dinitrophenyl (DNP)] und eine fluorogene Gruppe [(7-methoxycoumarin-4-yl)-acetyl (mca)] mit einer EDEDED Sequenz verbunden. Durch die proteolytische Spaltung des Peptids kommt es zur räumlichen Trennung der fluorogenen Gruppe vom Quencher und damit zum Anstieg des Immunfluoreszenzsignals. Q: Quencher; F: Fluorophor; FRET: *fluorescence resonance energy transfer*; Ex: Excitation; Em: Emission.

Transient transfizierte (2.2.5) HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden in PBS gelöst und gezählt (2.2.3). Oberflächenaktivitätsmessungen wurden in 48-well Platten mit 300 μ l Gesamtvolumen durchgeführt. Pro Well wurden 0,5 $\times 10^6$ vitale Zellen in PBS ausgesät. Um eine Adhärenz der Zellen zu erreichen wurden die Platten für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Meprin β Inhibitors Actinonin (Kruse et al., 2004; Wang et al., 2011) wurden die Platten abermals 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das spezifische S2 Peptidsubstrat wurde in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt.

Die zur proteolytischen Aktivität proportionale relative Fluoreszenz (*relative fluorescence units*: RFUs) wurde über 2 Stunden, alle 30 Sekunden im Spektrophotometer bestimmt. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der als Duplets durchgeführten Messungen genutzt.

Die Detektion der proteolytischen Aktivität in gewonnenen Zellüberständen erfolgte in 96-well Platten mit 100 μ l Gesamtvolumen. Die verwendeten Volumina der Überstände wurden entsprechend ihrer zuvor bestimmten Proteinkonzentration angepasst. Zur Aktivierung der proteolytischen Aktivität von

Meprin β im Überstand, wurde ein Teil der Proben für 30 min bei 37 °C mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin inkubiert. Um den Einfluss von Mikrovesikeln auf die Aktivitäten zu untersuchen wurde ein Teil der Überstände vor der Aktivitätsmessung ultrazentrifugiert [55.000 rpm, 2 Stunden, 4 °C, (Optima TLX, Beckman)]

2.2.19 Zellproliferation und Zellmigration/Invasion (xCELLigence System)

Zur Untersuchung von Zellproliferation und Zellmigration wurde eine Echtzeit-Zellanalyse (xCELLigence *DP real time cell analyzer*, ACEA Bioscience) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei können über einen definierten Zeitraum, dichteabhängige Veränderungen von Zellpopulationen beobachtet und somit das Adhärenzverhalten, die Wachstumsrate und das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Zellpopulationen aufgezeichnet werden. Kernstück des Analyseverfahrens sind spezielle 200 μl Wells, welche an ihrem Boden mit Mikrogoldelektroden ausgestattet sind. Zu jedem beliebigen Zeitpunkt kann hierdurch der Wechselstromwiderstand am Boden der Wells gemessen werden und erlaubt somit ganz ohne den Gebrauch von Farbstoffen oder Markierungssystemen eine sehr sensitive und automatisierte Untersuchung von Zellsystemen. Kommt es zur Zellproliferation, kommt es, über die Zunahme der von Zellen besetzten Fläche am Boden der Kammern, zu einem Anstieg der Impedanz. Dieser kann über einen dimensionslosen *Cell-Index* ausgegeben werden. Umgedreht führt ein Zellsterben zu einem Absinken des Wechselstromwiderstandes. Dem *Cell-Index* (CI) liegt folgende Formel zugrunde: $CI = (Z_i - Z_0) / 15 \Omega$. Z_i stellt hierbei die Impedanz zu einem individuellen Zeitpunkt und Z_0 die Impedanz zum Zeitpunkt null dar.

2.2.19.1 Messung der Wachstumsrate/Zellproliferation

Zur Bestimmung möglicher Einflüsse einer Überexpression von Meprin β bzw. den beiden Meprin β Varianten D47A und G32R auf die Proliferationsrate von Zellen, wurden HeLa Zellen transient transfiziert, 48 Stunden später geerntet, in DEMEM/GlutaMax mit 10 % (v/v) FBS resuspendiert und gezählt. Jedes Well wurde mit 100 μl DEMEM +10 % FBS gefüllt und für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Um den Einfluss des Mediums auf die Impedanz in der Auswertung berücksichtigen zu können, wurde zur Bestimmung des Hintergrundsignals eine erste Leermessung durchgeführt. In jedes Well wurden daraufhin 1×10^4 Zellen ausgesät, die Platte eine weitere Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und folglich für 72 Stunden alle 30 Minuten der Wechselstromwiderstand am Boden der Wells gemessen. Alle Ansätze wurden als Triplikate geführt. Um ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten und Unterschiede in der Anzahl ausgesäter Zellen zu berücksichtigen, wurde der Startpunkt entsprechend gewählt und Folgewerte auf den festgelegten

Startpunkt normalisiert. Als Grundlage der statistischen Auswertung diente die Fläche unter der jeweiligen Kurvenfunktion.



Abbildung 2.2: Echtzeit Zellanalyse zur Messung der Zellmigration:

Vereinfachte Darstellung der 200 μl Mikrogroblektroden- Wells zur kontinuierlichen Messung der Impedanz (Z).

2.2.19.2 Messung der Migration/Invasion

Um den Einfluss der Meprin β Expression auf das Migrationsverhalten bzw. Invasionsverhalten von Zellen zu untersuchen, wurde die oben beschriebene Echtzeitzell-Messung mit einer speziellen Platte (*CIM-Plate 16*) durchgeführt. Diese besteht aus zwei Teilen und besitzt im Unterschied zu den oben beschriebenen Wells, eine trennende Membran wodurch ein vertikales zwei-Kammersystem entsteht. Die eingesetzte Membran ist von feinen Poren ($8 \mu\text{m} \varnothing$) durchsetzt und wurde zusätzlich mit $12 \mu\text{g}$ Kollagen IV [humane Plazenta, $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma Aldrich (C5533)] beschichtet (siehe

Abbildung 2.3). Folglich führen nur die Zellen zu einem Impedanz Anstieg am Boden der Wells, die die Fähigkeit besitzen, durch die Poren der Membran zu migrieren und die Kollagen IV Schicht zu invadieren. Um eine Proliferation der Zellen zu verhindern wurde der FBS Anteil im Medium auf 1 % reduziert [DEMEM +1 % (v/v) FBS] und ein kürzerer Beobachtungszeitraum festgelegt.

Nach Beschichtung der Membran im oberen Teil der Platte, wurden die Wells der unteren Platte mit jeweils $160 \mu\text{l}$ Medium befüllt. Anschließend wurden die beiden Teile der Platte zusammengesteckt, die oberen Wells mit $50 \mu\text{l}$ Medium befüllt und die Platten für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Nach erfolgter Hintergrundmessung wurden pro Well 5×10^4 HeLa Zellen in jeweils $100 \mu\text{l}$ Medium in die oberen Kammern der Wells pipettiert. Die Messung erfolgte in 30-minütigen Abständen über 24 Stunden. Zur Berücksichtigung möglicher Verzerrungen durch leichte Unterschiede der Zellzahlen, wurde ein Delta *Cell-Index* berechnet. Hierbei diente der *Cell-Index* nach einer Stunde als Referenzwert zu dem ein Delta-Wert addiert wurde. Die zu Grunde liegende Formel lautet: $DCI_{ti} = CI_{ti} + (DCI_{reference} - CI_{Delta_time})$. Als Grundlage der statistischen Auswertung diente auch in diesem Experiment die Fläche unter der jeweiligen Kurvenfunktion.

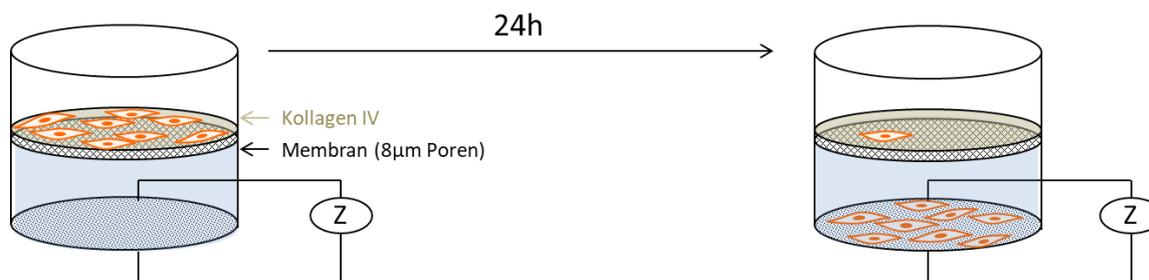


Abbildung 2.3: Echtzeit-Zellanalyse zur Messung der Zellinvasion.

Schematische Darstellung der *Transwells* der CIM-16 Platte. Kollagenbeschichtung [12 µg Kollagen IV, humane Plazenta, 0.4 µg/ml, Sigma Aldrich (C5533)] in olivgrün, Medium [100 µl DEMEM +1 % (v/v) FBS] in blau dargestellt. Z: Impedanz.

2.2.20 Immunhistochemische Meprin β Färbungen im gesunden und neoplastischen humanen Endometriumgewebe

Zum Nachweis von Meprin β in humanem Endometriumgewebe wurden immunhistochemische Färbungen an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Endometriumkarzinomen aus dem Archiv des Pathologischen Instituts in Kiel durchgeführt. Ein entsprechender Ethikantrag zur Verwendung humanen Gewebes wurde gestellt und genehmigt (Referenznummer D417/18).

Untersucht wurden endometrioide Adenokarzinome des Endometriums (ICD-O-3: C54.- M8380/3) von Patientinnen die zwischen 2009 und 2017 operiert wurden. Verwendetes Gewebe wurde erneut von einer Pathologin / einem Pathologen beurteilt. Expression und Lokalisation von Meprin β wurden in den T-Stadien T1, T2 und T3 (TNM-Klassifikation) des endometrioiden Adenokarzinoms untersucht. Als Kontrolle wurde Meprin β in nicht neoplastisch verändertem Endometriumgewebe aus Operations-Präparaten von Patientinnen mit Uterusmyomen (ICD-10 D25.-) gefärbt.

Gewebediagnose	Anzahl
ICD-O: C54.1 M8380/3 pT1 a/b	12
ICD-O: C54.1 M8380/3 pT2	10
ICD-O: C54.1 M8380/3 pT3b	12
ICD-10 D25.-	10

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden am Mikrotom (Leica RM2245) 2 µm dicke Großflächenschnitte angefertigt, auf Leica Bond Superfrost-Objektträger (Leica) aufgezogen und über

Nacht bei 54 °C im Brutschrank (Binder) getrocknet. Die Färbungen wurden mit Hilfe des Leica Bond-Max Färbeautomaten (*Bondmax automated slide staining system*, Leica Biosystems, Nussloch) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Antigendemaskierung erfolgte mit der *Epitope Retrieval Solution 1* (Leica) für 20 Minuten. Der Primärantikörper [rabbit anti-Mep β , (B1; Brösmeli)] wurde dazu 1:1000 verdünnt (*Bond Primary Antibody Diluent AR9352*, Leica Biosystems) und das *Polymer Refine Detection System* (Leica) wurde zur Visualisierung verwendet. Der verwendete Antikörper [B1 (Brösmeli)] wurde für die AG Becker-Pauly von Prof. Erwin Sterchi in Bern produziert und bereits erfolgreich in DAB-Färbungen humaner Gewebe eingesetzt (Becker-Pauly et al., 2007). Nach der Rehydrierung der gefärbten Schnitte wurden diese Xylol-basiert am Coverslipper eingedeckt. Gefärbte Gewebeschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica) bewertet und exemplarische Schnitte eingescannt (Leica SCN 400). Aufgrund der kleinen Kohorte mit insgesamt 44 Patientinnen wurde keine statistische Auswertung vorgenommen.

2.2.21 Immunhistochemische Mep β Färbungen im Kolonkarzinom

Eingeschlossene Patientenproben stammen aus dem Kolonkarzinom Archiv des Pathologischen Institutes der Christian Albrechts Universität zu Kiel. Alle Gewebeproben waren dort nach der schriftlichen Einwilligung der Patientinnen und Patienten im Rahmen diagnostischer oder therapeutischer chirurgischer Eingriffe gewonnen. Die Studie wurde gemäß den Erklärungen von Helsinki durchgeführt. Vor Einschluss in die Studie wurden alle Patientendaten pseudonymisiert. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts Universität Kiel genehmigt (Referenznummer D417/18). Enthaltene Gewebeproben wurden zwischen 1995 und 2011 gewonnen und waren in Formalin eingebettet, Paraffin fixiert und entsprechende Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt worden. Die Tumorklassifikation erfolgte entsprechend den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sowie der *Union internationale contre le cancer* (UICC; 7th edition) und wurde von zertifizierten Pathologen vorgenommen. Ausgeschlossen wurden Patientenproben ohne Tumorgewebenachweis und Proben von Patientinnen und Patienten mit syn- oder metachronen Kolonkarzinomen.

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Kolonkarzinom-Operationspräparaten wurden zur Herstellung von Gewebemikroarrays (TMA:*Tissue mikroarray*) verwendet wie anderswo ausführlich beschrieben (Kononen et al., 1998). Je Gewebeprobe wurden drei verschiedene, repräsentative Bereiche ausgewählt und davon jeweils drei Stenzen angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Immunhistochemische Färbungen erfolgten automatisiert mit Hilfe des Leica Bond-Max Färbeautomaten (siehe Abschnitt 2.2.20). Alle Auswertungen wurden von derselben Person am selben Mikroskop und unter vorgegebenen Umgebungsbedingungen und

Geräteeinstellungen durchgeführt. Drei Färbeintensitäten (null, eins und zwei) wurden mittels Referenzschnitte klar definiert. Die Färbeintensität null bedeutete das Fehlen einer Meprin β Färbung. Zur Berechnung des HistoScores (vgl. Stenger, 2015) wurden die prozentualen Verteilungen der definierten Färbeintensitäten innerhalb des Tumorgewebes bestimmt. Statistische Analysen wurden mittels der SPSS Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ausgeführt. Das Kollektiv wurde am Median (HScore 100) in eine Gruppe mit hoher Meprin β Expression (HScore>100) und die Gruppe mit niedriger Meprin β Expression (HScore \leq 100) dichotomisiert. Der Kendalls Tau-Test wurde für die Auswertung der Variablen Alter, Kategorien der TNM-Klassifikation und bei der Auswertung der UICC-Stadien angewendet. Die Kaplan-Meier-Methode wurde zur Überlebensanalyse eingesetzt.

2.2.22 Probenvorbereitung Massenspektrometrie/ In-Gel Verdau

Mit Hilfe der Massenspektrometrie sollte überprüft werden, ob es durch das eingefügte Arginin-32 im Propeptid der G32R Variante zu einer zusätzlichen Spaltungsstelle für tryptische Serinproteasen kommt. Die entsprechende Probenvorbereitung durfte ich dankenswerterweise in den Räumlichkeiten der AG Tholey (Institut für experimentelle Medizin, systematische Proteomics und Bioanalyse, UKSH Kiel) und mit der Unterstützung von Dr. rer. nat. Diego Yepes durchführen. HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit wildtypischem Meprin β oder einer der Varianten (D47, G32R, G32R_R61S) transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (2.2.4), immunpräzipitiert (2.2.12) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.6). Das native Gel wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen, die sichtbar gemachten Meprin β Banden ausgeschnitten und über Nacht mit 200 μ l Wasch-Lösung [50 % Methanol (v/v), 5 % Essigsäure (v/v)] bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben erneut mit 200 μ l Waschlösung für 3 Stunden inkubiert. Nach abnehmen der Wasch-Lösung wurden die Proben zur Dehydratation der Gelstücke 5 Minuten bei RT mit 200 μ l Acetonitril (ACN) -inkubiert. Zur vollständigen Trocknung wurden die Proben für 3 Minuten in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert. Zur Reduktion der Proben wurden 30 μ l 10 mM Dithiothreitol (DTT) in Ammoniumbicarbonat-Puffer (ABC-Puffer) zugegeben und die Proben 1 Stunde bei 56 °C im Schüttler inkubiert. Die DTT Lösung wurde verworfen und die Proben, durch eine einstündige Inkubation bei RT mit 60 μ l Iodacetamid (IAA), alkyliert. Zur weiteren Dehydratation wurden die Proben erneut mit 200 μ l ACN für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Rehydrierung der Proben erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei RT in 200 μ l, 100 mM ABC-Puffer. Wiederholt folgte die Dehydrierung durch Inkubation mit 200 μ l ACN für 5 Minuten bei RT und die anschließende Trocknung der Proben in der Vakuumzentrifuge. Die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin wurden mit H₂¹⁸O im Verhältnis 1:1 eingesetzt (100 % H₂¹⁸O *Labeling*). Verdaut wurde über Nacht bei 37 °C. Am dritten Tag wurden die Proben mit 10 %iger Ameisensäure (FA) auf einen pH von 3 \pm 4 angesäuert. Um die Peptide zu extrahieren wurden die Proben zunächst mit 100 μ l, 1 %iger FA-Lösung für 15 Minuten bei 25 °C

inkubiert und daraufhin für 2 Minuten in eiskaltem Wasser sonifiziert. Die Proben wurden eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in 0.5 µl Reaktionsgefäßen gesammelt. Zur weiteren Extraktion der Peptide aus dem Gel wurde die Proben mit einer 60 % ACN-/1 % FA-Lösung und anschließend mit einer 100 % ACN-Lösung für je 15 Minuten bei 25 °C inkubiert und jeweils erneut 2 Minuten in eiskaltem Wasser sonifiziert. Die gesammelten Überstände wurden zusammengeführt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 3 % ACN/0.1 % Trifluoressigsäure resuspendiert.

Zur HPLC/MS Analyse (*high performance liquid chromatography –mass spectrometry*) wurde ein Dionex Ultimate 3000 nano-HPLC Systems (Thermo Scientific, Bremen) online mit einem Q Exactive Massenspektrometer (Thero Scientific, Bremen) gekoppelt. Die Proben wurden auf einer C18 Trap-Säule (Acclaim Pepmap 100 C18, 10 mm × 300 µm, 3 µm, 100 Å, Dionex) für 5 Minuten mit 3 % ACN/0.1 % TFA und einer Flussrate von 30 µl/min. gewaschen. Anschließend wurde die Trap-Säule in Reihe mit einer C18-analytische Säule geschaltet [(Acclaim PepMap 100 C18 *analytical column* (15 cm × 75 µm, 3 µm, 100 Å, Dionex)]. Die Elution der Peptide erfolgte mit einem linearen Gradienten (5 % ± 50 % B in 120 min., 50 % ± 95 % B in 5 min., 95 % B für 10 min. 95 % ± 5 % B in 0.1 min., Äquilibration bei 5 % B für 10 min.) und einer Flussrate von 300 nL/min. (Lösungsmittel A: 0.05 % FA; Lösungsmittel B: 80 % ACN/0.04 % FA). Nach Elution der Peptide in die Nanospray-Ionenquelle (Thermo Scientific, Bremen) wurden die Peptide mittels Elektrospray desolvatisiert (Fenn et al., 1989). Die an der *nano*-ESI-Quelle der Q Exactive angebrachte Spannung betrug 1.25 kV, die Kapillartemperatur betrug 250 °C. Das Total Ion Chromatogramm (TIC) wurde von 5 bis 145 min., zwischen 300 und 2.000 m/z (Masse-zu-Ladung-Verhältnis) mit einer Auflösung von 60.000 bei m/z 400 akquiriert (Maximum des AGC (automatic gain control) von 1×10^6 , maximale Füllzeit von 500 ms). Die fünf intensivsten Ionen mit einem Ladungszustand von +2 wurden mit einem Isolationsfenester von 1.6 m/z sequentiell isoliert und in der Kollisionszelle mittels HCD (*Higher-energy Collision Dissociation*) fragmentiert. Die Kollisionsenergie wurde auf 25 normalisiert. Die Massentoleranzen lagen bei 10 ppm, das Zeitfenster der *dynamic exclusion* betrug 30 ms. Zur Peptid- und Proteinidentifizierung wurden die aufgezeichneten Spektren mit computer-assistierten Datenbanken abgeglichen [Proteome Discoverer (PD) 2.2.0.388; Suchmaschine SequestHT (Thermo Scientific)]. Gesucht wurde nach humanem Meprin β, einschließlich Isoformen (runtergeladen von Uniprot, 25 Juli 2017). Zugelassene dynamische Variationen waren Deamidierung (N), Oxidation (M), und ¹⁸O-Labeling der C-Termini. Cysteincarbamidomethylierungen wurden als fixe Modifikation definiert.

3 Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten wurden größtenteils im Fachjournal „Journal of Cell Science“ (Schäffler et al., 2019) veröffentlicht und sollen im Folgenden nochmals zusammenfassend dargestellt werden. Die erhobenen Daten der immunhistochemischen Meprin β Färbungen an Gewebeproben von Kolonkarzinom-Operationspräparaten sind zum Zeitpunkt dieser Niederschrift noch nicht publiziert.

3.1 Generierung der Meprin β Varianten D47A und G32R

Um der wissenschaftlichen Fragestellung dieser Arbeit nachzugehen, wurden zunächst die zu untersuchenden Meprin β Varianten D47A und G32R mittels ortsspezifischer Mutagenese generiert (2.2.14). Als Basis diente ein Wildtyp-Meprin β -pcDNA4/TO-Konstrukt mit C-terminalem FLAG-Tag. Durch Mini- und Midi-Plasmidpräparation (2.2.17) gewonnene Konstrukte wurden zur Kontrolle komplett sequenziert (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland).

10	20	30	40	50	
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	GGMDQDIFDI	NEGLGLDLFE	WT
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	G R MDQDIFDI	NEGLGLDLFE	G32R
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	GGMDQDIFDI	NEGLGL A LFE	D47A
60	70	80	90	100	
GDIRLDRAQI	RNSIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	WT
GDIRLDRAQI	RNSIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	G32R
GDIRLDRAQI	RNSIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	D47A
110	120	130	140	150	
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCRIATV	WT
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCRIATV	G32R
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCRIATV	D47A
160	170	180	190	200	
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSL	WT
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSL	G32R
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSL	D47A
210	220	230	240	250	
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSLLKLN	WT
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSLLKLN	G32R
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSLLKLN	D47A

Abbildung 3.1: Auszug der Aminosäuresequenz sequenzierter Konstrukte von Meprin β

Aminosäuresequenzen des N-Terminalen Bereichs von wildtypischem Meprin β und den Varianten G32R und D47A. Vollständige Sequenzierung der Konstrukte durch *GATC Biotech*. Verwendete Primer sind in

Tabelle 14 aufgeführt. Die Punktmutationen der Varianten sind gelb hinterlegt und in rot dargestellt. Die Aminosäuresequenzen der Varianten unterscheiden sich vom wildtypischen Meprin β einzig in der gewünschten Mutation (G32R: Glycin₃₂→Arginin₃₂, D47A: Aspartat₄₇→Alanin₄₇).

3.2 Die Meprin β Varianten D47A und G32R zeigen eine typische Oberflächenexpression

Um mögliche Einflüsse der Punktmutationen auf den Transport zur Plasmamembran bzw. die Expression an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Oberflächenbiotinylierungen durchgeführt.

3.2.1 Oberflächenbiotinylierung

Ziel der Oberflächenbiotinylierung war es, die Expression von Meprin β an der Zelloberfläche transient transfizierter COS-7 Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren (2.2.7). Zur Isolation der Oberflächenproteine wurden diese mit Biotin markiert. Als Ladekontrolle für die Membranfraktion wurde der membranständige, ubiquitär auf Zellen exprimierte Transferrin Rezeptor-1 genutzt. Abbildung 3.2A zeigt eine repräsentative Western Blot-Analyse nach Oberflächenbiotinylierung, Abbildung 3.2B zeigt die zugehörige Quantifizierung durchgeführter Einzelerperimente. Alle mit Biotin behandelten Proben zeigen für Meprin β und den Transferrin Rezeptor 1 ein deutliches Signal in der Western Blot-Analyse. Die für Meprin β typische Expression an der Zelloberfläche (Becker et al., 2003; Bertenshaw et al., 2003) konnte somit auch für die Meprin β Varianten D47A und G32R gezeigt werden.

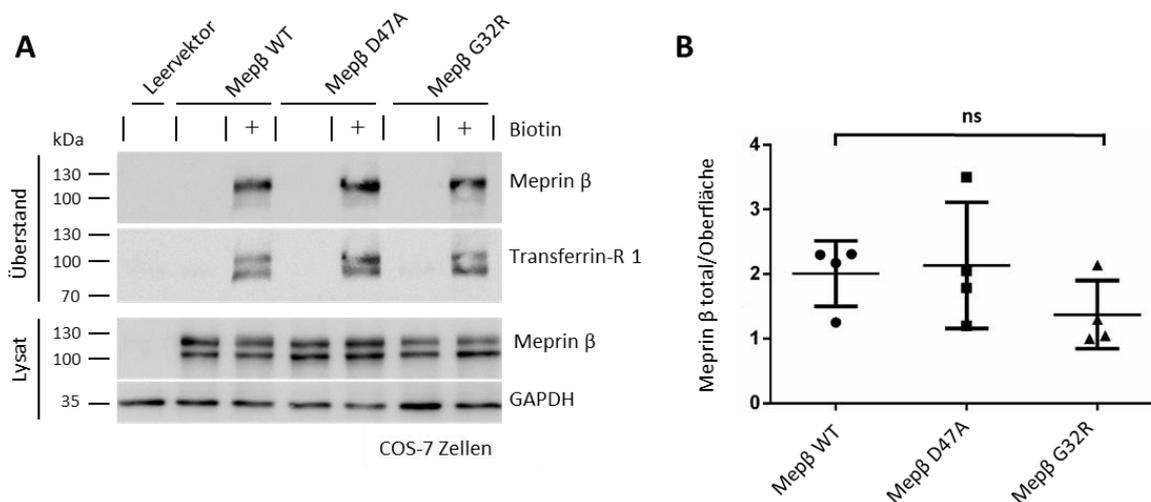


Abbildung 3.2: Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis von Meprin β

A) Repräsentativer Blot nach Oberflächenbiotinylierung. Der Transferrinrezeptor 1 wurde als Ladekontrolle der Membranfraktion, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Ladekontrolle der Lysate eingesetzt. Mittels Biotin-Markierung und Streptavidin-Pulldown konnte für alle Varianten die typische Expression an der Zelloberfläche gezeigt werden. B) zeigt die Quantifizierung der durchgeführten Einzelerperimente. In der Bewertung der Oberflächenexpression von Meprin β konnten zwischen wildtypischem Meprin β und den Meprin β Varianten D47A und G32R keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (N=4, One-way ANOVA mit Tukey post hoc test, $p > 0.05$ nicht signifikant (ns)).

Wenngleich für die G32R Variante der Trend einer leicht reduzierten Oberflächenexpression beobachtet wurde, konnte zwischen den Varianten kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenexpression festgestellt werden.

3.2.2 Immunfluoreszenz

Zur Bestätigung der in der Oberflächenbiotinylierung gezeigten Ergebnisse wurde Meprin β mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert und die subzelluläre Lokalisation mikroskopisch untersucht. Ziel dabei ist es, mögliche Akkumulationen auf dem sekretorischen Weg zu detektieren. Mit Meprin β transient transfizierte COS-7 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und fixiert. Es folgte die Permeabilisation der Zellen mittels Saponin und die Inkubation der primären und sekundären Antikörper. Abbildung 3.3 zeigt exemplarische Aufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung mit einer Blaufärbung der Zellkerne (DAPI) und Grünfärbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) [ER-Markerprotein PDIA6 (*Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6*) (Vekich et al., 2012)]. Alle Varianten zeigten die für Meprin β typische Expression an der Zelloberfläche. Auffällige Kolokalisationen wurden nicht beobachtet. Bezüglich der Oberflächenexpression zeigten sich somit auch in der Immunfluoreszenz keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischem Meprin β und den tumorassoziierten Varianten D47A und G32R.

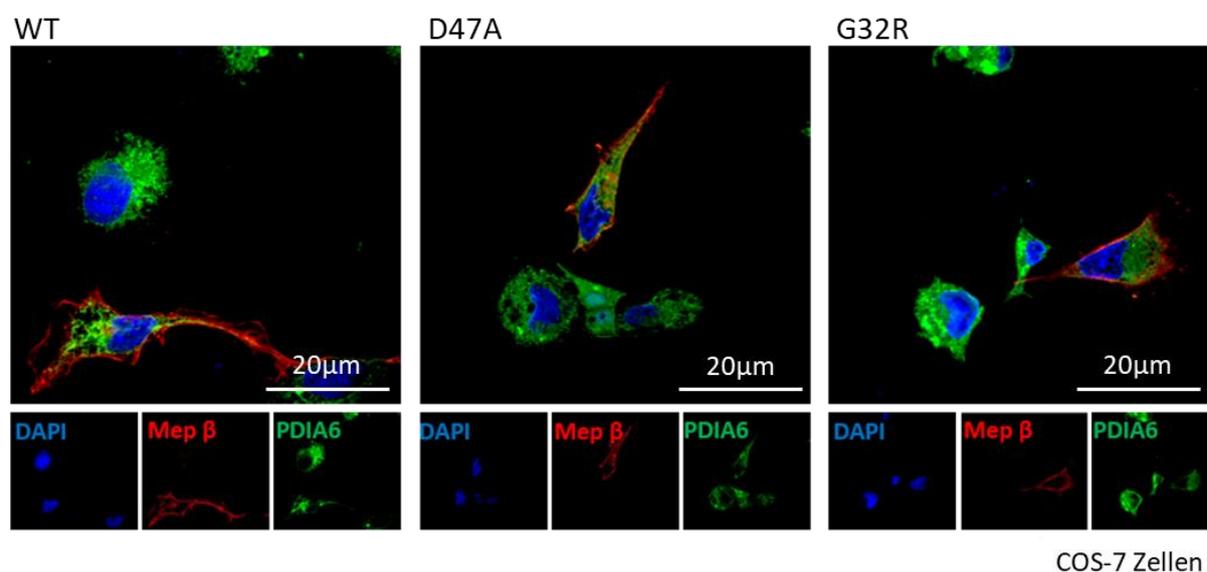


Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Meprin β Fluoreszenzmikroskopische Analyse von transient transfizierten COS-7 Zellen zeigt für wildtypisches Meprin β (WT) sowie die beiden Varianten D47A und G32R die typische Lokalisation an der Plasmamembran. Die Färbung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Der Zellkern wurde mittels DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) blau angefärbt, das endoplasmatische Retikulum mithilfe des ER-Markers PDIA6 (*Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6*) grün und Meprin β rot. Auffällige Kolokalisationen konnten nicht beobachtet werden.

3.2.3 Meprin β Variante G32R zeigte erhöhte Oberflächenaktivität

Da wir durch den Austausch der Aminosäuren Glycin zu Arginin (G32R) und Aspartat zu Alanin (D47A) einen Einfluss auf die Aktivierung und Aktivität der Protease vermuteten, wurden Aktivitätsanalysen durchgeführt. Hierbei nutzten wir einen bereits etablierten Peptid-Spaltungs-Assay. Das hierbei verwendete Peptid ist auf einer Seite mit einer fluorogenen Gruppe und auf der anderen Seite mit einem Quencher gekoppelt. Kommt es zur proteolytischen Spaltung des Peptids, wird die räumliche Nähe zwischen Fluorophor und Quencher aufgehoben, was zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz führt (2.2.18). HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit Meprin β bzw. einer der Varianten transient transfiziert. Oberflächenaktivitätsmessungen wurden 48 Stunden später in 48-well Platten durchgeführt. Pro Well wurden $0,5 \times 10^6$ vitale Zellen ausgesät. Der Meprin β Inhibitor Actinonin wurde als Spezifitätskontrolle für das verwendete Peptidsubstrat eingesetzt (Kruse et al., 2004; Wang et al., 2011).

Während die D47A Variante eine dem Wildtyp vergleichbare proteolytische Aktivität an der Zelloberfläche zeigte, wurde bei der G32R Variante eine signifikant erhöhte Oberflächenaktivität gemessen. Abbildung 3.4A zeigt exemplarische Messergebnisse, Abbildung 3.4B die Quantifizierung gemessener Oberflächenaktivitäten und Abbildung 3.4C die zugehörige Western Blot Kontroll-Analyse.

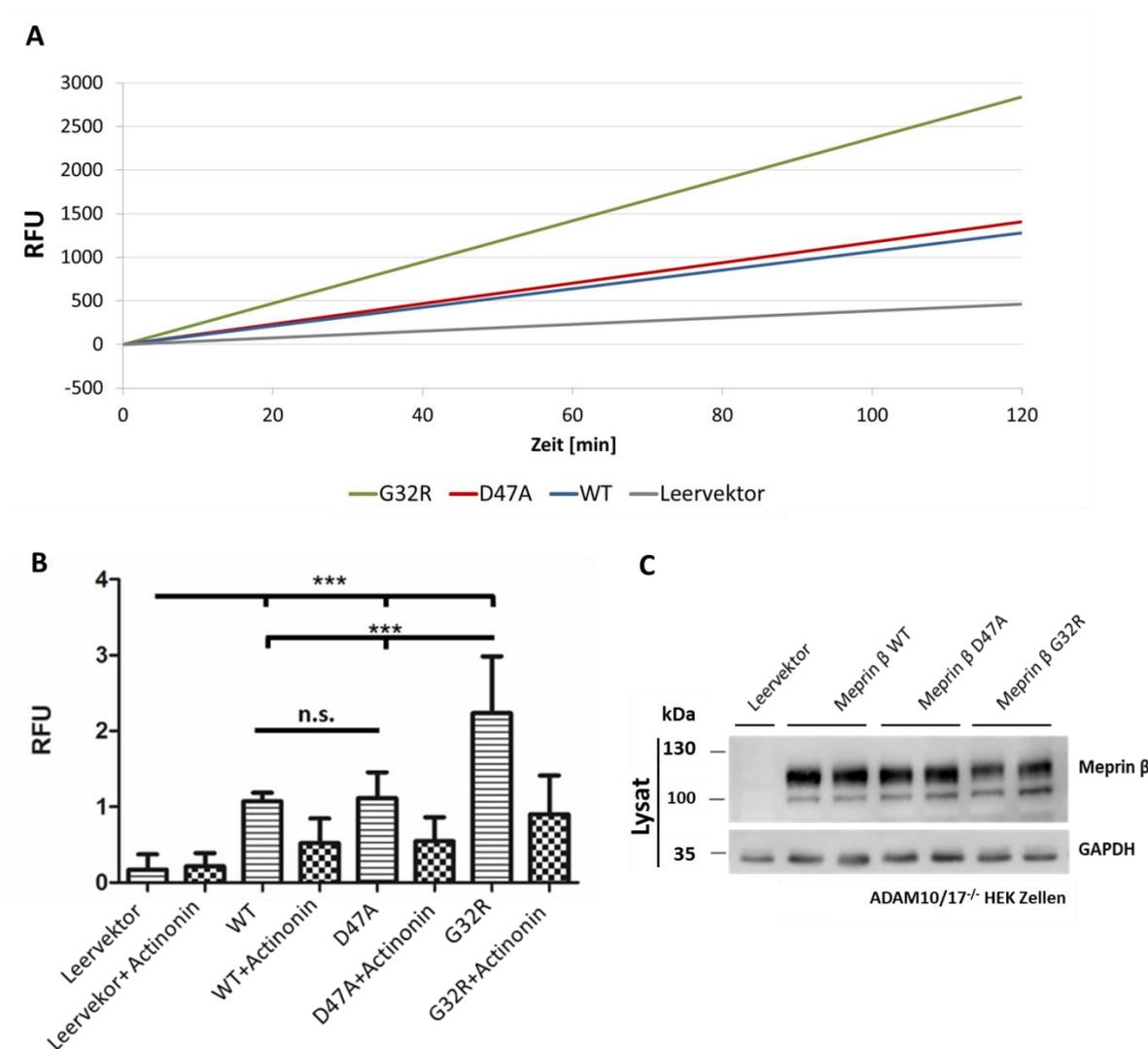


Abbildung 3.4: Meprin β G32R Variante zeigt erhöhte Oberflächenaktivität: A) Oberflächenaktivitäten der Meprin β Varianten über die Zeit. HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit einem Leervektor oder einer der drei Meprin β Varianten transient transfiziert. Die Oberflächenaktivität der Varianten wurde mittels des in Abschnitt (2.2.18) beschriebenen Peptid-Spaltungs-Assays bestimmt. Fluoreszenzmessungen wurden alle 30 Sekunden über zwei Stunden durchgeführt. B) Quantifizierung und statistische Analyse gemessener Oberflächenaktivitäten. Die G32R Variante zeigte im Vergleich zum wildtypischen Meprin β und der D47A Variante eine signifikant erhöhte Oberflächenaktivität. Der Meprin β Inhibitor Actinonin führte in allen Ansätzen zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenaktivität (N=7, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, p>0.05 nicht signifikant (ns), *** = p<0.001). C) Exemplarische Western Blot-Analyse zur Expressionskontrolle transfizierter Plasmide. RFU = *relative fluorescent units*.

3.2.4 Relativ verminderte Aktivierung der hyperaktiven G32R Variante durch Mariprase-2

Nachdem für die G32R Variante eine erhöhte Oberflächenaktivität beobachtet werden konnte, sollten mögliche Einflüsse der Mutationen auf die Aktivierung von Meprin β an der Zelloberfläche untersucht werden (Abbildung 3.5). Meprin β wird als inaktives Pro-Meprin β an der Zelloberfläche exprimiert. Zur Aktivierung bedarf es der Abspaltung des Propeptids, welches durch verschiedene Serinproteasen

bewerkstelligt werden kann (Johnson und Bond, 1997). 2015 konnte mit Matriptase-2 [transmembrane serine protease 6, (TMPRSS6 oder MT2)] ein membranständiger Aktivator von Pro-Meprin β identifiziert werden (Jäckle et al., 2015).

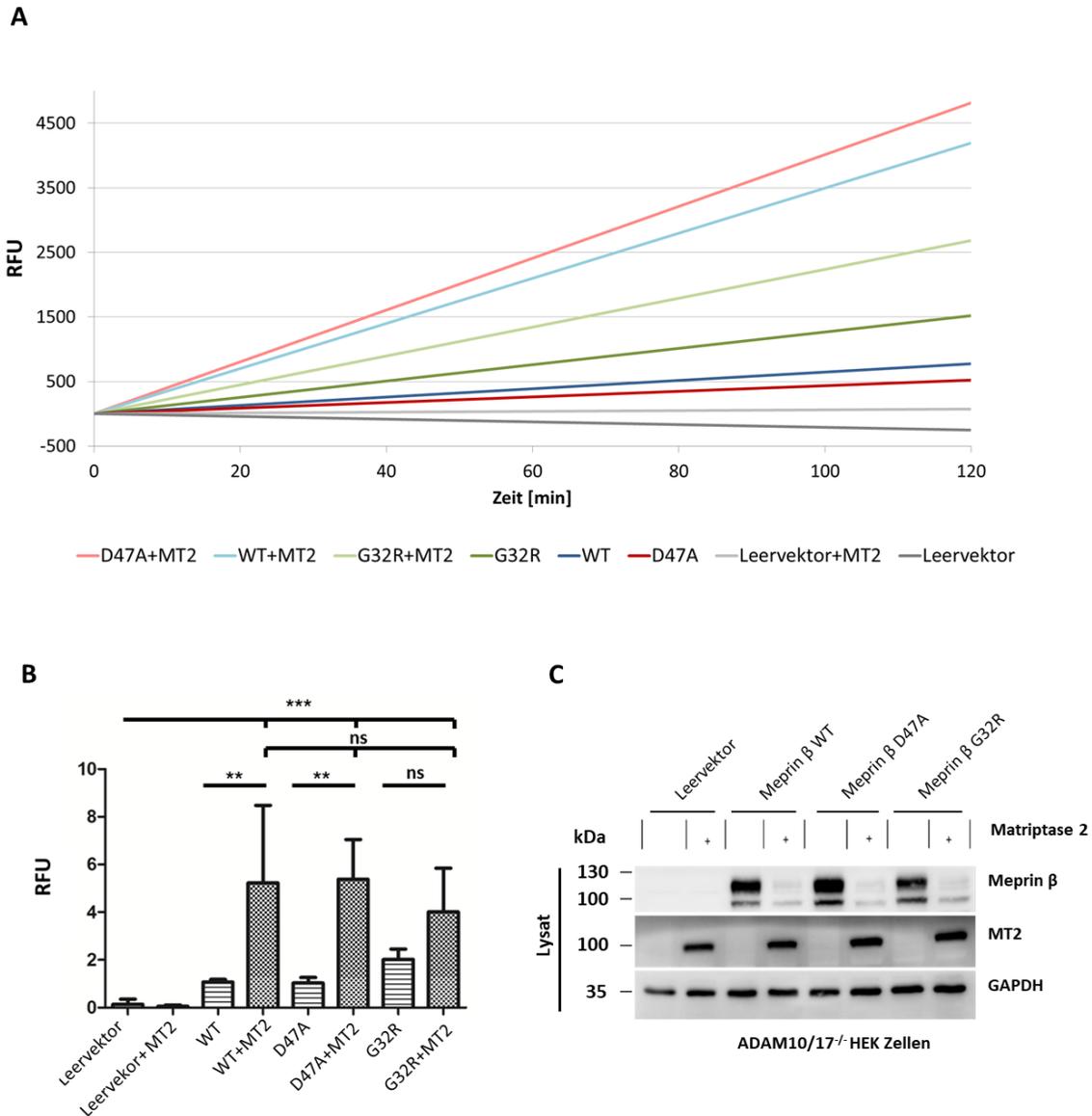


Abbildung 3.5: Aktivitätssteigerung von Meprin β durch Matriptase 2

HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit entsprechender Meprin β -Variante und Matriptase-2 (MT2) co-transfiziert. Zur Kontrolle wurden Einzeltransfektionen der Meprin β -Varianten mitgeführt. A) Exemplarische Darstellung gemessener Oberflächenaktivitäten über die Zeit. B) Quantifizierung und statistische Analyse gemessener Oberflächenaktivitäten. Die Co-Transfektion mit dem membrangebundenen Aktivator Matriptase-2 (MT2) steigerte die Oberflächenaktivität aller Varianten. Für die G32R Variante fiel diese Aktivitätssteigerung jedoch deutlich geringer und nicht signifikant aus (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, $p > 0.05$ nicht signifikant (ns), ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). C) Repräsentative Western Blot-Analyse zugehöriger Zelllysate zur Transfektionskontrolle. Bei Co-Expression mit Matriptase-2 zeigten die Meprin β Banden eine deutlich reduzierte Intensität. Zur Ladekontrolle wurde ein GAPDH Immunoblot durchgeführt. RFU = relative fluorescent units.

Die Serinprotease schneidet das Propeptid von Pro-Meprin β zwischen den Aminosäuren Arginin -61 und Asparagin-62 und erhöht somit den Anteil von aktivem Meprin β an der Zelloberfläche. HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit einer der Meprin β -Varianten und Matriptase-2 Co-transfiziert. Als Kontrollproben wurden Einzeltransfektionen der Meprin β -Varianten mitgeführt. Zur Bestimmung der Oberflächenaktivität wurde der bereits beschriebene Peptid-basierte Aktivitätsassay (2.2.18) verwendet.

In der Einzeltransfektion konnte die erhöhte Oberflächenaktivität der G32R Variante bestätigt werden. Die Co-Expression mit Matriptase-2 (MT-2) führte bei allen Varianten zu einem zusätzlichen Anstieg der Oberflächenaktivität. Diese fiel in den mit der G32R Variante transfizierten Proben deutlich geringer aus. Bei erhöhter Grundaktivität konnte somit für die G32R Variante eine verminderte Aktivierung durch membrangebundene Aktivatoren beobachtet werden.

3.3 Vermindertes *Shedding* der hyperaktiven Meprin β G32R Variante durch ADAM17

Wie eingangs beschrieben, kann die proteolytische Aktivität von Meprin β über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Neben der Aktivierung von Meprin β an der Zelloberfläche durch die Serinprotease Matriptase-2 (Jäckle et al., 2015) konnten die beiden ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 als potente *Sheddases* von Meprin β identifiziert werden. Interessant hierbei ist, dass ausschließlich die inaktive Proform von Meprin β durch die beiden ADAM Proteasen ADAM10 und ADAM17 von der Zelloberfläche gespalten wird.

Zur Untersuchung möglicher Einflüsse der eingefügten Punktmutationen auf das *Shedding* von Meprin β durch ADAM17 wurden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen mit jeweils einer der Meprin β -Varianten und ADAM17 Co-transfiziert bzw. retransfiziert. 48 Stunden nach Co-Transfektion wurden die Überstände abgenommen, Zelllysate hergestellt und diese mittels SDS-Page und Western Blot-Analyse untersucht.

In den Überständen der mit der G32R Variante transfizierten Proben konnten deutlich geringere Mengen an löslichem Meprin β nachgewiesen werden (Abbildung 3.6A). Dies lässt auf ein vermindertes *Shedding* der hyperaktiven G32R Variante durch ADAM17 schließen. Die mit Sternchen markierten Banden repräsentieren *full length* Meprin β auf Mikrovesikeln. Es konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit der Meprin β *Sheddases* ADAM10 und ADAM17 zu einer Freisetzung von Meprin β via Mikrovesikeln kommt (Wichert et al., 2017). Wie in der zitierten Arbeit verschwanden auch in den Versuchen dieser Arbeit die entsprechenden Banden nach Ultrazentrifugation der Überstände (Abbildung 3.6E).

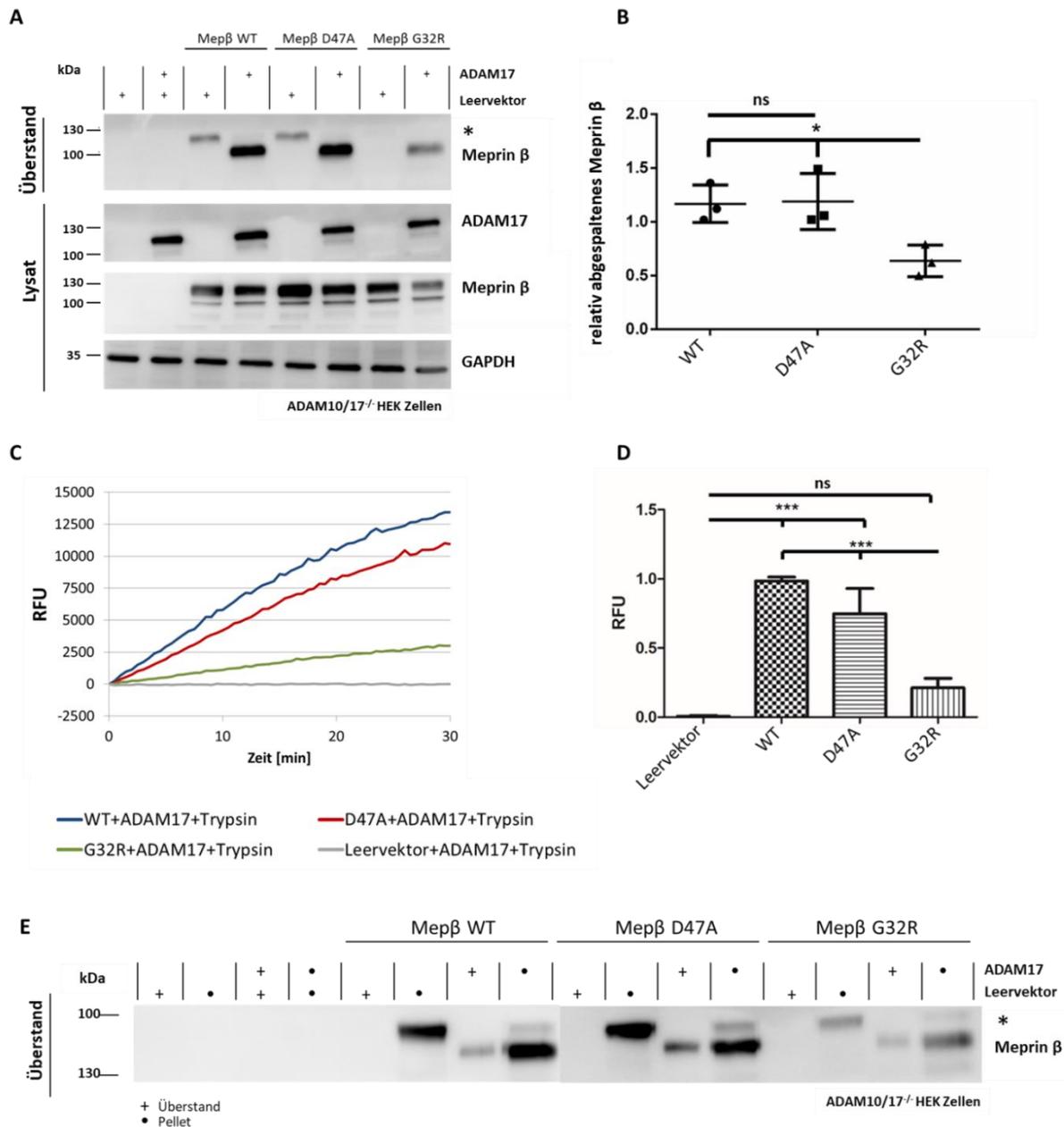


Abbildung 3.6: Shedding von Meprin β durch ADAM17

A) Exemplarische Western Blot-Analyse von Überstand und Zelllysat der mit ADAM17 und Meprin β Co-transfizierten HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen. Das Sternchen* markiert *full length* Meprin β , das sich auf Mikrovesseln im Überstand befindet (siehe Wichert et al., 2017). B) Die Quantifizierung der in A) exemplarisch gezeigten Western Blot-Analysen zeigte für die G32R Variante ein vermindertes *Shedding* durch ADAM17 (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, p>0.05 nicht signifikant (ns), * = p<0.05). C) Zur Aktivierung von abgespaltenem Meprin β wurden gewonnene Zellkulturüberstände mit Trypsin (10 μ g/ml) inkubiert. Die proteolytische Aktivität wurde durch bereits beschriebene Verfahren bestimmt (2.2.18). Die Überstände der mit der G32R Variante und ADAM17 Co-transfizierten Proben zeigten eine verminderte Meprin β Aktivität. D) zeigt die Quantifizierung und statistische Analyse durchgeführter Aktivitätsmessungen (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, p>0.05 nicht signifikant (ns), *** = p<0.001). E) Western Blot-Analyse der Überstände und Pellets nach Ultrazentrifugation der in A) gezeigten Proben. Mikrovesseln wurden abzentrifugiert wodurch *full length* Meprin β im Überstand (+) verschwand und nur noch in den Pellets (•) nachweisbar blieb. RFU = *relative fluorescent units*.

Zur Aktivierung von abgespaltenem, folglich inaktivem, Meprin β in den Überständen wurde die lösliche Serinprotease Trypsin eingesetzt. Die Überstände wurden dazu für 30 Minuten bei 37 °C mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin inkubiert. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Meprin β erfolgte mittels bereits beschriebener Peptid-basierter Aktivitätsassays (2.2.18).

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse bestätigend, konnte auch hier eine deutlich geringere Meprin β Aktivität in den Überständen der mit der G32R Variante transfizierten Proben gemessen werden. Trypsin alleine führte zu keiner messbaren Proteolyse des spezifischen Peptids. Zusammenfassend konnte die hyperaktive G32R Variante in geringerem Maße durch ADAM17 von der Zelloberfläche abgespalten werden, wodurch eine verminderte proteolytische Aktivität der Überstände beobachtet werden konnte.

3.3.1 Hyperaktive G32R Variante spaltet vermehrt membrangebunden IL-6-Rezeptor

Wie gezeigt werden konnte, ist Meprin β neben der Spaltung und Degradation des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (Keiffer und Bond, 2014) auch in der Lage, den membranständigen Interleukin-6 Rezeptor zu spalten (Arnold, Boll, et al., 2017), der über verschiedene Signalwege sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Effekte bewirken kann (Wolf et al., 2014). Allerdings ist nur membrangebundenes, nicht lösliches Meprin β in der Lage, den IL-6R zu spalten.

Zur Untersuchung möglicher Veränderungen der proteolytischen Aktivität der Meprin β Varianten gegenüber einem membrangebundenen Substrat wurden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen mit den Meprin β Varianten und humanem IL-6R co-transfiziert (2.2.5). 48 h nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen, die Zellen geerntet und anschließend lysiert. Proteinkonzentrationen der Lysate wurden bestimmt (2.2.8) und das Volumen der eingesetzten Überstände den Proteinkonzentrationen der jeweilige Lysate angepasst. Löslicher IL-6 Rezeptor (sIL-6R = *soluble IL-6R*) wurde aus dem Überstand mit Concanavalin A gefällt (2.2.11). Es folgten SDS-PAGE und Western Blot-Analysen. Zur Detektion des IL-6R im Immunoblot wurde ein am N-Terminus bindender Antikörper eingesetzt (mouse-anti-human-IL-6R (4–11), Chalaris et al., 2007).

Abbildung 3.7A zeigt dazu eine exemplarische Western Blot-Analyse. Im Überstand transfizierter Zellen konnte der etwas kleinere, sIL-6R bei ca. 50 kDa, im Lysat die *full length* Form des IL-6R bei ca. 100 kDa detektiert werden. Zur Kontrolle wurde die Proteinexpression von Meprin β und GAPDH im Lysat geprüft.

In den Überständen der G32R / IL-6R Co-transfizierten Zellen konnte vermehrt sIL-6R gefällt und detektiert werden (Abbildung 3.7B). Passend dazu zeigte die für den IL-6R typische Doppelbande (Arnold, Boll, et al., 2017) in den Lysaten der G32R / IL-6R Co-transfizierten Proben eine schwächere Intensität. Zur Quantifizierung der individuellen Experimente wurden die Intensitäten der Banden des

IL-6R und die des sIL-6R zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zusammenfassend konnte in diesem Experiment die proteolytische Hyperaktivität der G32R Variante auch gegenüber dem IL-6R als ein physiologisches, primär membrangebundenes Substrat von Meprin β bestätigt werden.

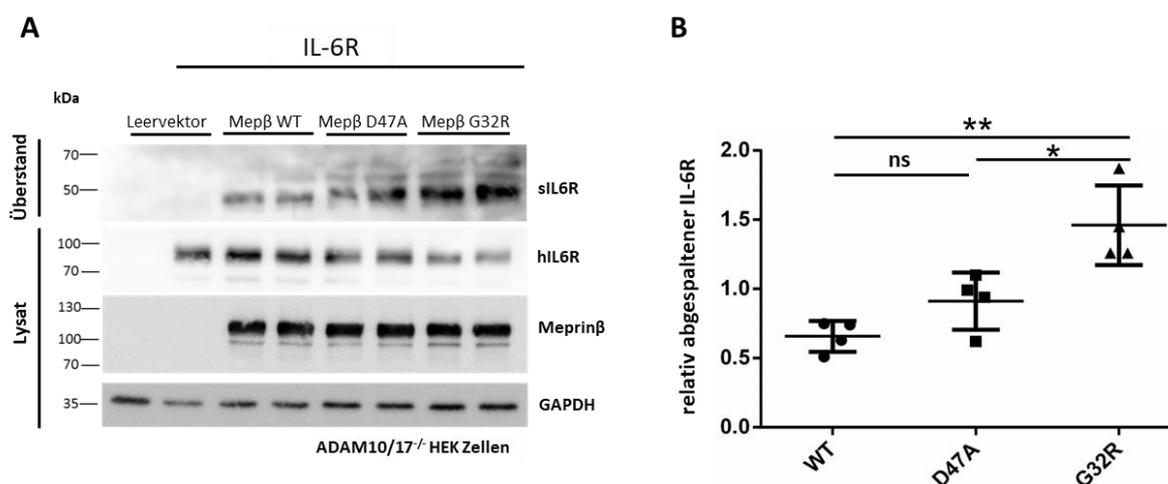


Abbildung 3.7: Shedding des IL-6R durch Meprin β

A) Western Blot Analyse der Lysate und der mit Concanavalin A gefällten Überstände nach 48-stündiger Co-Transfektion der Meprin β Varianten mit humanem IL-6R (hIL6R) in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen. In den mit der G32R Variante transfizierten Proben konnte hierbei vermehrt sIL-6R bei ca. 50 kDa im Überstand detektiert werden. Genutzt wurde ein N-Terminal bindender Antikörper. B) Quantifizierung der durchgeführten Western Blot-Analysen. Die G32R Variante zeigte im Vergleich zur D47A Variante und dem Wildtyp eine signifikant erhöhte proteolytische Oberflächenaktivität gegenüber dem membrangebundenen humanen IL-6R (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, $p > 0.05$ nicht signifikant (ns), ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$).

3.4 Meprin β G32R_R61S Variante

Wie beschrieben, muss zur Aktivierung von Meprin β das N-Terminale Propeptid abgespalten werden. Verschiedene tryptische Proteasen, u.a. *kallikrein-related peptidases* (KLKs), sind dazu in der Lage (Johnson und Bond, 1997; Ohler et al., 2010) und nutzen dazu die selbe Schnittstelle zwischen den Aminosäuren Arginin-61 und Asparagin-62 (Jäckle et al., 2015). Eine Meprin β Variante, die statt des Arginins ein Serin an der konstitutiven Schnittstelle trägt, kann daher nicht aktiviert werden und zeigt folglich keine proteolytische Aktivität (Jäckle et al., 2015).

Im Folgenden sollte getestet werden, ob es über den eingefügten Argininrest der G32R Variante zu einer zusätzlichen, von der klassischen Aktivierungsstelle unabhängigen, Teilaktivierung kommt. Mittels ortsspezifischer Mutagenese (2.2.14) wurde dazu eine G32R_R61S Doppelvariante hergestellt (2.2.14). Diese kombiniert gewissermaßen die hyperaktive G32R Variante mit der inaktiven R61S Variante.

10	20	30	40	50	
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	GGMDQDIFDI	NEGLGLDLFE	WT
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	GR MDQDIFDI	NEGLGLDLFE	G32R
MDLWNLSWFL	FLDALLVISG	LATPENFDVD	GR MDQDIFDI	NEGLGLDLFE	G32R_R61S
60	70	80	90	100	
GDIRLDRAQI	RNSIIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	WT
GDIRLDRAQI	RNSIIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	G32R
GDIRLDRAQI	S NSIIIGEKYR	WPHTIPYVLE	DSLEMNAKGV	ILNAFERYRL	G32R_R61S
110	120	130	140	150	
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCDRIATV	WT
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCDRIATV	G32R
KTCIDFKPWA	GETNYISVFK	GSGCWSSVGN	RRVGKQELSI	GANCDRIATV	G32R_R61S
160	170	180	190	200	
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSLN	WT
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSLN	G32R
QHEFLHALGF	WHEQSRSDRD	DYVRIMWDRI	LSGREHNFNT	YSDDISDSLN	G32R_R61S
210	220	230	240	250	
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSDLLKLN	WT
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSDLLKLN	G32R
VPYDYTSVMH	YSKTAFQNGT	EPTIVTRISD	FEDVIGQRM	FSDSDLLKLN	G32R_R61S

Abbildung 3.8: Aminosäuresequenz der G32R_R61S Variante

Aminosäuresequenzen verschiedener Meprin β Konstrukte. Die Sequenz des wildtypischen Enzyms ist oben, die Sequenzen der Varianten G32R und G32R_R61S darunter aufgeführt. Entsprechende Punktmutationen sind rot geschrieben und gelb hinterlegt. Verwendete Primer sind in

Tabelle 14 gelistet. WT: Wildtyp.

HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden transient transfiziert und Oberflächenaktivitätsmessungen durchgeführt (2.2.18). Hierbei konnte für die G32R_R61S Variante eine deutliche Oberflächenaktivität gemessen werden. Verglichen mit wildtypischem Meprin β zeigte die G32R_R61S Variante eine höhere Oberflächenaktivität. Die signifikant erhöhte Aktivität der G32R Variante wurde abermals bestätigt. Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen vermuten, dass es über das eingefügte Arginin innerhalb des Propeptids an der Position 32 bei der G32R-, und G32R_R61S Variante zu einer (zusätzlichen) Aktivierung kommt.

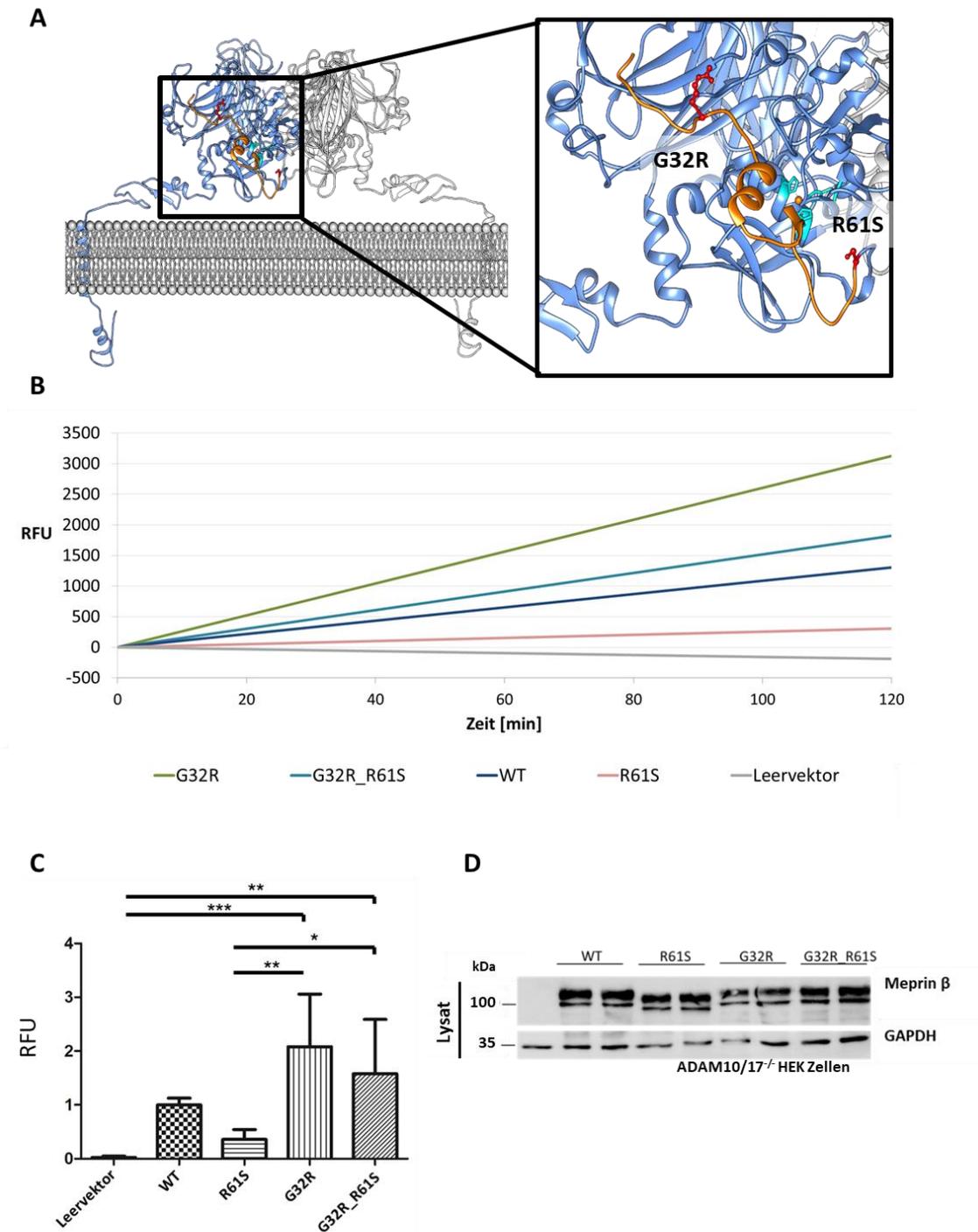


Abbildung 3.9: Analyse der Meprin β G32R_R61S Variante

A) Molekulares Modell der Metalloprotease Meprin β an der Zelloberfläche. Die durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauschten Aminosäurereste an der Position 32 (Glycin \rightarrow Arginin) und 61 (Arginin \rightarrow Serin) sind in rot, das Propeptid in orange dargestellt (verändert nach Arolas et al., 2012, PNAS). B) Oberflächenaktivitätsmessung von Meprin β gegenüber dem spezifischen S2 Peptidsubstrat. Die G32R_R61S Doppelvariante zeigte im Gegensatz zur inaktiven R61S Einzelvariante eine deutliche Oberflächenaktivität. Die G32R Einzelvariante zeigte erneut erhöhte Oberflächenaktivitäten. C) Quantifizierung der Ergebnisse aus B) (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). D) Western Blot-Analyse zur Kontrolle der Proteinexpression der in B) gemessenen Proben. RFU = relative fluorescent units.

3.5 Massenspektrometrie

Der Vermutung, es könnte bei der hyperaktiven G32R Variante über das eingefügte Arginin-32 innerhalb des Propeptids zu einer zusätzlichen Aktivierungsstelle kommen, sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie geprüft werden.

HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit der jeweiligen Meprin β Variante (WT, G32R, G32R_R61S) transient transfiziert, nach 24 Stunden geerntet und Meprin β aus den Lysaten immunopräzipitiert (2.2.12). Weiter wurde eine SDS-PAGE Analyse durchgeführt, native Gele mit Coomassie-Lösung gefärbt, die Meprin β Banden aus dem Gel geschnitten und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet (2.2.18).

Kurz gefasst wurde daraufhin ein In-Gel Proteinverdau mit Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt und entstandene Schnittstellen mit 100 % H₂¹⁸O markiert. Die Analyse der Peptide erfolgte durch LC-MS/MS-Kopplung (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie) mit einem ESI-Interface (Electrospray-Interface). Alle Messparameter und das genaue Vorgehen sind in Abschnitt 2.2.18 beschrieben. Zur Auswertung erhobener Spektren wurden Computer assistierte Suchmaschinen eingesetzt (Proteome Discoverer 2.2.0.338; SequestHT, Thermo Scientific) und die Ergebnisse mit der Datenbank Uniprot (25. Juli 2017) abgeglichen. Abbildung 3.10 zeigt die Aminosäuresequenz von Pro-Mepirin β im FASTA-Format. Gelb hinterlegte Sequenzen markieren die mit Trypsin / H₂¹⁸O *labeling* identifizierten Peptide. Mittels Chymotrypsin / H₂¹⁸O *labeling* identifizierte Bereiche sind unterstrichen.

In den Ergebnissen der MS-Analyse fiel die geringe Anzahl detektierter Peptide und eine damit einhergehende geringe Sequenzabdeckung mit Sequenzabdeckungen zwischen 22 % und 45 % auf. Wünschenswert wäre eine Sequenzabdeckung im Bereich von 70-80 %. Besonders N-Terminal, im Bereich des Propeptids, konnten keine Peptide identifiziert werden. Eine Aussage über mögliche Spaltstellen innerhalb dieser Sequenz war daher auf Grundlage dieser Ergebnisse nicht möglich. Auch in der mehrfachen Wiederholung der Versuche konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

A

MDLWNLSWFLFLDALLVISGLATPENFDVDG**G**MDQDIFDINEGLGLDLFEGDIRLDRAQI
RNSIIGEKYRWPHTIPYVLEDSLEMNAKGVILNAFERYRLK**T**CIDFKPWAGETNYISVFK
 GSGCWSSVGNRRVKGQELSIGANCDRIATVQHEFLHALGFWHEQSRSDRDDYVRIMWDRI
 LSGREHNFTYSDDISDSLNPYDYTSVMHYSKTAFQNGTEPTIVTRISDFEDVIGQRM
FSDSDLKLNQLYNCSSSLSFMDSCSFELENCVGMIOSSGDNADWQRVSOVPRGPESDHS
NMGQCOGSGFFMHFDSSSVNVGATAVLESRTLYPKRGFQCLQFYLYNSGSESDQLNIYIR
 EYSADNVDGNLTLVEEIK**E**IPTGSWQLYHVTLK**V**TKKFRVVFEGR**K**SGASLGGLS**I**DDI
NLSETRCPHHIWHIRNFTQFIGSPNGTLYSPFFYSSKGYAFQIYLNLAHVNTAGIYFH
 LI SGANDDQLQWPCPWQATMTLLDQNPDIRQRMNSQR**S**ITTDPFMTTDNGNYFWDRPSKVG
 TVALFSNGTQFR**R**GGGYGTS**A**F**I**THE**R**LKSRDFIKGDDVYILLTVEDISHLNSTQIQ
 LTP APSVQDLCSKTTCKNDGVCTVRDGKAECR**C**QSGED**W**Y**M**GER**C**EKRGSTRDTIVIAVSS
 T VAVFALMLIITLVSVCYTRKRYRERMSSNRPNLTPQNQHAF

B

MDLWNLSWFLFLDALLVISGLATPENFDVDG**R**MDQDIFDINEGLGLDLFEGDIRLDRAQI
RNSIIGEKYRWPHTIPYVLEDSLEMNAKGVILNAFERYRLK**T**CIDFKPWAGETNYISVFK
 GSGCWSSVGNRRVKGQELSIGANCDRIATVQHEFLHALGFWHEQSRSDRDDYVRIMWDRI
 LSGREHNFTYSDDISDSLNPYDYTSVMHYSKTAFQNGTEPTIVTRISDFEDVIGQRM
FSDSDLKLNQLYNCSSSLSFMDSCSFELENCVGMIOSSGDNADWQRVSOVPRGPESDHS
NMGQCOGSGFFMHFDSSSVNVGATAVLESRTLYPKRGFQCLQFYLYNSGSESDQLNIYIR
 EYSADNVDGNLTLVEEIK**E**IPTGSWQLYHVTLK**V**TKKFRVVFEGR**K**SGASLGGLS**I**DDI
NLSETRCPHHIWHIRNFTQFIGSPNGTLYSPFFYSSKGYAFQIYLNLAHVNTAGIYFH
 LI SGANDDQLQWPCPWQATMTLLDQNPDIRQRMNSQR**S**ITTDPFMTTDNGNYFWDRPSKVG
 TVALFSNGTQFR**R**GGGYGTS**A**F**I**THE**R**LKSRDFIKGDDVYILLTVEDISHLNSTQIQ
 LTP APSVQDLCSKTTCKNDGVCTVRDGKAECR**C**QSGED**W**Y**M**GER**C**EKRGSTRDTIVIAVSS
 T VAVFALMLIITLVSVCYTRKRYRERMSSNRPNLTPQNQHAF

C

MDLWNLSWFLFLDALLVISGLATPENFDVDG**R**MDQDIFDINEGLGLDLFEGDIRLDRAQI
SNSIIGEKYRWPHTIPYVLEDSLEMNAKGVILNAFERYRLK**T**CIDFKPWAGETNYISVFK
 GSGCWSSVGNRRVKGQELSIGANCDRIATVQHEFLHALGFWHEQSRSDRDDYVRIMWDRI
 LSGREHNFTYSDDISDSLNPYDYTSVMHYSKTAFQNGTEPTIVTRISDFEDVIGQRM
FSDSDLKLNQLYNCSSSLSFMDSCSFELENCVGMIOSSGDNADWQRVSOVPRGPESDHS
NMGQCOGSGFFMHFDSSSVNVGATAVLESRTLYPKRGFQCLQFYLYNSGSESDQLNIYIR
 EYSADNVDGNLTLVEEIK**E**IPTGSWQLYHVTLK**V**TKKFRVVFEGR**K**SGASLGGLS**I**DDI
NLSETRCPHHIWHIRNFTQFIGSPNGTLYSPFFYSSKGYAFQIYLNLAHVNTAGIYFH
 LI SGANDDQLQWPCPWQATMTLLDQNPDIRQRMNSQR**S**ITTDPFMTTDNGNYFWDRPSKVG
 TVALFSNGTQFR**R**GGGYGTS**A**F**I**THE**R**LKSRDFIKGDDVYILLTVEDISHLNSTQIQ
 LTP APSVQDLCSKTTCKNDGVCTVRDGKAECR**C**QSGED**W**Y**M**GER**C**EKRGSTRDTIVIAVSS
 T VAVFALMLIITLVSVCYTRKRYRERMSSNRPNLTPQNQHAF

Abbildung 3.10: Sequenzabdeckungen der Meprin β Varianten in der Massenspektrometrie

Aminosäuresequenz von Pro-Meprin β im FASTA-Format. Durch Trypsin-Verdau/100% $H_2^{18}O$ labeling identifizierte Sequenzen sind gelb hinterlegt. Unterstrichene Bereiche markieren durch Chymotrypsin-Verdau/100% $H_2^{18}O$ labeling identifizierte Peptide. Entsprechende Mutationen der Varianten sind in Rot dargestellt. A) Wildtypisches Pro-Meprin β (Sequenzabdeckung: Trypsin-Verdau/ $H_2^{18}O$ labeling: 45%; Chymotrypsin/ $H_2^{18}O$ labeling: 22%). B) G32R Variante (Sequenzabdeckung: Trypsin-Verdau/ $H_2^{18}O$ labeling: 39%; Chymotrypsin/ $H_2^{18}O$ labeling: 27%). C) G32R_R61S Variante (Sequenzabdeckung: Trypsin-Verdau/ $H_2^{18}O$ labeling: 39%; Chymotrypsin/ $H_2^{18}O$ labeling: 34 %)

3.6 Einfluss von Meprin β WT und den Varianten G32R und D47A auf Zellproliferation und Zellmigration

Im nächsten Schritt sollten funktionelle Effekte einer Meprin β Überexpression, bzw. der Überexpression der beiden Meprin β Varianten auf zellbiologischer Ebene näher untersucht werden. Dazu wurde über eine Echtzeit Zellanalyse (*xCELLigence real time cell analyzer*, ACEA Biotechnologies) das Wachstumsverhalten, das Migrationsverhalten und das Invasionsverhalten von Meprin β überexprimierenden HeLa Zellen untersucht.

Über die Verwendung spezieller Wells konnten dichteabhängige Veränderungen von Zellpopulationen, ganz ohne die Verwendung von Farbstoffen oder Markierungssystemen, analysiert werden. Durch vermehrte Zellproliferation kam es hierbei zu einem Anstieg des Wechselstromwiderstandes am Boden der Wells, der über den dimensionslosen *Cell Index* (CI) ausgelesen werden konnte. Pro Well wurden 1×10^4 transient transfizierte HeLa Zellen ausgesät und das Proliferationsverhalten für 72 Stunden aufgezeichnet. Ausgewertet wurde die Fläche unter der jeweiligen Kurvenfunktion. In Abbildung 3.11A ist der Kurvenverlauf einer exemplarischen Messung dargestellt, Abbildung 3.11B zeigt die statistische Auswertung durchgeführter Experimente. Für die Darstellung in Abbildung 3.11B wurden die Ergebnisse auf die Werte der mit Leervektor transfizierten HeLa Zellen normalisiert. HeLa Zellen, die wildtypisches Meprin β oder die D47A Variante auf ihrer Oberfläche überexprimierten, zeigten keine signifikanten Unterschiede zum Proliferationsverhalten der mit Leervektor transfizierten Zellen. Die Überexpression der G32R Variante führte zu einer leicht verminderten Proliferation der HeLa Zellen. Somit konnte in diesem Versuch ein gering negativer Einfluss der Meprin β Überexpression auf die Proliferation der transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Um Aussagen über den Einfluss der Meprin β Überexpression auf das Invasionsverhalten von Zellen treffen zu können, wurden spezielle Wells verwendet, die durch den Einsatz einer mit Kollagen IV beschichteten, feinporigen Membran ein vertikales Zweikammersystem besitzen.

Nur Zellen, die durch ihren motilen Phänotyp durch die Membran migrieren und weiter mittels proteolytischer Aktivität die Kollagen IV Schicht invadieren konnten, erreichten den Boden der Wells und lösten damit einen Anstieg der Impedanz aus. Dieser wurde über 24 Stunden aufgezeichnet und ist hier durch einen dimensionslosen, relativen *Cell Index* (CI) abgebildet. Um eine Proliferation der Zellen zu verhindern, wurde DEMEM +1 % (v/v) FBS verwendet und ein kürzerer Beobachtungszeitraum festgelegt.

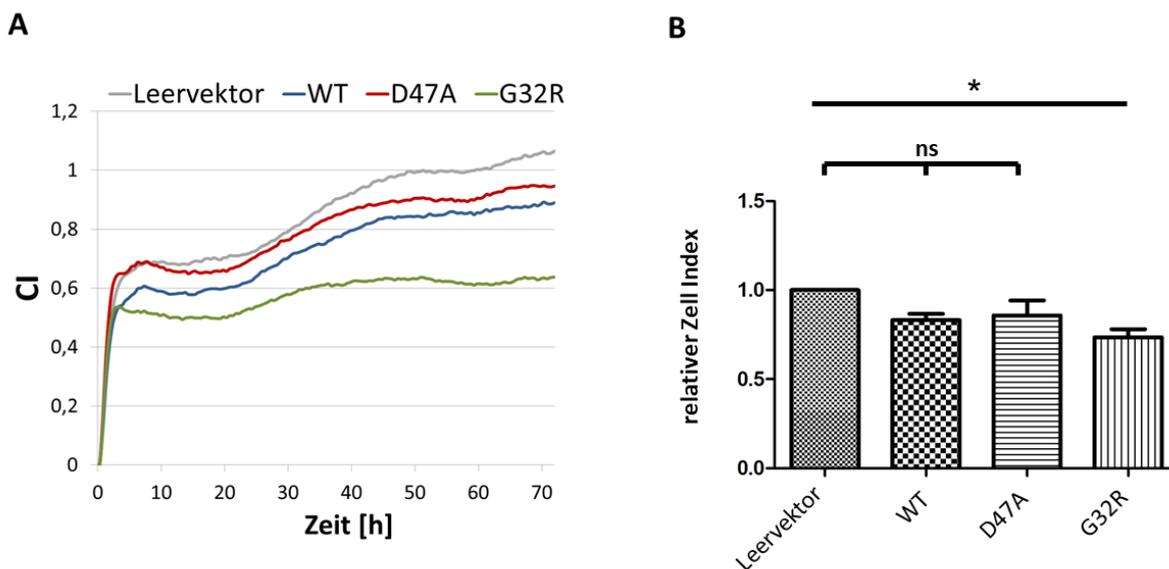


Abbildung 3.11: Proliferationsanalyse von Meprin β -transfizierten HeLa Zellen

A) HeLa Zellen wurden mit Meprin β WT, D47A oder G32R transfiziert. Je 1×10^4 Zellen wurden als Triplikate in die Wells des Echtzeit-Zellanalyse-Systems ausgesät. Über die Messung des Wechselstromwiderstandes am Boden der Wells wurde das Wachstumsverhalten über 72 Stunden in Echtzeit aufgezeichnet und über einen dimensionslosen *Cell Index* (CI) ausgelesen. B) Quantifizierung der CI Werte durchgeführter Experimente. Grundlage der Werte bilden die Flächen unter den jeweiligen Kurvenfunktionen. Meprin β G32R überexprimierende Zellen zeigten eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten HeLa Zellen. (N=4, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, $p > 0.05$ nicht signifikant (ns), * = $p < 0.05$).

Die in Abbildung 3.12 dargestellten Ergebnisse zeigen die erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit von Meprin β überexprimierenden Zellen. Die Überexpression der hyperaktiven G32R Variante zeigte dabei den größten Einfluss. Zwischen der Motilität bzw. der Fähigkeit der Zellen eine Kollagen IV Schicht zu invadieren und der Expression von Meprin β auf HeLa Zellen, zeigte sich hier eine positive Korrelation.

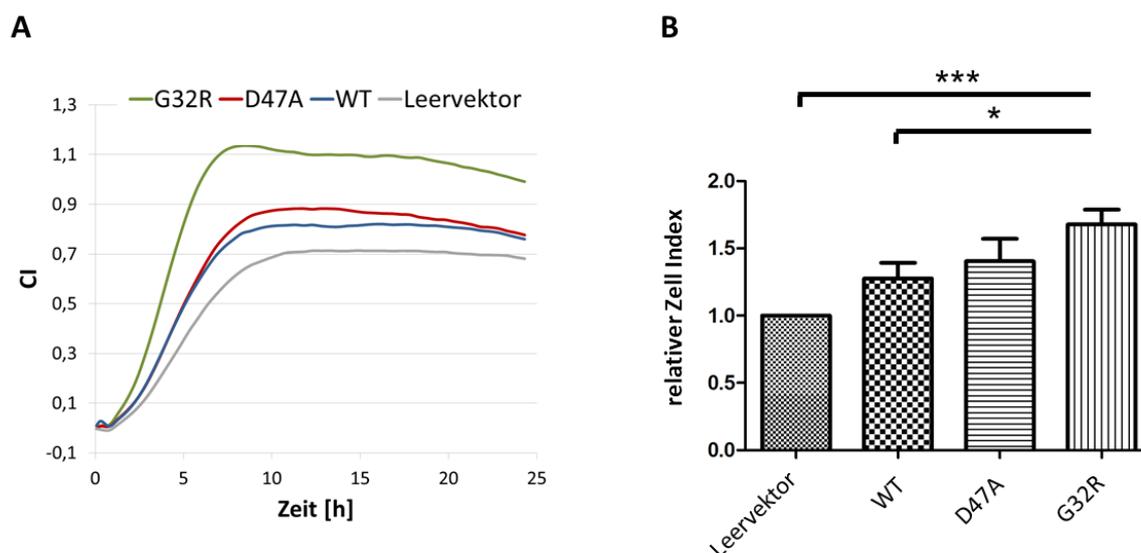


Abbildung 3.12: Migrationsanalyse von Meprin β -transfizierten HeLa Zellen

A) Messung der Zellmigration/Zellinvasion von HeLa Zellen durch eine mit Kollagen IV beschichtete, feinporige Membran. Die Überexpression von Meprin β erhöhte die Fähigkeit der HeLa Zellen, die beschichtete Membran zu überwinden. Resultierende Impedanzveränderungen am Boden der Wells wurden in 30-minütigen Abständen über 24 Stunden aufgezeichnet. B) Quantifizierung der CI (Cell Index) Werte. Die CI Werte wurden auf den Leervektor normalisiert. (N=3, One-way ANOVA mit Turkey post hoc test, $p > 0.05$ nicht signifikant (ns), * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$)

3.7 Meprin β Färbungen in humanem Gewebe

Um die bisher unbekannte Expression von Meprin β in humanem Endometriumgewebe zu prüfen, führten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken (Pathologisches Institut Kiel) immunhistochemische Färbungen an humanen Gewebsschnitten des Endometriums durch. Ein entsprechender Ethikantrag wurde gestellt und von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (Ethikvotum D417/18). Insgesamt wurden 34 Tumor- und 10 Kontrollproben gefärbt, am Lichtmikroskop ausgewertet und einige Schnitte, zur exemplarischen Darstellung, eingescannt (2.2.18).

In nicht neoplastisch veränderten Gewebeproben gesunder Patientinnen konnte eine apikale Expression für Meprin β innerhalb der Endometriumzellen (Abbildung 3.13) nachgewiesen werden. In neoplastisch veränderten Gewebeproben von Patientinnen mit diagnostiziertem Endometriumkarzinom (ICD-O: C54.- M8380/3) zeigte sich hingegen ein verändertes Expressionsmuster. Hier konnte neben der betont apikalen Expression sowohl eine basolaterale, als auch zytoplasmatische Expression von Meprin β dargestellt werden. Einige Tumorzellen der Invasionsfront zeigten dabei, im Vergleich zu tumorzentralen Zellen und dem umliegenden Tumorgewebe, eine deutlich stärkere Anfärbung für Meprin β . Zwischen Tumoren verschiedener T-

Stadien (TNM-Klassifikation) konnte kein Unterschied im Expressionsmuster beobachtet werden. Auch einzelne Zellen des umliegenden Gewebes, insbesondere Makrophagen, zeigten eine deutliche Färbung (siehe Abbildung 3.13). Diese konnte auch in Kontrollschnitten beobachtet werden (nicht abgebildet). Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der kleinen Kohorte von insgesamt 44 Patientenproben verzichtet.

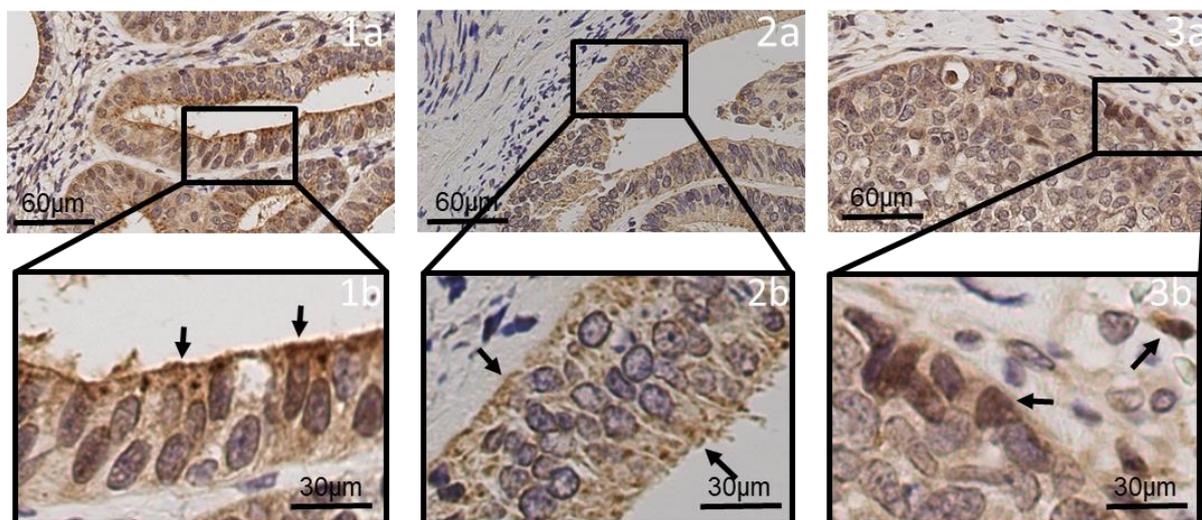


Abbildung 3.13: Meprin β Expression in humanem Endometrium-Gewebe

Immunhistochemische Färbungen an Großflächenschnitten von Kontrollgewebe (1a/b) und endometrioidem Adenokarzinom des Endometriums [2a/b (ICD-O-3: C54 M8380/3 pT2, pN0 (0/35), pNx, G2, L0, V0, R0); 3a/b (ICD-O-3: C54.1 M8380/3 pT3b L0 V0 pR1 G2)]. Darstellung des anti-Meprin β -Antikörpers [B1(Brösmeli)] über DAB (Diaminobenzidin), Gegenfärbung mit Hämalaun (2.2.18). Originale Vergrößerung X 600. Gesunde Endometriumzellen zeigen eine betont apikale Expression für Meprin β (Pfeile). In neoplastisch veränderten Zellen zeigt sich ein verändertes Expressionsmuster mit zytoplasmatischer und stellenweise basal betonter Meprin β Expression (Pfeile).

Zusammenfassend konnte hier die Expression von Meprin β in humanem Endometriumgewebe nachgewiesen werden. Dabei konnten wir eine betont apikale Expression in nicht neoplastisch verändertem Gewebe und ein dazu verändertes Expressionsmuster im tumorösen Gewebe beobachten. In neoplastisch veränderten Zellen kam es zu einer Umverteilung von Meprin β innerhalb der Zelle. Hier zeigte sich neben der apikalen Expression eine zytoplasmatische und stellenweise betont basolaterale Expression von Meprin β .

3.8 Meprin β im Kolonkarzinom

Während einige Daten auf eine Rolle der Metalloprotease Meprin α im Kolonkarzinom hindeuten (siehe Einleitung), sind Expression sowie etwaige pathophysiologische Funktionen für die Metalloprotease Meprin β im Kolonkarzinom bislang unerforscht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte

erstmals die Expression von Meprin β in Gewebeproben von Patientinnen und Patienten mit Kolonkarzinom immunhistochemisch untersucht werden.

Insgesamt wurden 559 Gewebestanden immunhistochemisch auf Meprin β gefärbt (2.2.21) und die Färbeargebnisse mit klinisch pathologischen Parametern sowie dem Überleben korreliert. Detaillierte Angaben zu Patientenkollektiv und statistischer Auswertung sind dem Methodenteil (2.2.21) und Tabelle 15 zu entnehmen. Kurz beschrieben wurden drei Färbeintensitäten (null, eins und zwei) festgelegt. Die Färbeintensität null definierte das Fehlen einer immunhistochemischen Abfärbung von Meprin β , die Färbeintensitäten eins und zwei wurden mittels Referenzschnitte klar definiert. Innerhalb jeder Stanze wurde die prozentuale Verteilung der jeweiligen Färbeintensitäten innerhalb des Tumorgewebes bestimmt. Grundlage der statistischen Auswertung bildete der HistoScore (2.2.21).

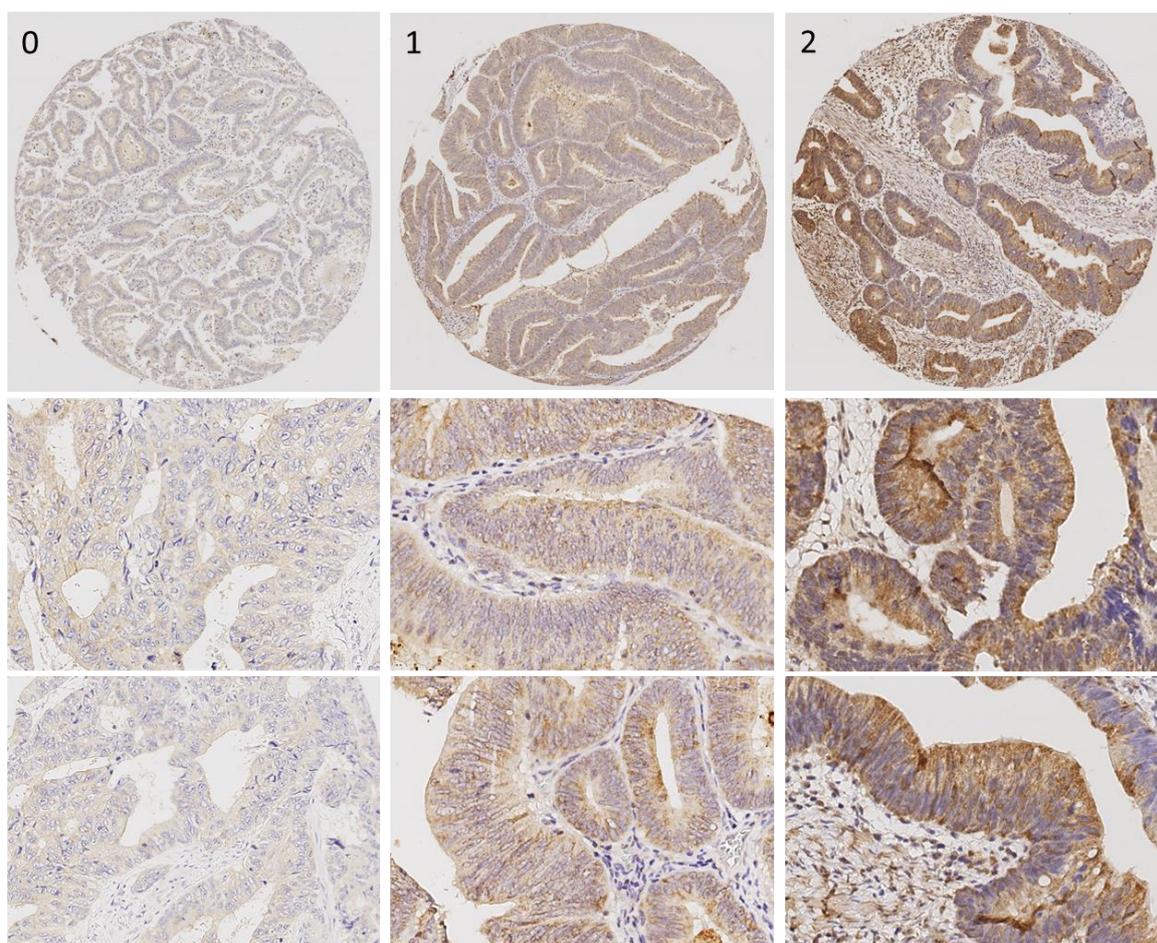


Abbildung 3.14: Referenzstanzen der Meprin β Expression aus neoplastisch verändertem Kolongewebe

Zur Evaluierung der Meprin β Expression im Kolonkarzinom wurden Gewebestanden immunhistochemisch auf Meprin β gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Zur Berechnung des eingesetzten *Histo-Scores* wurden die Färbeintensitäten null, eins und zwei differenziert. Aus der prozentualen Verteilung dieser drei Intensitäten innerhalb des Tumorgewebes einer Stanze wurde der Histo-Score berechnet. Dargestellt sind exemplarische Referenzstanzen mit überwiegender Präsentation der jeweiligen Intensität. Vergrößerung 50x /300x.

Zur statistischen Analyse wurde das Kollektiv am Median (HScore 100) in zwei Gruppen dichotomisiert. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante, inverse Korrelation zwischen der Meprin β Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, Lymphgefäßinvasion, Fernmetastasen, dem Grading sowie dem UICC-Stadium. In Bezug auf das Überleben der Patientinnen und Patienten zeigte sich eine positive Korrelation (Abbildung 3.15).

Im Hinblick auf das lokale Tumorwachstum (T-Stadien der TNM-Klassifikation) zeigte die Auswertung tendenziell hohe Färbeintensitäten in frühen (T1/2) Tumorstadien und niedrige Färbeintensitäten in späten (T3/4) Tumorstadien ($p=0.351$). Eine signifikant negative Korrelation zeigte sich zwischen der Meprin β Expression und dem N-Stadium ($p=0.001$), dem M-Stadium ($p=0.019$) und dem Grading ($p=0.002$). Entsprechend zeigte die Auswertung der auf der TNM-Klassifikation aufbauenden und klinische bedeutsamen UICC-Stadien (*Union internationale contre le cancer*) ebenfalls die signifikant negative Korrelation ($p=0.006$) zwischen der Meprin β Expression und dem jeweiligen UICC-Stadium.

Die Expression von Meprin β korrelierte signifikant mit dem Gesamt- und tumorspezifischen Überleben der Patientinnen und Patienten. Eine hohe Meprin β Expression in der Tumorstanze (HScore>100) korrelierte dabei mit einem längeren Gesamt- ($p=0.179$) sowie einem längeren tumorspezifischen Überleben ($p=0.019$).

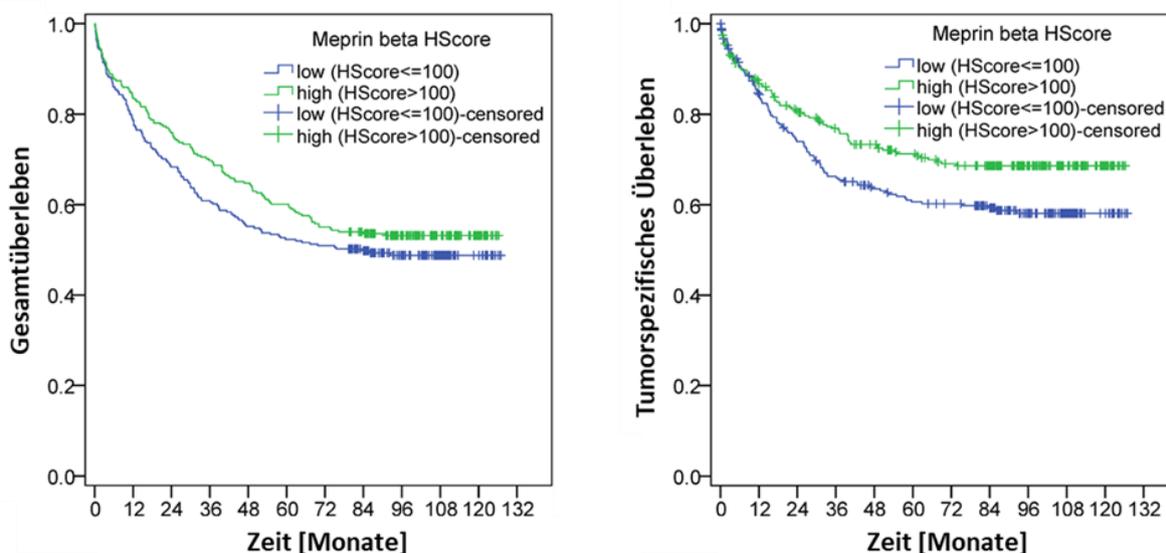


Abbildung 3.15: Einfluss der Meprin β Expression im Kolonkarzinom auf das Patientenüberleben

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen und Patienten mit Kolonkarzinom. Die Patientengruppe mit hoher Meprin β Expression (HScore>100) sind in der grünen Überlebenskurve, die Patientengruppe mit vergleichsweise niedriger Meprin β Expression (HScore \leq 100) in der blauen Überlebenskurve erfasst. Zensierungszeitpunkte sind durch senkrechte Striche markiert. Die Auswertung zeigt für Patientinnen und Patienten mit hoher Meprin β Expression des Tumors (HScore>100) einen Vorteil bezüglich dem Gesamtüberleben ($p=0.179$) sowie dem tumorspezifischen Überleben ($p=0.019$).

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Meprin β Expression im Kolonkarzinom

	HScore low ≤100 (%)	HScore high >100 (%)	Total	Rangkorrelationskoeffizient (Kendalls Tau)
Gesamt	281 (50.3)	278 (49.7)	559	
Männer	138 (47.1)	155 (52.9)	293	
Frauen	143 (53.8)	123 (46.2)	266	
Altersgruppe				
<71	127 (46.2)	148 (53.8)	275	
≥71	154 (54.2)	130 (45.8)	284	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	.063
T-Stadium				
T1	16 (61.5)	10 (38.5)	26	
T2	55 (46.6)	63 (53.4)	118	
T3	154 (48.4)	164 (51.6)	318	
T4a/b	56 (57.7)	41 (42.3)	97	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	.351
N-Stadium				
N0	138 (44.4)	173 (55.6)	311	
N1 a/b/c	67 (53.2)	59 (46.8)	126	
N2 a/b	73 (62.9)	43 (37.1)	116	
total	278 (50.3)	275 (49.7)	553	.001
M-Stadium				
MX (\cong M0)	238 (48.4)	254 (51.6)	492	
M1	43 (64.2)	24 (35.8)	67	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	.019
L-Status				
L0	195 (47.1)	219 (52.9)	414	
L1	86 (59.3)	59 (40.7)	145	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	.012
V-Status				
V0	261 (50.4)	257 (49.6)	518	
V1	20 (48.8)	21 (51.2)	41	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	.872
Pn-Status				
Pn0	159 (60.2)	105 (39.8)	264	
Pn1	6 (50)	6 (50)	12	
total	165 (59.8)	111 (40.2)	276	.553

	HScore low ≤100 (%)	HScore high >100 (%)	Total	Rangkorrelationskoeffizient (Kendalls Tau)
Grading				
Low (G1/G2)	222 (47.5)	245 (52.5)	467	
High (G3)	51 (37.1)	25 (32.9)	76	
total	273 (50.3)	270 (49.7)	543	
				.002
Stadium (UICC)				
I	55 (49.5)	56 (50.5)	111	
II a/b/c	78 (40.6)	114 (59.4)	192	
III a/b/c	105 (55.6)	84 (44.4)	189	
IV a/b	43 (64.2)	24 (35.8)	67	
total	281 (50.3)	278 (49.7)	559	
				.006

4 Diskussion

4.1 Hyperaktive Meprin β Variante G32R

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen und zellulären Konsequenzen der beiden tumorassoziierten Mutationen G32R und D47A auf die Funktion der Metalloprotease Meprin β untersucht. Beide Punktmutationen wurden im Rahmen groß angelegter Sequenzierungen im Endometriumkarzinom identifiziert und befinden sich innerhalb des Propeptids der Protease, das mit seiner Länge von 46 Aminosäuren (von Position 25-61) die proteolytische Aktivität von Meprin β blockiert. Die G32R Mutation wurde ausgewählt, da das eingefügte Arginin an Position 32 eine mögliche Spaltstelle für tryptische Proteasen darstellt und somit eine zusätzliche Aktivierungsstelle für Meprin β bedeuten könnte. Die D47A Mutation wurde aufgrund unserer Hypothese ausgewählt, es könnte durch den Austausch einer geladenen Aminosäure (Aspartat) mit einer ungeladenen Aminosäure (Alanin) zu Änderungen der chemischen Eigenschaften und damit der korrekten Proteinfaltung kommen. Primäres Ziel dieser Arbeit war die Generierung und biochemische Charakterisierung der beiden mutationstragenden Meprin β Varianten G32R und D47A, um somit zum funktionellen Verständnis der Metalloprotease Meprin β beizutragen. Die Bedeutung speziell dieser beiden Mutationen für das Endometriumkarzinom stand nicht im Fokus und ist aufgrund der Mutationsdichte entarteter Zellen insgesamt als gering einzustufen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die bislang weitestgehend offene Frage einer möglichen Meprin β Beteiligung an der Karzinogenese spezifischer Tumorentitäten adressiert werden. Als ein erster Schritt wurde dazu erstmals die wildtypische Meprin β Expression im Endometrium- und Kolonkarzinom mittels immunhistochemischer Färbungen geprüft.

Das sogenannte „*Protease-web*“ ist ein komplex miteinander interagierendes Netzwerk aus proteolytischen Enzymen und für fast alle physiologischen Prozesse im menschlichen Körper relevant (Ehrmann und Clausen, 2004). Da Dysregulierungen proteolytischer Enzyme häufig mit pathologischen Zuständen assoziiert sind, kommt ihrer spezifischen Regulation und deren Verständnis besondere Bedeutung zu. Ein wichtiges Instrument zur Analyse proteolytischer Enzyme ist die Beobachtung möglicher Konsequenzen, die durch Hemmung bzw. Steigerung der proteolytischen Aktivität der zu untersuchenden Protease auftreten. Der bis dato potenteste Meprin β Inhibitor ist der Hydroxamatinhibitor *Actinonin* mit Inhibitionskonstanten im niederen mikromolaren Bereich (Kruse et al., 2004; Wang et al., 2011). Pankreatisches Trypsin, KLK4, KLK5 und KLK8 wurden als potente *in vitro* Aktivatoren für lösliches Meprin β (Ohler et al., 2010), Matriptase 2 als Aktivator für membrangebundenes Meprin β beschrieben (Jäckle et al., 2015). Varianten, die zu einer Beeinträchtigung bzw. einem Verlust der Aktivität der Protease führen, sind bereits beschrieben

(Arnold et al., 2015; Jäckle et al., 2015). Mit der G32R Variante konnte im Rahmen dieser Arbeit nun erstmals eine Variante der Metalloprotease Meprin β mit signifikant erhöhter, endogener proteolytischer Oberflächenaktivität beschrieben werden. Die G32R Variante stellt damit ein wertvolles Werkzeug zur Simulation gesteigerter Meprin β -Oberflächenaktivität in zukünftigen Experimenten dar. Für die D47A Variante konnten bezüglich der Oberflächenaktivität, wie auch in allen weiteren durchgeführten Experimenten, keine signifikanten Unterschiede zu wildtypischem Meprin β beobachtet werden, weshalb im Verlauf nicht weiter auf die D47A Variante eingegangen wird. Die Hypothese einer möglichen Beeinträchtigung der Proteinfaltung durch Austausch der geladenen Aminosäure Aspartat mit der ungeladenen Aminosäure Alanin konnte durch die Ergebnisse der Biotinylierungs- und Immunfluoreszenz-Experimente widerlegt werden. Diese zeigen für beide Varianten den regulären Transport über den sekretorischen Weg, sowie eine mit wildtypischem Meprin β vergleichbare Oberflächenexpression. Das eingefügte Alanin an Position 47 scheint somit keinen Einfluss auf die untersuchten Funktionen der Protease zu haben und die D47A Mutation kann am ehesten als „*silent bystander mutation*“ betrachtet werden.

In Folgeexperimenten wurde die beobachtete Hyperaktivität der G32R Variante näher untersucht. Die Aktivierung von wildtypischem Meprin β erfolgt durch Spaltung verschiedener tryptischer Serinproteasen zwischen Arginin 61 und Asparagin 62 (Jäckle et al., 2015). Die bereits beschriebene R61S Variante kann durch das eingefügte Serin an Position 61 nicht mehr aktiviert werden (Jäckle et al., 2015). Durch das zusätzliche Einfügen eines Arginins an Position 32 erzeugten wir die G32R_R61S Doppelmutante. Während für die R61S Variante keine relevante Oberflächenaktivität detektiert werden konnte, zeigte die Doppelmutante eine deutliche Oberflächenaktivität. Dieser Aktivitätsanstieg der G32R_R61S Doppelmutante legt nahe, dass das Arginin an Position 32 durch verschiedene Serinproteasen gespalten werden kann, was zu einer vorzeitigen Aktivierung und gesteigerten Oberflächenaktivität der G32R Variante führt.

Massenspektrometrische Analysen zur Bestätigung dieser Hypothese und zum Nachweis einer zusätzlichen Aktivierungsstelle innerhalb des Propeptids der G32R Variante lieferten aufgrund geringer Peptididentifikationen keine verwertbaren Ergebnisse (3.5). Bei direkter Korrelation zwischen der Detektionsrate und der eingesetzten Proteinmenge (Washburn et al., 2001) spielen Proteinverluste in der Probenvorbereitung eine entscheidende Rolle. Kritische Punkte in der Probenvorbereitung sind unter anderem die Peptidrückgewinnung aus dem Gel sowie der Zugang der eingesetzten Protease zur Prozessierung des untersuchten Peptids im Gel (Meyer et al., 2011). Oft bleiben die spezifischen Schritte und Parameter, die die Peptidrückgewinnung und -identifikation negativ beeinflussen leider unklar (Speicher et al., 2000). In der Literatur werden verschiedene Strategien zur Erhöhung der Peptidrückgewinnung diskutiert, die in Folgeversuchen berücksichtigt werden könnten. Mögliche Ansätze wären: Ein Ansatz in Lösung mit präzipitiertem Protein, die Alkylierung der Proben vor

Durchführung der SDS-Page, der Einsatz hoher Acetonitril Konzentrationen zur Peptidextraktion oder die Variation der Dicke des verwendeten Gels (Sechi und Chait, 1998; Speicher et al., 2000). Zudem könnte versucht werden, durch einen Multienzymverdau der Proben erhöhte Detektionsraten zu erzielen (Biringer et al., 2006; Choudhary et al., 2003). Auch posttranslationale Modifikationen können die Sequenzanalyse erschweren, insbesondere wenn diese nicht als Modifikationen in der Suche berücksichtigt werden. Aufgrund der komplexen Zusammenhänge in der Fragmentierung von Zuckerketten im Massenspektrometer können z.B. Glykosylierungen entscheidenden Einfluss auf die Detektionsrate nehmen. Meprin β ist ein hochgradig glykosyliertes Enzym (Broder und Becker-Pauly, 2013), wobei bekannte Bereiche hoher Glykosylierung weiter C-Terminal der beiden Mutationen lokalisiert sind (Arolas et al., 2012; Leuenberger et al., 2003; Pischitzis et al., 1999).

Im Revisionsprozess der aus dieser Arbeit resultierenden Publikation (Schäffler et al., 2019) wurde die offene Frage der zusätzlichen Aktivierung erneut experimentell untersucht. Dazu wurden mittels Strep-tag, N-terminal markierte Meprin- β -Varianten generiert, um aktiviertes von nicht aktiviertem Meprin β zu unterscheiden. Zur Hemmung der Meprin β Aktivierung an der Zelloberfläche wurde Pefabloc, zur Hemmung intrazellulärer Furin-ähnlicher Serinproteasen im Golgi Apparat ein Proprotein-Konvertase-Inhibitor (PCI) eingesetzt. Die Inhibition von Furin-ähnlichen Proproteinkonvertasen unter Verwendung von PCI erhöhte das Niveau des nachweisbaren N-Terminus für G32R- und G32R_R61S-Varianten. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen somit auf die vorzeitige Aktivierung der G32R Variante durch endogene Proprotein-Konvertasen im Golgi Apparat schließen (Schäffler et al., 2019). Während in vorherigen Arbeiten eine Beeinträchtigung im Transport zur Plasmamembran für Meprin β Varianten mit vorzeitiger Aktivierung im endoplasmatischen Retikulum beobachtet wurde (z.B. D204A oder eine Variante gänzlich ohne Propeptid (Arnold *et al.*, 2015; Wichert *unpublished*)), zeigen die aktuellen Daten den regulären Transport der vorzeitig im Golgi aktivierten G32R Variante.

Eine erhöhte Aktivität der Metalloprotease Meprin β an der Zelloberfläche könnte verschiedene mögliche Konsequenzen für Meprin β exprimierende Zellen und deren Umfeld haben. Bei Co-expression der G32R Variante mit dem IL-6R in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen konnten wir *in vitro* ein erhöhtes IL-6R *Shedding* durch die hyperaktive G32R Variante mit konsekutiv erhöhtem sIL-6R Level im Überstand nachweisen. *Via trans-signaling* formt der abgespaltene sIL-6R einen Komplex mit Interleukin 6 und gp130 und induziert auf Zielzellen pro-inflammatorische und antiapoptotische Stimuli, die mit pathologischen Zuständen wie Arthritis, Neurodegeneration, entzündlichen Darmerkrankungen und verschiedenen Tumorentitäten wie dem HCC, dem CRC und dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas assoziiert sind (Arnold, Boll, et al., 2017; Bergmann et al., 2017; Lesina et al., 2011; Rose-John, 2012; Schmidt et al., 2018). Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass neben den Proteasen ADAM10/17 auch membrangebundenes Meprin β

in der Lage ist, membrangebundenen IL-6R zu spalten und den bioaktiven löslichen sIL-6R zu generieren (Arnold, Boll, et al., 2017).

Die vorzeitige Aktivierung beeinflusst ebenfalls die Balance zwischen membrangebundenem und sezerniertem Meprin β , da nur die inaktive Proform von Meprin β dem Shedding durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 zugänglich ist. Da sich das Substratspektrum der membrangebundenen und der löslichen Form der Protease unterscheidet, bedeutet dies einen wichtigen Regulationsmechanismus. Bekannt wurde dieser durch die Entdeckung des membrangebundenen Meprin β Aktivators Matriptase 2, der durch Aktivierung von membranständigem Meprin β dessen weitere Abspaltung durch ADAM10/17 verhindert (Jefferson et al., 2013; Wichert et al., 2017). Durch die vorzeitige Aktivierung im Golgi mit konsekutiver Überaktivität an der Zellmembran zeigte die G32R Variante passend dazu ein signifikant vermindertes *Shedding* durch ADAM17. Bei Co-Transfektion von Meprin β und Matriptase-2 in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen zeigte sich interessanterweise eine, in Relation zu wildtypischem Meprin β , geringere zusätzliche Aktivierung der hyperaktiven G32R Variante, was am wahrscheinlichsten auf die vorzeitige Teilaktivierung im Golgi zurückzuführen ist. Unsere Ergebnisse bestätigen damit erneut, dass die Aktivierung von Meprin β an der Membranoberfläche die weitere Abspaltung durch die bis dato bekannten *Sheddases* ADAM10/17 blockiert und zeigen, dass dieser Zusammenhang ebenfalls für vorzeitig aktiviertes und hyperaktives membranständiges Meprin β gilt.

Zusammenfassend konnten wir mit der G32R Mutation eine Variante der Metalloprotease Meprin β mit erhöhter Oberflächenaktivität identifizieren, die, vermutlich aufgrund einer Aktivierung im Golgi, ein verringertes Shedding durch ADAM17 zeigte. Für die Zukunft ergeben sich mit der G32R Variante damit interessante Simulationsmöglichkeiten erhöhter endogener Meprin β Aktivität. Zukünftige Studien in geeigneten Tier- und Xenotransplantatmodellen werden die genauere Untersuchung dieser und weiterer Einzelnukleotid-Polymorphismen erlauben.

4.2 Meprin β Expression im Endometrium.

Erstmals konnten wir die Meprin β Expression in Epithelzellen von murinem und humanem Endometrium nachweisen (Schäffler et al., 2019). Das beobachtete apikale Expressionsmuster passt gut zu der beschriebenen apikalen Meprin β Expression in Enterozyten des Dünndarms (Schutte et al., 2014; Wichert et al., 2017) und in proximalen Tubuluszellen der Niere (Butler et al., 1987). Durch Spaltung von MUC2, Hauptbestandteil der intestinalen Muzinschicht, trägt Meprin β im Darm zur Ablösung und Erneuerung der intestinalen Schutzbarriere bei und schützt vor bakterieller Überbesiedelung (Wichert et al., 2017). Auch wenn man den Uterus lange Zeit für ein durch den Zervikalpfropf steril gehaltenes Hohlorgan hielt, zeigen neuere Studien den Nachweis von uterinen

Bakterien auch bei gesunden, asymptomatischen Frauen (Baker et al., 2018; Hemsell et al., 1989). Der Zerviko-Vaginalschleim wird von epithelialen Zellen des Uterus, der Zervix und der Vagina produziert und stellt auch hier eine wichtige Barriere gegen mikrobielle Infektionen dar. Die physiologische Funktion von Meprin β im Endometrium ist bisher unbekannt; eine Funktion als „*mucus-detaching Protease*“ (Wichert et al., 2017), ähnlich der beschriebenen Meprin β Funktion im Darm, wäre denkbar.

Als Reaktion auf schwankende Steroidhormonkonzentrationen unterliegt das Endometrium der fertilen Frau umfangreichen zyklischen Veränderungen. Während des in der Regel 28 Tage andauernden Zyklus wiederholen sich Proliferation, sekretorische Differenzierung, präziduale Formation, inflammatorische Zellinfiltration, Apoptose und letztlich die Abstoßung der oberen zwei Drittel des Endometriums. Die mit den Meprinen eng verwandten MMPs gelten als Schlüsseleffektoren der periodischen Veränderungen der Gebärmutter Schleimhaut (Goffin et al., 2003), sodass auch hier eine mögliche Meprin β Beteiligung an zyklischen Entzündungs- und Umbauprozessen des Endometriums in zukünftigen Studien geprüft werden könnte.

4.3 Meprin β Expression im Endometriumkarzinom

In Gewebeproben von Endometriumkarzinom-Patientinnen konnten wir statt der apikalen Expression vermehrt basolateral Signale für Meprin β detektieren. Der Verlust der Zellpolarität ist ein wichtiges Kennzeichen bei der Induktion des epithelial-mesenchymalen Überganges invasiver Karzinome (Moreno-Bueno et al., 2008; Xu et al., 2009). Entwicklung und Aufrechterhaltung der apikal-basalen Polarität beruhen auf Signalen verschiedener Polaritätsproteine, fokalen Adhäsionskontakten und epithelialen Cadherinen (Piroli et al., 2019). Die Konsequenz einer basalen Meprin β Expression wäre die Zugänglichkeit von Meprin β zu Strukturproteinen der Basallamina wie Kollagen IV, Laminin und Nidogen, die bereits *in vitro* als Substrate von Meprin β beschrieben wurden (Kruse et al., 2004). Herzog et al. konnten in Mäusen mit Cisplatin-induziertem Nierenversagen ebenfalls eine basolaterale Redistribution von Meprin β beobachten und durch Identifikation von Nidogen-1-Spaltprodukten im Urin der Mäuse auch die basolaterale Meprin β Aktivität nachweisen (Herzog et al., 2015). Nidogen-1 fungiert als Verbindungselement zwischen Kollagen IV und Laminin und integriert andere Basalmembrankomponenten, insbesondere Perlecan, in die EZM (Fox et al., 1991; Kvensakul et al., 2001). Der Abbau von Nidogen-1 durch Meprin β , so die Vermutung der Autoren, störe die Fähigkeit von Nidogen, andere Basalmembrankomponenten zu binden, und könnte die supramolekulare Organisation von Basalmembranen beeinflussen (Herzog et al., 2015). Ob es sich bei der beobachteten basolateralen Umverteilung von Meprin β allerdings um ein spezifisches Ereignis handelt, ist unklar. Am ehesten ist die Aufhebung der apikalen Expression als Folge des in malignen Zellen regelhaft zu beobachtenden Polaritätsverlustes (Khursheed und Bashyam, 2014) zu werten.

4.4 Zellmigration und -proliferation

Für die überwiegende Mehrheit krebsassoziierter Todesfälle ist nicht der Primärtumor, sondern die Ausbildung von Metastasen verantwortlich (Lambert et al., 2017). Die Basalmembran dient als eine physiologische Barriere gegen Metastasierung, sowohl bei der Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe, als auch bei der Intra- bzw. Extravasation maligner Tumorzellen (Chang und Chaudhuri, 2019). Kollagen IV ist eines der Hauptbestandteile der Basalmembran (Pozzi et al., 2017) und Studien ergaben, dass ein erhöhter Kollagen IV-Abbau mit einem erhöhten Metastasierungspotential korreliert (Liotta et al., 1980). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Überexpression von Meprin β das invasive Potenzial von HeLa-Zellen durch eine Kollagen-IV-Matrix steigert. Durch Überexpression der hyperaktiven G32R Variante konnte das invasive Potential der transfizierten HeLa Zellen nochmals signifikant erhöht werden. Dies steht im Einklang mit kürzlich durchgeführten Studien, die zeigen, dass Meprin β *in vitro* die Transmigration von Lewis-Lungenkarzinomzellen durch eine Endothelzellschicht erhöht (Bedau, Peters, et al., 2017) und dass in Meprin β *knock-out* Mäusen simulierte, periphere Entzündungsherde von einer geringeren Anzahl an Immunzellen infiltriert werden (Bedau, Schumacher, et al., 2017).

Die Aussagekraft unseres Experiments wird jedoch durch einige Aspekte limitiert. Nidogen, Perlecan und verschiedene Proteoglykane als wichtige weitere Strukturproteine der Basalmembran (Pozzi et al., 2017) finden in unserem Versuchsaufbau keine Berücksichtigung. In kommerziell erhältlichen Basalmembran *-in-vitro*-Modellen sind diese in der Regel enthalten und bieten daher eine teure, doch sinnvolle Alternative für zukünftige Experimente. Neben den verschiedenen Komponenten der Basalmembran trägt auch die Porengröße der Basalmembran entscheidend zur Barrierefunktion bei (Chang und Chaudhuri, 2019). Diese ist hier jedoch nicht klar definiert, was in Folgeversuchen berücksichtigt werden sollte. Aufgrund des fehlenden Nachweises von Kollagen IV Spaltprodukten kann des Weiteren streng genommen keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit tatsächlich die Meprin β vermittelte proteolytische Kollagen IV Spaltung für die gesteigerte Invasion der Meprin β überexprimierenden HeLa-Zellen verantwortlich ist. In Anbetracht neuerer Studien, die mechanische, nicht-proteolytische zelluläre Strategien zur Überwindung der Basalmembran beschreiben (Chang und Chaudhuri, 2019; Kelley et al., 2014), sollte in zukünftigen Experimenten auf den Nachweis von Spaltprodukten, zum Beweis einer proteolytischen Prozessierung der Kollagen IV Matrix, geachtet werden.

Um die beobachteten Einflüsse der Meprin β Expression auf die Zellmigration/-invasion in tumorähnlicheren Verhältnissen zu evaluieren, generierten meine Kollegen dreidimensionale Tumorsphäroide (Vinci et al., 2015) aus Meprin β überexprimierenden HeLa-Zellen. Nach Formierung der Sphäroide wurde durch Zugabe von Geltrex[®] Matrix eine, die Sphäroide umgebende, EZM simuliert

und das Auswuchsverhalten der Zellen über 72 Stunden dokumentiert. Knapp zusammengefasst zeigen die Ergebnisse nur eine geringfügige Auswirkung der Meprin β Expression auf die Auswuchsrate und den Auswuchsabstand transfizierter Zellen in die, die Sphäroide umschließende, Matrix (Schäffler et al., 2019). Während Meprin β unter Umständen eine Rolle beim Durchtritt der Zellen durch die Basallamina spielen könnte, scheint seine Rolle während der Zellmigration weniger ausgeprägt zu sein. Andere Proteasen, wie lösliche und membrangebundene Matrixmetalloproteasen (MMPs und MT1-MMP), könnten diese Rolle übernehmen (Thakur und Bedogni, 2016).

Neben der Zellmigration ist die Zellproliferation ein weiteres wichtiges Merkmal entarteter Zellen. Frühere Studien zur Meprin β Expression in der Haut zeigten allerdings antiproliferative Effekte für Meprin β (Becker-Pauly et al., 2007). Während Meprin α in der Haut besonders im *Stratum basale* exprimiert wird und hier proliferationsfördernde Effekte auf die Keratinozyten besitzt, wird Meprin β im *Stratum granulosum* exprimiert und ist an der Induktion des Zelltodes differenzierter Keratinozyten beteiligt. Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit rekombinantem Meprin β führte damals zu verminderter Zellzahl, verminderter Lebensfähigkeit der Zellen und dem Nachweis apoptotischer Signale. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte für wildtypisches Meprin β kein positiver Einfluss auf die Wachstumsrate transfizierter HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Im Einklang mit den vorbeschriebenen Daten zeigte die Echtzeitzellanalyse für die hyperaktive G32R Variante einen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der transfizierten Zellen.

4.5 Meprin β im Kolonkarzinom

Während die Expression von Meprin β im Endometrium bisher unbekannt war, ist die Meprin β Expression im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Wichert et al., 2017). Erst kürzlich konnte für zwei Subtypen des Magenkarzinoms, das chromosomal instabile (CIN) und das mikrosatelliteninstabile (MSI) Magenkarzinom, eine erhöhte Meprin β Expression nachgewiesen werden (Siemsen et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Meprin β in den Tumorzellen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebestücken von 559 Patientinnen und Patienten mit Kolonkarzinom mittels Immunhistochemie untersucht und (2.2.21) mittels HistoScore (vgl. Stenger, 2015) ausgewertet (2.2.21). Das Kollektiv wurde am Median in eine Gruppe mit hoher Meprin β Expression (HScore >100) und eine Gruppe mit niedriger Meprin β Expression (HScore ≤ 100) getrennt und Überlebenskurven sowie wichtige Tumormerkmale gegeneinander verglichen. Unsere Daten zeigen einen signifikanten Vorteil des Gesamt- ($p=0.179$) sowie des tumorspezifischen-Überlebens ($p=0.019$) für die Patientengruppe mit hoher Meprin β Expression im Tumorgewebe. Des Weiteren zeigte sich eine negative Korrelation für die N- ($p=0.001$) und M- ($p=0.019$) Kategorie der TNM-Klassifikation (Brierley et al., 2016) sowie für das Tumorgrading ($p=0.002$). Auch zwischen der Meprin β Expression

und den für die Therapieentscheidung relevanten UICC-Stadien bestand eine signifikant negative Korrelation ($p=0.006$). Nach unseren Daten korreliert eine hohe Meprin β Expression mit einer insgesamt besseren Prognose und einem längeren Überleben, sodass die hohe Meprin β Expression im Kolon protektive Effekte zu haben scheint. Für die Zukunft wäre ein Vergleich mit Färbungen aus gesundem Kolongewebe wünschenswert. Weiter können klinische Studien mit Biopsieanalysen bzw. Meprin β Aktivitätsanalysen im Stuhl von Kolonkarzinom-Patientinnen und Patienten Aufschluss über die tatsächlichen intraluminalen Aktivitätslevel von Meprin β geben.

Bisher konnten verschiedene, teils gegensätzlich wirkende Funktionen für enteral exprimierte Meprin β beschrieben werden. So sind für das an der Oberfläche von Enterozyten exprimierte Meprin β anti-inflammatorische Effekte beschrieben (Vazeille et al., 2011; Wichert et al., 2017), während für die Meprin β Expression auf Lymphozyten der *Lamina propria* pro-inflammatorische Effekte beobachtet wurden (Banerjee et al., 2011; Crisman et al., 2004). Wird inaktives Pro-Meprin β auf Epithelzellen des Darmlumens exprimiert, kann es durch ADAM10 abgespalten und im Darmlumen von pankreatischen Enzymen aktiviert werden (Wichert et al., 2017). Dort trägt es durch Spaltung von MUC2 zur Homöostase der intestinalen Muzinschicht bzw. ihrer regelmäßigen Erneuerung bei und wirkt damit einer bakteriellen Übersiedelung entgegen. Die Expression von Matriptase 2, die durch Aktivierung von Meprin β eine Abspaltung verhindern würde, konnte zumindest für den murinen Dünndarm ausgeschlossen werden (Jäckle et al., 2015), was auf die regelrechte Abspaltung ins Darmlumen hinweisen könnte. Interessanterweise konnte für das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* gezeigt werden, dass es durch seine Protease RgpB (*Gingipain R2 precursor*) membrangebundenes Meprin β spezifisch aktiviert, damit dessen weitere Abspaltung verhindert und somit die Funktion *als mucus detaching protease* beeinträchtigt. Obwohl *P. gingivalis* eher im Zusammenhang mit Parodontitis steht (Rafiei et al., 2017), konnte es nach oraler Gabe auch im Dünndarm von Mäusen nachgewiesen werden (Arimatsu et al., 2014). In Bezug auf das Kolonkarzinom ist interessant, dass im Stuhl von Darmkrebs-Patientinnen und Patienten gehäuft *P. gingivalis* nachgewiesen wurde (Ahn et al., 2013; Vogtmann et al., 2016) und die durch *P. gingivalis* verursachte Parodontitis als Risikofaktor für gastrointestinale Tumore gilt (Liu et al., 2019).

Auch im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden Meprin β anti-entzündliche und protektive Effekte zugeschrieben. So konnte in Patientinnen und Patienten mit ilealer CED eine verminderte Meprin β Expression nachgewiesen werden (Vazeille et al., 2011). Zusammenfassend sprechen die bisherigen Erkenntnisse weitestgehend für eine anti-inflammatorische Wirkung von Meprin β bei luminaler Expression und inflammatorische Effekte bei erhöhter Meprin β Aktivität von Myelozyten der intestinalen Lamina Propria.

Tierexperimentelle Studien könnten in Zukunft dazu beitragen, den inflammatorischen bzw. anti-inflammatorischen Einfluss der Protease im Darm genauer zu beschreiben. Denkbar wären hier Mausmodelle, die mithilfe eines Cre/loxP Rekombinations-Systems die gewebe-, bzw. zellspezifische Meprin β Expression erlauben. Ein solches Mausmodell würde die Möglichkeiten schaffen, die Einflüsse einer Meprin β Aktivität Zelltyp-spezifisch, bspw. in murinen Kolitismodellen, zu untersuchen.

Therapeutisch interessant sind Beobachtungen aus *ex vivo* Modellen, die eine Störung der Mucushomöostase bei Applikation des Meprin β Inhibitors Actinonin zeigten (Schutte et al., 2014; Wichert et al., 2017). Umgekehrt, so wird vermutet, könnte die orale bzw. rektale Substitution von rekombinantem löslichen Meprin β die regelhafte Ablösung und Erneuerung der intestinalen Schleimbarriere fördern, die Invasion adhärenter invasiver *E. coli* Bakterien verhindern und damit zur Therapie bzw. Symptomlinderung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beitragen.

Entzündliche Darmerkrankungen wiederum sind ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (Terzić et al., 2010). Hierbei wird davon ausgegangen, dass das erhöhte Risiko nicht auf vererbare Faktoren, sondern auf das Ausmaß und die Dauer der Entzündung zurückzuführen ist (Rhodes und Campbell, 2002). Im Hinblick auf die enge Verknüpfung von entzündlichen und neoplastischen Vorgängen könnten entzündungshemmende Effekte von Meprin β einen prognostischen Vorteil im Kolonkarzinom bewirken. Die erhobenen Daten dieser ersten systematischen Meprin β Färbung an einem repräsentativen Kolonkarzinom-Kollektiv bietet die wissenschaftliche Grundlage für weitere Experimente. Diese sind durchaus erstrebenswert, da mit dieser Arbeit bereits zwei wichtige Aussagen getroffen werden können. Erstens: Meprin β wird im Kolonkarzinom exprimiert. Zweitens: Meprin β Expressionslevel korrelieren mit dem Tumorstadium und zeigen eine Korrelation mit prognostischer Relevanz.

4.6 Meprin β als tumorassoziierte Protease

Die immunhistochemischen Meprin β Färbungen im Endometriumkarzinom zeigten im Vergleich zu gesundem Endometriumgewebe ein verändertes Expressionsmuster mit basaler Distribution der Protease. Hieraus ergibt sich eine räumliche Nähe zwischen Meprin β und der Basalmembran, dessen Hauptbestandteile Kollagen IV, Laminin, Nidogen als *in vitro* Substrate von Meprin β beschrieben sind (Kruse et al., 2004). Zur vereinfachten Simulation einer Basalmembran nutzten wir eine Kollagen IV beschichtete Membran und konnten die gesteigerte Invasion von Meprin β überexprimierenden HeLa Zellen beobachten. Zusammen mit Erkenntnissen vorheriger Studien, die Meprin β promigratorische und inflammatorische Effekte zuschreiben (Bedau, Schumacher, et al., 2017; Peters und Becker-Pauly, 2019), werden damit die tumorfördernden Eigenschaften von Meprin β bekräftigt. Im Kolonkarzinom hingegen korrelierte eine hohe Meprin β Expression invers mit dem Tumorstadium und die statistische

Analyse zeigte ein signifikant längeres Überleben der Patientinnen und Patienten mit hoher Meprin β Expression im Tumorgewebe zum Zeitpunkt der Operation. Dass Proteasen u.a. in Abhängigkeit Ihrer zellulären und subzellulären Lokalisation gegensätzliche Funktionen innehaben können, ist bekannt. Auch für die Metalloprotease Meprin β konnten wie oben beschrieben insbesondere im Darm sowohl inflammatorische, als auch anti-inflammatorische Effekte beobachtet werden. Die bislang weitgehend unbekannt Funktion der Metalloprotease Meprin β im Rahmen der Karzinogenese maligner Tumore sowie die unbekannt Mechanismen ihrer zellulären Signaltransduktionswege erschweren die abschließende Interpretation der in dieser Arbeit erhobenen Daten. Zukünftige Studien werden nötig sein, um die u.U. vielgestaltige Rolle von Meprin β im tumorösen Kontext weiter zu präzisieren.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die molekularen und zellulären Konsequenzen der beiden tumorassoziierten Meprin β Varianten D47A und G32R untersucht. Beide Mutationen wurden im Endometriumkarzinom identifiziert und befinden sich innerhalb des inhibierenden Propeptids der Metalloprotease Meprin β . Während die D47A Variante bezüglich Lokalisation, Aktivität und Aktivierung keine Unterschiede zu wildtypischem Meprin β zeigte, konnte für die G32R Variante eine signifikant höhere Aktivität beobachtet werden. Bei Expression an der Zelloberfläche transient transfizierter Zellen zeigte die G32R Variante eine deutlich erhöhte proteolytische Aktivität gegenüber dem eingesetzten spezifischen Peptidsubstrat sowie gegenüber dem membrangebundenen IL-6R, einem physiologischen Substrat von Meprin β . Mit der G32R Variante ergibt sich somit für zukünftige Studien erstmals die Möglichkeit endogen gesteigerte Meprin β Oberflächenaktivitäten zu simulieren.

Meprin β kann durch membrangebundene Aktivatoren wie Matriptase-2 direkt an der Zelloberfläche aktiviert werden, oder aber Meprin β wird durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 von der Zelloberfläche gespalten und erst im Extrazellulärraum durch verschiedene lösliche Serinproteasen aktiviert. Dabei kann nur inaktives Pro-Meprin β durch ADAM10/17 gespalten werden. Passend dazu führte die beobachtete erhöhte Grundaktivität der G32R Variante zu einem verminderten *Shedding* durch ADAM17 und einer verminderten (zusätzlichen) Aktivierung an der Zelloberfläche durch die Serinprotease Matriptase-2. Auch auf zellbiologischer Ebene zeigte die Hyperaktivität der G32R Variante Konsequenzen und führte zu einer Verstärkung wildtypischer Meprin β Effekte. Für wildtypisches Meprin β konnte hier ein positiver Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten transfizierter Zellen beobachtet werden, welcher im Falle der hyperaktiven G32R Variante signifikant ausfiel. Für das Proliferationsverhalten der Zellen zeigte sich dahingegen ein negativer Einfluss durch die Expression von Meprin β , der wiederum durch die G32R Variante verstärkt wurde.

In einem kleinen Patientenkollektiv mit insgesamt 44 Proben konnten wir erstmals die Expression von Meprin β in gesundem Endometrium und im endometrioiden Adenokarzinom zeigen. Während in gesundem Gewebe eine apikale Expression für Meprin β beobachtet werden konnte, zeigte sich in neoplastisch verändertem Gewebe weitgehend eine zytoplasmatische Expression für Meprin β . Zur weiteren Untersuchung möglicher Einflüsse auf die Tumorentwicklung und Progression solider Tumore wurde Meprin β erstmals auch im Kolonkarzinom gefärbt. In einem repräsentativen Kollektiv mit 559 Patientenproben korrelierte die hohe Meprin β Expression mit einem längeren Gesamt- und tumorspezifischen Überleben der Patientinnen und Patienten.

6 Literatur

- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J. J., Hayes, R. B., Yang, L. (2013). Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **105** (24), 1907–1911
- Ambort, D., Brellier, F., Becker-Pauly, C., Stöcker, W., Andrejevic-Blant, S., Chiquet, M., Sterchi, E. E. (2010). Specific processing of tenascin-C by the metalloprotease meprin β neutralizes its inhibition of cell spreading. *Matrix Biol.* **29** (1), 31–42
- Ambort, D., Stalder, D., Lottaz, D., Huguenin, M., Oneda, B., Heller, M., Sterchi, E. E. (2008). A novel 2D-based approach to the discovery of candidate substrates for the metalloendopeptidase meprin. *FEBS J.* **275** (18), 4490–4509
- Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M., Ryder, M. I., Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., Yamazaki, K. (2014). Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci. Rep.* **4** (4828)
- Arnold, P., Boll, I., Rothaug, M., Schumacher, N., Schmidt, F., Wichert, R., Schneppenheim, J., Lokau, J., Pickhinke, U., Koudelka, T., Tholey, A., Rabe, B., Scheller, J., Lucius, R., Garbers, C., Rose-John, S., Becker-Pauly, C. (2017). Meprin metalloproteases generate biologically active soluble interleukin-6 receptor to induce trans-signaling. *Sci. Rep.* **7** (44053)
- Arnold, P., Otte, A., Becker-Pauly, C. (2017). Meprin metalloproteases: Molecular regulation and function in inflammation and fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864** (11), 2096–2104
- Arnold, P., Schmidt, F., Prox, J., Zunke, F., Pietrzik, C., Lucius, R., Becker-Pauly, C. (2015). Calcium negatively regulates meprin b activity and attenuates substrate cleavage. *FASEB J.* **29** (8), 3549–3557
- Arolas, J. L., Broder, C., Jefferson, T., Guevara, T., Sterchi, E. E., Bode, W., Stocker, W., Becker-Pauly, C., Gomis-Ruth, F. X. (2012). Structural basis for the sheddase function of human meprin metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (40), 16131–16136
- Arribas, J., Merlos-Suárez, A. (2003). Shedding of plasma membrane proteins. in *Current Topics in Developmental Biology*, Bd. 54 125–144
- Baker, J. M., Chase, D. M., Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? *Front. Immunol.* **9** (208)
- Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357** (9255), 539–545
- Balkwill, F. R., Capasso, M., Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* **125** (23), 5591–5596
- Banerjee, S., Bond, J. S. (2008). Prointerleukin-18 is activated by meprin β in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J. Biol. Chem.* **283** (46), 31371–31377
- Banerjee, S., Jin, G., Bradley, S. G., Matters, G. L., Gailey, R. D., Crisman, J. M., 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** (2), G273-82
- Banerjee, S., Oneda, B., Yap, L. M., Jewell, D. P., Matters, G. L., Fitzpatrick, L. R., Seibold, F., Sterchi, E. E., Ahmad, T., Lottaz, D., Bond, J. S. (2009). MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2** (3), 220–231
- Barrett AJ, Rawlings ND, Salvesen G, F. W. J. (2013). *Handbook of proteolytic enzymes.* (S. G. Rawlings ND, Hrsg.). Academic Press
- Bauer, P., Hummel, M., Von Kalle, C., Schmutzler, R., Block, A., Stroth, M., Wopen, C., Engelke, K. (2016). Molekulargenetische Diagnostik - Was wissen die Maschinen? Was wollen wir wissen? *Oncol. Res. Treat.* **39** (2), 2–23

- Becker-Pauly, C., Barré, O., Schilling, O., Auf Dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schü, A., Kappelhoff, R., Stö, W., Overall, C. M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological Substrates. *Mol. Cell. Proteomics* **1** (15), 1–19
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E. E., Debela, M., Magdolen, V., Traupe, H., Stöcker, W. (2007). The α and β subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **127** (5), 1115–1125
- Becker, C., Kruse, M.-N., Slotty, K. A., Köhler, D., Harris, J. R., Rösmann, S., Sterchi, E. E., Stöcker, W. (2003). Differences in the activation mechanism between the α and β subunits of human meprin. *Biol. Chem.* **384** (5), 825–831
- Beckmann, G., Bork, P. (1993). An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem. Sci.* **18** (2), 40–41
- 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., Becker-Pauly, C. (2017). Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J.* **31** (3), 1226–1237
- 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., Becker-Pauly, C. (2017). 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** (33), 54873–54888
- Bergmann, J., Müller, M., Baumann, N., Reichert, M., Heneweer, C., Bolik, J., Lücke, K., Gruber, S., Carambia, A., Boretius, S., Leuschner, I., Becker, T., Rabe, B., Herkel, J., Wunderlich, F. T., Mittrücker, H. W., Rose-John, S., Schmidt-Arras, D. (2017). IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* **65** (1), 89–103
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T., Bond, J. S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases: Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* **278** (4), 2522–2532
- Bertenshaw, G. P., Turk, B. E., Hubbard, S. J., Matters, G. L., Bylander, J. E., Crisman, J. M., Cantley, L. C., Bond, J. S. (2001). Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J. Biol. Chem.* **276** (16), 13248–13255
- Beynon, R. J., Shannon, J. D., Bond, J. S. (1981). Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem. J.* **199** (3), 591–598
- Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen, S., Becker-Pauly, C., Pietrzik, C. U. (2012). The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *J. Biol. Chem.* **287** (40), 33304–33313
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* **24** (5), 541–550
- Biringer, R. G., Amato, H., Harrington, M. G., Fonteh, A. N., Riggins, J. N., Hühmer, A. F. R. (2006). Enhanced sequence coverage of proteins in human cerebrospinal fluid using multiple enzymatic digestion and linear ion trap LC-MS/MS. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **5** (2), 144–153
- Bond, J. S., Beynon, R. J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* **4** (7), 1247–1261

- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (12), 786–801
- Breig, O., Yates, M., Neaud, V., Couchy, G., Grigoletto, A., Lucchesi, C., Prox, J., Zucman-Rossi, J., Becker-Pauly, C., Rosenbaum, J. (2017). Metalloproteinase meprin α regulates migration and invasion of human hepatocarcinoma cells and is a mediator of the oncoprotein Reptin. *Oncotarget* **8** (5), 7839–7851
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C. (2016). TNM classification of malignant tumours. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*
- Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Konerding, M. A., Bahr, K., Muller, S., Overall, C. M., Bond, J. S., Koudelka, T., Tholey, A., Hulmes, D. J. S., Moali, C., Becker-Pauly, C. (2013). Metalloproteases meprin and meprin are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110** (35), 14219–14224
- Broder, C., Becker-Pauly, C. (2013). The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem. J.* **450** (2), 253–264
- Butler, P. E., McKay, M. J., Bond, J. S. (1987). Characterization of meprin, a membrane-bound metalloendopeptidase from mouse kidney. *Biochem. J.* **241** (1), 229–235
- Carr, J. C., Sherman, S. K., Wang, D., Dahdaleh, F. S., Bellizzi, A. M., O’Dorisio, M. S., O’Dorisio, T. M., Howe, J. R. (2013). Overexpression of membrane proteins in primary and metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Ann. Surg. Oncol.* **20** (3), 739–746
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., Jones, S. A., Rose-John, S., Scheller, J. (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110** (6), 1748–1755
- Chang, J., Chaudhuri, O. (2019). Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. *J. Cell Biol.* **218** (8), 2456–2469
- Chen, J. M., Stevens, R. A., Wray, P. W., Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1998). Thimet oligopeptidase: site-directed mutagenesis disproves previous assumptions about the nature of the catalytic site. *FEBS Lett.* **435** (1), 16–20
- Chinello, C., Cazzaniga, M., De Sio, G., Smith, A. J., Gianazza, E., Grasso, A., Rocco, F., Signorini, S., Grasso, M., Bosari, S., Zoppis, I., Dakna, M., Van Der Burgt, Y. E. M., Mauri, G., Magni, F. (2014). Urinary signatures of renal cell carcinoma investigated by peptidomic approaches. *PLoS One* **9** (9), e106684
- Choudhary, G., Wu, S. L., Shieh, P., Hancock, W. S. (2003). Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *J. Proteome Res.* **2** (1), 59–67
- Coussens, L. M., Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420** (6917), 860–867
- Crisman, J. M., Zhang, B., Norman, L. P., 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** (7), 4510–4519
- Dudani, J. S., Warren, A. D., Bhatia, S. N. (2018). Harnessing protease activity to improve cancer care. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2** (1), 353–376
- Ehrmann, M., Clausen, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* **38** (1), 709–724
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **365** (12), 1118–1127
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246** (4926), 64–71
- Forbes, S. A., Beare, D., Boutselakis, H., Bamford, S., Bindal, N., Tate, J., Cole, C. G., Ward, S., Dawson,

- E., Ponting, L., Stefancsik, R., Harsha, B., YinKok, C., Jia, M., Jubb, H., Sondka, Z., Thompson, S., De, T., Campbell, P. J. (2017). COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* **45** (D1), D777–D783
- Fortelny, N., Cox, J. H., Kappelhoff, R., Starr, A. E., Lange, P. F., Pavlidis, P., Overall, C. M. (2014). Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol.* **12** (5), e1001869
- Fox, J. W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* **10** (11), 3137–3146
- Franke, M., Schröder, J., Monhasery, N., Ackfeld, T., Hummel, T. M., Rabe, B., Garbers, C., Becker-Pauly, C., Floss, D. M., Scheller, J. (2016). Human and murine interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *J. Biol. Chem.* **291** (20), 10551–10561
- Goffin, F., Munaut, C., Frankenne, F., D’Hauterive, S. P., Béliard, A., Fridman, V., Nervo, P., Colige, A., Foidart, J. M. (2003). Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol. Reprod.* **69** (3), 976–984
- Gomis-Rüth, F. X., Trillo-Muyo, S., Stöcker, W. (2012). Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biol. Chem.* **393** (10), 1027–1041
- Hemsell, D. L., Obregon, V. L., Heard, M. C., Nobles, B. J. (1989). Endometrial bacteria in asymptomatic, nonpregnant women. *J. Reprod. Med. Obstet. Gynecol.* **34** (11), 872–879
- Herzog, C., Haun, R. S., Kaushal, G. P. (2019). Role of meprin metalloproteinases in cytokine processing and inflammation. *Cytokine* **114**, 18–25
- Herzog, C., Haun, R. S., Ludwig, A., Shah, S. V., Kaushal, G. P. (2014). ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J. Biol. Chem.* **289** (19), 13308–13322
- Herzog, C., Marisiddaiah, R., Haun, R. S., Kaushal, G. P. (2015). Basement membrane protein nidogen-1 is a target of meprin β in cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **236** (2), 110–116
- Huguenin, M., Müller, E. J., Trachsel-Rösmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E. E., Lottaz, D. (2008). The metalloprotease meprin β processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion. *PLoS One* **3** (5), e2153
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science* (80-.). **326** (5957), 1216–1219
- Jäckle, F., Schmidt, F., Wichert, R., Arnold, P., Prox, J., Mangold, M., Ohler, A., Pietrzik, C. U., Koudelka, T., Tholey, A., Gütschow, M., Stirnberg, M., Becker-Pauly, C. (2015). Metalloprotease meprin β is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem. J.* **470** (1), 91–103
- Jefferson, T., auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J. S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rose-John, S., Pietrzik, C. U., Postina, R., Overall, C. M., Becker-Pauly, C. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* **70** (2), 309–333
- Johnson, G. D., Bond, J. S. (1997). Activation mechanism of meprins, members of the astacin metalloendopeptidase family. *J. Biol. Chem.* **272** (44), 28126–32
- Joyce, J. A., Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9** (4), 239–52
- Keiffer, T. R., Bond, J. S. (2014). Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J. Biol. Chem.* **289** (11), 7580–8

- Kelley, L. C., Lohmer, L. L., Hagedorn, E. J., Sherwood, D. R. (2014). Traversing the basement membrane in vivo: A diversity of strategies. *J. Cell Biol.* **204** (3), 291–302
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141** (1), 52–67
- Khurshheed, M., Bashyam, M. D. (2014). Apico-basal polarity complex and cancer. *J. Biosci.* **39** (1), 145–55
- Kleifeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R. K., Starr, A. E., Foster, L. J., Kizhakkedathu, J. N., Overall, C. M. (2010). Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.* **28**, 281–288
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärnlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4** (7), 844–847
- Kronenberg, D., Bruns, B. C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E. E., Traupe, H., Böhm, M., Hulmes, D. J. S., Stöcker, W., Becker-Pauly, C. (2010). Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J. Invest. Dermatol.* **130** (12), 2727–35
- Kruse, M. N., Becker, C., Lottaz, D., Köhler, D., Yiallourous, I., Krell, H. W., Sterchi, E. E., Stöcker, W. (2004). Human meprin α and β homo-oligomers: Cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem. J.* **378** (2), 383–389
- Kuper, H., Adami, H. O., Trichopoulos, D. (2000). Infections as a major preventable cause of human cancer. *J. Intern. Med.* **248** (3), 171–183
- Kvansakul, M., Hopf, M., Ries, A., Timpl, R., Hohenester, E. (2001). Structural basis for the high-affinity interaction of nidogen-1 with immunoglobulin-like domain 3 of perlecan. *EMBO J.* **20** (19), 5342–5346
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168** (4), 670–691
- Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Klöppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., Schmid, R. M., Algül, H. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* **19** (4), 456–469
- Leuenberger, B., Hahn, D., Pischitzis, A., Hansen, M. K., Sterchi, E. E. (2003). Human meprin β : O-linked glycans in the intervening region of the type I membrane protein protect the C-terminal region from proteolytic cleavage and diminish its secretion. *Biochem. J.* **369** (3), 659–665
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284** (5751), 67–68
- Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet. Oncol.* **14** (6), 218–228
- Liu, X. B., Gao, Z. Y., Sun, C. T., Wen, H., Gao, B., Li, S. B., Tong, Q. (2019). The potential role of *P.gingivalis* in gastrointestinal cancer: A mini review. *Infect. Agent. Cancer* **14** (1), 1–7
- López-Otín, C., Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **283** (45), 30433–30437
- Lottaz, D., Maurer, C. A., Hahn, D., Büchler, M. W., Sterchi, E. E. (1999). Nonpolarized secretion of human meprin α in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res.* **59** (5), 1127–1133
- Mason, S. D., Joyce, J. A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* **21** (4), 228–37
- Matters, G. L., Manni, A., Bond, J. S. (2005). Inhibitors of polyamine biosynthesis decrease the expression of the metalloproteases meprin α and MMP-7 in hormone-independent human breast

cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **22** (4), 331–339

Meyer, B., Papatirou, D. G., Karas, M. (2011). 100% protein sequence coverage: A modern form of surrealism in proteomics. *Amino Acids* **41** (2), 291–310

Moreno-Bueno, G., Portillo, F., Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* **27** (55), 6958–6969

Muller, W. A. (2016). Localized signals that regulate transendothelial migration. *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 24–29

Ohler, A., Debela, M., Wagner, S., Magdolen, V., Becker-Pauly, C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol. Chem.* **391** (4), 455–460

Oneda, B., Lods, N., Lottaz, D., Becker-Pauly, C., Stöcker, W., Pippin, J., Huguenin, M., Ambort, D., Marti, H. P., Sterchi, E. E. (2008). Metalloprotease meprin β in rat kidney: Glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis. *PLoS One* **3** (5), e2278

OuYang, H.-Y., Xu, J., Luo, J., Zou, R.-H., Chen, K., Le, Y., Zhang, Y.-F., Wei, W., Guo, R.-P., Shi, M. (2016). MEP1A contributes to tumor progression and predicts poor clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **63** (4), 1227–1239

Pérez-Silva, J. G., Español, Y., Velasco, G., Quesada, V. (2016). The degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease. *Nucleic Acids Res.* **44** (D1), 351–355

Peters, F., Becker-Pauly, C. (2019). Role of meprin metalloproteases in metastasis and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* **38** (3), 347–356

Peters, F., Scharfenberg, F., Colmorgen, C., Armbrust, F., Wichert, R., Arnold, P., Potempa, B., Potempa, J., Pietrzik, C. U., Häslér, R., Rosenstiel, P., Becker-Pauly, C. (2019). Tethering soluble meprin α in an enzyme complex to the cell surface affects IBD-associated genes. *FASEB J.* **33** (6), 7490–7504

Piroli, M. E., Blanchette, J. O., Jabbarzadeh, E. (2019). Polarity as a physiological modulator of cell function. *Front. Biosci. - Landmark* **24** (3), 451–462

Pischitzis, A., Hahn, D., Leuenberger, B., 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** (2), 421–429

Pozzi, A., Yurchenco, P. D., Iozzo, R. V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* **57–58**, 1–11

Prox, J., Arnold, P., Becker-Pauly, C. (2015). Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol.* **44**, 7–13

Rafiei, M., Kiani, F., Sayehmiri, F., Sayehmiri, K., Sheikhi, A., Azodi, M. Z. (2017). Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **31** (1), 355–362

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46** (D1), 624–632

Rhodes, J. M., Campbell, B. J. (2002). Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol. Med.* **8** (1), 10–16

Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* **8** (9), 1237–1247

Schäffler, H., Li, W., Helm, O., Krüger, S., Böger, C., Peters, F., Röcken, C., Sebens, S., Lucius, R., Becker-Pauly, C., Arnold, P. (2019). The cancer-associated meprin β variant G32R provides an additional activation site and promotes cancer cell invasion. *J. Cell Sci.* **132** (11), jcs220665

- Schilling, O., Huesgen, P. F., Barré, O., auf dem Keller, U., Overall, C. M. (2011). Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **6**, 111–120
- Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangermann, S., Kenner, L., Schleder, M., Sibilja, M., Linder, M., Altendorf-Hofmann, A., Knösel, T., Gruber, E. S., Oberhuber, G., Bolik, J., Rehman, A., Sinha, A., Lokau, J., Arnold, P., Cabron, A. S., Zunke, F., Becker-Pauly, C., Preaudet, A., Nguyen, P., Huynh, J., Afshar-Sterle, S., Chand, A. L., Westermann, J., Dempsey, P. J., Garbers, C., Schmidt-Arras, D., Rosenstiel, P., Putoczki, T., Ernst, M., Rose-John, S. (2018). ADAM17 is required for EGF-R-induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling. *J. Exp. Med.* **215** (4), 1205–1225
- Schutte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M. E. V., Rodriguez-Pineiro, A. M., Backhed, F., Muller, S., Lottaz, D., Bond, J. S., Hansson, G. C. (2014). Microbial-induced meprin cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** (34), 12396–12401
- Schwaederle, M., Zhao, M., Lee, J. J., Eggermont, A. M., Schilsky, R. L., Mendelsohn, J., Lazar, V., Kurzrock, R. (2015). Impact of precision medicine in diverse cancers: A meta-analysis of phase II clinical trials. *J. Clin. Oncol.* **33** (32), 3817–3825
- Sechi, S., Chait, B. T. (1998). Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **70** (24), 5150–5158
- Siemsen, W., Halske, C., Behrens, H., Krüger, S., Becker-Pauly, C., Röcken, C. (2018). Meprin beta Expression im Magenkarzinom. *Z. Gastroenterol.* **56** (08), e301–e301
- Sivakumar, P. V., Westrich, G. M., Kanaly, S., Garka, K., Born, T. L., Derry, J. M. J., Viney, J. L. (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: Blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* **50** (6), 812–820
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, a K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal Biochem* 150: 76–85. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
- Speicher, K. D., Kolbas, O., Harper, S., Speicher, D. W. (2000). Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J. Biomol. Tech.* **11** (2), 74–86
- Stenger, M. (2015). Calculating H-Score - The ASCO Post (Zugriff vom 17.11.2019). <https://www.ascopost.com/issues/april-10-2015/calculating-h-score/>
- Sterchi, E. E., Green, J. R., Lentze, M. J. (1982). Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clin. Sci.* **62** (5), 557–560
- Sterchi, E. E., Stöcker, W., Bond, J. S. (2009). Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29** (5), 309–328
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **138** (6), 2101–2114
- Thakur, V., Bedogni, B. (2016). The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP at the forefront of melanoma cell invasion and metastasis. *Pharmacol. Res.* **111**, 17–22
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**, 145–149
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (9), 785–99
- Turk, B., Turk, D., Turk, V. (2012). Protease signalling: The cutting edge. *EMBO J.* **31** (7), 1630–1643
- Uren, A. G., Vaux, D. L. (1996). TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.* **21** (7), 244–5

- Vazeille, E., Bringer, M. A., Gardarin, A., Chambon, C., Becker-Pauly, C., Pender, S. L. F., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., Darfeuille-Michaud, A. (2011). Role of meprins to protect ileal Mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive e. coli. *PLoS One* **6** (6), e21199
- Vekich, J. A., Belmont, P. J., Thuerauf, D. J., Glembotski, C. C. (2012). Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53** (2), 259–267
- Vinci, M., Box, C., Eccles, S. A. (2015). Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *J. Vis. Exp.* **2015** (99), e52686
- Vogtmann, E., Hua, X., Zeller, G., Sunagawa, S., Voigt, A. Y., Hercog, R., Goedert, J. J., Shi, J., Bork, P., Sinha, R. (2016). Colorectal cancer and the human gut microbiome: Reproducibility with whole-genome shotgun sequencing. *PLoS One* **11** (5)
- Walker, P. D., Kaushal, G. P., Shah, S. V. (1998). Meprin A, the major matrix degrading enzyme in renal tubules, produces a novel nidogen fragment in vitro and in vivo. in *Kidney International*, Bd. 53 1673–1680
- Wang, X., Chen, J., Wang, J., Yu, F., Zhao, S., Zhang, Y., Tang, H., Peng, Z. (2016). Metalloproteases meprin- α (MEP1A) is a prognostic biomarker and promotes proliferation and invasion of colorectal cancer. *BMC Cancer* **16** (1), 383
- Wang, Z., Herzog, C., Kaushal, G. P., Gokden, N., Mayeux, P. R. (2011). Actinonin, a meprin a inhibitor, protects the renal microcirculation during sepsis. *Shock* **35** (2), 141–147
- Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19** (3), 242–247
- 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., 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** (8), 2090–2103
- Wichert, R., Scharfenberg, F., Colmorgen, C., Koudelka, T., Schwarz, J., Wetzels, S., Potempa, B., Potempa, J., Bartsch, J. W., Sagi, I., Tholey, A., Saftig, P., Rose-John, S., Becker-Pauly, C. (2019). Meprin β induces activities of a disintegrin and metalloproteinases 9, 10, and 17 by specific prodomain cleavage. *FASEB J.* **33** (11), 11925–11940
- Wilkins, M. R., Appel, R. D., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F. (2007). *Proteome Research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Aufl.
- Wolf, J., Rose-John, S., Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* **70** (1), 11–20
- Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R. (2009). TGF-B-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19** (2), 156–172

7 Anhang

7.1 Ethik Antrag

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. rer. nat Christoph Becker-Pauly
Christian Albrechts-Universität zu Kiel
Biochemisches Institut
Otto-Hahn-Platz 9
24118 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 500-14 191
Telefax 04 31 / 500-14 195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 06. Februar 2018

AZ: D 417/18 (bitte stets angeben)
Studienplan: **Histopathologische Untersuchung der Metalloprotease Meprin B und assoziierter Interaktionspartner in humanen Geweben mit entzündlich fibrotischen oder tumorösen Veränderungen**
(Untersuchungen an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Archivmaterial)
Studienleiter: **Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, Dr. Philipp Arnold, CAU Kiel**
In Kooperation mit: **Prof. Ralph Lucius, Anatomisches Institut der CAU Kiel**
Prof. Christoph Röcken, Institut für Pathologie des UKSH Kiel
Antrag vom: **24. Januar 2018 (Eingang: 25. Januar 2018)**

Sehr geehrter Herr Kollege Becker-Pauly,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt bei der Projektleitung und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8 Danksagung

Mein Dank gilt...

meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. rer. nat. Christoph Becker-Pauly für die Möglichkeit in der AG Becker-Pauly promovieren zu dürfen. In einem hervorragend ausgestatteten Labor hatte ich die Gelegenheit, mit großer Freiheit viele grundlegende Methoden zu Erlernen. Vielen Dank für die hoch motivierte und stets konstruktive Betreuung meiner Arbeit.

der gesamten Arbeitsgruppe der AG Becker-Pauly, von der ich freundlich ins Team aufgenommen wurde und stets auf eine bereichernde Hilfsbereitschaft zählen konnte. Für die initiale Einarbeitung bedanke ich mich insbesondere bei Herrn Dr. rer. nat. Florian Peters.

meinem Betreuer Herrn PD. Dr. rer. nat. Philipp Arnold für die enge Zusammenarbeit, die inspirativen Denkanstöße und die kontinuierliche Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Wenjia Li für Ihre Hilfe im Revisionsprozess der aus dieser Arbeit resultierenden Publikation.

Herrn Professor Dr. med. Christoph Röcken, Frau PD Dr. med. Christine Halske und Sandra Krüger aus dem Pathologischen Institut Kiel, deren kooperative Unterstützung es mir erlaubte, Meprin β in humanem Gewebe zu färben, sowie Herrn Dr. rer. medic. Hans Michael Behrens für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Färbungen.

Frau Bettina Facompré für die Unterstützung bei der Auswertung der Meprin β Färbungen im Kolonkarzinom

Frau Professor Dr. rer. nat. Susanne Sebens und Herrn Dr. Ole Helm aus dem Institut für experimentelle Tumorforschung, die mich mit vielen guten Ideen und materieller Großzügigkeit bei den Proliferations- und Migrationsversuchen unterstützten.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Andreas Tholey und Herrn Dr. Diego Yepes des Instituts für experimentelle Medizin der Universität Kiel für die Betreuung und Anleitung bei den massenspektrometrischen Analysen.

der Medizinischen Fakultät der Christian Albrechts Universität zu Kiel sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Förderung meiner Arbeit.

meiner Familie für die langjährige Unterstützung während meines Studiums und den Zuspruch und Rückhalt in dieser intensiven Zeit.