

Hemmung von Proproteinkonvertasen durch
das *Branchiostoma*-Serpine *Bl-Spn1* und
Charakterisierung eines neuen humanen Serpins

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biotech. Caterina Bentele

Technische Fakultät der Universität Bielefeld

Februar 2008

*Science is wonderfully equipped to answer the question “HOW?”
but it gets terribly confused when you ask the question “WHY?”
(Erwin Chargaff)*

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermann Ragg. Ihm danke ich insbesondere für seine stetige wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie dafür, dass er mir die Bearbeitung eines so faszinierenden Themas ermöglicht hat.

Frau Prof. Dr. Dorothee Staiger möchte ich ganz herzlich für ihre prompte Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Mein weiterer Dank gilt allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen „Zelluläre Genetik“ und „Zellkulturtechnik“ für die gute Zusammenarbeit und die ausgesprochen angenehme Atmosphäre. Hervorgehoben sei insbesondere Annemarie, die mir durch ihre Unterstützung beim Kultivieren zahlreicher Zellen und auch darüber hinaus wertvolle Hilfe geleistet hat. Danke auch an Katharina und Natalie für ihre großzügige Hilfsbereitschaft im Labor. Bei meinen Diplomanden/innen Marc, André und Samantha bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und viele erheiternde Momente im Labor. Auch Mareke sei nicht vergessen, die mich in die ersten Geheimnisse der Laborwelt eingewiesen hat und später als Kollegin ein wichtiger Diskussionspartner war. Steffi möchte ich sagen, dass mir die schöne Zeit auch abseits des Laboralltags unvergessen bleiben wird.

Ein herzliches Dankeschön auch an Maurice, der mir durch seine exzellente Praktikumsbetreuung sehr viel Arbeit abgenommen hat.

Gedankt sei außerdem den Herren Dr. Matthias Letzel (Organische Chemie I, Fakultät für Chemie), Marc Wingsens und Dr. Raimund Hoffrogge (AG Zellkulturtechnik) für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen sowie Herrn Dr. Claude Lazure, Frau Nadia Rabah (Clinical Research Institute of Montreal) und Frau Christina Geerds (Biochemie II, Fakultät für Chemie) für die Bereitstellung von Enzymen, Zelllinien und anderen Materialien.

Elisabeth, Jens, Florian und Margeritta danke ich für ihre aufmunternde und tatkräftige Begleitung während der Entstehung dieser Arbeit.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützt haben und immer für mich da waren.

Zu guter Letzt danke ich meinem Jan. Wir haben zusammen auf die Diplomprüfungen gelernt, zusammen die Diplomarbeit gemeistert und schließlich noch parallel eine Doktorarbeit geschrieben. Dabei haben wir uns immer gegenseitig unterstützt. Lieber Jan, ganz herzlichen Dank für die vielen wertvollen Tipps während der Durchführung dieser Arbeit. Es ist gut zu wissen und zu spüren, dass du immer hinter mir stehst. Ich freue mich auf einen neuen spannenden Lebensabschnitt mit dir!

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt vorab veröffentlicht:

Bentele, C., Krüger, O., Tödtmann, U., Oley, M. & Ragg, H. (2006) A proprotein convertase-inhibiting serpin with an endoplasmic reticulum targeting signal from *Branchiostoma lanceolatum*, a close relative of vertebrates. *Biochem J*, **395**, 449-456.

Bentele, C., Krüger, O., Tödtmann, U., Oley, M. & Ragg, H. (2006) The role of serpins along the secretory pathway: regulation of prohormone convertases and beyond. Poster, *Gordon Research Conference* "Proprotein Processing, Trafficking and Secretion", New London, USA, 2006.

Bentele, C., Krüger, O., Tödtmann, U., Oley, M. & Ragg, H. (2007) Proprotein convertase-inhibiting serpins along the secretory pathway.

Poster, 58. Mosbacher Kolloquium "Protein and lipid sorting in health and disease", Mosbach (Baden), 2007.

[DOI:10.1240/sav_gbm_2007_m_001713]

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	Proteinkonvertasen	2
2.1.1	Struktur, Aktivierung und subzelluläre Lokalisation	2
2.1.2	Spezifität und (patho)-physiologische Relevanz	5
2.2	Regulation/Inhibition von Proteinkonvertasen.....	8
2.3	Serpine	10
2.3.1	Serpine als Inhibitoren von Proteinkonvertasen.....	13
2.4	Serpine und Proteinkonvertasen in <i>Branchiostoma</i>.....	15
3	ZIELE DER ARBEIT.....	18
4	MATERIAL UND METHODEN	19
4.1	Material.....	19
4.2	Mikrobiologische Methoden	19
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen.....	19
4.2.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
4.3	Molekularbiologische Methoden	21
4.3.1	RNA-Isolierung aus tierischen Zellen	21
4.3.2	Reverse Transkription	22
4.3.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	22
4.3.4	Polymerasekettenreaktion.....	22
4.3.5	Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	24
4.3.6	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	25
4.3.7	Plasmidisolierung.....	26
4.3.8	Restriktionsspaltung.....	26
4.3.9	Ligation.....	26
4.3.10	„TA“-Subklonierung.....	26
4.3.11	Expressionsplasmide.....	27

4.3.12	Sequenzierung.....	29
4.4	Expression und Reinigung von His₆-GST-Serpin-Fusionsproteinen.....	30
4.4.1	Entfernung des GST- <i>Tags</i> durch die TEV-Protease.....	32
4.5	Gewinnung eines Anti-SERPINE3-Antiserums.....	32
4.6	Zellkultur.....	33
4.6.1	Zelllinien und Kulturmedien.....	33
4.6.2	Stammhaltung und Zellpassagierung.....	34
4.6.3	Zellzahlbestimmung.....	34
4.6.4	Kryokonservierung.....	35
4.6.5	Expression rekombinanter Proteine in COS-7-und HEK-293-EBNA-Zellen.....	35
4.6.6	Serumfreie Kultivierung und Herstellung von Zellextrakten.....	37
4.7	Proteinbiochemische Methoden.....	38
4.7.1	SDS-PAGE und Western-Blot.....	38
4.7.2	Analyse von humanen Gewebeproben.....	41
4.8	Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Serpin-Protease-Interaktionen.....	42
4.8.1	Proteasen und Puffer.....	42
4.8.2	Komplexierungstests.....	43
4.8.3	Enzymkinetik.....	44
4.9	Massenspektrometrische Analysen.....	49
4.10	Affinitätschromatographie.....	51
4.10.1	Affinitätsreinigung polyklonaler Anti-Serpin-Antiseren.....	51
4.10.2	Kopplung von Anti-SERPINE3-Antikörpern an Protein A-Sepharose.....	52
4.10.3	Reinigung von endogenem SERPINE3 aus Kulturüberständen von MCF-7-Zellen.....	53
5	ERGEBNISSE.....	54
5.1	Funktionelle Charakterisierung des Serpins <i>Bl-Spn1</i> aus <i>Branchiostoma lanceolatum</i>.....	54
5.1.1	Nachweis SDS-stabiler Komplexe mit Furin und PC1/3.....	55
5.1.2	Kinetische Charakterisierung der mPC1/3- und Furin-Hemmung.....	59
5.1.3	Identifikation der Proproteinkonvertase-Spaltstellen.....	62

5.1.4	Das C-terminale KDEL-Motiv verhindert den Export von <i>Bl-Spn1</i> aus COS-7-Zellen	64
5.1.5	Genomische Organisation des <i>Bl-Spn1</i> -Gens	65
5.2	SERPINE3 – ein neues humanes Serpin mit dibasischem RSL-Motiv	67
5.2.1	SERPINE3 ist unter Vertebraten hoch konserviert	67
5.2.2	Amplifikation und Klonierung der SERPINE3-cDNA	68
5.2.3	Analyse der SERPINE3-Aminosäuresequenz und Modellierung des Proteins	69
5.2.4	Organisation des SERPINE3-Gens	72
5.2.5	Bakterielle Expression und Reinigung von His ₆ -GST-SERPINE3	74
5.2.6	Antikörpergewinnung und Reinigung der Antikörper	77
5.2.7	Versuche zum Nachweis der Aktivität von His ₆ -GST-SERPINE3	79
5.2.8	Herstellung und Charakterisierung einer <i>Bl-Spn1</i> -Mutante mit SERPINE3-RSL-Sequenz	80
5.2.9	Lokalisation von SERPINE3	83
5.2.10	Expression von SERPINE3-Varianten in der Zelllinie HEK-293-EBNA ..	85
5.2.11	Versuche zum Nachweis der Aktivität von rekombinantem SERPINE3 aus HEK-293-EBNA-Zellen	89
5.2.12	Analysen zur endogenen Expression von SERPINE3 in Zelllinien und Geweben	90
6	DISKUSSION	95
6.1	<i>Bl-Spn1</i>, ein neuer Proproteinkonvertase-Inhibitor im sekretorischen Pfad	95
6.1.1	<i>Bl-Spn1</i> im Vergleich mit anderen PC inhibierenden Serpinen	96
6.1.2	Hemmung von Proproteinkonvertasen durch ER-residente Serpine	98
6.2	SERPINE3, ein neues humanes Serpin der Gruppe 3	102
6.2.1	Rekombinante Expression von SERPINE3	103
6.2.2	SERPINE3 zeigt keine inhibitorische Aktivität <i>in vitro</i>	104
6.2.3	Studien zur endogenen Expression von SERPINE3 – Hinweise auf eine inhibitorische Aktivität	111
6.3	Ausblick	113
7	LITERATURVERZEICHNIS	115
8	ANHANG	127

8.1	Vektorkarten	127
8.2	Primer	129
8.3	Sequenzen und <i>Alignments</i>.....	131
8.3.1	cDNA-Sequenz von <i>Bt-Spn1</i>	131
8.3.2	<i>Alignment</i> der cDNA und der genomischen DNA von <i>Bt-Spn1</i>	133
8.3.3	cDNA-Sequenz von SERPINE3	138
8.3.4	<i>Alignment</i> zur Bestimmung von Intronpositionen	140
8.3.5	Aminosäure- <i>Alignment</i> humaner Serpine	142
8.4	Computer-Programme	147
8.5	Abkürzungsverzeichnis	148
8.6	Serpinnomenklatur	150

1 Zusammenfassung

Proteinkonvertasen (PCs) aktivieren eine Vielzahl von (patho)-physiologisch relevanten Vorläuferproteinen im sekretorischen Pfad. Zur Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts muss ihre Aktivität daher sehr genau reguliert werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Serpin *Bl-Spn1* aus *Branchiostoma lanceolatum*, einem nahen Verwandten der Wirbeltiere, die PCs Furin und PC1/3 mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit inhibiert und mit beiden Proteasen SDS-stabile Komplexe bildet. Durch massenspektrometrische Analysen wurde nachgewiesen, dass die PCs die reaktive Schleife (RSL, *reactive site loop*) von *Bl-Spn1* C-terminal von der Sequenz Met-Met-Lys-Arg spalten, was mit der klassischen Erkennungs-/Spaltsequenz von Vertebraten-PCs übereinstimmt. *Bl-Spn1* besitzt an seinem C-Terminus ein Retentionssignal (KDEL) für das Endoplasmatische Retikulum. Eine Deletion dieses Motivs bewirkt, dass der Inhibitor von transfizierten COS-7 Zellen sekretiert wird, während das Wildtyp-Protein im Zellinnern zurückgehalten wird. Somit ist *Bl-Spn1* nach *Dm-Spn4A* aus *Drosophila melanogaster* erst das zweite Serpin, das aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaft und seiner subzellulären Lokalisation als physiologischer Inhibitor von PCs in Frage kommt. Im Gegensatz zum *Drosophila*-Serpin zeigt *Bl-Spn1* keine inhibitorische Aktivität gegenüber PC2, weshalb das *Branchiostoma*-Serpin wichtige Hinweise für die Entwicklung selektiver PC-Hemmstoffe liefert.

Weiterhin wurde die cDNA-Sequenz des neuen humanen Serpins SERPINE3 isoliert, das wie *Bl-Spn1* ein PC-Erkennungsmotiv im RSL besitzt und eine für inhibitorische Serpine typische *Hinge*-Region aufweist. SERPINE3 wurde rekombinant in Bakterien und Säugerzellen exprimiert. Es wurden funktionelle Antikörper gegen das Serpin produziert, die durch Affinitätschromatographie gereinigt wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass das ca. 57 kD große Protein eine extrazelluläre Lokalisation aufweist. Gewebsexpressionsanalysen implizieren, dass SERPINE3 in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist. Weiterhin wurden mehrere HEK-293-EBNA-Zelllinien erzeugt, die kontinuierlich SERPINE3 und verschiedene Mutanten des Serpins ins Medium sezernieren. Durch Immunoaffinitätschromatographie mit Anti-SERPINE3-Antiserum gelang es, SERPINE3 spezifisch aus den Kulturüberständen der Brustkrebszelllinie MCF-7 anzureichern. Dadurch wurde erstmalig der Nachweis der endogenen Expression von SERPINE3 auf Proteinebene erbracht. Weiterhin wurden mit dieser Methode Proteine angereichert, die möglicherweise SERPINE3 in komplexierter Form repräsentieren, was darauf hindeutet, dass SERPINE3 ein inhibitorisches Serpin ist. Die Tatsache, dass eine inhibitorische Aktivität des Serpins *in vitro* bislang nicht demonstriert werden konnte, impliziert, dass rekombinantes SERPINE3 in einer latenten Konformation vorliegt oder für seine Aktivität die Bindung eines Kofaktors benötigt. Diese Vermutung wird durch Mutagenesestudien gestützt.

2 Einleitung

2.1 Proproteinkonvertasen

Viele Hormone, Wachstumsfaktoren, virale Hüllproteine und andere Proteine erlangen ihre biologische Aktivität erst nach posttranslationaler proteolytischer Prozessierung. Die Spaltung dieser inaktiven Vorläuferproteine erfolgt C-terminal von spezifischen Sequenzmotiven und wird in den meisten Fällen von Proproteinkonvertasen (PCs) vorgenommen. PCs sind hochkonservierte, Kalzium-abhängige Serinproteasen, die im sekretorischen Pfad und/oder auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und ihre Substrate im Zellinnern, an der Zelloberfläche oder im extrazellulären Milieu prozessieren (Seidah & Chretien, 1999; Rockwell *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer Eigenschaft, Proproteine und Propeptide zu aktivieren, spielen PCs eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl physiologischer, aber auch pathologischer Prozesse. Sieben von bislang neun identifizierten Mitgliedern der PC-Familie sind homolog zur Serinprotease Kexin aus der Hefe. Diese sieben Mitglieder (Furin, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5, PC7) spalten ihre Substrate C-terminal von basischen Aminosäuren. Die erst kürzlich identifizierten PCs SKI-1 und NARC-1 spalten dagegen hinter nicht-basischen Aminosäuren und spielen eine Schlüsselrolle bei der Cholesterin-Homöostase (Seidah *et al.*, 2006). Die folgenden Abschnitte behandeln Struktur, Funktion und (patho)-physiologische Relevanz der PCs mit basischer Substratspezifität.

2.1.1 Struktur, Aktivierung und subzelluläre Lokalisation

PCs bestehen aus mehreren konservierten Domänen (Abbildung 1). Auf ein N-terminales Signalpeptid, das die Translokation des Proenzym ins Endoplasmatische Retikulum (ER) ermöglicht, folgt die so genannte Prodomäne, die entscheidend für die Faltung, Aktivierung und den Transport der PCs ins Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ist. Bei allen PCs mit Ausnahme von PC2 wird die Prodomäne im ER autokatalytisch gespalten, was zur Ausbildung eines nicht-kovalenten Komplexes aus PC und Prodomäne führt. Diese erste Spaltung ist essenziell für den weiteren Transport der PCs ins TGN (Molloy *et al.*, 1994; Vey *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1997; Nour *et al.*, 2003). Für Furin konnte gezeigt werden, dass die niedrigeren pH-Werte und die höheren Kalziumkonzentrationen im TGN eine weitere autokatalytische Prozessierung begünstigen, was schließlich zur Freisetzung der Prodomäne führt (Abbildung 2). Erst

nach Freisetzung der Prodomäne erlangt das Enzym seine volle katalytische Aktivität (Anderson *et al.*, 1997). PC5A (eine Splicevariante von PC5) und möglicherweise auch PACE4 verlassen die Zelle im Verbund mit der Prodomäne und sind daher erst extrazellulär aktiv (Mayer *et al.*, 2007). Der Aktivierungsprozess von PC2 unterscheidet sich gänzlich von dem der anderen PCs: Für den Transport vom ER zum TGN benötigt das Enzym die Unterstützung des neuroendokrinen Chaperons 7B2. Das Chaperon wird im TGN durch Furin gespalten, bleibt aber mit PC2 assoziiert. In den noch unreifen sekretorischen Granula wird die Prodomäne autokatalytisch gespalten, bleibt aber ebenso wie die 7B2-Fragmente mit dem Enzym verbunden. In den reifen sekretorischen Granula werden die 7B2-Fragmente und die Prodomäne degradiert, und das Enzym erreicht seine volle biologische Aktivität (Muller *et al.*, 1997).

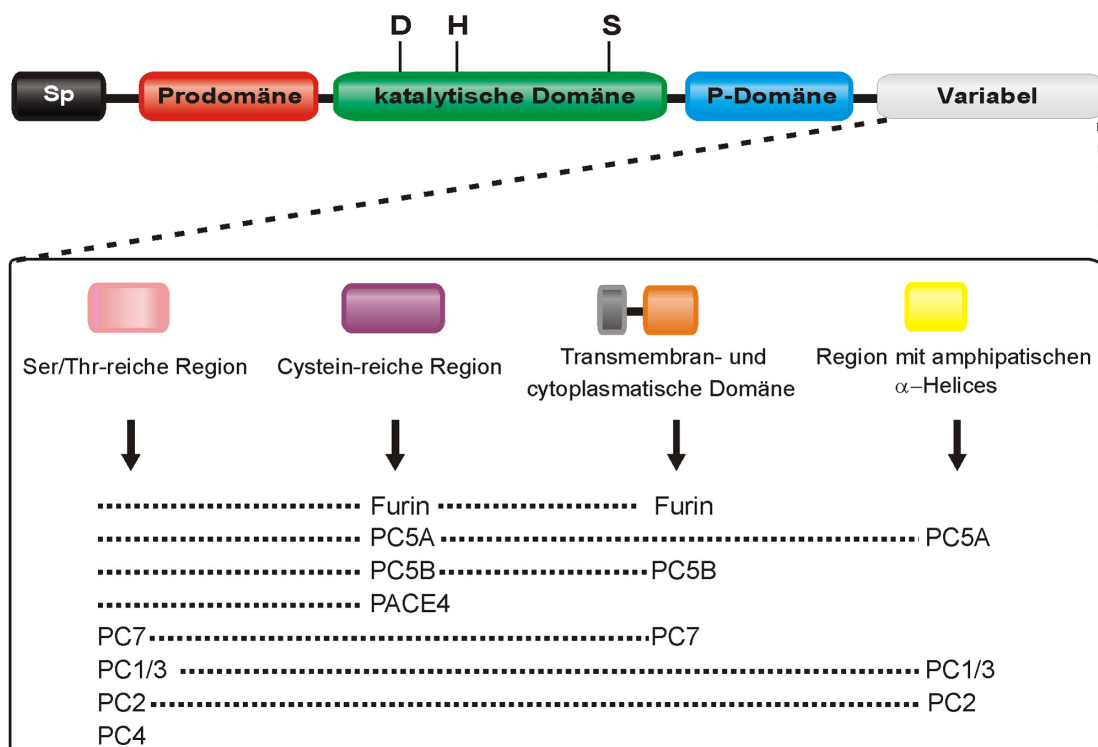


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Säuger-PCs. Alle Kexin-ähnlichen PCs besitzen ein N-terminales Signalpeptid (Sp), eine Prodomäne, eine katalytische Domäne und eine P-Domäne. Der C-Terminus ist hoch variabel (siehe Box) und beherbergt eine oder mehrere Domänen, die die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen PC determinieren. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind im Einbuchstabencode gezeigt.

Die katalytische Domäne mit ihrer streng konservierten katalytischen Triade (Ser, His, Asp) ist die am stärksten konservierte Domäne und homolog zu der Domäne der bakteriellen Serinprotease Subtilisin (Siezen & Leunissen, 1997). C-terminal von dieser Domäne liegt die P-Domäne, die charakteristisch für alle Kexin-ähnlichen PCs ist. Sie ist essenziell für die Aktivität der PCs und reguliert Kalzium- und pH-Abhängigkeit

(Zhou *et al.*, 1998). Der nur wenig konservierte C-Terminus beherbergt eine oder mehrere Domänen sowie zelluläre Lokalisationssignale. PC7, Furin und PC5B besitzen eine Transmembrandomäne. Diese PCs, ebenso wie PC4 und PACE4, prozessieren ausschließlich Proteine, die über den konstitutiven sekretorischen Pfad sekretiert werden (Seidah & Chretien, 1999). Studien haben gezeigt, dass Furin, die am besten charakterisierte PC, vom TGN zur Plasmamembran und von dort über die Endosomen zum TGN rezirkuliert. Gelenkt wird dieser dynamische Prozess von verschiedenen, in der cytoplasmatischen Domäne beherbergten Signalsequenzen (Molloy *et al.*, 1999).

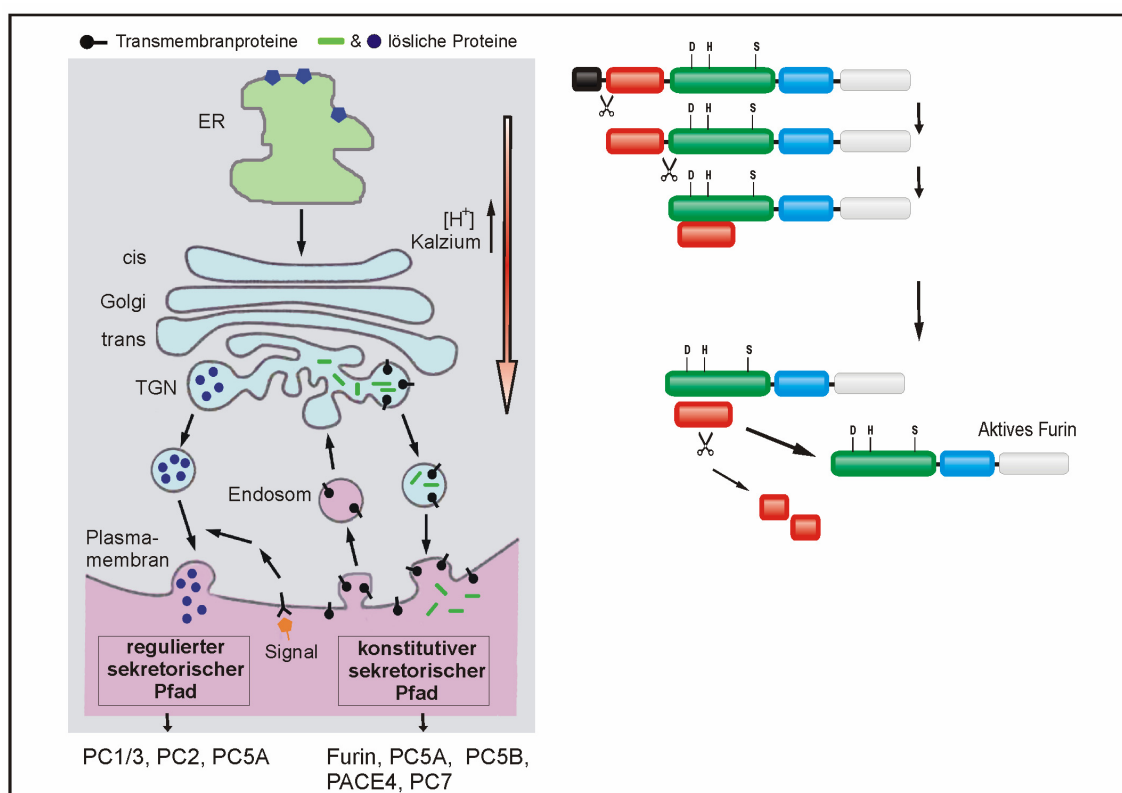


Abbildung 2: Reifung von PCs. Im linken Bildausschnitt sind die Transportwege des sekretorischen Pfades dargestellt. Es ist angezeigt, welche PCs im konstitutiven und welche PCs im regulierten sekretorischen Pfad wirken. Der rechte Bildausschnitt zeigt die verschiedenen Stufen der PC-Reifung am Beispiel von Furin (Die Bezeichnung der Furin-Domänen ist Abbildung 1 zu entnehmen.). Nach Abspaltung des Signalpeptides im ER durchläuft das noch inaktive Profurin verschiedene Faltungsprozesse, an denen die als Chaperon fungierende Prodomäne maßgeblich beteiligt ist. Noch im ER wird die Prodomäne autokatalytisch abgespalten. Die abgespaltene Prodomäne verbleibt nicht-kovalent mit der katalytischen Domäne verbunden und wirkt als Autoinhibitor. Der Komplex aus Prodomäne und gespaltenem Enzym verlässt das ER und gelangt über den Golgi-Apparat zum TGN. Das leicht saure und Kalzium-reiche Milieu begünstigt dort eine weitere autokatalytische Spaltung. Die gespaltene Prodomäne löst sich vom Enzym ab, wodurch dieses seine volle Aktivität erlangt.

Die neuroendokrinen Konvertasen PC1/3 und PC2 werden dagegen in die Granula des regulierten sekretorischen Pfades gelenkt, wo sie Proteine aktivieren, die erst nach

Stimulus freigesetzt werden (De Bie *et al.*, 1996; Muller & Lindberg, 1999). PC5A prozessiert sowohl konstitutiv als auch regulativ sekretierte Proteine. In Zellen mit reguliertem sekretorischem Pfad wird PC5A wie die neuroendokrinen PCs in die dicht gepackten Granula geleitet. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass α -helikale Strukturen essenziell für diese subzelluläre Lokalisation sind (Dikeakos *et al.*, 2007).

Mehrere PCs weisen eine ausgeprägte Cystein-reiche Region (CRR) auf. Die CRR von Furin unterstützt die proteolytische Freisetzung einer löslichen Variante dieses Enzyms (Denault *et al.*, 2002). Im Falle der sekretierten und Heparin-bindenden PCs PACE4 und PC5A fungiert die CRR als Zelloberflächen-Anker (Tsuji *et al.*, 2003; Nour *et al.*, 2005). Bislang ist unklar, ob die Bindung dieser Enzyme an die Zelloberfläche auf einer direkten oder indirekten Interaktion der CRR mit Heparin-Proteoglykanen innerhalb der extrazellulären Matrix (ECM) beruht. Für PC5A konnte nachgewiesen werden, dass durch Abspaltung der CRR eine verkürzte, nicht membranassoziierte PC5A-Variante entsteht (Nour *et al.*, 2005).

2.1.2 Spezifität und (patho)-physiologische Relevanz

Die proteolytische Spezifität der Kexin-ähnlichen PCs wurde in zahlreichen Koexpressionsstudien mit Vorläuferproteinen und *in vitro* mit Peptid-Substraten analysiert (Rockwell *et al.*, 2002). Diese Studien zeigten, dass Kexin-ähnliche PCs ihre Substrate C-terminal von basischen Aminosäuren spalten. In den überwiegenden Fällen ist die Position P1 des Substrates mit einem Arginin und die Position P2 mit einem Lysin besetzt (Nomenklatur nach Schechter & Berger, 1967; Positionen N-terminal von der Spaltstelle werden mit P1, P2, ... bezeichnet, Positionen C-terminal zu der Spaltstelle mit P1', P2', ...). Viele PC-Substrate weisen N-terminal zu der Spaltstelle noch weitere basische Aminosäuren auf. Besonders häufig treten solche an der Position P4 auf, aber auch an den Positionen P3, P5, oder P6. Für Furin wurde gezeigt, dass eine effiziente Spaltung nur dann stattfindet, wenn neben einem P1-Arginin noch mindestens zwei weitere basische Aminosäuren an den Positionen P2, P4 oder P6 im Substrat vorhanden sind (Nakayama, 1997; Rockwell *et al.*, 2002). Die Enzyme PC1/3 und PC2 prozessieren dagegen auch sehr effizient Substrate, die ausschließlich an den Positionen P1 und P2 basische Aminosäuren aufweisen (Day *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 2000). Die weiteren PCs (PC4, PC5, PACE4 und PC7) sind weniger gut charakterisiert. Die bisherigen Studien deuten allerdings darauf hin, dass PC7 und PACE4 eine ähnliche Selektivität/Spezifität wie Furin aufweisen (Munzer *et al.*, 1997; Sucic *et al.*, 1999). Studien zur Charakterisierung der Enzyme PC4 und PC5 zeigten, dass diese PCs, ebenso wie PC1/3 und PC2, auch effizient nach dibasischen Motiven spalten (Basak *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2002).

Die erst in jüngerer Zeit veröffentlichte Kristallstruktur von Furin im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon (dec-RVKR-cmk) (Henrich *et al.*, 2003) und darauf aufbauende Homologie-Modellierungen der anderen PCs (Henrich *et al.*, 2005) liefern eine Erklärung für die Präferenz der PCs für basische Aminosäuren. Die Substrat-Binderegionen aller PCs weisen eine hohe Dichte an negativ geladenen Aminosäuren auf, wobei diese bei Furin am höchsten ist. PC1 und PC2 enthalten im Bereich der S4- und S6-Bindetasche eine geringere negative Ladungsdichte, was eine Erklärung für die geringere Präferenz dieser PCs für basische Aminosäuren an den Positionen P4 und P6 ist (Henrich *et al.*, 2005).

Trotz dieser Unterschiede sind die Prozessierungseigenschaften der PCs in vielen Fällen redundant. *In vivo* wird ihre Selektivität für bestimmte Substrate häufig durch ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation (Abschnitt 2.1.1) und Gewebeverteilung bestimmt (Bergeron *et al.*, 2000; Henrich *et al.*, 2005). PC1/3 und PC2 werden z. B. fast ausschließlich in neuroendokrinen Geweben exprimiert, wo sie eine Vielzahl von Prohormonen und Neuropeptid-Vorläufern, wie z. B. Proinsulin, Proglucagon, Proenkephalin oder Proopiomelanocortin (POMC) prozessieren (Benjannet *et al.*, 1991; Smeekens *et al.*, 1992; Rouille *et al.*, 1995; Johanning *et al.*, 1996). Furin wird dagegen ubiquitär exprimiert (Bergeron *et al.*, 2000). *In-vivo*- und *in-vitro*-Studien haben gezeigt, dass dieses ubiquitär exprimierte Enzym mit seiner breiten subzellulären und teilweise auch extrazellulären Lokalisation eine große Vielzahl von Proproteinen aus völlig unterschiedlichen Klassen prozessiert. Furin aktiviert Wachstumsfaktoren, Hormone, Serumproteine, Zelloberflächenproteine, Rezeptoren, Proteine der extrazellulären Matrix, virale Proteine und andere Proteine (Thomas, 2002). Für PACE4, PC5 und PC7 konnte eine breite, aber nicht ubiquitäre Gewebeverteilung nachgewiesen werden. PC4 wird dagegen fast ausschließlich in den Keimbahnen der Hoden exprimiert (Seidah *et al.*, 1992; Mbikay *et al.*, 1997).

Die physiologische Relevanz/Funktion der PCs wurde u. a. durch Inaktivierung ihrer Gene bei Mäusen untersucht. Die Vielzahl der Phänotypen deutet auf distinkte physiologische Funktionen der PCs hin. Furin und PC5/6 sind essenziell für die Embryonalentwicklung. Die Inaktivierung ihrer Gene verursacht eine frühe embryonale Letalität (Roebroek *et al.*, 1998; Essalmani *et al.*, 2006). Die oftmals ausgeprägten Missbildungen bei PACE4-*Knockout*-Embryonen implizieren ebenso eine wichtige Funktion dieser PC während der Embryonalentwicklung (Constam & Robertson, 2000). Diese Studien unterstreichen die Ergebnisse zahlreicher Prozessierungsstudien, die belegen, dass PC5, PACE4 und Furin Proteine prozessieren, die eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielen (Lissitzky *et al.*, 2000; Dubois *et al.*, 2001; Ulloa *et al.*, 2001). Weniger schwerwiegend sind die Defekte bei Mäusen, bei denen die Loci für die Gene PC4, PC1/3, PC2 oder PC7 inaktiviert wurden. PC7-*Knockout*-Mäuse

wachsen normal und zeigen auch sonst keinen abnormalen Phänotyp (Constam *et al.*, 1996; Scamuffa *et al.*, 2006). PC4-*Knockout*-Mäuse sind unfruchtbar (Mbikay *et al.*, 1997). PC1/3- bzw. PC2-defiziente Mäuse zeigen Wachstumsdefekte und weisen einen erhöhten Proinsulinspiegel auf (Furuta *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die Prozessierung vieler weiterer Prohormone und Propeptide bei diesen Mäusen gestört, wobei Art und Menge der unvollständig prozessierten Zymogene bei PC2- bzw. PC1/3-defizienten Mäusen teilweise unterschiedlich sind (Scamuffa *et al.*, 2006).

Tabelle 1: Phänotypen von PC-*Knockout*-Mäusen

PC	Gewebeverteilung	Zelluläre Lokalisation	<i>Knockout</i> -Phänotyp
Furin	ubiquitär	TGN, Endosomen, extrazellulär	embryonal letal; ventraler Furchungsdefekt; Fehler in der axialen Drehung (Roebroek <i>et al.</i> , 1998)
PC1/3	neuroendokrines System	sekretorische Granula	starke Wachstumsdefekte, Hyperproinsulinämie; Störung der endokrinen Peptidprozessierung (Zhu <i>et al.</i> , 2002)
PC2	neuroendokrines System	sekretorische Granula	verringertes Wachstum; Hypoglykämie, Proinsulinämie; Störung der endokrinen Peptidprozessierung (Furuta <i>et al.</i> , 1997)
PC5	breit	PC5A: sekretorische Granula, extrazellulär, ECM	letal (Essalmani <i>et al.</i> , 2006)
		PC5B: TGN, Endosomen, extrazellulär	
PACE4	breit	extrazellulär, ECM	teilweise embryonal letal; starke Missbildungen an Herz und Kopf; Defekte im zentralen Nervensystem (Constam & Robertson, 2000)
PC4	Keimbahn	unklar, möglicherweise Membran-assoziiert (Gyamera-Acheampong <i>et al.</i> , 2006)	reduzierte Fruchtbarkeit (Mbikay <i>et al.</i> , 1997)
PC7	breit	TGN, Endosomen, extrazellulär	keine offensichtlichen Defekte (Constam <i>et al.</i> , 1996)

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher herauskristallisiert, dass die PC-Familie nicht nur bei vielen physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle spielt, sondern

auch bei einer Reihe von pathologischen Prozessen. Mittlerweile ist klar, dass viele bakterielle und virale Pathogene die Prozessierungsmaschinerie ihres Wirts zu ihren Gunsten ausnutzen. Die Spaltung des Hüllproteins gp-160 des *human immunodeficiency virus* (HIV) durch Furin oder eine andere PC ist essenziell für die Membranfusion, die gleichzeitig die Virusinfektion einleitet. Auch die Hüllproteine von Ebolaviren, Influenzaviren, Masern-Viren, SARS-Viren und H5N1-Influenzaviren werden von PCs prozessiert (Subbarao *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2003; Bergeron *et al.*, 2005). Weiterhin aktivieren PCs verschiedene bakterielle Toxine wie z. B. das Anthrax-Toxin, das Diphtherie-Toxin oder das Botulinum-Toxin (Bergeron *et al.*, 2000).

PCs werden auch mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und anderen krankhaften Prozessen wie z. B. Krebs in Verbindung gebracht. Viele PC-Substrate wie z. B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Matrixmetalloproteasen oder Integrine spielen eine direkte Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung. In vielen Tumoren konnte eine erhöhte PC-Expression nachgewiesen werden. Ebenso zeigen mehrere Studien, dass die Aggressivität und Invasivität von Tumoren direkt mit dem Expressionsniveau von PCs korreliert (Bassi *et al.*, 2005).

2.2 Regulation/Inhibition von Proproteinkonvertasen

Da PCs viele zelluläre Prozesse beeinflussen, muss ihre Aktivität sehr genau reguliert werden. Interessanterweise sind die zellulären Mechanismen, die an der Regulation dieser wichtigen Enzymfamilie beteiligt sind, weitgehend unbekannt. Intrazelluläre pH- und Kalziumgradienten sowie die PC-eigenen Prodomänen verhindern eine vorzeitige autokatalytische Aktivierung dieser Enzyme (Abschnitt 2.1.1). Die vorzeitige Aktivierung von PC2 wird durch das neuroendokrine Protein 7B2 verhindert, dessen C-Terminus stark inhibierend wirkt (Martens *et al.*, 1994). Ein weiterer physiologischer Regulator von PC2 ist möglicherweise CRES (*cystatin-related epididymal spermatogenic protein*), ein Protease-Inhibitor aus der Familie der Cystatine (Cornwall *et al.*, 2003). Das neuroendokrine Protein proSAAS könnte ein endogener Inhibitor von PC1/3 sein. Eine Überexpression dieses Vorläuferproteins in AtT-20-Zellen reduziert die Prozessierung des PC1/3-Substrates POMC (Fricker *et al.*, 2000). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass auch Mitglieder aus der Superfamilie der Serpine (Serin-Protease-Inhibitoren) eine wichtige Rolle bei der zellulären Regulation von PCs spielen könnten (Abschnitt 2.3.1). In *Drosophila melanogaster* wurde ein Serpin identifiziert, dessen inhibitorische Eigenschaften und subzelluläre Lokalisation darauf hindeuten, dass das Serpin ein physiologischer Regulator der Furin- und PC2-Homologe in *Drosophila* ist (Oley *et al.*, 2004; Osterwalder *et al.*, 2004; Richer *et al.*, 2004). Neuere Ergebnisse implizieren, dass das humane Serpin Protease-Inhibitor 8 (PI8, SERPINB8),

das *in vitro* sehr potent Furin inhibiert, die Aktivität von Furin während der Hämostase reguliert (Leblond *et al.*, 2006).

Da PCs in viele pathologische Prozesse involviert sind (Abschnitt 2.1.2), ist die Identifikation von PC-Inhibitoren auch von medizinischer Relevanz. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von synthetischen PC-Hemmstoffen entwickelt. Der bekannteste und am häufigsten für Funktionsstudien eingesetzte Inhibitor ist dec-RVKR-cmk. Im Gegensatz zu vielen anderen Inhibitoren kann dec-RVKR-cmk aufgrund seines hydrophoben Ankers leicht die Zellmembran passieren. Mit diesem Inhibitor ist es u. a. gelungen, die PC-vermittelte Prozessierung von HIV-gp-160 zu unterdrücken (Hallenberger *et al.*, 1992). Für pharmakologische Anwendungen ist dieser Inhibitor allerdings ungeeignet, da er sehr stark cytotoxisch wirkt. Ein weiterer Nachteil ist seine mangelnde Selektivität. Dec-RVKR-cmk unterdrückt die Aktivität aller Kexin-ähnlichen PCs. Da PCs aber an vielen physiologisch wichtigen Prozessen beteiligt sind, könnte eine generelle Blockade ihrer Aktivität äußerst schädlich sein (Bergeron *et al.*, 2000). Hinsichtlich Selektivität und Toxizität sind kurze polybasische Peptide deutlich vielversprechendere Hemmstoffe. Es wurde gezeigt, dass kurze Peptide, bestehend aus neun Argininen, die PCs Furin und PACE4 mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich inhibieren. Die Affinität dieser Peptide für PC1/3 ist deutlich geringer ($K_i = 2,5 \mu\text{M}$), und PC2 wird gar nicht gehemmt (Cameron *et al.*, 2000). Auch mit diesen Polyargininen ist es gelungen, die Prozessierung von HIV-gp-160 einzudämmen (Kibler *et al.*, 2004). Neben diesen synthetischen Inhibitoren wurden auch viele Hemmstoffe auf der Basis von Proteinen entwickelt. Der bekannteste unter ihnen ist das Serpin α_1 -Antitrypsin-Portland (α_1 -PDX). Bei diesem Serpin handelt es sich um eine genetisch modifizierte Variante des humanen Elastaseinhibitors α_1 -Antitrypsin (SERPINA1), bei dem durch ortsspezifische Mutagenese zwei Aminosäuren in der reaktiven Schleife durch basische Aminosäuren ersetzt wurden (Anderson *et al.*, 1993) (Abschnitt 2.3.1). Was die Selektivität dieses Serpins anbelangt, so widersprechen sich die Studien teilweise. Die ursprünglichen Entwickler berichten, dass α_1 -PDX ein relativ spezifischer Inhibitor von Furin ist und z. B. PACE4, PC2 und PC7 gar nicht inhibiert (Jean *et al.*, 1998). Dem stehen die Ergebnisse einer japanischen Arbeitsgruppe gegenüber, die auf Basis von Ratten- α_1 -Antitrypsin einen ähnlichen Hemmstoff entwickelt hat. Dieses „Ratten“- α_1 -PDX inhibiert sowohl Furin, PACE4 als auch PC5 mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich (Tsuji *et al.*, 2002).

2.3 Serpine

Die Superfamilie der Serpine, von der zurzeit ca. 1500 Mitglieder bekannt sind, kommt in allen Domänen des Lebens (Bakterien, Archaeen und Eukaryoten) und ebenso in Viren vor (Gettins, 2002b; Law *et al.*, 2006). Die Serpine der Vertebraten werden in 16 Klassen (Klassen A bis P) (Irving *et al.*, 2000) oder alternativ in sechs Gruppen eingeteilt (Ragg *et al.*, 2001). Letzteres Klassifikationssystem basiert auf der hochkonservierten, gruppenspezifischen Exon-Intron-Struktur der Serpingene.

Die überwiegende Zahl der etwa 40–60 kD großen Proteine inhibiert spezifisch und irreversibel Serinproteasen. Für die Inhibition ihrer Zielenzyme nutzen Serpine einen einzigartigen Selbstmord-Mechanismus, der in der Ausbildung von irreversiblen Komplexen aus Inhibitor und Zielenzym endet. Diese Komplexe sind SDS- und hitzestabil und können durch Western-Blot nachgewiesen werden (Gettins, 2002b). Ein außergewöhnliches Kennzeichen der Serpin-Protease-Interaktion ist die gravierende Konformationsänderung des Inhibitors, insbesondere die der reaktiven Schleife (*reactive site loop*, RSL). Dieser hochflexible und an der Oberfläche des Serpins exponierte Strang bestimmt maßgeblich die Proteasespezifität des Serpins und wird der Zielprotease als Pseudosubstrat präsentiert. Nach der anfänglichen Acylierungsreaktion, die in der Freisetzung des C-Terminus resultiert, wird das katalytische Zentrum der Protease irreversibel deformiert (Huntington *et al.*, 2000; Gettins, 2002b; Dementiev *et al.*, 2006). Durch diese Deformation wird eine Deacylierungsreaktion, die die Freisetzung der Protease zur Folge hätte, verhindert. Inhibitorische Serpine regulieren vielfältige proteolytische Prozesse wie z. B. die Blutgerinnung, Fibrinolyse, Apoptose oder Nekrose (Silverman *et al.*, 2001; Gettins, 2002b; Luke *et al.*, 2007). Neben diesen Serinprotease-Antagonisten beinhaltet die strukturell hochkonservierte Serpin-Superfamilie aber auch Cysteinprotease-Inhibitoren und nicht inhibitorische Serpine. Nicht inhibitorische Serpine üben ganz unterschiedliche Funktionen aus, dazu gehören z. B. der Hormontransport, die Tumorsuppression oder auch die Blutdruckregulation. Trotz dieser funktionellen Unterschiede und einer Aminosäure-Identität von zuweilen nur 30 % haben alle Mitglieder der Serpin-Familie die gleiche Tertiärstruktur, die immer aus drei β -Faltblättern (sA–sC) und acht bis neun α -Helices (hA–hI) besteht (Abbildung 3) (Gettins, 2002b).

Entscheidend für die Inhibitionsreaktion sind ein exponierter RSL und das β -Faltblatt A. Nach der Spaltung der P1/P1'-Bindung des RSLs durch die Protease wird der N-terminale Bereich des RSLs in das β -Faltblatt A des Inhibitors eingelagert. Dieser N-terminale Bereich ist bei den meisten Serpinen 17 Aminosäuren lang. Durch die Einlagerung wird die kovalent über eine Esterbindung verbundene Protease an den

entgegengesetzten Pol des Inhibitors verlagert (Abbildung 3 B) (Stratikos & Gettins, 1999). Die gespaltene Serpin-Konformation (*relaxed*, R) ist thermodynamisch deutlich stabiler als die metastabile, RSL-exponierte Konformation (*stressed*, S) (Silverman *et al.*, 2001). Neben diesen beiden Konformationen gibt es noch die so genannte latente Serpin-Konformation, bei der der ungespaltene RSL in das β -Faltblatt des Inhibitors inseriert ist (Abbildung 3 C). Vom thermodynamischen Gesichtspunkt aus gesehen liegt diese Konformation zwischen derjenigen von R- und S-Form. „Latente“ Serpine können ihre Zielprotease nicht mehr inhibieren, da der RSL nicht frei zugänglich ist (Gettins, 2002b).

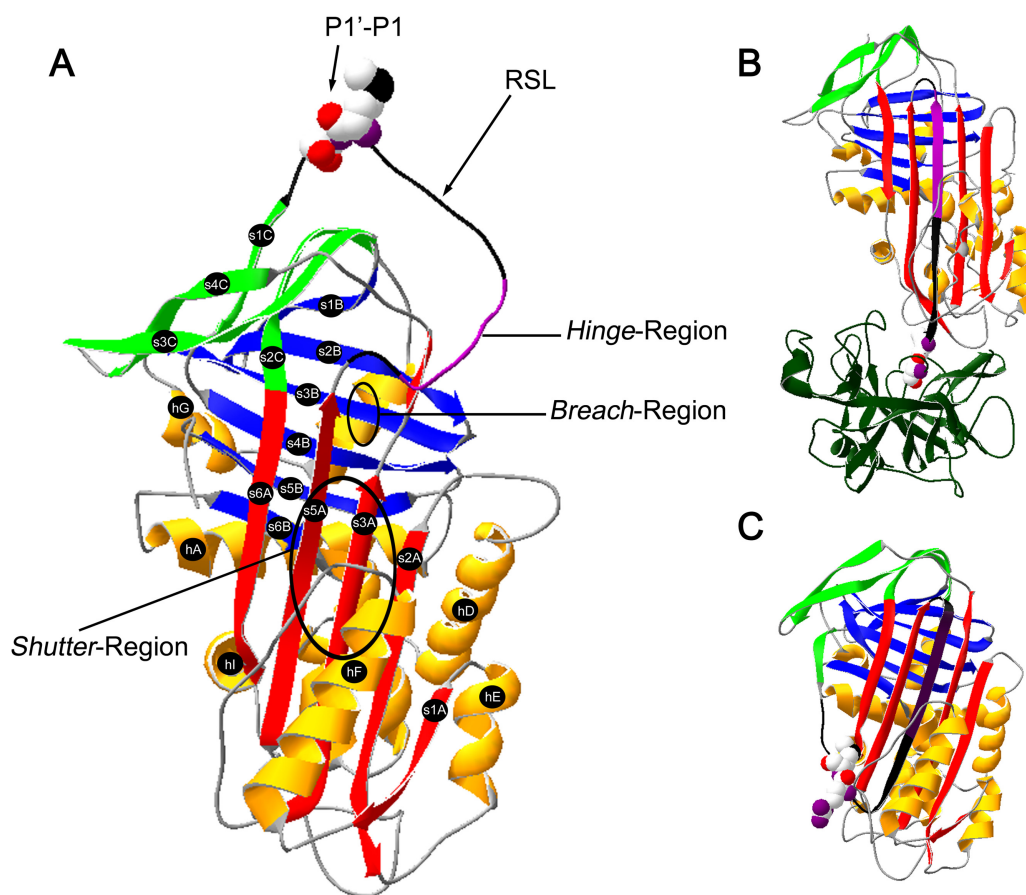


Abbildung 3: Serpinstruktur und Konformationsänderungen. (A) Dargestellt ist α_1 -Antitrypsin (PDB-Struktur: 1QLP) in seiner aktiven, RSL-exponierten Konformation (S-Konformation). Helices sind gelb, β -Faltblätter rot (sA), blau (sB) und grün (sC) gekennzeichnet. Der RSL ist schwarz bzw. lila (Hinge-Region) eingefärbt. Die Proteasespaltstelle (P1-P1') ist in der Kalottendarstellung gezeigt. Weiterhin gekennzeichnet sind die Breach-Region und die Shutter-Region, die für die Insertion des RSLs zwischen die Stränge s3A und s5A wichtig sind. (B) α_1 -Antitrypsin im Komplex mit Elastase (PDB-Struktur: 2D26); die kovalente Bindung zwischen dem P1-Methionin des Inhibitors und dem Ser¹⁹⁵ der Protease ist als Kalottendarstellung gezeigt. (C) Latente Konformation des Serpins PAI-1 (PDB-Struktur: 1DVN). Die P1-P1'-Positionen sind als Kalotten dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Swiss-PDB-Viewer erstellt.

Der latente Zustand wurde zum ersten Mal in einer Kristallstruktur von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1, SERPINE1) entdeckt (Mottonen *et al.*, 1992). Unter physiologischen Bedingungen geht PAI-1 innerhalb von wenigen Stunden von der S-Form in die latente Form über, wodurch seine Aktivität zeitlich begrenzt wird (Hekman & Loskutoff, 1985).

Der Übergang von der S-Form in die R-Form ist ein integraler Bestandteil des Inhibitionsmechanismus von Serpinen. Diese Konformationsänderung wird durch verschiedene Regionen im Serpin kontrolliert und moduliert (Abbildung 3). Bei inhibitorischen Serpinen ist die so genannte *Hinge*-Region (P15-P9) hochkonserviert. P15 ist meistens ein Glycin und P14 ein Threonin oder ein Serin. Die Positionen P12–P9 sind allesamt mit kleinen Aminosäuren besetzt. Die *Hinge*-Region ermöglicht eine schnelle und effiziente Insertion des RSLs in das β -Faltblatt A (Hopkins *et al.*, 1993). Bei den meisten nicht inhibitorischen Serpinen ist diese Region nicht konserviert. Häufig treten große Aminosäuren auf, die eine effiziente und schnelle Insertion des RSLs verhindern (Gettins, 2002b). Die *Breach*- und die *Shutter*-Region sind zwei weitere stark konservierte Regionen, die für den Übergang von der S-Form in die R-Form wichtig sind. Die *Breach*-Region, die oberhalb des β -Faltblatts A lokalisiert ist, ist die Region, in der die Insertion des RSLs beginnt. Die *Shutter*-Region liegt in der Nähe des Zentrums von β -Faltblatt A. Zusammen mit der *Breach*-Region ermöglicht sie die Öffnung des β -Faltblatts, so dass der RSL inserieren kann (Whisstock *et al.*, 2000).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Inhibition der Protease ist eine schnelle Insertion des RSLs. Bei unphysiologischen Interaktionen oder bei mutierten Serpinen ist die RSL-Verlagerung langsamer als die konkurrierende Deacylierungsreaktion. Dies hat zur Folge, dass das Serpin als Substrat der Protease fungiert. Die beiden Konkurrenzreaktionen werden über den *Branched-Pathway*-Mechanismus beschrieben (Abbildung 4) (Huntington *et al.*, 2000; Gettins, 2002b). Über die Geschwindigkeitskonstanten des *Branched-Pathway* ist auch der SI-Wert (*stoichiometry of inhibition*) definiert: $SI = (k_3 + k_4) / k_4$. Der SI-Wert gibt an, wie viele Moleküle Serpin benötigt werden, um ein Molekül Zielenzym zu inhibieren. Reaktionen von physiologischer Relevanz zeichnen sich durch niedrige SI-Werte (~ 1) aus (Gettins, 2002b).

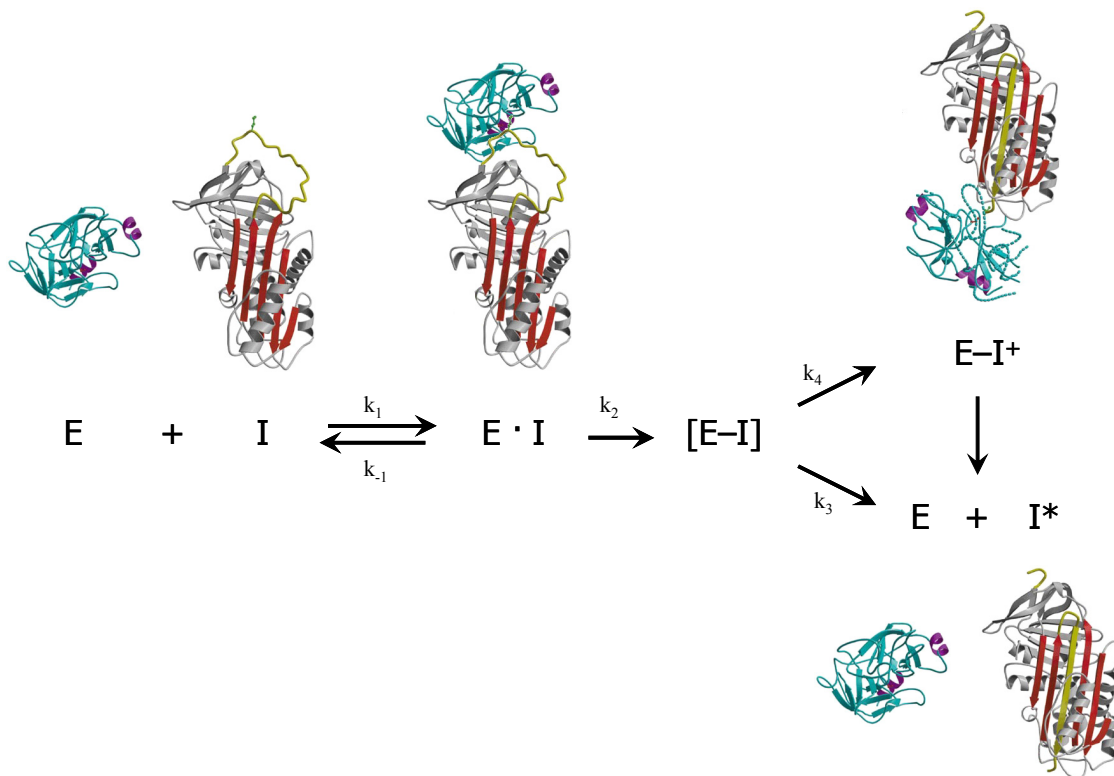


Abbildung 4: Branched-Pathway-Mechanismus von Serpinen. Bei der Interaktion von Protease (E) und Serpin (I) bildet sich zunächst ein nicht-kovalenter Michaelis-Komplex (E·I) aus. Dieser Komplex kann dissoziieren oder nach Spaltung der P1-P1'-Bindung in ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat übergehen [E-I]. Für das Acyl-Enzym-Intermediat gibt es zwei Wege: Bei der irreversiblen Inhibition wird das katalytische Zentrum der Protease durch Einlagerung des RSLs in das β -Faltblatt irreversibel deformiert; das Resultat ist ein kovalenter Komplex (E-I⁺). Alternativ kann auch ein nicht inhibitorischer Weg eingeschlagen werden: Wenn die Geschwindigkeit der RSL-Insertion (k_4) viel kleiner ist als die konkurrierende Deacylierungsreaktion (k_3), fungiert das Serpin als Substrat (I*), was mit der Freisetzung der aktiven Protease einhergeht. Die Abbildung wurde aus der Literatur übernommen (Huntington *et al.*, 2000) und modifiziert.

2.3.1 Serpine als Inhibitoren von Propeptidkonvertasen

Die Proteasespezifität von Serpinen wird vorwiegend durch die Aminosäuresequenz des RSLs bestimmt. Zahlreiche Mutagenesestudien und Analysen natürlich vorkommender Serpin-Mutanten zeigten, dass dabei die Positionen in der benachbarten Umgebung der Proteasespaltstelle – allen voran die P1-Position, an die die Protease bindet – besonders wichtig für die Zielspezifität des Serpins sind (Gettins, 2002b). Ein Beispiel hierfür ist die Pittsburgh-Variante des Serpins α_1 -Antitrypsin, die zum ersten Mal bei einem Patienten mit starken Blutungen nachgewiesen wurde (Owen *et al.*, 1983). Das physiologische Target von α_1 -Antitrypsin, dessen P1-Position mit einem Methionin besetzt ist, ist die neutrophile Elastase. Die Pittsburgh-Variante besitzt an der Position P1 ein Arginin. Diese Mutation führt dazu, dass die neutrophile Elastase nur noch

schwach inhibiert wird. Stattdessen inhibiert die Mutante sehr stark Thrombin, das zentrale Enzym der Blutgerinnung.

Die Möglichkeit, die Spezifität von Serpinen durch ortsspezifische Mutagenese gezielt zu verändern, wurde im Jahre 1993 dazu genutzt, auf der Basis von humanem α_1 -Antitrypsin (A³⁵⁵-I-P-M³⁵⁸↓) durch Veränderung der Positionen P1 und P4 einen sehr effizienten Furin-Hemmstoff (R³⁵⁵-I-P-R³⁵⁸↓) zu erzeugen (Anderson *et al.*, 1993). Dieses als α_1 -PDX designierte „Designer“-Serpine hemmt neben Furin auch noch PC5. Allerdings fungiert ein großer Anteil von α_1 -PDX als PC5-Substrat (Anderson *et al.*, 1993). In der Zwischenzeit wurde vielfach gezeigt, dass durch Transfektion oder exogene Zugabe von α_1 -PDX die Prozessierung zahlreicher PC-Substrate eingedämmt werden kann (Jean *et al.*, 2000; Khatib *et al.*, 2002; Basak, 2005). Diese Studien waren nicht nur aus pharmakologischer Sicht interessant, sie lieferten auch den wichtigen Hinweis, dass Serpine möglicherweise als physiologische Inhibitoren von PCs in Frage kommen. Im Jahre 1998 wurde in einer *in-vitro*-Interaktionsstudie gezeigt, dass das humane Serpin PI8 Furin mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit inhibiert (Dahlen *et al.*, 1998). Dieses Serpin besitzt in seinem RSL mehrere basische Aminosäuren und gehört zur Klasse B der Vertebraten-Serpine. Serpine dieser Klasse besitzen kein N-terminales Signalpeptid und sind daher nicht wie PCs im sekretorischen Pfad lokalisiert. Daher ist unklar, ob diese *in vitro* nachgewiesene Interaktion von physiologischer Relevanz ist. Eine neuere Studie deutet aber darauf hin, dass PI8 möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Furin-Aktivität während der Hämostase spielt (Leblond *et al.*, 2006). Die Autoren zeigen, dass der Inhibitor in Thrombozyten exprimiert wird und nach deren Aktivierung über einen bislang noch ungeklärten Mechanismus in den extrazellulären Raum gelangt, wo er SDS-stabile Komplexe mit einer löslichen Form von Furin bildet. PI8 ist bislang das einzige natürliche Vertebraten-Serpine mit nachgewiesener PC inhibierender Aktivität.

Der bislang potenteste Furin-Inhibitor stammt aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Im Jahre 2002 wurde gezeigt, dass durch alternatives *Splicen* des *Dm-Spn4*-Gens mehr als zehn verschiedene Spn4-mRNAs generiert werden. Diese Transkripte kodieren für acht verschiedene Proteinisoformen mit jeweils vier unterschiedlichen RSLs und unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Lokalisation (Krüger *et al.*, 2002). Eine dieser Isoformen, das Serpin *Dm-Spn4A*, ist von einem N-terminalen Signalpeptid und einem C-terminalen ER-Retentionssignal (HDEL) flankiert. Ebenso wie die intrazelluläre Isoform Spn4E besitzt diese Isoform in ihrem RSL mehrere basische Aminosäuren (Positionen P1, P2, P3 und P4). *Dm-Spn4A* und *Dm-Spn4E* inhibieren *in vitro* sehr effizient humanes Furin (Oley *et al.*, 2004; Osterwalder *et al.*, 2004; Richer *et al.*, 2004). Ebenso hemmen sie das *Dm-PC2*-Homolog (Richer *et al.*, 2004) und bilden SDS-stabile Komplexe mit den *Drosophila*-

Furin-Homologen Dfurin1 und Dfurin2 (Brüning *et al.*, 2007). Durch massenspektrometrische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die PC-Spaltung C-terminal von der Sequenz RRKR↓ im RSL erfolgt. Vieles deutet darauf hin, dass die Isoform *Dm-Spn4A* ein physiologischer Inhibitor von PCs in *Drosophila melanogaster* ist. Durch Kotransfektionsstudien konnte gezeigt werden, dass *Dm-Spn4A* die Prozessierung des Furin-Substrates Apolipoprotein in Insektenzellen unterdrückt (Brüning *et al.*, 2007). Nach Überexpression von *Dm-Spn4A* in neuronalen Zellen zeigten die Fliegen einen Phänotyp, der eine gestörte Prozessierung von Neuropeptiden impliziert (Osterwalder *et al.*, 2004). Immunfluoreszenzstudien von COS-7-Zellen, die transient *Dm-Spn4A* exprimierten, zeigten, dass der Inhibitor im ER lokalisiert ist. Eine Deletion des Signals bewirkte, dass das Serpin von transfizierten COS-7 Zellen sekretiert wurde, wohingegen die natürliche Variante mit HDEL-Signal im Zellinnern zurückgehalten wurde. Die Ergebnisse der Ko- und Überexpressionsstudien sowie die subzelluläre Lokalisation von *Dm-Spn4A* gehen konform mit einer generellen Rolle des Serpins als Inhibitor von PCs im sekretorischen Pfad. Die neueren Untersuchungen zur Funktion des intrazellulären Furin-Inhibitors PI8 deuten darauf hin, dass die intrazelluläre Spn4-Variante *Dm-Spn4E* ebenso eine physiologische Rolle bei der Regulation der PC-Aktivität spielen könnte, wenn auch nicht im vesikulären System des sekretorischen Pfades.

2.4 Serpine und Proproteinkonvertasen in *Branchiostoma*

Der Cephalochordat *Branchiostoma lanceolatum* (Amphioxus, Lanzettfischchen) wird nach den Tunicaten als der engste noch lebende Verwandte der Vertebraten angesehen (Delsuc *et al.*, 2006). Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu Vertebraten ist *Branchiostoma* ein beliebter Modellorganismus zur Erforschung entwicklungs- und evolutionsbiologischer Zusammenhänge. Vom anatomischen Standpunkt aus betrachtet ist das im Meer lebende Lanzettfischchen den niederen Vertebraten sehr ähnlich, allerdings ist es deutlich weniger komplex aufgebaut (Abbildung 5). Statt eines Gehirns besitzt *Branchiostoma* z. B. nur eine Ansammlung von Neuronen. *Branchiostoma* hat keine Knochen, kein richtiges Herz, keine Blutkapillaren, kein Hämoglobin und keine Erythrocyten. Der einfache Körperbau spiegelt sich ebenso in der geringen Komplexität seines Genoms wider (Furlong & Holland, 2002; Holland *et al.*, 2004).

In *Branchiostoma californiensis* konnten drei PC-Gene identifiziert werden. Zwei dieser Gene weisen eine hohe Aminosäureidentität zu den Säuger-PCs PC1/3 und PC2 auf, weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich bei diesen Genen (aPC1/3 und aPC2) um Orthologe der neuroendokrinen Vertebraten-PCs handelt (Oliva *et al.*, 1995). Das dritte PC-Gen (aPC6) von *Branchiostoma* kodiert für drei verschiedenen PC-Isoformen (aPC6A,

aPC6B, aPC6C) deren konservierter Bereich am stärksten mit dem des Vertebraten-PC6-Gens übereinstimmt. Allerdings ist die Übereinstimmung mit Vertebraten-PACE4 und -Furin nur geringfügig niedriger, weshalb das aPC6-Gen auch das Orthologe dieser PC-Gene repräsentieren könnte (Oliva *et al.*, 1995; Bertrand *et al.*, 2006).

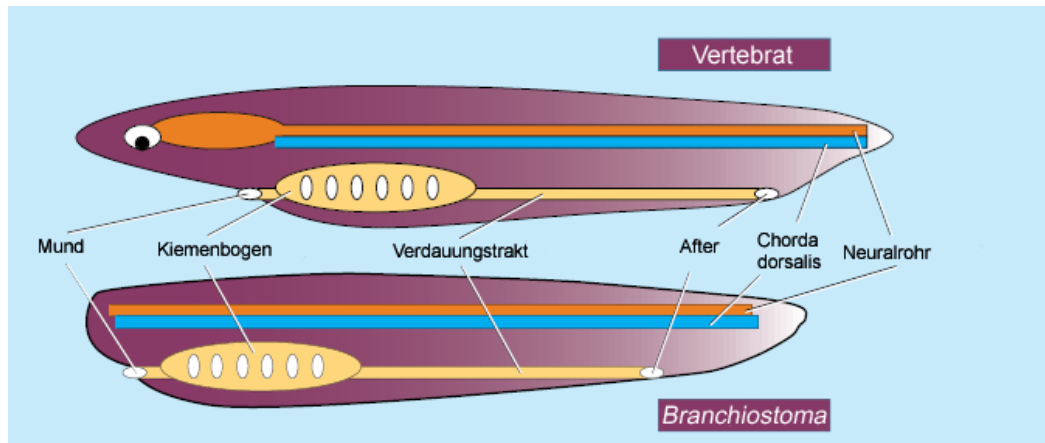


Abbildung 5: Schematischer Vergleich des Cephalochordaten *Branchiostoma* mit einem primitiven Vertebraten. Die Abbildung wurde aus der Literatur entnommen (Finnerty, 2000) und modifiziert.

Neben PC-Genen wurden in *Branchiostoma* auch mehrere Serpin-Gene identifiziert: Mit Hilfe eines RT-PCR-Ansatzes mit degenerativen Primern konnte gezeigt werden, dass *Branchiostoma lanceolatum* mindestens fünf unterschiedliche Serpine exprimiert (O. Krüger, AG Zelluläre Genetik, nicht publizierte Daten). Zwei dieser Serpine (*Bl-Spn1* und *Bl-Spn2*) sind mit einem C-terminalen ER-Retentionssignal ausgestattet, weshalb sie als „Wächter“ des sekretorischen Pfades in Frage kommen. Allerdings sind die RSL-Sequenzen dieser beiden Serpine stark unterschiedlich. *Bl-Spn1* besitzt an den mutmaßlichen P2/P1-Positionen basische Aminosäuren, *Bl-Spn2* dagegen hydrophobe Aminosäuren (Abbildung 6).



Abbildung 6: Vergleich der RSL-Sequenzen von *Bl-Spn1* und *Bl-Spn2*. Das Alignment wurde mit *CLUSTALW* erstellt. Identische Aminosäuren sind invertiert (weiß auf schwarz) dargestellt. Die mutmaßlichen P2/P1-Positionen sind durch Boxen gekennzeichnet.

Bl-Spn1 wurde von Ulf Tödtmann im Rahmen seiner Doktorarbeit rekombinant in *E. coli* exprimiert und in aktiver Form gereinigt (Tödtmann, 2004). Er konnte

nachweisen, dass *Bl-Spn1* SDS-stabile Komplexe mit der Serinprotease Thrombin bildet. Allerdings war die Interaktion sehr langsam, und ein Großteil des Serpins fungierte als Substrat der Protease. Es wurden Antiseren gegen *Bl-Spn1* gewonnen, mit denen das Serpin in den Extrakten von *B. lanceolatum* als 62 kD großes Protein nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte in den Extrakten ein 97 kD großes Protein detektiert werden, das möglicherweise *Bl-Spn1* im Komplex mit einer natürlichen Zielprotease repräsentiert (Tödtmann, 2004). Die physiologische Funktion von *Bl-Spn1* ist bislang unklar. Die Präsenz basischer Aminosäuren im RSL und das C-terminale KDEL-Retentionssignal deuten allerdings darauf hin, dass *Bl-Spn1* eine Rolle bei der Regulation PC-ähnlicher Proteasen in *Branchiostoma* spielen könnte.

3 Ziele der Arbeit

Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Serpin *Dm-Spn4A* aus *Drosophila melanogaster* sehr effizient PCs hemmt und mit diesen im sekretorischen Pfad kolokalisiert. Bislang ist unklar, ob auch Vertebraten die inhibitorische Aktivität von Serpinen zur Regulation von PCs im sekretorischen Pfad nutzen. In *Branchiostoma*, einem nahen Verwandten der Wirbeltiere, wurde kürzlich ein Serpin (*Bl-Spn1*) identifiziert, das aufgrund seiner basischen Aminosäuren im RSL und wegen seines C-terminalen ER-Retentionssignals (KDEL) als „Wächter“ von PCs im sekretorischen Pfad in Frage kommt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob PCs Zielenzyme des *Branchiostoma*-Serpins sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten Komplexierungstests und kinetische Analysen mit verschiedenen PCs durchgeführt werden. Durch Massenspektrometrie sollte weiterhin die Spaltstelle der Zielenzyme von *Bl-Spn1* identifiziert werden. Eine weitere Zielsetzung war es, herauszufinden, ob das KDEL-Motiv von *Bl-Spn1* funktionell ist und das Serpin somit im sekretorischen Pfad zurückgehalten wird. Da *Branchiostoma* ein interessanter Modellorganismus für die Erforschung der Evolution von Vertebraten ist, war weiterhin die Aufklärung der Organisation des *Bl-Spn1*-Gens von Interesse.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Analyse des neuen humanen Serpins SERPINE3, dessen Expression im Jahre 2006 im Rahmen einer PCR-Studie postuliert wurde. SERPINE3 weist wie *Bl-Spn1* eine klassische PC-Erkennungssequenz im RSL auf. Die tatsächliche Expression dieses neuen Serpins war allerdings unklar, da die Sequenz für SERPINE3 lediglich aus dem Humangenom abgeleitet worden war. Es sollte zunächst untersucht werden, ob SERPINE3 exprimiert wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte die cDNA-Sequenz von SERPINE3 isoliert werden. Weiterhin sollten Antikörper gegen das Serpin gewonnen werden, so dass die Expression von SERPINE3 auf Proteinebene analysiert werden konnte. Hierfür sollte das Protein in ausreichenden Mengen in rekombinanter Form produziert werden. Durch Lokalisations-, Interaktions- und weitere Studien sollte darüber hinaus die Funktion dieses neuen Serpins beleuchtet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien wurden in höchst möglichem Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Roth, Roche Diagnostics, Sigma oder Serva bezogen. Spezialchemikalien, Enzyme, Antikörper, Primer und Kits sowie weitere Materialien sind im Text aufgeführt oder dem Anhang zu entnehmen (Abschnitt 8). Für die Herstellung von Lösungen wurde Reinstwasser (dH₂O) verwendet (Milli[®]-Q-Anlage, Millipore). Alle Versuche wurden mit sterilen Gefäßen und Pipettenspitzen durchgeführt. Medien für Bakterien und Lösungen, die für enzymatische Versuche benötigt wurden, wurden durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium, das nach Bedarf mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt wurde (Tabelle 2). Für molekularbiologische Arbeiten wurde der Stamm TOP10 verwendet. Die Expression rekombinanter Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine erfolgte im Stamm BL21(DE3) (Tabelle 2). Die Kulturen wurden auf Festmedium, in Roller- oder Schüttelkulturen bei 220 *rpm* und 37 °C über Nacht inkubiert. Als Ausgangsmaterial für Flüssigkulturen dienten Einzelkolonien von Kulturplatten. Für die Langzeitlagerung von *E. coli*-Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde das Pellet einer 2 mL-Kultur in 500 µL LB-Medium mit 20 % (w/v) Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2: Bakterienstämme und Medien

Bakterienstämme und Medien	Zusammensetzung
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Novagen)	F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
LB-Medium (Lennox L Broth Base)	1 % (w/v) Trypton/Pepton (Roth, #8952.2) 0,5 % (w/v) SELECT Hefe Extrakt (DIFCO, #0127-17-9) 0,5 % (w/v) NaCl
LB-Medium-Amp	LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin (Roth, #K029.2)
LB-Medium-Kan	LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin (Invitrogen, #11815)
LB-Agar (Lennox L Agar)	1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) SELECT Hefe Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,2 % (w/v) Agar (Sigma, #A-7002)
LB-Agar-Amp	LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin
LB-Agar-Kan	LB-Agar mit 30 µg/mL Kanamycin
SOC-Medium	0,5 % (w/v) SELECT Hefe Extrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose

Die Medien wurden in dH₂O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Antibiotika wurden nach Abkühlen der Lösungen zugesetzt.

4.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Sambrook & Russel, 2001). Hierzu wurden 250 mL LB-Medium mit 10 mL einer frischen Übernachtskultur beimpft und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (4 °C, 4000 × g, 10 min) und in 65 mL einer eiskalten MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut zentrifugiert und das Pellet in 13 mL einer CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach einer letzten Inkubationsperiode auf Eis (20 min) wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 2,6 mL 85 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50 µL-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein 50 µL-Aliquot mit 100-300 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 s bei 42 °C) wurden die Zellen

für 4 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 750 µL SOC-Medium (Tabelle 2) vermischt und bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Es wurden verschiedene Volumina auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 RNA-Isolierung aus tierischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen erfolgte mit TRIZOL, einer monophasischen Lösung, bestehend aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol (Chomczynski, 1993). Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 mL TRIZOL (Tabelle 3) pro 10 cm² Kulturoberfläche resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 12000 × g, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 200 µL Chloroform – Isoamylalkohol (24:1) je mL TRIZOL versetzt und die Proben anschließend 2 min heftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (15 min, 12000 × g, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und der Chloroform-Schritt so lange wiederholt, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Zur Fällung der RNA wurde die Lösung mit einem halben Volumen Isopropanol gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (s. o.). Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (5 min Inkubation, 5 min Zentrifugation), die RNA bei Raumtemperatur für ca. 10 min getrocknet und anschließend in DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 3: Lösungen für die RNA-Isolierung mit TRIZOL

Lösung	Zusammensetzung
TRIZOL	3,05 g Ammoniumthiocyanat 9,44 g Guanidiniumthiocyanat 5,75 mL Glycerin 3,33 mL 3 M Natriumacetat (NaAc), pH 8,0 40 mL DEPC-Wasser pH 5,0 einstellen mit Essigsäure und autoklavieren 38 mL Roti [®] -Aqua-Phenol (Roth, #A980.1)
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC in Wasser, 1 h rühren, autoklavieren

4.3.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA mit RNA-abhängigen DNA-Polymerasen in cDNA (*copy*-DNA) umgeschrieben. Für die Reverse Transkription wurde das *RevertAid H Minus M-MuLV RT*-Kit (Fermentas, #K1631) mit Oligo(dT)₁₈-Primern nach den Herstellerangaben verwendet (Fermentas, 2004). Die im Kit enthaltene Reverse Transkriptase ist eine genetisch modifizierte Version der Reversen Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus. Für jede Reaktion wurden standardmäßig 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

4.3.3 Isolierung genomischer DNA aus *Branchiostoma lanceolatum*

Zur Isolierung genomischer DNA aus adulten Lanzettfischchen (*Branchiostoma lanceolatum*) wurde das *DNeasy Tissue Kit* der Firma Qiagen (#69504) entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Qiagen, 2004). Die Tiere (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Helgoland) wurden lebendig in Meerwasser geliefert und direkt nach Erhalt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Isolierung wurde ein Tier mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerstoßen und 25 mg Gewebe mit Proteinase K enzymatisch über Nacht aufgeschlossen (Qiagen, 2004). Anschließend wurde die genomische DNA selektiv an eine Silikamembran gebunden, gewaschen und mit 200 µL Elutionspuffer eluiert.

4.3.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte (Saiki *et al.*, 1985). Die Methode wurde zur Amplifikation gezielter Bereiche von cDNA und genomischer DNA und zur gerichteten Einführung von Mutationen in *Template*-DNAs eingesetzt.

Für die meisten PCRs wurden der in Tabelle 4 beschriebene PCR-Ansatz und das in Tabelle 5 dargestellte Programm verwendet. Wenn die Sequenz-Integrität der Amplifikate entscheidend war, wurde *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* als Synthesenzym eingesetzt, da diese Polymerase über eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion verfügt (Lundberg *et al.*, 1991). Analytische PCRs wurden mit *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* durchgeführt. Zur Bestimmung von Primer-*Annealing*-Temperaturen (T_A) wurde das Programm *Oligo Analyzer* 3.0 verwendet (Abschnitt 8.4). Die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.2).

Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen
<i>Template</i>	cDNA: 250 ng/ μ L Plasmid-DNA: ca. 0,3-0,5 ng/ μ L genomische DNA: ca. 180 ng/ μ L	1 μ L
10 \times Puffer (PeqLab, #01-1020) (Promega, #M774)	10 \times	5 μ L
Primer	10 μ M	je 2 μ L
dNTPs (Fermentas, #R0181)	10 mM je dNTP	1 μ L
Polymerase <i>Taq</i> (PeqLab, #01-1020) <i>Pfu</i> (Promega, #M774)	<i>Taq</i> : 5 U/ μ L <i>Pfu</i> : 2,5 U/ μ L	0,5 μ L
H ₂ O		ad 50 μ L

Tabelle 5: Standard-PCR-Programm

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur	Schritt
1 \times	3 min	95 °C	1. Denaturierung
25-40 \times	30 s	95 °C	Denaturierung
	30-40 s 1 min/kb (<i>Taq</i>) bzw. 2 min/kb (<i>Pfu</i>)	variabel 72 °C	<i>Annealing</i> Elongation
1 \times	10 min	72 °C	Finale Elongation
1 \times	∞	4 °C	Lagerung

Die Einführung gezielter Punktmutationen erfolgte in Anlehnung an die *QuickChange Site[®]-Directed Mutagenesis*-Methode von Stratagene (Stratagene, 2004). Diese Methode nutzt komplementäre Primerpaare, die die gewünschten Mutationen mittig, flankiert von jeweils 15-20 komplementären Nukleotiden, tragen.

Tabelle 6: Mutagenese-PCR

Mutagenese-PCR-Ansatz	Mutagenese-PCR-Programm
50 ng Plasmid-DNA	3 min bei 95 °C
5 μ L 10 \times <i>Pfu</i> -Puffer	1 \times
250 ng je Primer	30 s bei 95 °C
1 μ L <i>Pfu</i> -Polymerase	1 min bei 55 °C
1 μ L dNTPs (je 10 mM)	2 min/kb bei 72 °C
ad 50 μ L mit H ₂ O	18 \times
	10 min bei 72 °C
	1 \times

Jeder Strang des zirkulären Parentalplasmids wird, ausgehend von den Primern, mit Hilfe einer *Proofreading*-Polymerase kopiert, so dass jeder neu synthetisierte Plasmid-Strang die gewünschte Mutation enthält (Tabelle 6). Im Anschluss an die PCR wird die methylierte, nicht-mutierte Parental-DNA durch Verdau mit *DpnI* (10 U, 1 h bei 37 °C) abgebaut und 5 µL des Ansatzes in kompetente Bakterien transformiert (Abschnitt 4.2.2).

4.3.5 Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren lassen sich mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe auftrennen. Im elektrischen Feld wandern die aufgrund ihres Phosphodiesterückgrates negativ geladenen Moleküle zur Anode.

Tabelle 7: Puffer und Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese

Puffer/Reagenz	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris 40 mM Natriumacetat (NaAc) 1 mM EDTA, pH 8,0
10 × DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromophenolblau 0,1 % (w/v) SDS 0,1 M EDTA in 10 x TAE-Puffer
DNA-Größenstandards	GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter (Fermentas, #SM0312) 100 Bp DNA-Leiter (Genecraft, # GC-015-004)
MOPS-Puffer	10 mM MOPS 4 mM NaAc 0,5 mM EDTA, pH 7,0
RNA-Ladepuffer	0,15 % (v/v) 10 x MOPS-Puffer 0,19 % (v/v) Formaldehyd 0,66 % (v/v) Formamid
Formaldehyd-Gel	1,5 % (w/v) Agarose 10 % (v/v) 10 x MOPS-Puffer 3,5 % (v/v) 37 % Formaldehyd in Wasser

DNA-Fragmente wurden in 0,8-3,0 %igen (w/v), mit 1 × TAE gegossenen Agarosegelen aufgetrennt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Beladen mit 10 × DNA-Ladepuffer vermischt. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde parallel ein

DNA-Größenstandard aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 140 V in $1 \times$ TAE-Puffer.

Zur Überprüfung der Qualität von RNA-Präparationen wurde eine denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Probenvorbereitung wurden 8 μ L RNA (ca. 1-3 μ g) mit 20 μ L RNA-Ladepuffer gemischt und für 15 min bei 65 °C erhitzt. Nach der Zugabe von 3,9 μ L Glycerin mit Bromphenolblau wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V.

DNA- und RNA-Gele wurden in einem 0,5 %igen Ethidiumbromidbad für 5 min gefärbt, 10 min gewässert und schließlich unter UV-Licht (312 nm) mit einem Doc-Print II System der Firma Vilber Lourmat photographiert.

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, #28706) gemäß den Herstellerangaben verwendet (Qiagen, 2002). Die Elution der DNA erfolgte mit 30 μ L 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

4.3.6 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch mit UV/VIS-Spektrophotometern der Firmen Shimadzu (UV-1602) bzw. Nanodrop Technologies (Nanodrop® ND-1000) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Grundlage für die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ist das Lambert-Beer'sche Gesetz. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 μ g/mL doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/mL einzelsträngiger RNA (Sambrook & Russell, 2001).

Tabelle 8: Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Lambert-Beer'sches Gesetz $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$	A: Absorption ε : molarer Absorptionskoeffizient [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] c: Konzentration [$mol \cdot L^{-1}$] d: Weglänge des Lichtes [cm]
Weglänge des Lichts	Shimadzu-Photometer: 1 cm Nanodrop: 0,1 cm und 0,02 cm

Zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden zusätzlich die Extinktionswerte bei 280 nm gemessen. Ein Quotient $OD_{260/280}$ zeigt an, ob eine Nukleinsäurelösung mit Proteinen verunreinigt ist. Bei reinen DNA-Lösungen liegt das Verhältnis oberhalb von 1,8, bei reinen RNA-Lösungen oberhalb von 2,0 (Sambrook & Russell, 2001).

4.3.7 Plasmidisolierung

Zur Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im analytischen Maßstab wurde das *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* eingesetzt (Fermentas, #K0503). Für die präparative Plasmidgewinnung wurde das *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, #12662) verwendet. Nach Freisetzung der Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) wurde die Plasmid-DNA durch Adsorptionschromatographie an einer Silicamembran (*Miniprep*) oder über Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Isoopropanol Fällung (*Maxiprep*) gereinigt. Die Reinigungen wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt (Qiagen, 2005; Fermentas, 2006). Mit dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* konnten durchschnittlich 5 bis 20 µg Plasmid-DNA aus 3 mL Bakterienkultur isoliert werden. Die Ausbeuten bei Maxipräparationen aus 250 mL-Kulturvolumen beliefen sich auf 200 bis 600 µg Plasmid-DNA.

4.3.8 Restriktionsspaltung

Die Spaltung von Plasmid-DNA und cDNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (NEB) und Fermentas gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für analytische Zwecke (300 ng DNA) betrug die Inkubationszeit 1 bis 3 h, für präparative Spaltansätze (1 bis 3 µg DNA) 5 bis 24 h.

4.3.9 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das *Quick Ligation™ Kit* der Firma NEB (#M2200) entsprechend der Herstellerangaben verwendet (New England Biolabs, 2006). Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase (Fermentas, #EF0341) dephosphoryliert. Hierzu wurden 30 µL gereinigter Vektor mit 1 U alkalischer Phosphatase vermischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert (10 min, 85 °C).

4.3.10 „TA“-Subklonierung

PCR-Produkte wurden durch Subklonierung in so genannte „TA“-Vektoren gesichert. Verwendet wurden die Vektoren pCR[®]4-Topo[®] (Invitrogen, #K4575) und pGEM[®]-T (Promega, #A3600). Die Klonierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen, 2006; Promega, 2007).

4.3.11 Expressionsplasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene bakterielle und eukaryotische Expressionsplasmide für die Serpine *Bl-Spn1*, SERPINE3 und deren Mutanten erzeugt. Ausgangspunkt für die Herstellung der verschiedenen Expressionskonstrukte waren Plasmide mit entsprechenden cDNA-Inserts oder cDNA-Pools, aus denen mit spezifischen Primern das zu klonierende Zielfragment amplifiziert wurde. PCR-Amplifikate wurden zur Sicherung wie beschrieben subkloniert (Abschnitt 4.3.10). Die Insert tragenden Plasmide und der Ziel-Vektor wurden mit den in Tabelle 10 aufgeführten Restriktionsenzymen gespalten (Abschnitt 4.3.8). Insert- und Vektor-Fragmente wurden durch Gelextraktion gereinigt (Abschnitt 4.3.5), ligiert (4.3.9) und anschließend in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (Abschnitt 4.2.2). Aus den Einzelkolonien wurden 3 mL-Flüssigkulturen angezogen (4.2.1) und die Plasmide der Bakterien wie unter Abschnitt 4.3.7 beschrieben isoliert. Die Integrität der Konstrukte wurde durch Sequenzierung (4.3.12) oder im Falle einfacher Umklonierungen durch Restriktionsspaltung bestätigt. In Tabelle 9 sind alle Konstrukte aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden. In Tabelle 10 ist dargestellt, wie die verschiedenen Expressionsvektoren hergestellt wurden. Alle bakteriellen Expressionskonstrukte basieren auf dem Vektor pKM-263 (Melcher, 2000). Zur Herstellung eukaryotischer Expressionskonstrukte wurden die Vektoren pcDNA3.1+, pSecTag2B oder pCEP4 verwendet. Der Aufbau dieser Vektoren ist im Anhang dargestellt (Absatz 8.1).

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Plasmidname (interne Nummer)	Kodiert für / Kommentar	Vektor	Hersteller/Bezugsquelle
pKM-263 (Nr. 133)	bakterieller Expressionsvektor		Karsten Melcher (Melcher, 2000)
pcDNA3.1+ (Nr. 73)	eukaryotischer Expressionsvektor		Invitrogen
pSecTag2B (Nr. 148)	eukaryotischer Expressionsvektor		Invitrogen
pCEP4 (Nr. 240)	eukaryotischer Expressionsvektor		Invitrogen
pUT16 (Nr. 125)	enthält <i>Bl-Spn1</i> cDNA	pCR [®] 4_Topo [®]	Ulf Tödtmann
pUT18 (Nr. 127)	GST- <i>Bl-Spn1</i> (AS 16-407)	pGEX-4T-3	Ulf Tödtmann
pUT19 (Nr. 128)	His ₆ -GST- <i>Bl-Spn1</i> (AS 16-407)	pKM-263	Ulf Tödtmann (Tödtmann, 2004)
pKM-V1 (Nr. 134)	His ₆ -GST- <i>Spn4A/E</i> (AS 1-392 von <i>Dm-Spn4E</i>)	pKM-263	Mareke Oley (Oley, 2006)

Fortsetzung der Tabelle 9

Plasmidname (interne Nummer)	Kodiert für / Kommentar	Vektor	Hersteller/Bezugsquelle
pCB3.1Spn1 (Nr. 169)	<i>Bl</i> -Spn1 (AS 15-407)/ kein Signalpeptid	pcDNA3.1+	Caterina Bentele
pCB3.1Spn1wSp (Nr. 170)	<i>Bl</i> -Spn1 (AS 1-407)	pcDNA3.1+	Caterina Bentele
pCB3.1Spn1Mut (Nr. 171)	<i>Bl</i> -Spn1 Δ KDEL (AS 1-403)/ <i>Bl</i> -Spn1 ohne C-terminales KDEL- Motiv	pcDNA3.1+	Caterina Bentele
pTOPO_E3 (Nr. 199)	enthält SERPINE3 cDNA (AS 1-404) Sequenz, siehe Abschnitt 8.3.3	pCR [®] 4_Topo [®]	Caterina Bentele
pFUK_E3 (Nr. 200)	SERPINE3 (AS 1-404)	pcDNA3.1+	Caterina Bentele
pKM_INA_E3 (Nr. 201)	His ₆ -GST-SERPINE3 (AS 18-404)	pKM-263	Caterina Bentele
LuckyLoop (Nr. 202)	<i>Bl</i> -Spn1-Mutante mit SERPINE3 RSL-Sequenz (P9-P2')	pKM-263	Caterina Bentele
pTerminator3C (Nr. 242)	His ₆ -SERPINE3 (AS 21-404)/ IgG κ Signalsequenz	pSecTag2B	Oliver Krämer (Krämer, 2007)
pKKS-E3 (Nr. 210)	SERPINE3 (AS 1-404)/ mit optimierter Kozak-Sequenz	pcDNA3.1+	Caterina Bentele
pT3C-P1A (Nr. 244)	SERPINE3 (AS 21-404) mit Alanin an Position P1; IgG κ Signalsequenz	pSecTag2B	Caterina Bentele
pT3C-P2A (Nr. 245)	SERPINE3 (AS 21-404) mit Alanin an Position P2; IgG κ Signalsequenz	pSecTag2B	Caterina Bentele
pCEP4-T3C (Nr. 243)	SERPINE3 (AS 21-404); IgG κ Signalsequenz	pCEP4	Caterina Bentele
pCEP4-T3C-P1A (Nr. 246)	SERPINE3 (AS 21-404) mit Ala an P1; IgG κ Signalsequenz	pCEP4	Caterina Bentele
pCEP4-T3C-P2A (Nr. 247)	SERPINE3 (AS 21-404) mit Ala an P2; IgG κ Signalsequenz	pCEP4	Caterina Bentele
pCEP4-EGFP (Nr. 248)	EGFP	pCEP4	Caterina Bentele
pWTBI1 (Nr.1)	HCII (AS 1-527)	pCDM8	Hermann Ragg

Tabelle 10: Konstruktion von Expressionsplasmiden

Plasmidname	Vektor	Herkunft des Inserts	Kloniert über
pCB3.1Spn1	pcDNA3.1+	pUT18	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI
pCB3.1Spn1wSp	pCB3.1Spn1	pUT16	<i>Nhe</i> I, <i>Bsg</i> I
pCB3.1Spn1Mut	pCB3.1Spn1wSp	PCR mit Primerpaar 8/12 <i>Template</i> : pCB3.1Spn1wSP	<i>Sac</i> II, <i>Eco</i> RI
pTOPO_E3	pCR [®] 4_Topo [®]	<i>Nested</i> -PCR mit den Primerpaaren 13/14 und 15/16; <i>Template</i> : A549 cDNA	TA Klonierung
pFUK_E3	pcDNA3.1+	pTOPO_E3	<i>Eco</i> RI
pKM_INA_E3	pKM-263	PCR mit Primerpaar 17/18 <i>Template</i> : pTOPO_E3	<i>Xho</i> I, <i>Nco</i> I
pLuckyLoop	pKM-263	Mutagenese-PCR mit Primerpaar 19/20 <i>Template</i> : pUT19	
pKKS-E3	pcDNA3.1+	Mutagenese-PCR mit Primerpaar 23/24 <i>Template</i> : pFUK_E3	<i>Eco</i> RI
pT3C-P1A	pSecTag2B	Mutagenese-PCR mit Primerpaar 25/26 <i>Template</i> : pTerminator3C	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I
pT3C-P2A	pSecTag2B	Mutagenese-PCR mit Primerpaar 27/28 <i>Template</i> : pTerminator3C	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I
pCEP4-T3C	pCEP4	pTerminator3C	<i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I
pCEP4-T3C-P1A	pCEP4	pT3C-P1A	<i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I
pCEP4-T3C-P2A	pCEP4	pT3C-P2A	<i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I
pCEP4-EGFP	pCEP4	pIRES-EGFP (M. Kathib)	<i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I

Zur Herstellung der verschiedenen Expressionsplasmide (Spalte 1) wurden Vektor- (Spalte 2) und *Insert*plasmide (Spalte 3) mit Restriktionsenzymen gespalten (Spalte 4), durch Gelextraktion gereinigt, ligiert und transformiert. Die Sequenzen von Primern, die zur Herstellung von *Insert*sequenzen benötigt wurden, sind dem Anhang zu entnehmen (Abschnitt 8.2). Die Karten der kommerziell erhältlichen Vektoren pCEP4, pSecTag2B, pcDNA3.1+ und pKM-263 sind ebenfalls im Anhang dargestellt (Abschnitt 8.1).

4.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung von cDNA-Sequenzen in Plasmiden erfolgte, wie beschrieben (Tödtmann, 2004), nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode mit Hilfe eines *LiCor DNA Sequencer 4200S-1*-Sequenziersystems (Sanger, 1977). Teilweise wurden die Sequenzierungen in Auftrag gegeben (MWG-Biotech oder AG Weishaar, Uni Bielefeld). Die verwendeten Sequenzierprimer sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.2).

4.4 Expression und Reinigung von His₆-GST-Serpin-Fusionsproteinen

Zur Expression von His₆-GST-Fusionsproteinen wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3), mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert (Tabelle 11). Anschließend wurden 200 mL LB-Medium-Amp (Tabelle 2) mit 10 mL einer frischen *E. coli* BL21(DE3) Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 unter Schütteln in AnzuchtKolben (1 L) kultiviert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch die Zugabe von 0,1-0,5 mM IPTG induziert. Nach weiterer Kultivierung bei 30° C (5 h) oder RT (12 h) wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und bei 4000 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Tabelle 11). Das Pellet wurde einmal mit PBS (Tabelle 12) gewaschen und anschließend bei -80 °C gelagert.

Tabelle 11: Expressionsparameter

Fusionsprotein	Plasmid (Abschnitt 4.3.11)	Expressionsparameter
His ₆ -GST- <i>Bt</i> -Spn1	pUT19	0,5 mM IPTG 5 h Expression, 30 °C
His ₆ -GST-SERPINE3	pKM-INA-E3	0,2 mM IPTG, 12 h Expression, RT
His ₆ -GST-LuckyLoop	pLuckyLoop	0,2 mM IPTG 12 h Expression, RT
His ₆ -GST-Spn4A/E	pKM-V1	0,2 mM IPTG 12 h Expression, RT

Zur Reinigung von His₆-GST-Fusionsproteinen wurden die Bakterienpellets auf Eis aufgetaut und in Equilibrierungspuffer (Tabelle 12) mit 1 mM PMSF resuspendiert (5 mL pro Pellet). Lösliche Proteine wurden durch zwei *French-Press*-Passagen (SLM Aminco) bei 1415 bar freigesetzt und unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugation (30000 × g, 4 °C, 10 min) entfernt. Der geklärte Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und Fusionsproteine im *Batch*-Verfahren oder mit einer *fast performance liquid chromatography* (FPLC)-Anlage (GE Healthcare) an Glutathion-Sepharose wie folgt gereinigt:

Tabelle 12: Puffer und Materialien für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Puffer/Material	Zusammensetzung/Bezugsquelle
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Equilibrierungspuffer	PBS, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,3
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8,2
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, #17-0756-01
PD-10 Säulen	GE Healthcare, #17-0435-01

Reinigung im *Batch*-Verfahren:

Der geklärte Überstand wurde mit equilibrierter Glutathion-Sepharose (250 µL Suspension pro Pellet) für 1,5 h bei 4° C und 0,5 h bei RT unter leichtem Schütteln in PD-10 Säulen inkubiert. Nach Waschen mit Equilibrierungs- und Waschpuffer (jeweils dreimal, 10 mL) wurden gebundene Proteine mit 3 mL Elutionspuffer eluiert und in 500 µL-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 4.7.1) und Fraktionen mit hohem Fusionsproteinanteil vereinigt. Die Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder zur Entfernung des His₆-GST-*Tags* mit TEV-Protease behandelt (4.4.1).

Reinigung über FPLC:

Der Aufbau der FPLC-Anlage wurde bereits ausführlich in vorangehenden Arbeiten beschrieben (Tödtmann, 2004; Eckert, 2005). Alle Puffer wurden auf Eis gekühlt und unmittelbar vor der Verwendung mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.

Zur Reinigung wurde eine mit 5 mL Glutathion-Sepharose-Suspension gepackte C10/10 Leersäule (GE Healthcare) zunächst mit 10 Säulenvolumen (*column volume, cv*) Equilibrierungspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min equilibriert. Die Beladung der Säule mit geklärtem *French-Press*-Lysat erfolgte über eine externe 5 mL Injektionsschleife am Motorventil MV7 mit einer Flussrate von 0,2 mL/min. Nach der Probenauftragung wurde zunächst mit 10 *cv* Equilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde solange mit Waschpuffer gewaschen, bis das UV-Signal den Ausgangswert erreicht hatte (Flussrate: 1 mL/min). Zur Elution gebundener Proteine wurde Elutionspuffer mit 0,3 mL/min über die Säule geleitet und 0,5 oder 1 mL Fraktionen gesammelt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie für das *Batch*-Verfahren beschrieben.

Bradford-*Assay*:

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Bradford-*Assay* angewendet. Dieser Test beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs im sauren Milieu von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit dem *Coomassie Protein Assay Reagent* der Firma Pierce (#23200) durchgeführt. Zunächst wurden 20 µL Probe, Eichstandard (25-1000 µg/mL BSA) oder Referenzlösung mit 250 µL Coomassie-Reagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben in einem Mikrotiterlesegerät (BioTek) bei 595 nm gemessen und anhand der Eichgeraden (linearer Bereich) die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

4.4.1 Entfernung des GST-Tags durch die TEV-Protease

Zur Abtrennung des His₆-GST-Tags an Fusionsproteinen wurde die TEV-Protease aus dem *Tobacco Etch Virus* (TEV) eingesetzt. Die TEV-Protease erkennt die Aminosäuresequenz E-N-L-Y-F-Q-↓-(G/S') und hydrolysiert die Peptidbindung zwischen der sechsten (P1) und der siebten (P1') Aminosäure ihrer Erkennungssequenz. Mutagenesestudien zeigten, dass die TEV-Protease an der P1'-Position eine Vielzahl von Aminosäuren toleriert (Kapust *et al.*, 2002). Fusionskonstrukte können daher so konzipiert werden, dass die nach der Spaltung freigesetzten Proteine keine zusätzlichen Aminosäuren der TEV-Erkennungsstelle beinhalten, sondern mit ihrer natürlichen Aminosäure beginnen. Die in dieser Arbeit verwendete AcTev-Protease (Invitrogen, #12575) ist eine genetisch veränderte Form der TEV-Protease, die sich durch eine höhere Stabilität auszeichnet, über einen breiten Temperaturbereich aktiv ist und N-terminal mit einem His₆-Tag versehen ist (Invitrogen, 2003).

Für die Spaltung wurden ca. 0,5-1 mg gereinigtes Fusionsprotein mit 100 U AcTev-Protease über Nacht (ÜN) bei 4 °C inkubiert. Die Protease und der freigesetzte His₆-GST-Tag wurden anschließend durch *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) abgereichert. Hierfür wurden *Protino*® Ni 2000 Säulen (Macherey Nagel, #745120, 1 mL Bettvolumen) mit 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,15 % Triton X-100, pH 8,0 equilibriert und der TEV-Spaltansatz zur Verhinderung unspezifischer Bindungen auf eine Endkonzentration von 300 mM NaCl eingestellt. Der Ansatz wurde auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurde mit 3 mL Equilibrierungspuffer gewaschen. Es wurden 0,5 mL Fraktionen aufgefangen, die aliquotiert und bei -80 °C gelagert wurden. Die höchste Serpin-Konzentration lag zumeist in der ersten Elutionsfraktion vor.

4.5 Gewinnung eines Anti-SERPINE3-Antiserums

Die Gewinnung polyklonaler Anti-GST-SERPINE3-Antikörper wurde als externe Auftragsarbeit von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) vorgenommen. Für die Immunisierung eines Kaninchens wurde His₆-GST-SERPINE3 in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und das Fusionsprotein durch FPLC gereinigt (Abschnitt 4.4). Die verschiedenen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon YM-30-Säulen ankonzentriert. Dem Unternehmen wurden schließlich vier Gefäße mit jeweils 100 µg gereinigtem Protein (250 ng/µL) auf Trockeneis zugeschickt. Die Immunisierung erfolgte nach dem firmeneigenen Standardprotokoll mit jeweils vier 100 µg-Injektionen in zweiwöchigen bzw. vierwöchigen Abständen. Die Blutentnahmen fanden 37, 65 und 85 Tage nach Start der Immunisierung statt (2 mL, 22 mL bzw. 60 mL Antiserum). Die

SERPINE3-Antiseren, ebenso wie das mitgelieferte Präimmenserum (2 mL) wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Ein Teil des Serums des 85. Tages wurde durch Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 4.10.1).

4.6 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank (Lamine Air HB2448, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank (Begasungsbrutschrank Forma Scientific; Model 3336) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 6 % CO₂.

4.6.1 Zelllinien und Kulturmedien

Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Zelllinien COS-7 und HEK-293-EBNA wurden zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. Alle anderen Zelllinien wurden für analytische Zwecke kultiviert.

Tabelle 13: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung (Literatur)	Bezugsquelle
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze; transformiert mit einer Replikationsursprungsdefekten SV40-Mutante (Gluzman, 1981)	ATCC #CRL1651
A549	epithelartige, humane Lungenkarzinom-Zelllinie (Giard <i>et al.</i> , 1973)	ECACC #86012804
HepG2	epithelartige, humane Leberkarzinom-Zelllinie (Aden <i>et al.</i> , 1979; Knowles <i>et al.</i> , 1980)	ECACC #85011430
HEK-293T	humane, embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie; exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus; Ursprungszelllinie: HEK-293 (Graham <i>et al.</i> , 1977)	H. Thie Uni. Braunschweig
HEK-293-EBNA	humane, embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie; exprimiert das EBNA-1 Gen des Epstein-Barr-Virus Ursprungszelllinie: HEK-293 (Graham <i>et al.</i> , 1977)	AG Frey, Uni. Bielefeld
MCF-7	epithelartige, humane Brust-Adenokarzinom-Zelllinie (Soule <i>et al.</i> , 1973)	ATCC #HTB22
Ramos	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Klein <i>et al.</i> , 1975; Farrell <i>et al.</i> , 1991)	DMSZ #ACC 603
HL-60	humane promyeloische Leukämie-Zelllinie (Collins <i>et al.</i> , 1977; Gallagher <i>et al.</i> , 1979; Dalton <i>et al.</i> , 1988)	DMSZ #ACC 3

4.6.2 Stammhaltung und Zellpassagierung

Alle Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen mit Polystyroloberfläche gezüchtet (Firma Nunc, Modell Nunclon). Die zur Kultivierung verwendeten Medien sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Medien zur Kultivierung von Zelllinien

Zelllinie	Medien
COS-7, A549, HEK-293T	DMEM Flüssigmedium (PAA, #E15-843) 10 % FCS (PAA, #A15-105)
HEK-293-EBNA (nicht transfiziert)	DMEM Flüssigmedium 250 µg/mL G418 (Invitrogen, #10153-219) 10 % FCS
HEK-293-EBNA (transfiziert)	DMEM Flüssigmedium 250 µg/mL G418 (Invitrogen, #10153-219) 400 µg/mL Hygromycin (Roth, #CP12.2) 20 % FCS (vier Wochen nach der Transfektion: 10 % FCS)
HL-60, Ramos, MCF-7, HepG2	RPMI 1640 Flüssigmedium (PAA #E15-848) 10 % FCS

Adhärent wachsende Zelllinien (alle Zelllinien mit Ausnahme von Ramos und HL-60) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dann zur weiteren Expansion von der Kulturoberfläche gelöst und in neue Gefäße überführt. Hierfür wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, anschließend mit einem Gemisch aus 0,5 mg/mL Trypsin und 0,22 mg/mL EDTA in PBS (PAA, #L11-044) bedeckt und für kurze Zeit (1-3 min) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Ablösung von HepG2 Zellen wurde EDTA-freies Trypsin verwendet (2,5 mg/mL in PBS, PAA, #L11-001). Der Trypsinierungsvorgang wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt. Die schnell proliferierenden Zelllinien COS-7, HEK-293T, HEK-293-EBNA (Wildtyp) und A549 wurden alle drei Tage 1:3 bis 1:5 ausverdünnt. Die Linien MCF-7 und HepG2 wurden alle fünf Tage 1:2 geteilt. Die in Suspension wachsenden Zelllinien Ramos und HL-60 wurden zweimal wöchentlich 1:3 verdünnt. Hierfür wurden die Zellen bei 700 × g für 5 min abzentrifugiert, in neuem Medium resuspendiert und auf neue Flaschen verteilt.

4.6.3 Zellzahlbestimmung

Zellzahlen wurden entweder manuell mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder automatisch mit Hilfe des CEDEX-Zellzählgerätes (Innovatis AG) bestimmt. Die Viabilität der Zellen wurde durch Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt (Tennant, 1964; Lindl, 2002).

4.6.4 Kryokonservierung

Von allen verwendeten und selbst hergestellten Zelllinien wurden Sicherungsbanken angelegt. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in einem Kryotank (Chronos Biosafe 350, Messer-Griessheim) in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von $-187\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen abzentrifugiert oder abtrypsiniert und in 1 mL frisch angesetztem Einfriermedium resuspendiert (RPMI bzw. DMEM Flüssigmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO). Vor der Überführung in den Kryotank wurden die Zellen zunächst für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend für ca. 12 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei Verwendung einer Kryokultur wurde die aufgetaute Zellsuspension in frischem Medium aufgenommen, das zelltoxische DMSO durch Zentrifugation ($700 \times g$, 5 min) entfernt und das Zellpellet nach Resuspension in frischem Medium in neue Kulturflaschen überführt.

4.6.5 Expression rekombinanter Proteine in COS-7- und HEK-293-EBNA-Zellen

Für Expressionsanalysen und zur Untersuchung der Sekretion oder intrazellulären Retention der Serpine *Bl-Spn1*, SERPINE3 und deren Mutanten wurden COS-7-Zellen mit entsprechenden Plasmiden (Abschnitt 4.3.11) transfiziert. COS-7-Zellen exprimieren konstitutiv das große T-Antigen des SV40 Virus, das mit Hilfe seiner Helicase-Aktivität die Replikation von Plasmiden mit einem SV40-Replikationsursprung einleitet. Die hohe Plasmid-Kopienzahl führt zur Überexpression des transfizierten Gens (Gluzman, 1981; Dean *et al.*, 1992; Edwards & Aruffo, 1993). Für die Transfektion von COS-7-Zellen wurden Konstrukte auf Basis der Vektoren pcDNA3.1+ und pSecTag2B verwendet, die beide den SV40 *Origin* besitzen (Abschnitt 8.1).

Für Produktionszwecke und zur Durchführung von Wachstumsanalysen im Rahmen der Untersuchungen zu SERPINE3 wurde auf das HEK-293-EBNA-System zurückgegriffen. HEK-293-EBNA Zellen exprimieren konstitutiv das EBNA-1 Gen des Epstein-Barr-Virus (EBV), dessen Genprodukt über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die episomale Replikation von Plasmiden, die den EBV-Replikationsursprung (*ori P*) enthalten, bewirkt (Yates *et al.*, 1985; Horlick *et al.*, 1997). Darüber hinaus exprimieren sie stabil das Neomycin-Resistenz-Gen des pRSV4neo-Plasmids (Lambert *et al.*, 1988). Für die Transfektion der Zellen wurden Konstrukte auf der Basis des Plasmids pCEP4 (Abschnitt 8.1) eingesetzt, der den EBV *ori P* enthält und eine Hygromycin-Resistenzkassette aufweist, so dass transfizierte Zellen selektioniert werden können.

Expression in COS-7-Zellen:

Die Transfektion von COS-7-Zellen erfolgte in 9 cm² Kulturschalen mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen, #11668), einem auf kationischen Lipiden basierenden Transfektionsreagenz. Am Tag vor der Transfektion wurde eine konfluente COS-7-Schale 1:2 verdünnt. Für die Transfektion wurden 8,3 µL Lipofectamin 2000 mit 208 µL serumfreiem DMEM-Medium (DMEM-SF) gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 3,3 µg Plasmid-DNA in 208 µL DMEM-SF vereinigt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden 6-14 h nach der Transfektion dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL DMEM-SF bedeckt. Die Analyse von Überständen und Extrakten (Abschnitt 4.6.6) erfolgte 36-48 h nach Transfektion durch Western-Blot (Abschnitt 4.7.1).

Expression in HEK-293-EBNA-Zellen:

Zur Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen wurde lineares Polyethylenimin (PEI) verwendet (Tabelle 15). Dieses kationische Reagenz kondensiert DNA unter Bildung von DNA/PEI-Komplexen. Die Komplexe interagieren mit den auf der Zelloberfläche exprimierten Proteoglycanen und werden über Endozytose in die Zellen aufgenommen (Kopatz *et al.*, 2004). In den endolysosomalen Kompartimenten soll PEI als Protonenschwamm fungieren, den pH puffern und den Zusammenbruch der endolysosomalen Membran bewirken, wodurch die DNA freigesetzt wird (Boussif *et al.*, 1995; Akinc *et al.*, 2005). PEI wurde bereits erfolgreich zur Transfektion von HEK-293-EBNA-Suspensionskulturen eingesetzt (Geisse & Henke, 2005).

Die Transfektion von HEK-293-EBNA Zellen erfolgte in 25 cm²-Flaschen mit jeweils 2×10^6 Zellen. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 3 mL DMEM-SF bedeckt. Anschließend wurden 6 µg Plasmid-DNA (Tabelle 15) mit 150 µL DMEM-SF gemischt. Das Gemisch wurde mit 30 µL PEI-Lösung versetzt (Tabelle 15) und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde zu den Zellen gegeben und durch Schwenken der Flaschen gleichmäßig verteilt. Nach ca. 6-12 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 6 mL Kultivierungsmedium bedeckt (Tabelle 14). 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen abtrysiniert, in Selektionsmedium aufgenommen (Tabelle 15) und in eine neue 25 cm²-Flasche überführt. Das Selektionsmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Wenn die Produktion des rekombinanten Proteins im Vordergrund stand, wurden Einzelklone isoliert und expandiert. Das Ablösen der Einzelklone erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Die Zellen der abgelösten Einzelklone wurden in eine 9 cm²-Schale überführt und dort durch Resuspendieren vereinzelt. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle fünf bis sieben Tage (1:2 bis 1:3). Von allen Klonen wurden Sicherungsbanken angelegt.

Tabelle 15: PEI-Lösung, Selektionsmedium und Plasmide

PEI-Lösung (10 mg/mL)	10 mg PEI (25 kD, Polysciences, Inc., #23966) in 9,6 mL Wasser lösen Zugabe von 220 µL 1M HCl vortexen, bis sich das PEI gelöst hat pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und sterilfiltrieren
Selektionsmedium	DMEM 20 % FCS 250 µg/mL G418 400 µg/mL Hygromycin
Verwendete Plasmide (Abschnitt 4.3.11)	pCEP4-T3C, pCEP4-T3C-P1A, pCEP4-T3C-P2A, pCEP4-EGFP die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des <i>HiSpeed Plasmid Maxi Kits</i> (Abschnitt 4.3.7). Das OD _{260/280} -Verhältnis lag bei allen Plasmiden oberhalb von 1,8.

Für Wachstumsanalysen wurden alle Klone durch Trypsinierung vereinigt und in neuen Flaschen bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Vor jeder Passagierung wurde die Lebendzellzahl mit Hilfe des Cedex-Zellzählgerätes bestimmt (Abschnitt 4.6.3).

4.6.6 Serumfreie Kultivierung und Herstellung von Zellextrakten

Zur Produktion von rekombinantem SERPINE3 wurden Einzelklone transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen bis zur Konfluenz expandiert und anschließend mit DMEM-SF bedeckt (2 mL pro 9 cm²). Nach vier Tagen wurden die Überstände geerntet und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 7000 × g) abgetrennt. Die Überstände wurden durch Western-Blot analysiert oder bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung von MCF-7-Zellkulturüberständen wurden MCF-7-Zellen bis zur Konfluenz in 175 cm²-Flaschen gezüchtet und anschließend mit 30 mL serumfreiem RPMI-Medium für vier Tage inkubiert. Die Überstände wurden wie beschrieben geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung (Abschnitt 4.10.3) bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung von Extrakten wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit PBS von der Kulturflasche abgeschabt, bei 5000 × g für 5 min abzentrifugiert und schließlich in eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 1 % (v/v) NP 40, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert (300 µL pro 10 cm² Kulturoberfläche). Der Lysepuffer wurde standardmäßig mit Protease-Inhibitoren der Firma Sigma (#P8340) oder Roche (#11873580) nach den Herstellerangaben versetzt (Sigma, 2006; Roche, 2007). Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Extrakte durch Zentrifugation (60 min, 13000 × g) geklärt.

4.7 Proteinbiochemische Methoden

4.7.1 SDS-PAGE und Western-Blot

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels diskontinuierlicher Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Ornstein, 1964; Laemmli, 1970) Die Zusammensetzung der Gellösungen und der Puffer sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: SDS-PAGE Lösungen

Puffer/Lösung/Material	Zusammensetzung/Bezugsquelle
Trenngellösung (10 %), für zwei Gele	2,5 mL 40 % Acrylamid/Bis <i>solution</i> , 29:1 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 4,85 mL H ₂ O 100 µL 10 % (w/v) SDS 50 µL 50 % (w/v) Ammoniumpersulfat 5 µL TEMED
Sammelgellösung (4 %), für zwei Gele	0,49 mL 40 % Acrylamid/Bis <i>solution</i> , 29:1 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,4 3,2 mL H ₂ O 50 µL 10 % (w/v) SDS 25 µL 50 % (w/v) Ammoniumpersulfat 5 µL TEMED
SDS-Laufpuffer	24 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2 x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Coomassie Färbelösung	1 Coomassie R350 Tablette (GE Healthcare, #17-0518-01) 150 mL H ₂ O 50 mL Essigsäure 100 mL Isopropanol
Entfärber	200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure 700 mL H ₂ O
Größenstandards	LMW-Marker (GE Healthcare, #17-0446-01) HMW-Marker (GE Healthcare, #17-0615-01) PageRuler™ (Fermentas, #SM0671)

Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in SDS-Probenpuffer oder Gewebepuffer (Abschnitt 4.7.2) durch 3-minütiges Erhitzen bei 95 °C.

Die SDS-PAGE mit selbst hergestellten Gelen wurde mit einem MiniProtean III-System der Firma BioRad durchgeführt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (25 mA je Gel) durchgeführt. Die SDS-PAGE mit NuPAGE® 10 % BIS-Tris-Fertiggelen (Invitrogen, #NP0302) erfolgte nach Angaben des Herstellers in Kombination mit einem *XCell SureLock™ Mini-Cell*-System (Invitrogen). Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend zur Entfernung des Hintergrundes mehrere Stunden mit Entfärber-Lösung und Wasser entfärbt.

Western-Blot:

Beim Western-Blot, einer sensitiven Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen, werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen, die anschließend zur Detektion eines bestimmten Antigens mit entsprechenden Antikörpern inkubiert wird (Towbin *et al.*, 1979).

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte mit der *Semi-Wet*-Methode in Mini Trans-Blot®-Zellen der Firma Bio-Rad. Verwendet wurden *Hybond-P* PVDF-Membranen (GE Healthcare, #RPN2109), die vor dem Transfer kurz mit Methanol benetzt und anschließend für mindestens 10 min in Transferpuffer (Tabelle 17) equilibriert wurden. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 90 min. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran zunächst mit einer BSA-haltigen Blockierlösung abgesättigt (RT, 1 h oder 4 °C, ÜN) und dann für 1 h mit dem entsprechenden Primärantikörper in Antikörperpuffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (dreimal 20 min) wurde die Membran für 1 h mit einem an *horseradish peroxidase* (HRPO)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, danach wiederum gewaschen und schließlich durch Chemolumineszenz analysiert. Hierfür wurde das *ECL™ Western Blotting Detection*-System (GE Healthcare, #RPN2109) in Kombination mit Röntgenfilmen des Typs Hyperfilm™ ECL™ (GE Healthcare, #RPN2103K) gemäß den Herstellerangaben verwendet (GE Healthcare, 2006). Die Belichtung der Filme wurde in Autoradiographiekassetten (10 sec bis 15 min) vorgenommen. Die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer ist Tabelle 17 zu entnehmen. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 17: Puffer und Reagenzien für Western-Blot Analysen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bezugsquelle
Transferpuffer (selbst hergestellte Gele)	96 mM Glycin 12 mM Tris-HCl 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Transferpuffer (NuPAGE® Bis-Tris Gele)	NuPAGE® Transfer Buffer (Invitrogen, #NP0006-1)
Blockierlösung	3 % (w/v) BSA 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS
Antikörperpuffer	1 % (w/v) BSA 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS
Waschpuffer	0,3 % (w/v) BSA 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS
Entwickler und Fixierer	Kodak Entwickler D19 (Sigma, #P5670) Kodak Fixierer (Sigma, #P8307)

Tabelle 18: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle/Verdünnung
Anti-GST- <i>Bl</i> -Spn1 (polyklonal, aus Kaninchen)	Pineda Antikörper Service, Berlin Verdünnung, 1:10000
Anti- <i>Bl</i> -Spn1, gereinigt (Abschnitt 4.10.1)	Pineda Antikörper Service, Berlin Verdünnung, 1:2000
Anti-GST-SERPINE3 (polyklonal, aus Kaninchen)	Eurogentec, Seraing, Belgien Verdünnung, 1:5000
Anti-SERPINE3, gereinigt (Abschnitt 4.10.1)	Eurogentec, Seraing, Belgien Verdünnung, 1:500
Anti-HCII IgG (polyklonal, aus Kaninchen, Abnahme 6)	Hoechst Verdünnung, 1:50000
Anti-GST (polyklonal, aus Ziege)	GE Healthcare, #27-4577-01 Verdünnung, 1:1000
Anti-Maus-PC1 (polyklonal, Kaninchen)	Affinity BioReagents, #ABR-PA1-057 0,4 µg/mL
Anti-Kaninchen IgG, HRPO-Konjugat (aus Esel)	GE Healthcare, #NA934 Verdünnung, 1:4000
Anti-Maus IgG, HRPO-Konjugat (aus Pferd)	Cell Signaling Technology, #7076 Verdünnung, 1:4000
Anti-Ziege/ Schaf IgG, HRPO-Konjugat (monoklonal, aus Maus, Klon GT-34)	Sigma, #A9452 Verdünnung, 1:40000

4.7.2 Analyse von humanen Gewebeproben

Humane Gewebeproben (20 µg Gesamtprotein) und humanes Plasma (0,5 bzw. 1 µg Gesamtprotein) wurden in 2 × SDS-Gewebepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 10000 × g) entfernt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und anschließend mit gereinigten Anti-SERPINE3- bzw. Anti-HCII-Antikörpern analysiert (Abschnitt 4.7.1).

Tabelle 19: Materialien und Puffer zur Analyse von Gewebeproben

Material/Puffer	Bezugsquelle/Zusammensetzung
Gewebeproben und Plasma	<i>Human Brain Protein Medley</i> (Clontech, #635301) <i>Human Heart Protein Medley</i> (Clontech, #635302) <i>Human Kidney Protein Medley</i> (Clontech, #635303) <i>Human Liver Protein Medley</i> (Clontech, #635306) <i>Human Placenta Protein Medley</i> (Clontech, #635307) <i>Human Spleen Protein Medley</i> (Clontech, #635312) Standard-Human-Plasma (Dade Behring, #ORKL13)
2 x SDS-Gewebepuffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 8 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

4.8 Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Serpin-Protease-Interaktionen

Serpine reagieren mit Serinproteasen unter Ausbildung irreversibler, kovalenter Komplexe, die weder durch Hitze noch durch Behandlung mit SDS zerstört werden (Gettins, 2002b).

Zur Identifikation von Serpin-Protease-Interaktionen wurden Komplexierungsansätze und/oder kinetische Tests durchgeführt. Für Komplexierungsreaktionen wurden die Serpine mit potenziellen Zielenzymen inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch Western-Blot (Abschnitt 4.7.1) analysiert. Die kovalenten Komplexe wandern im SDS-Gel bei einer Größe, die ungefähr der Summe der Massen von Protease und Serpin entspricht. Kinetische Methoden mit Farbstoff markierten Protease-Substraten wurden vorrangig zur quantitativen Charakterisierung von Inhibitionsreaktionen eingesetzt. Sie wurden aber ebenso wie Komplexierungsansätze dazu genutzt, Zielenzyme zu identifizieren oder sie als solche auszuschließen.

4.8.1 Proteasen und Puffer

Für alle Komplexierungsreaktionen und Enzymkinetiken wurden die in Tabelle 20 und Tabelle 21 aufgelisteten Proteasen und Puffer verwendet.

Tabelle 20: Proteasen

Protease	Bezugsquelle und Beschreibung
Humanes Furin (hFurin)	Bezugsquelle: New England Biolabs, #P8077, 2 U/ μ L rekombinant hergestellt in SF9-Zellen, C-terminal verkürzt
Humanes PC1/3 (hPC1/3)	Bezugsquelle: R&D Systems, #2810-SE, 0,652 μ g/ μ L rekombinant hergestellt in NS0-Zellen, C-terminal verkürzt (AS 84-753),
Maus PC1/3 (mPC1/3)	Bezugsquelle: C. Lazure und N. Rabah, <i>Clinical Research Institute</i> , Montreal mPC1/3-Proform, rekombinant hergestellt in SF9-Zellen (Boudreault <i>et al.</i> , 1998; Rabah <i>et al.</i> , 2004) Prä-Aktivierung: 6-stündige Inkubation in 100 mM NaAc, 10 mM CaCl ₂ , pH 6,0
Maus PC2 (mPC2)	Bezugsquelle: MP Biomedicals, #Fur02, 0,1 U/ μ L rekombinant hergestellt in CHO-Zellen (Lamango <i>et al.</i> , 1996) Prä-Aktivierung: 2-stündige Inkubation in 100 mM NaAc, 5 mM CaCl ₂ , 0,1 % Brij, pH 5,0
Thrombin	Bezugsquelle: Sigma; aus humanem Plasma in dH ₂ O gelöst und auf eine Konzentration von 0,310 NIH U/ μ L eingestellt
Trypsin	Bezugsquelle: Sigma, #T-8003; aus Rinderpankreas in Trypsinpuffer gelöst und auf eine Konzentration von 500 ng/ μ L eingestellt

Tabelle 21: Puffer für Komplexierungsassays und Enzymkinetiken

Puffer	Für Komplexierungsreaktionen	Für Kinetiken
2 × Furin-Puffer	200 mM Hepes, 2 mM CaCl ₂ , 0,5 % Triton X-100, pH 7,5	wie Komplexierungspuffer
2 × hPC1/3-Puffer	200 mM NaAc, 10 mM CaCl ₂ , 0,02 % Triton X-100, pH 6,0	
2 × mPC1/3-Puffer	200 mM NaAc, 20 mM CaCl ₂ , 0,02 % Triton X-100, pH 6,0	200 mM NaAc, 10 mM CaCl ₂ , pH 6,0
2 × mPC2-Puffer	200 mM NaAc, 10 mM CaCl ₂ , 0,2 % Brij, pH 5,0	wie Komplexierungspuffer
Thrombinpuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4	
Trypsinpuffer	67 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,6	

4.8.2 Komplexierungstests

Bakteriell gereinigte Serpine wurden mit möglichen Zielproteasen unter den in Tabelle 22 angegebenen Reaktionsbedingungen inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch SDS-PAGE oder Western-Blot analysiert (Abschnitt 4.7.1).

Tabelle 22: Komplexierungsansätze mit bakteriell exprimierten Serpinen

Zielprotease	Komplexierungsansatz	Inkubationsbedingungen
Furin	5 µL 2 × Furin-Puffer 1 µL Serpin (2,5 µM) 2 U Furin 2 µL H ₂ O	60 min bei 30 °C
hPC1/3	5 µL 2 × hPC1/3-Puffer 1 µL <i>Bl</i> -Spn1 (2,5 µM) 2 µL hPC1/3 2 µL H ₂ O	60 min bei 30 °C
mPC1/3	10 µL 2 × mPC1/3-Puffer 2 µL <i>Bl</i> -Spn1 (1,8 µM) 1 µL mPC1/3 (123 nM) 7 µL H ₂ O	60 min bei 30 °C
mPC2	6 µL 2 × mPC2-Puffer 2 µL <i>Bl</i> -Spn1 (1,5 bis 3 µM) 1 µL mPC1/3 (0,1 U/µL) 3 µL H ₂ O	5 bis 90 min bei 30 °C
Trypsin	3 µg Serpin-Fusionsprotein 0,5 µg bis 2 µg Trypsin ad 20 µL mit Trypsinpuffer	1-20 min bei RT

Zur Analyse einer potenziellen Interaktion von rekombinantem, in HEK-293-EBNA Zellen produziertem SERPINE3 (Abschnitt 4.6.5) mit den Serinproteasen Furin, Trypsin und Thrombin wurden Zellkulturüberstände eines SERPINE3 produzierenden HEK293-EBNA-Klons unter den in Tabelle 23 dargestellten Reaktionsbedingungen inkubiert und die Reaktionsprodukte durch Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle dienten Zellkulturüberstände von COS-7 Zellen, die mit Plasmiden für *Bl-Spn1ΔKDEL* (pCB3.1Spn1Mut) bzw. HCII (pWTBI1) transfiziert worden waren (Abschnitte 4.3.11 und 4.6.5). Als Negativkontrolle dienten Überstände von COS-7-Zellen bzw. HEK-293-EBNA-Zellen, die mit den leeren Ausgangsvektoren bzw. pCEP4-EGFP transfiziert worden waren.

Tabelle 23: Komplexierungsansätze mit Transfektionsüberständen

Zielprotease	Versuchsbedingungen
Furin	27,5 μ L Zellkulturüberstand 1,5 μ L CaCl ₂ (20 mM) 1 U Furin 30-60 min Inkubation bei 30 °C
Thrombin	50 μ L Zellkulturüberstand 1 μ L Dermatansulfatlösung (20 μ g/mL in Thrombinpuffer) 3 min Inkubation bei 25 °C Zugabe von 1 μ L Thrombin (0,3 NIH Units) 30 min Inkubation bei 25 °C
Trypsin	30 μ L Zellkulturüberstand 1 μ L Trypsin (25 ng/ μ L) 1-60 min Inkubation bei 25 °C

4.8.3 Enzymkinetik

Die Effektivität, mit der Serpine ihre Zielenzyme inhibieren, wird durch die Parameter SI (Stöchiometrie der Inhibierung) und k_{ass} (apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung) angezeigt. Der SI-Wert beschreibt das Verhältnis von Inhibierungs- zu Substratreaktion und ist definiert als die Anzahl von Serpinmolekülen, die benötigt werden, um ein Molekül Zielenzym zu inhibieren. Die Geschwindigkeit, mit der die Hemmreaktion abläuft, wird durch den Wert k_{ass} beschrieben (Gettins, 2002b; Schechter & Plotnick, 2004).

Zur Bestimmung der beiden Parameter wurden verschiedene kinetische Ansätze gewählt, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden. Alle Messungen (100 μ L) wurden in 96-well Mikrotiterplatten (Corning, #3686) in einem FLUOstar/POLARstar galaxi Spektrometer der Firma BMG Labtechnologies bei 30 °C

vorgenommen. Untersucht wurde die Hemmkinetik verschiedener PCs. Als PC-Substrat wurde ein kurzes, an den Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) gekoppeltes Peptid mit PC-Konsensus-Sequenz (Arg-Thr-Lys-Arg) gewählt (Tabelle 24). Dieses Peptid wird von den PCs effektiv gespalten, wodurch die AMC-Gruppe freigesetzt wird, deren Fluoreszenz bei 460 nm vermessen werden kann (Anregung: 380 nm).

Tabelle 24: PC-Substrate und Hemmstoffe

Substrat/Inhibitor	Bezugsquelle/Verarbeitung
pyr-RTKR-AMC	Bachem, #I-1650 gelöst in entgastem dH ₂ O und auf eine Konzentration von 5 mM eingestellt; Lagerung bei -20 °C
dec-RVKR-cmk	Bachem, #N1505 gelöst in DMSO und auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt; Lagerung bei -20 °C

Bestimmung von SI-Werten:

Voraussetzung für eine akkurate SI-Bestimmung ist die genaue Kenntnis der aktiven Protease- und Serpinkonzentrationen ($[E_0]$ bzw. $[I_0]$). Die Bestimmung der aktiven Konzentrationen von Furin bzw. mPC1/3 erfolgte durch Titration mit dem irreversiblen PC-Inhibitor dec-RVKR-cmk (Tabelle 24). Dieser reagiert mit den PCs im Verhältnis 1:1, wobei der K_i Wert in beiden Fällen bei 2,0 nM liegt (Bieth, 1995; Knight, 1995; Jean *et al.*, 1998).

Für die Titration wurden konstante Furin- bzw. mPC1/3-Mengen mit unterschiedlichen dec-RVKR-cmk-Konzentrationen für 1 h im jeweiligen PC-Puffer inkubiert. Die genauen Reaktionsansätze sind Tabelle 25 zu entnehmen. Vor der Titration wurde mPC1/3 durch eine 6-stündige Inkubation in 100 mM NaAc, 10 mM CaCl₂, pH 6,0 bei 25 °C prä-aktiviert und anschließend mit Hilfe von Amicon YM-30 Säulen (Millipore, #42409) um den Faktor fünf ankonzentriert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Titrationsansätze mit PC-Substrat und Puffer versetzt und die AMC-Freisetzung mit der Zeit verfolgt (Tabelle 25). Die Abnahme der proteolytischen Aktivität steht dabei in linearem Zusammenhang mit der Inhibitorkonzentration $[I_0]$. Zur Bestimmung der aktiven PC-Konzentrationen wurde die Geradensteigung, die die Restaktivität der Protease repräsentiert, gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Es wurde eine Gerade an die Funktionswerte angelegt und aus deren Schnittpunkt mit der x-Achse die Konzentration des aktiven Enzyms abgeleitet (Schechter & Plotnick, 2004)

Zur Bestimmung der SI-Werte wurden die PCs mit dem Serpin *Bl-Spn1* analog zu dem für dec-RVKR-cmk beschriebenen Verfahren titriert. Für die Titration von Furin (2 nM)

wurde *Bl*-Spn1 in Konzentrationen von 0-75 nM eingesetzt. Die Titration von mPC1/3 (2,5 nM) erfolgte mit 0-885 nM *Bl*-Spn1. Die PC-Restaktivität wurde gegen das *Bl*-Spn1/Enzym-Verhältnis ($[I_0]/[E_0]$) aufgetragen und die SI-Werte über lineare Regression aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse (absolute Hemmung) abgeleitet.

Tabelle 25: Reaktionsansätze für die SI-Wert Bestimmung

Ansatz	Zusammensetzung
Furin-Titrationsansatz	1,5 µL Furin (3 U) 4,5 µL dec-RVKR (0-100 nM) 6 µL 2 × Furinpuffer 1 h Inkubation bei 30 °C
mPC1/3-Titrationsansatz	4 µL mPC1/3 2 µL 2 × mPC1/3 Puffer 1 µL H ₂ O 1 µL dec-RVKR-cmk (0-1000 nM) 1 h Inkubation bei 25 °C
Furin-Substratlösung	20 µL pyr-RTKR-AMC (1 mM) 50 µL 2 × Furinpuffer 20 µL H ₂ O Zugabe von 10 µL Titrationsansatz und Start der Messung
mPC1/3-Substratlösung	10 µL Pyr-Arg-Lys-Thr-Arg-AMC (1 mM) 50 µL 2 × mPC1/3-Puffer 33 µL H ₂ O Zugabe von 7 µL Titrationsansatz und Start der Messung

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{ass} :

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung der PCs durch *Bl*-Spn1 wurden mit der *Progress-Curve*-Methode ermittelt, die ursprünglich zur Bestimmung kinetischer Konstanten für eine zweistufige, irreversible *Tight-Binding*-Inhibition durch kleine Hemmstoffe entwickelt wurde. Sie ist direkt anwendbar auf die irreversible Hemmung durch Serpine (Bieth, 1995; Schechter & Plotnick, 2004).

Bei dieser Methode wird Enzym (E) zu einem Gemisch aus Inhibitor (I) und Substrat (S) gegeben und die Freisetzung des Produkts (P) kontinuierlich verfolgt. Bei einem solchen Ansatz stehen die beiden Reaktionen - proteolytische Freisetzung des Substrates (P) und Inhibition der Protease (EI) - in direkter Konkurrenz, was vereinfacht durch das in Abbildung 7 gezeigte Schema dargestellt werden kann.

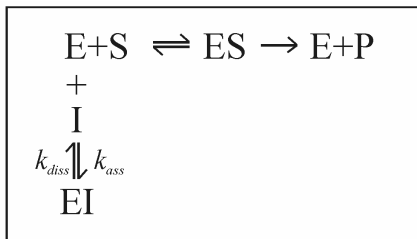


Abbildung 7: Schema der Progress-Curve-Methode. Bei k_{diss} und k_{ass} handelt es sich um Konstanten, die die Geschwindigkeit der Komplexbildung bzw. Komplexdissoziation beschreiben. Im Falle einer irreversiblen Inhibition gilt: $k_{diss} = 0$.

Die Konstanten k_{diss} und k_{ass} stehen dabei in folgendem mathematischen Zusammenhang mit der Gleichgewichtskonstanten K_i :

$$\text{Gleichung 1} \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$$

Wenn der Substratumsatz während der Reaktion weniger als 5 % beträgt und wenn $[I_0] \geq 10 [E_0]$, so kann die Produktbildung mit der Zeit (t) durch Gleichung 2 beschrieben werden:

$$\text{Gleichung 2} \quad F = [P] = v_s t + \frac{v_z - v_s}{k'} (1 - e^{-k' t}) + b$$

v_z beschreibt die Anfangsgeschwindigkeit, v_s die *Steady-State*-Geschwindigkeit und b ist die Fluoreszenz (F) zum Zeitpunkt $t = 0$. Bei k' handelt es sich um die apparente Relaxionskonstante pseudo-erster Ordnung, die mit k_{diss} und k_{ass} durch den in Gleichung 3 beschriebenen Zusammenhang in Verbindung steht. Wenn sich das Gleichgewicht für die Bildung des Enzym/Substratkomplexes deutlich schneller einstellt, als das Gleichgewicht für den Enzym/Inhibitor-Komplex, so steigt die durch Gleichung 2 beschriebene Produktbildung zunächst exponentiell. Sobald sich das System aus (E), (I) und (S) im Gleichgewicht befindet, nimmt der Produktumsatz entweder einen linearen Verlauf an (bei reversiblen Inhibitoren, Gleichungen 2 und 3) oder er bewegt sich auf einen Grenzwert zu (bei irreversiblen Inhibitoren, Gleichungen 4 und 5). Die Gleichungen 4 und 5 ergeben sich aus den Gleichungen 2 und 3 bei Anwendung der für irreversible Inhibitoren geltenden Beziehung $v_s = k_{diss} = 0$.

$$\text{Gleichung 3} \quad k' = \frac{k_{ass} [I_0]}{1 + [S_0] / K_m} + k_{diss}$$

$$\text{Gleichung 4} \quad F = [P] = \frac{v_z}{k'} (1 - e^{-k' t}) + b$$

Gleichung 5
$$k' = \frac{k_{ass} [I_0]}{1 + [S_0] / K_m}$$

Zur Bestimmung von k_{ass} wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzzunahme aufgenommen. Die Fluoreszenzzunahme ist dabei proportional zur Produktbildung [P] und wird mit dieser gleichgesetzt. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe der Software ENZFITTER an die Gleichung 2 angepasst, wodurch für jede Inhibitorkonzentration $[I_0]$ der entsprechende Wert für k' bestimmt werden konnte. Wie aus den Gleichungen 3 und 5 hervorgeht, stehen $[I]$ und k' in linearem Zusammenhang. Durch Auftragung von k' gegen $[I]$ wurde aus der Geradensteigung (m) der Wert für k_{ass} ermittelt (Gleichung 6).

Gleichung 6
$$m = \frac{k_{ass}}{1 + [S_0] / K_m} \Leftrightarrow k_{ass} = m \cdot (1 + [S_0] / K_m)$$

Da in die Berechnung von k_{ass} die Michaelis-Menten-Konstante K_m mit einfließt, musste diese bestimmt werden. Der K_m -Wert beschreibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Gleichung 7 zeigt den Zusammenhang zwischen K_m , der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}), der Substratkonzentration $[S]$ sowie der tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeit (v).

Gleichung 7
$$m = v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

Zur Bestimmung von K_m wurde die zeitliche Produktbildung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und konstanter Enzymkonzentration gemessen. Für jedes $[S]$ wurde die Geradensteigung (m) ermittelt. Diese entspricht der tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeit v . Der Wert für K_m wurde schließlich durch Auftragung der Werte für v gegen $[S]$ und Anpassung der Gleichung 7 mittels ENZFITTER ermittelt. Eine detaillierte Beschreibung der zur Bestimmung von K_m und k_{ass} gewählten Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 26 zu finden. Der K_m -Wert für die Reaktion von Furin mit pyr-RTKR-AMC (20 μ M) wurde aus der Literatur übernommen (Oley *et al.*, 2004).

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen zur Bestimmung von k_{ass} und K_m

k_{ass} -Bestimmung, Furin- <i>Bl</i> -Spn1	2 nM Furin Substratkonzentration: 200 μ M Puffer: 1 \times Furinpuffer <i>Bl</i> -Spn1 Konzentrationen: 0-576 nM Dauer der Messung: 116 min
k_{ass} -Bestimmung, Furin- <i>Bl</i> -Spn1	2,5 nM mPC1/3 Substratkonzentration: 10 μ M Puffer: 1 \times mPC1/3 Puffer <i>Bl</i> -Spn1-Konzentrationen: 0 bis 63 nM Dauer der Messung: 20 min
K_m -Bestimmung, mPC1/3-pyr-RTKR-AMC	0,5 nM mPC1/3 in 1 \times mPC1/3 Puffer Substratkonzentrationen: 1-100 μ M Dauer der Messung: 23 min

4.9 Massenspektrometrische Analysen

Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*-Massenspektrometrie) kann die Masse hochmolekularer Biomoleküle sehr genau bestimmt werden. Die zu analysierende Probe wird mit einem großen Überschuss einer geeigneten Matrix gemischt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels bildet die Matrix Kristalle, in denen die Probenmoleküle eingeschlossen werden. Im Hochvakuum des Massenspektrometers werden die Kristalle für wenige Nanosekunden einem kurzwelligen Laserimpuls ausgesetzt, wodurch die UV-absorbierenden Matrixmoleküle sowie die eingebauten Analyten in die Gasphase freigesetzt werden. Bei diesem Vorgang werden die Analyten durch Protonierung ionisiert. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und auf dem Weg zum Detektor in einer feldfreien Flugröhre entsprechend ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt (Zaluzec *et al.*, 1995).

Die MALDI-TOF-MS wurde zur Bestimmung der Furin- bzw. hPC1/3-Spaltstelle im *Bl*-Spn1-RSL eingesetzt. Des Weiteren wurde die Methode zur Verifizierung der Identität von bakteriell exprimiertem His₆-GST-SERPINE3 eingesetzt.

Analyse der PC-Spaltstellen:

Zur Identifikation der PC-Spaltstellen im RSL von *Bl-Spn1* wurde gereinigtes *Bl-Spn1* mit Furin bzw. hPC1/3 für 1 h bei 30 °C inkubiert (Tabelle 27). Als Negativkontrolle wurde *Bl-Spn1* ohne PC-Zusatz auf die gleiche Weise behandelt.

Tabelle 27: Ansätze und Lösungen zur Identifikation der PC-Spaltstellen im *Bl-Spn1*-RSL

Reaktion/Lösung	Zusammensetzung
Furin-Spaltansatz	15 µL Furin (196 nM), 3 µL <i>Bl-Spn1</i> (7,2 µM), 2 µL H ₂ O, 1,5 µL 20 mM CaCl ₂ , 8,5 µL 50 mM Hepes, pH 7,5
hPC1/3-Spaltansatz	5 µL hPC1/3, 3 µL <i>Bl-Spn1</i> (7,2 µM), 4 µL H ₂ O, 3 µL 100 mM CaCl ₂ , 15 µL 50 mM MES, H 6,0
Kontrolle	3 µL <i>Bl-Spn1</i> (7,2 µM), 17 µL H ₂ O, 1,5 µL 20 mM CaCl ₂ , 8,5 µL 50 mM Hepes, pH 7,5
Matrixlösung	10 mg 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure), 300 µL Acetonitril, 700 µL 0,1 % TFA

Die Entsalzung und Reinigung der Spaltansätze erfolgte mit Hilfe von ZipTip[®] C18-Spitzen (Millipore), wie bereits beschrieben (Oley, 2006). Die Eluate wurden auf einen Maldi-Targetchip pipettiert und zur Kristallisation mit 1 µL Matrixlösung gemischt. Die Spektren wurden von Dr. Matthias Letzel (Abteilung Massenspektrometrie, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld) mit einem Voyager DE Massenspektrometer (PE Biosystems GmbH) aufgenommen, der mit einem *Large Scale Integration* (LSI) Stickstoff-Laser (337 nm) und einem linearen Flugrohr (1,2 m Länge) ausgestattet ist. Für die Kalibrierung des Gerätes wurde das *ProteoMassTM Protein MALDI-MS Calibration Kit* (Sigma, #MSCAL3) nach Herstellerangaben verwendet (Sigma, 2001). Die Eichproteine wurden ebenso wie die Spaltansätze durch eine ZipTip-Behandlung gereinigt und entsalzt.

Analyse von His₆-GST-SERPINE3:

Zur Verifizierung der Identität von His₆-GST-SERPINE3 wurde eine Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden 750 ng gereinigtes His₆-GST-SERPINE3 (Abschnitt 4.4) aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und das Gelstück anschließend zweimal für 10 min mit 350 µL 30 % (v/v) Acetonitril (ACN) in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Das Gelstück wurde für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 1 µL Verdauerpuffer (3 mM Tris-HCl, pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin (Promega, #V5280)) rehydratisiert. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 × g) wurden 2 µL 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 zugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 6 µL Wasser und 5 µL 0,1 %

TFA in 30 % ACN (jeweils 10 min Inkubation) wurde der Ansatz einer ZipTip-C18-Behandlung unterzogen. Die Elution der Peptide erfolgte hierbei direkt in 5 μ L Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) TFA). 2 μ L des Eluates wurden anschließend auf einen Targetchip aufgetragen. Die Probe wurde von Raimund Hoffrogge und Marc Wingens (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) in einem Ultraflex BRUKER Daltonics MALDI-TOF-System mit *flexControl*-Programm vermessen. Die erhaltenen Peptidmassen wurden unter Zuhilfenahme des Programms Mascot (Abschnitt 8.4) mit der NCBI-nr-Datenbank (alle Spezies) abgeglichen. Dabei wurde eine Massenabweichung von 150 *ppm* (*parts per million*) toleriert und maximal eine übersprungene Spaltstelle zugelassen.

4.10 Affinitätschromatographie

4.10.1 Affinitätsreinigung polyklonaler Anti-Serpin-Antiseren

Die Reinigung SERPINE3- bzw. *Bl*-Spn1-spezifischer Antikörper aus polyklonalem Kaninchen-Antiserum erfolgte durch Bindung der Antikörper an immobilisierte GST-Fusionsproteine und anschließend saurer Elution (Bar-Peled & Raikhel, 1996). In einem vorangehenden Schritt wurden gegen GST gerichtete Antikörper durch Inkubation des Serums mit GST-vernetzter Sepharose angereichert.

His₆-GST, His₆-GST-*Bl*-Spn1 und His₆-GST-SERPINE3 wurden, wie unter Abschnitt 4.4 beschrieben, exprimiert (His₆-GST, His₆-GST-*Bl*-Spn1: 200 mL Kultur; His₆-GST-SERPINE3: 600-1000 mL Kultur). Die geklärten Bakterienextrakte wurden bei RT für 1 h mit 500 μ L Glutathion-Sepharose in einer 10 mL-PD10 Säule inkubiert. Dieser, wie auch alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten unter vertikalem Schütteln bei RT.

Tabelle 28: Puffer für die Antikörperreinigung

Puffer	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer für Säulengenerierung	PBS, 1 % Triton-X100, 1 mM EDTA
Boratpuffer	0,2 M Borsäure, pH 9,6
Kopplungspuffer	20 mg DMP in 4 mL Boratpuffer unmittelbar vor der Kopplungsreaktion angesetzt
Terminationspuffer	0,2 M Ethanolamin, pH 8,2
Equilibrierungspuffer für Antikörperreinigung	PBS, 2 mM PMSF
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5
Neutralisationspuffer	2 M Tris-HCl, pH 13,0

Anschließend wurden die Sepharosen viermal mit 10 mL Equilibrierungspuffer, zweimal mit 10 mL PBS (jeweils 5 min Inkubation) und dreimal mit 12 mL Boratpuffer gewaschen. Für die Kopplungsreaktion wurden 4 mL Kopplungspuffer auf die Säule gegeben und das Gemisch für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Kopplungsreaktion wurde die Säule zunächst 5 min, dann 1 h mit 12 mL Terminationspuffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Säulen bis zur Verwendung in PBS mit 0,02 % Natriumazid und Proteaseinhibitorcocktail (Roche) bei +4 °C gelagert.

Alle Schritte der Antikörperreinigung erfolgten bei 4 °C. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurden 2 mL des Antiserums zweimal zentrifugiert (13000 × g, 15 min) und anschließend mit 8 mL PBS verdünnt. Zur Abreicherung His₆-GST-spezifischer Antikörper wurde das Serum mit Hilfe einer Schlauchpumpe kontinuierlich über die His₆-GST-vernetzte und equilibrierte Säule gepumpt (3 h). Der Durchlauf wurde anschließend über die mit His₆-GST-Serpin-vernetzte Säule gepumpt (3 h). Nach intensivem Waschen der Gelmatrix mit PBS wurden gebundene Antikörper mit 3 mL Elutionspuffer eluiert und 1 mL Fraktionen aufgesammelt. Um eine sofortige Neutralisation der Lösung zu bewirken, wurde in den Elutionsgefäßen jeweils 40 µL Neutralisationspuffer vorgelegt. Die Antikörperlösungen wurden mit 0,02 % Natriumazid und Proteaseinhibitorcocktail versetzt und bei -20 °C gelagert.

4.10.2 Kopplung von Anti-SERPINE3-Antikörpern an Protein A-Sepharose

Zur Anreicherung von endogenem SERPINE3 aus MCF-7-Zellkulturüberständen wurde eine Immunoaffinitätsmatrix hergestellt. Gereinigte SERPINE3-Antikörper wurden, wie unter Abschnitt 4.10.1 beschrieben, kovalent an Protein A-Sepharose gebunden. Protein A, ein 42 kD großes Protein aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, bindet Immunglobuline des IgG-Typs gerichtet über deren Fc-Teil (Langone, 1982). Bei dem in der Arbeit verwendeten Protein A handelt es sich um rekombinantes, in *E. coli* produziertes Material (GE Healthcare, #17-5280). Es zeichnet sich durch eine hohe Kapazität (10-30 mg IgG pro mL Bettvolumen) und Stabilität aus (GE Healthcare, 2002).

Zunächst wurde mit PBS equilibrierte Protein A-Sepharose für 3-4 h mit Antikörpern unter vertikalem Schütteln bei 4 °C inkubiert (40 µg Antikörper pro 100 µL Bettvolumen). Anschließend wurde die Matrix mit ca. 50 mL PBS gewaschen und die Antikörper mit DMP, wie in Abschnitt 4.10.1 beschrieben, kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelt. Nach Terminierung der Reaktion mittels Ethanolamin wurde die Säule bei 4 °C in PBS mit 0,02 % Azid und Proteaseinhibitorcocktail gelagert (Abschnitt 4.10.1).

4.10.3 Reinigung von endogenem SERPINE3 aus Kulturüberständen von MCF-7-Zellen

MCF-7 Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, unter serumhaltigen Bedingungen in 175 cm²-Flaschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das serumhaltige Medium entfernt und die Zellen für vier Tage in 30 mL serumfreiem Medium inkubiert. Die Überstände wurden geerntet und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Zur spezifischen Anreicherung von SERPINE3 aus MCF-7-Kulturüberständen wurden 100 µL der mit Anti-SERPINE3-Antikörpern vernetzten Protein A-Sepharose in eine 2 mL Leersäule gefüllt. Anschließend wurden 20 mL der MCF-7 Kulturüberstände für 2 h kontinuierlich bei 4 °C im Kreis über die Säule gepumpt. Nach ausgiebigem Waschen mit 40 mL PBS wurden gebundene Proteine dreimal mit 100 µL 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5 eluiert. Die Elutionsfraktionen und die Säule wurden anschließend sofort mit Neutralisationspuffer (Abschnitt 4.10.1) neutralisiert. Die Elutionsfraktionen wurden bei -20 °C gelagert oder sofort durch Western-Blot mit SERPINE3-spezifischen Antikörpern analysiert.

5 Ergebnisse

Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Serpin Spn4A aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*Dm*) ein sehr potenter Inhibitor des humanen Furins und des PC2-Homologs aus *Dm* ist und aufgrund seines Signalpeptids und ER-Retentionssignals mit PCs im sekretorischen Pfad kolokalisiert (Oley *et al.*, 2004; Osterwalder *et al.*, 2004; Richer *et al.*, 2004). In Vertebraten wurde bisher nur ein PC hemmendes Serpin (PI8) identifiziert, dessen Rolle als physiologischer Inhibitor allerdings unklar ist, da es nicht wie PCs im sekretorischen Pfad lokalisiert ist.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Serpin *Bl*-Spn1 aus *Branchiostoma lanceolatum*, einem nahen Verwandten der Wirbeltiere, und dem humanen Serpin SERPINE3. Beide Serpine besitzen ein PC-Erkennungsmotiv an den mutmaßlichen P2/P1-Positionen in ihrem RSL und ein Signalpeptid für den Zugang zum sekretorischen Pfad. Das *Branchiostoma*-Serpins weist darüber hinaus wie das *Dm*-Serpins Spn4A ein ER-Retentionssignal auf. Abschnitt 5.1 behandelt die Funktion und Lokalisation von *Bl*-Spn1. Der zweite thematische Abschnitt (5.2) beschreibt die Identifikation, Klonierung und Expression von SERPINE3 sowie erste Analysen zur Funktion dieses Serpins.

5.1 Funktionelle Charakterisierung des Serpins *Bl*-Spn1 aus *Branchiostoma lanceolatum*

Das *Branchiostoma*-Serpins *Bl*-Spn1 wurde im Rahmen einer früheren Arbeit rekombinant in Bakterien exprimiert und in biologisch aktiver Form gereinigt (Tödtmann, 2004). Durch den Nachweis SDS-stabiler Komplexe mit der Serinprotease Thrombin konnte gezeigt werden, dass *Bl*-Spn1 ein inhibitorisches Serpin ist. Da die Komplexierungsreaktion sehr langsam verlief und der überwiegende Teil des Serpins als Substrat von Thrombin fungierte, erschien die Interaktion als unphysiologisch (Tödtmann, 2004).

Zwei Merkmale in der *Bl*-Spn1-Proteinsequenz ließen vermuten, dass PCs natürliche Zielenzyme von *Bl*-Spn1 sind: (1) Viele PCs prozessieren Zielenzyme nach dibasischen Motiven. Die mutmaßlichen Positionen P2/P1 des RSLs von *Bl*-Spn1 sind mit den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin besetzt. (2) Das Signalpeptid in Kombination mit dem C-terminalen ER-Retentionssignal „KDEL“ deutet auf eine Lokalisation des Serpins im sekretorischen Pfad, dem Aufenthaltsort von PCs, hin. Der Fragestellung, ob PCs als Zielenzyme von *Bl*-Spn1 in Betracht kommen, wurde zunächst durch *in vitro*-

Komplexierungstests mit den PCs Furin, PC1/3 und PC2 nachgegangen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

5.1.1 Nachweis SDS-stabiler Komplexe mit Furin und PC1/3

Um eine Interaktion zwischen *Bl-Spn1* und PCs nachzuweisen, wurde *Bl-Spn1* als His₆-GST-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt. Aus 200 mL Bakterienkultur konnte durchschnittlich 5 mg *Bl-Spn1*-Fusionsprotein gereinigt werden. Der N-terminale His₆-GST-Tag wurde durch Behandlung mit TEV-Protease abgespalten und zusammen mit der TEV-Protease über *IMAC* abgereichert (Abschnitt 4.4, Abbildung 8). Die Reinigungsprozedur glich größtenteils dem bereits beschriebenen Verfahren (Tödtmann, 2004). Für die Elution und die Abreicherung von Kontaminanten im Spaltansatz wurden allerdings phosphationenfreie Puffer verwendet, um so einer Komplexierung von Kalziumionen, die für die Aktivität von PCs essenziell sind, vorzubeugen. Aus Abbildung 8 geht hervor, dass das ca. 45 kD große *Bl-Spn1* in hochreiner Form gewonnen werden konnte. Erwähnenswert ist, dass keine Signale detektiert werden konnten, die auf RSL-gespaltene (berechnete Größe: ca. 39,5 kD) und somit inaktive *Bl-Spn1*-Moleküle hingedeutet hätten.

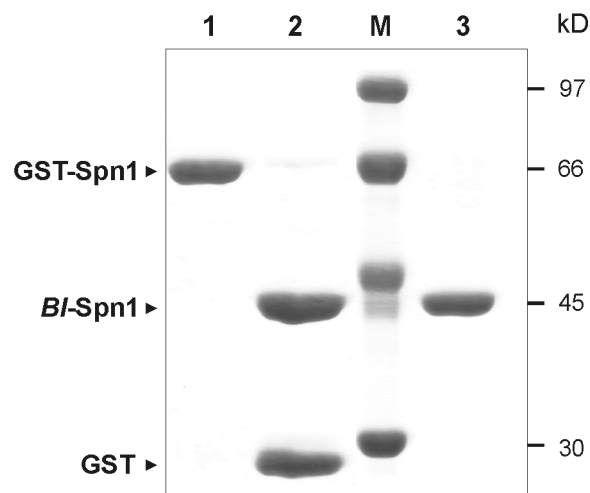


Abbildung 8: Reinigung von rekombinantem *Bl-Spn1*. Bakteriell exprimiertes His₆-GST-*Bl-Spn1* wurde über Glutathion-Sepharose gereinigt (Spur 1) und zur Freisetzung des Serpin-Anteils mit TEV-Protease inkubiert (Spur 2). Kontaminanten mit His₆-Tag (TEV-Protease und His₆-GST-Tag) wurden anschließend über *IMAC* abgereichert (Spur 3). Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie gefärbtes 10 %iges SDS-Gel. Die Größen von Markerproteinen (Spur M) sind rechts angegeben.

In einem ersten Komplexierungstest wurde eine Interaktion zwischen *Bl*-Spn1 und Furin (ca. 53 kD) getestet. Hierfür wurde *Bl*-Spn1, wie in Abschnitt 4.8.2 beschrieben, mit einer verkürzten löslichen Form von humanem Furin unter Zusatz von 1 mM CaCl₂ inkubiert; anschließend wurden die Reaktionsprodukte im Western-Blot analysiert. Abbildung 9 zeigt, dass *Bl*-Spn1 SDS-stabile Komplexe mit Furin bildet. Der ca. 105 kD große Komplex konnte sowohl mit Anti-*Bl*-Spn1- als auch mit Anti-Furin-Antikörpern (Abbildung 9 A bzw. B, Spuren 2) nachgewiesen werden. Der mit Anti-*Bl*-Spn1-Antikörpern entwickelte Western-Blot zeigt darüber hinaus, dass ein Teil der Inhibitormoleküle von Furin gespalten wird, was sich mit der Theorie des *Branched-Pathway*-Mechanismus von Serpinen deckt (Gettins, 2002b). Die Komplexierungsreaktion erfolgte in Gegenwart eines Überschusses von Inhibitormolekülen. Aus Abbildung 9 B geht hervor, dass Furin nahezu vollständig durch *Bl*-Spn1 komplexiert wurde, da nach der Reaktion kein freies Furin mehr vorliegt.

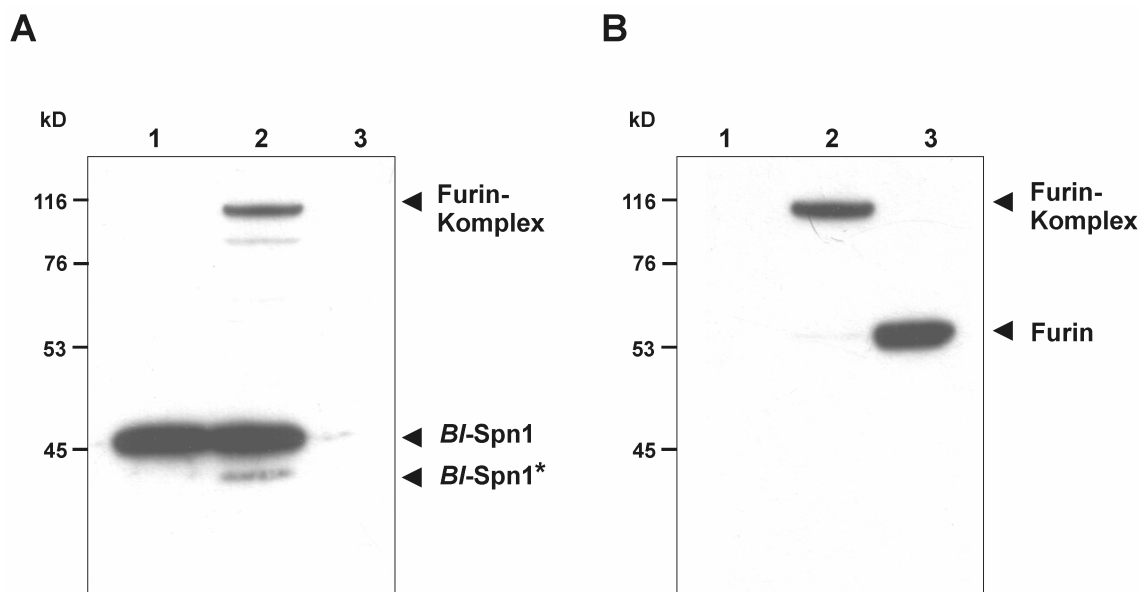


Abbildung 9: Bildung SDS-stabiler Komplexe zwischen *Bl*-Spn1 und Furin. *Bl*-Spn1 wurde für 1 h mit Furin inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch Western-Blot (10 %ige Gele). Zur Detektion wurde Anti-*Bl*-Spn1-Antiserum (A) oder Anti-Furin-Antiserum (B) eingesetzt. Die Komplexierungsreaktionen sind jeweils in Spur 2 dargestellt, die Kontrollen in Spur 1 (nur *Bl*-Spn1) und Spur 3 (nur Furin). Die RSL-gespaltene Form von *Bl*-Spn1 ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Größen von Markerproteinen sind jeweils am linken Bildrand angegeben.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *Bl*-Spn1 SDS-stabile Komplexe mit humanem Furin bildet, wurde untersucht, ob auch PC1/3 und PC2 – zwei weitere Mitglieder der PC-Familie – durch *Bl*-Spn1 komplexiert werden. Da *Branchiostoma* Homologe dieser Säuger-PCs exprimiert, war diese Analyse besonders interessant. Die Untersuchung von

PC1/3 war darüber hinaus auch deshalb von Interesse, weil bislang noch kein Serpin mit inhibitorischer Aktivität gegenüber PC1/3 identifiziert wurde.

Im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten Protease Furin werden PC1/3 und PC2 überwiegend in neuroendokrinen Zellen exprimiert, wo sie eine zentrale Rolle bei der Prozessierung vieler Prohormone und Neuropeptide spielen (Seidah & Chretien, 1999). PC1/3 und PC2 existieren in unterschiedlich aktiven Formen. In saurem und kalziumreichem Milieu entstehen jeweils durch autokatalytische Prozessierung C-terminal-verkürzte und deutlich aktivere Varianten dieser Enzyme (Zhou & Lindberg, 1994). Die Analyse der Interaktion zwischen *BI-Spn1* und PC1/3 erfolgte sowohl mit humanem PC1/3 (hPC1/3) als auch mit dem Maus-Homolog (mPC1/3). Während hPC1/3 bereits in der aktivierten 66-kD-Form bezogen wurde, mussten mPC1/3 und mPC2 in die kürzeren Varianten umgewandelt werden (Abschnitt 4.8.1, 71 kD bzw. 66 kD). Die beiden PC1/3-Enzyme wurden für 1 h mit *BI-Spn1* inkubiert (Abschnitt 4.8.2). Anschließend wurden die Reaktionsprodukte durch Western-Blot analysiert. Aus Abbildung 10 geht hervor, dass *BI-Spn1* sowohl mit hPC1/3 als auch mit mPC1/3 SDS-stabile Komplexe (ca. 120 kD) bildete. Wie auch bei der Reaktion mit Furin, fungierten Teile des Inhibitors als PC1/3-Substrat.

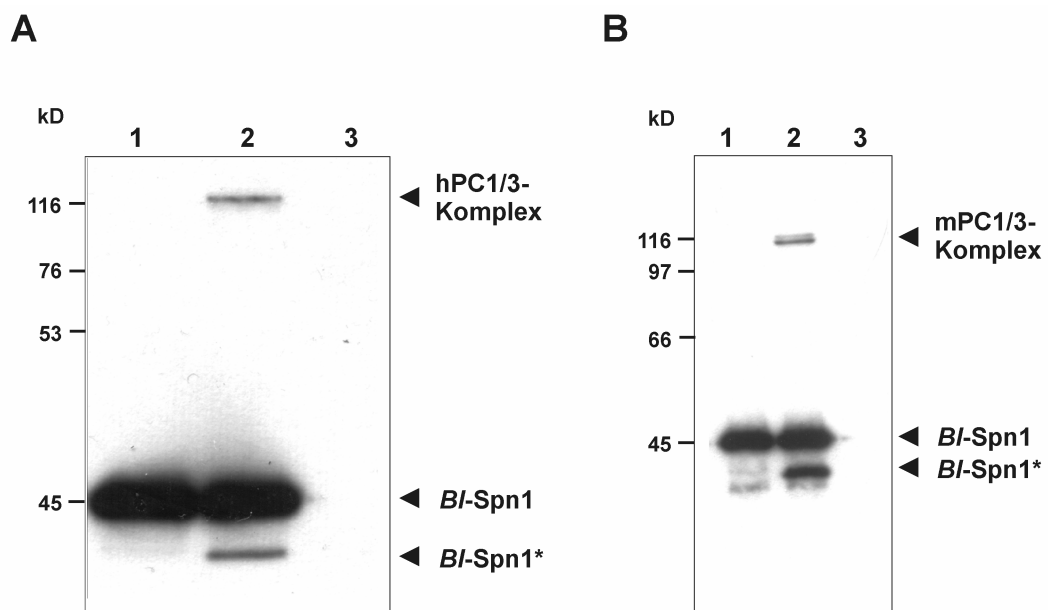


Abbildung 10: Bildung SDS-stabiler Komplexe zwischen *BI-Spn1* und PC1/3. *BI-Spn1* wurde mit hPC1/3 (A) bzw. mPC1/3 (B) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Western-Blot (10 %ige Gele) mit Anti-*BI-Spn1*-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Komplexbildungsreaktionen sind in den Spuren 2 dargestellt, die entsprechenden Kontrollen in den Spuren 1 (nur *BI-Spn1*) und Spuren 3 (nur PC1/3). Die RSL-gespaltene Form von *BI-Spn1* ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Größen von Markerproteinen sind jeweils am linken Bildrand angegeben.

Zur Analyse der Hemmung von mPC2 wurden verschiedene *Bl*-Spn1-Konzentrationen mit konstanten mPC2-Konzentrationen bei pH 5,0 inkubiert (Abschnitt 4.8.2). Nach verschiedenen Zeitintervallen (5-90 min) wurden Proben genommen und diese im Western-Blot analysiert. Keiner der Reaktionsansätze führte zur Ausbildung SDS-stabiler Komplexe. Neben freiem Serpin (45 kD) konnten lediglich RSL-gespaltene Formen detektiert werden (nicht gezeigt). Auch in einer anschließenden *Progress-Curve*-Analyse (Abschnitt 4.8.3), bei der die proteolytische Aktivität der Protease in Gegenwart unterschiedlicher *Bl*-Spn1-Konzentrationen gemessen wurde, konnte keine Reduktion der Aktivität von mPC2 durch *Bl*-Spn1 (215-2150 nM) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bewirkte *Dm*-Spn4A/E eine drastische Reduktion der mPC2-Aktivität (Abbildung 11).

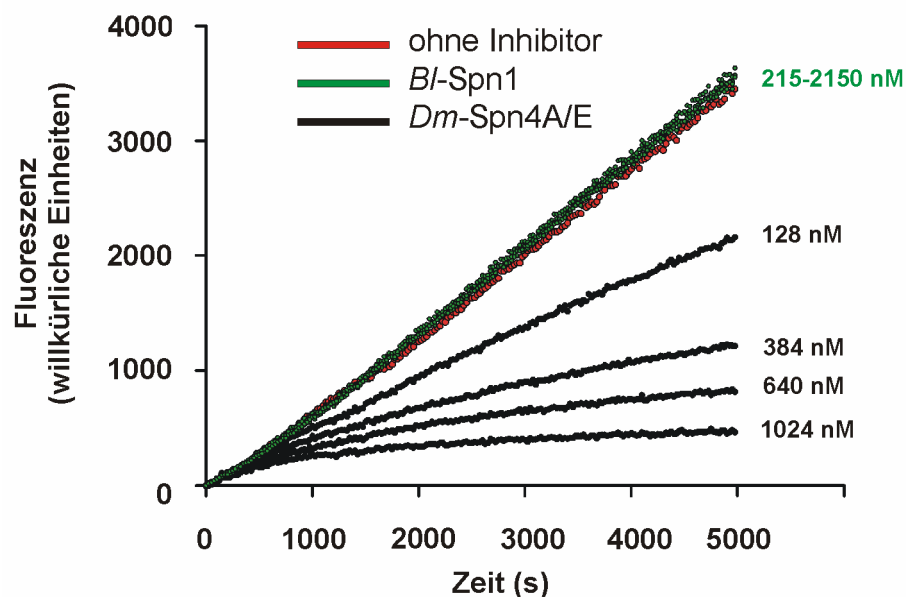


Abbildung 11: Kinetische Analyse der Hemmung von mPC2 durch Serpine. Unterschiedliche Konzentrationen von *Bl*-Spn1 (grün) und *Dm*-Spn4A/E (schwarz) wurden jeweils mit dem Substrat pRTKR-AMC (200 μ M) gemischt und die Reaktionen durch Zugabe von mPC2 (0,1 U) gestartet. Die Serpinkonzentrationen sind rechts neben den Kurven angegeben.

Durch die vorstehend beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Bl*-Spn1 mit humanem Furin und mit PC1/3, nicht aber mit mPC2 SDS-stabile Komplexe bildet. Eine inhibitorische Aktivität gegenüber mPC2 konnte auch im Rahmen einer anschließend durchgeführten kinetischen Analyse nicht nachgewiesen werden. *Bl*-Spn1 ist das erste Serpin, von dem gezeigt werden konnte, dass es SDS-stabile Komplexe mit PC1/3 bildet.

5.1.2 Kinetische Charakterisierung der mPC1/3- und Furin-Hemmung

Die Inhibition von Serinproteasen durch Serpine ist ein einzigartiger und komplexer Prozess, der chemische und strukturelle Veränderungen nach sich zieht. Nach der Bildung eines kovalenten Serpin-Acyl-Protease-Intermediats wird die Protease durch Insertion des RSLs in das β -Faltblatt A des Inhibitors irreversibel inhibiert. Neben dieser irreversiblen Hemmung kann aber auch eine Konkurrenzreaktion stattfinden, bei der die Protease aus dem Acyl-Intermediat durch Deacylierung freigesetzt wird, wodurch das Serpin zum Substrat der Protease wird. Das Verhältnis dieser beiden Reaktionen wird über den SI-Wert (*stoichiometry of inhibition*) beschrieben. Interaktionen von physiologischer Relevanz zeichnen sich durch niedrige SI-Werte und hohe Inhibitionskonstanten aus (Gettins, 2002b; Schechter & Plotnick, 2004).

Die in Abschnitt 5.1.1 dargestellten Untersuchungen hatten ergeben, dass *Bl*-Spn1 SDS-stabile Komplexe mit Furin und PC1/3 bildet, wobei Teile des Inhibitors auch als Substrat fungieren. Zur Quantifizierung des relativen Verhältnisses von Hemm- zu Substratreaktion wurden für beide Interaktionen die SI-Werte bestimmt (Abbildung 12). Hierfür wurden verschiedene *Bl*-Spn1-Konzentrationen mit konstanten Konzentrationen von Furin (25 nM) bzw. mPC1/3 (206 nM) inkubiert und anschließend die Restaktivitäten der Enzyme durch Zugabe des fluorogenen PC-Substrates pyr-RTKR-AMC gemessen (Abschnitt 4.8.3).

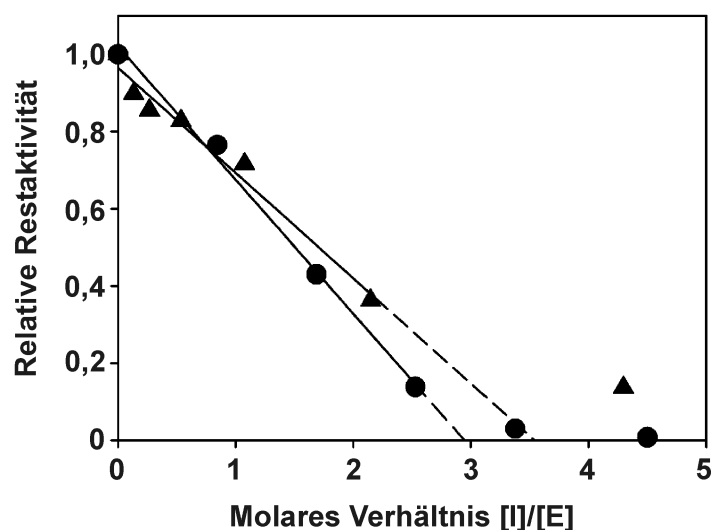


Abbildung 12: SI-Bestimmung für die Hemmung von Furin und mPC1/3 durch *Bl*-Spn1.

Furin (●-●) und mPC1/3 (▲-▲) wurden jeweils mit einem bis zu 4,5-fachen Überschuss an *Bl*-Spn1 inkubiert und die Restaktivitäten der Enzyme gemessen. Die Auftragung zeigt die relativen Restaktivitäten in Abhängigkeit vom molaren *Bl*-Spn1/Protease-Verhältnis. Aus den Regressionsgeraden der abfallenden Funktionswerte konnten die SI-Werte aus den Schnittpunkten mit der x-Achse abgeleitet werden.

Die Restaktivität der Enzyme wurde gegen das *Bl*-Spn1/Enzym-Verhältnis ($[I_0]/[E_0]$) aufgetragen und die SI-Werte durch lineare Regression aus den Schnittpunkten der Geraden mit der x-Achse abgeleitet. Für die Reaktion mit Furin wurde ein SI-Wert von 2,9 ermittelt (Abbildung 12). Der SI-Wert für die Interaktion von *Bl*-Spn1 mit mPC1/3 lag mit 3,5 etwas höher. Diese SI-Werte liegen in derselben Größenordnung wie der SI-Wert, der für die Interaktion von *Dm*-Spn4A/E und Furin ($SI = 3,5$) bestimmt wurde (Oley *et al.*, 2004).

Anschließend wurde für beide Hemmreaktionen mit Hilfe der *Progress-Curve*-Methode die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (k_{ass}) ermittelt (Abschnitt 4.8.3). Bei physiologisch relevanten Serpin-Protease Interaktionen hat k_{ass} einen Wert zwischen $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Gettins, 2002b). Zur Bestimmung von k_{ass} wurden verschiedene Konzentrationen von *Bl*-Spn1 mit Substrat gemischt und die Reaktionen jeweils durch Zugabe von Furin bzw. mPC1/3 gestartet. Abbildung 13 zeigt, dass die Fluoreszenz zu Beginn der Reaktionen schnell ansteigt, im Laufe der Zeit aber durch Hemmung der Proteasen immer mehr abflacht. Dabei gilt: je höher die *Bl*-Spn1-Konzentration, desto schneller die Hemmung. Durch nichtlineare Regression (Gleichung 2, Abschnitt 4.8.3) wurde für jede Serpinkonzentration die Hemmkonstante pseudo-erster Ordnung k' bestimmt und gegen die jeweilige Inhibitor-konzentration aufgetragen. Die Assoziationskonstante k_{ass} wurde durch lineare Regression (Gleichung 3, Abschnitt 4.8.3) unter Berücksichtigung der jeweiligen K_m -Werte bestimmt. Der K_m -Wert für Furin wurde aus der Literatur übernommen (Oley *et al.*, 2004). Der K_m -Wert für mPC1/3 ($9 \mu\text{M}$) wurde wie in Abschnitt 4.8.3 beschrieben bestimmt (nicht dargestellt). Für die Interaktion von *Bl*-Spn1 mit Furin wurde eine Hemmkonstante von $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Da die SI-Bestimmung ergeben hatte, dass 2,9 *Bl*-Spn1-Moleküle zur Hemmung eines Furin-Moleküls nötig sind, wurde die Konstante mit dem SI-Wert multipliziert und so ein apparenter k_{ass} -Wert von $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Für die Interaktion von *Bl*-Spn1 mit mPC1/3 wurde ein Wert von $2,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Der SI-bereinigte Wert liegt für diese Interaktion bei $9,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Somit liegen die Inhibitionskonstanten für Furin und mPC1/3 im physiologisch relevanten Bereich.

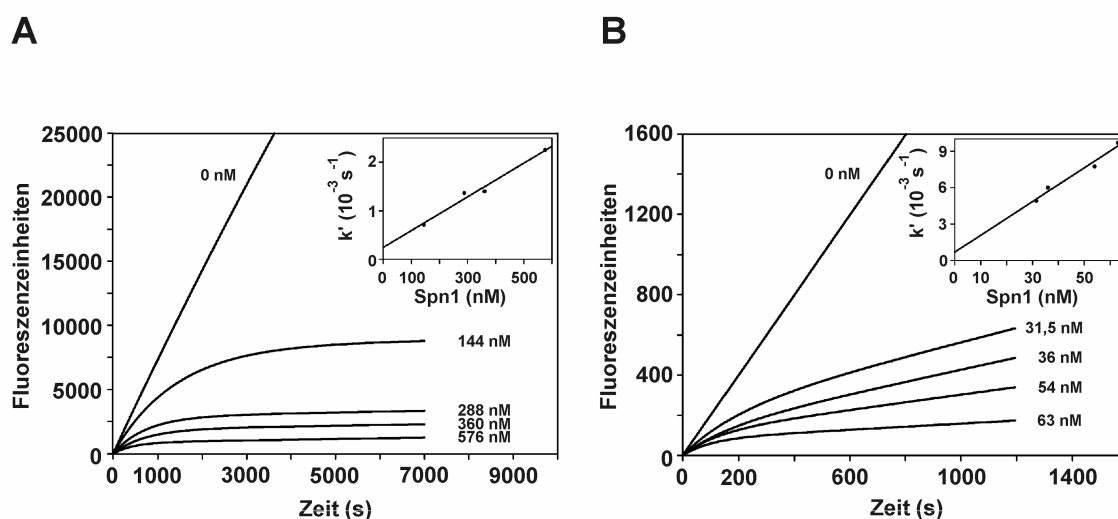


Abbildung 13: Kinetik der Hemmung von Furin und mPC1/3 durch BI-Spn1. Unterschiedliche BI-Spn1-Konzentrationen wurden mit dem Substrat pRTKR-AMC gemischt und die Reaktionen jeweils durch Zugabe von Furin (A) bzw. mPC1/3 (B) gestartet. Die Serpinkonzentrationen sind rechts neben den jeweiligen *Progress-Curves* angegeben. Die oben eingefügten Abbildungen zeigen jeweils die lineare Abhängigkeit der Hemmkonstante k' von der Serpinkonzentration.

Aus Abbildung 13 geht hervor, dass die Schnittpunkte der extrapolierten Geraden mit der y-Achse >0 sind. Diese Werte, die der Dissoziationskonstanten k_{diss} entsprechen, wurden zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_i herangezogen (Gleichung 1, Abschnitt 4.8.3). Für beide Reaktionen liegen die K_i -Werte im nanomolaren Bereich (Tabelle 29), weshalb beide Inhibitionsreaktionen als irreversibel betrachtet werden können.

Durch die kinetischen Analysen konnte daher gezeigt werden, dass BI-Spn1 Furin und PC1/3 mit physiologisch relevanten Geschwindigkeiten hemmt. PC2 wird dagegen nicht von BI-Spn1 inhibiert.

Tabelle 29: Kinetische Parameter der Furin- und mPC1/3-Inhibition

	Furin	mPC1/3
SI	2,9	3,5
k_{ass}	$3,8 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$2,8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$
$k_{ass} \times SI$	$1,1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$9,8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$
k_{diss}	$2,4 \times 10^4 s^{-1}$	$6,9 \times 10^4 s^{-1}$
K_i	6,3 nM	2,5 nM

5.1.3 Identifikation der Proproteinkonvertase-Spaltstellen

In den vorangehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass *Bl-Spn1* Furin und PC1/3 inhibiert. Die Präsenz basischer Aminosäuren an den Positionen 363 und 364 (Sequenz siehe Abschnitt 8.3.1), dem mutmaßlichen reaktiven Zentrum von *Bl-Spn1*, hatte ursprünglich den Hinweis auf die Hemmung der PCs gegeben.

Im weiteren Verlauf wurde durch Massenspektrometrie untersucht, ob die Spaltung des Serpins bei Durchlaufen des Substratpfads tatsächlich C-terminal der Aminosäure Arginin³⁶⁴ erfolgt. Hierfür wurde *Bl-Spn1* mit Furin bzw. hPC1/3 inkubiert und die Reaktionsprodukte nach Entsalzung durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abschnitt 4.9). Als Kontrolle wurde der Inhibitor ohne PC-Zusatz inkubiert. Für eine Spaltung C-terminal zur Position 364 (Arg) wurden dabei Fragmente der Größe $m/z = 39614$ (N-terminales Fragment) und $m/z = 4910,52$ (C-terminales Fragment) erwartet. Abbildung 14 zeigt Ausschnitte aus den Spektren im Bereich $m/z = 4560-6000$. Es ist zu sehen, dass nach Inkubation des Inhibitors mit Furin (A) und hPC1/3 (B) ein Peak bei $m/z = 4918,29$ bzw. $4918,95$ auftritt, der im Kontrollansatz (C) fehlt. Diese Werte korrelieren gut mit dem Wert, der für das erwartete C-terminale Fragment nach PC-vermittelter Proteolyse berechnet wurde. Die erhaltenen Massen weichen um weniger als 0,16 % von der berechneten Masse ab, weshalb dieses Ergebnis als signifikant eingestuft werden kann. Fragmente, die durch Proteolyse C-terminal von der Aminosäurepositionen 363 (P2-Position) oder 365 (P1'-Position) entstanden wären, hätten Abweichungen von 1,8 bzw. 3,1 % verursacht. Der Nachweis des größeren N-terminalen Fragments ist mit dieser Methode nicht gelungen. Gleichwohl konnte durch dieses Experiment eindeutig gezeigt werden, dass die PCs den RSL von *Bl-Spn1* C-terminal zum dibasischen Motiv spalten. Dieses Ergebnis wird weiterhin dadurch untermauert, dass eine *Bl-Spn1*-Mutante mit einem Alanin an Position P1 Furin nicht mehr inhibiert (Mischo, 2004).

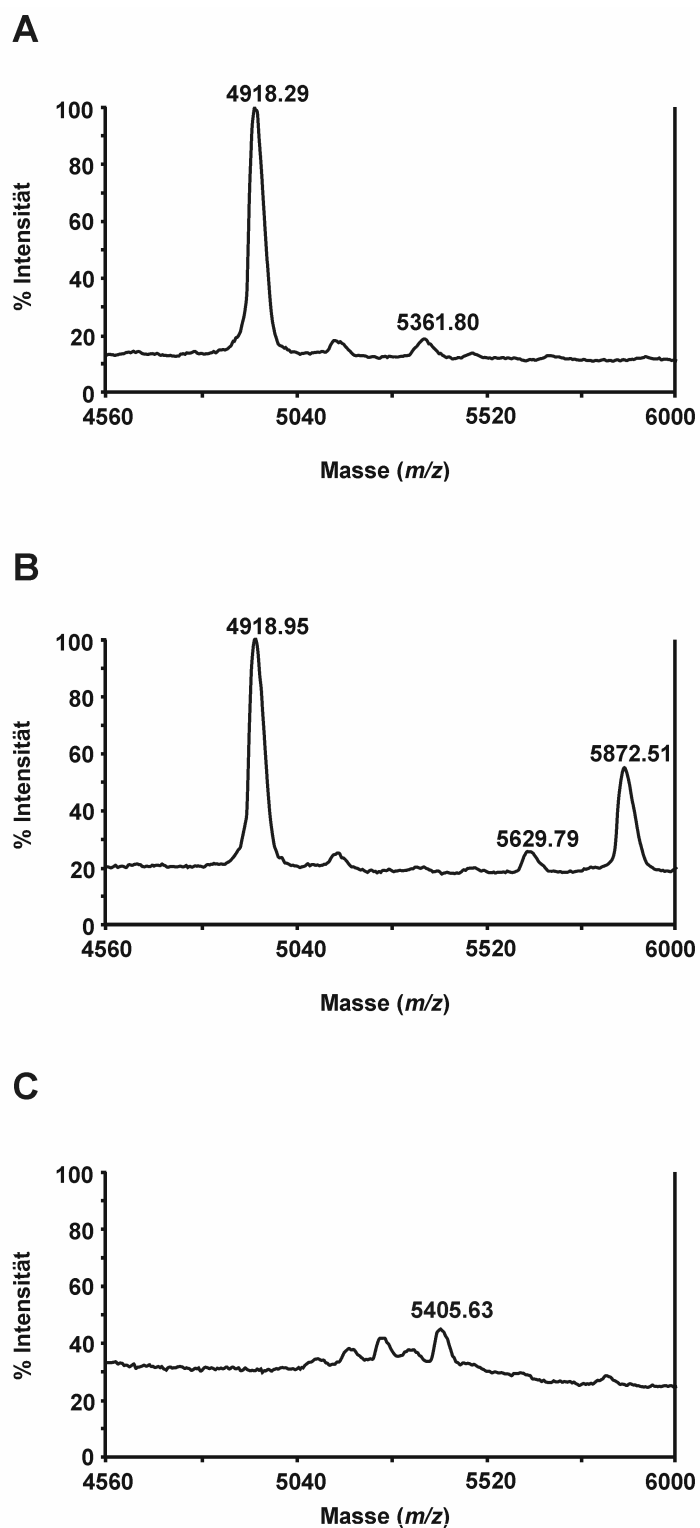


Abbildung 14: Identifizierung der PC-Spaltstellen im RSL von *Bl-Spn1*. *Bl-Spn1* wurde mit Furin (A), hPC1/3 (B) oder H₂O (C) inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch MALDI-TOF-MS analysiert. Die in (A) und (B) auftretenden Signale bei $m/z = 4918,29$ bzw. $4918,95$ belegen, dass die Spaltung C-terminal von der Sequenz MMKR erfolgt. In der Kontrollreaktion (C) tritt dieses Signal nicht auf.

5.1.4 Das C-terminale KDEL-Motiv verhindert den Export von *Bl*-Spn1 aus COS-7-Zellen

Das *Branchiostoma*-Serpine *Bl*-Spn1 war nicht nur wegen seines dibasischen RSL-Motivs als Inhibitor von PCs in Betracht gezogen worden, sondern auch aufgrund seines C-terminalen ER-Retentionssignals (KDEL). Dieses Signal, in Kombination mit dem N-terminalen Signalpeptid, ließ vermuten, dass der Inhibitor im sekretorischen Pfad, dem Wirkort der PCs, zurückgehalten wird. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das Furin inhibierende Serpin *Dm*-Spn4A, das über ein ähnliches Retentionssignal verfügt (HDEL), im ER lokalisiert ist (Oley *et al.*, 2004). Im Folgenden wurde untersucht, ob auch die C-terminale KDEL-Sequenz von *Bl*-Spn1 eine intrazelluläre Retention des Serpins bewirkt.

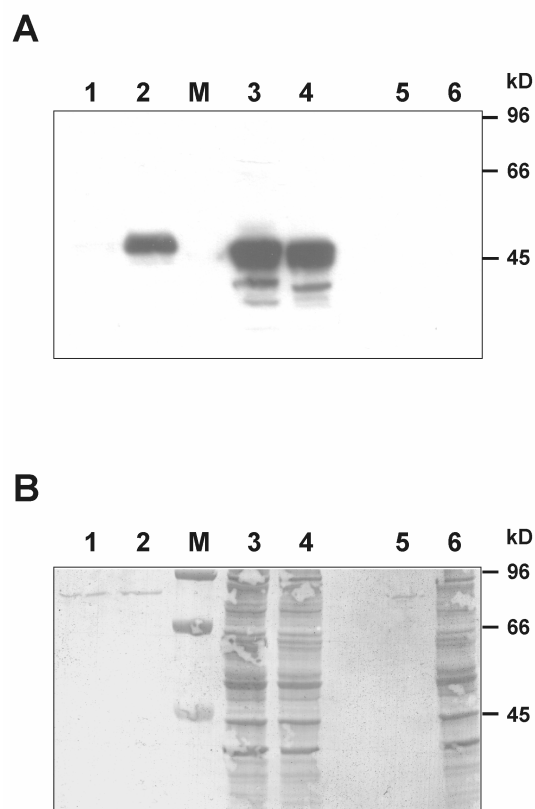


Abbildung 15: Das KDEL-Motiv verhindert die Sekretion von *Bl*-Spn1 aus COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für Wildtyp-*Bl*-Spn1 oder für eine KDEL-Deletionsmutante des Serpins (Spn1 Δ -KDEL) kodieren. Die Überstände und Extrakte der Zellen wurden durch Western-Blot (10 %ige Gele) mit Anti-*Bl*-Spn1-Antikörpern analysiert (A). Die PVDF-Membran wurde anschließend gefärbt, um eine gleichmäßige Gelbeladung zu belegen (B). Die Spuren 1 und 2 zeigen jeweils die Überstände von COS-7-Zellen, transfiziert mit Wildtyp-*Bl*-Spn1 bzw. mit *Bl*-Spn1 Δ KDEL. Die entsprechenden Extrakte sind in den Spuren 3 (Wildtyp-*Bl*-Spn1) und 4 (*Bl*-Spn1 Δ KDEL) dargestellt. Die Spuren 5 und 6 zeigen die Überstände bzw. Extrakte nicht-transfizierter Zellen. Die Größen von Markerproteinen (Spur M) sind jeweils am rechten Bildrand angegeben.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden zwei eukaryotische Expressionskonstrukte hergestellt, von denen das eine für Wildtyp-*Bl-Spn1* (pcDNA3.1Spn1wSp) und das andere für eine KDEL-Deletionsmutante des Serpins (pcDNA3.1Spn1Mut, *Bl-Spn1*ΔKDEL) kodierte (Abschnitt 4.3.11). COS-7-Zellen wurden anschließend mit jeweils einem dieser Konstrukte transfiziert (Abschnitt 4.6.5). Im Anschluss an die Transfektion wurden die Proteine der Überstände und Extrakte der transfizierten Zellen durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Anti-*Bl-Spn1*-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle dienten die Überstände und Extrakte nicht-transfizierter Zellen.

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass das Wildtyp-Serpin vollständig im Zellinnern von COS-7-Zellen zurückgehalten wurde, da es nur in den Extrakten (Spur 3), nicht aber in den Überständen (Spur 1) transfizierter COS-7-Zellen nachweisbar war. Die KDEL-Deletionsmutante konnte dagegen sowohl in den Extrakten (Spur 4) als auch im Medium (Spur 2) nachgewiesen werden. In der Abbildung ist außerdem die nachträglich mit Coomassie angefärbte PVDF-Membran dargestellt, die belegt, dass gleiche Mengen der Wildtyp- und Mutanten-Proben analysiert wurden. Durch dieses Experiment konnte daher eindeutig gezeigt werden, dass das postulierte ER-Rückführungssignal die Sekretion von *Bl-Spn1* aus COS-7-Zellen verhindert.

5.1.5 Genomische Organisation des *Bl-Spn1*-Gens

Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse hatten gezeigt, dass *Bl-Spn1* ebenso wie das *Dm*-Serpin Spn4A ein PC inhibierendes Serpin ist, das aufgrund seines ER-Retentions-signals im sekretorischen Pfad zurückgehalten wird. Aufgrund dieser funktionellen Ähnlichkeit und der gemeinsamen subzellulären Lokalisation bestand die Möglichkeit, dass die beiden Serpine Orthologe sind, d.h. dass ihre Gene von einem gemeinsamen Vorläufer-Gen abstammen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Aminosäuresequenzen der beiden Serpine und die Organisation ihrer Gene miteinander verglichen.

Ein *CLUSTALW-Alignment* der Proteinsequenzen von *Bl-Spn1* und *Dm-Spn4A* zeigte, dass die beiden Serpine eine Aminosäure-Identität von 38 % aufweisen. Um die Signifikanz dieses Wertes einschätzen zu können, wurde die Aminosäure-Sequenz von *Bl-Spn1* mit den Sequenzen von weiteren 27 *Dm*-Serpinen durch ein *CLUSTALW-Alignment* verglichen. Das betreffende *Alignment* ist im Internet zu finden (ALIGN_000632.dat; <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/embl/align/>). Die Sequenzidentitäten bewegen sich zwischen 19 % (*Bl-Spn1*/ACP76A) und 36 % (*Bl-Spn1*/CG9456).

Zur Bestimmung der Exon-Intron-Struktur des *Bl-Spn1*-Gens wurden aus der *Bl-Spn1*-cDNA verschiedene Primer abgeleitet (Abschnitt 8.2) und diese zur Amplifikation überlappender, genomischer Teilbereiche eingesetzt (Abschnitte 4.3.3

und 4.3.4). Die Teilfragmente wurden subkloniert und anschließend sequenziert. Aus den überlappenden Sequenzen wurde eine Gesamtsequenz erstellt (GenbankTM-Zugangsnummer AJ889984), die anschließend zur Identifikation der Intronbereiche mit der *Bl-Spn1* cDNA aligniert wurde. Die Struktur des Gens ist in Abbildung 16 dargestellt. Das *Alignment* von cDNA und genomischer *Bl-Spn1*-DNA ist im Anhang dargestellt (Abschnitt 8.3.2). Hier sei erwähnt, dass es zwischen der kodierenden Sequenz der *Bl-Spn1*-cDNA und der genomischen Sequenz mehrere Nukleotidsubstitutionen gibt. Manche dieser Substitutionen führen zu einer veränderten Aminosäuresequenz (cDNA→genomische Sequenz: 7S→C, 43T→A, 66A→T, 94V→A, 213I→V, 256L→F, 276I→L, 330S→L). Diese Unterschiede sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass cDNA und genomische DNA von unterschiedlichen Individuen isoliert wurden. Für die Bestimmung der Genstruktur von *Bl-Spn1* sind diese Unterschiede aber ohne Bedeutung.



Abbildung 16: Exon-Intron-Struktur des *Bl-Spn1*-Gens. Exons sind als nummerierte Kästchen dargestellt. Translatierte Bereiche sind schwarz, untranslatierte Bereiche sind weiß eingefärbt. Introns sind als Linien dargestellt. Die Größen von Exons und Introns sind jeweils in Bp angegeben. Die (exakte) Lokalisation der *Bl-Spn1*-Introns ist dem Text oder dem im Anhang dargestellten *Alignment* zu entnehmen (Abschnitt 8.3.4).

Das *Bl-Spn1*-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns, wobei das erste Intron in der 5'-untranslatierten Region (UTR) lokalisiert ist. Intron 2 unterbricht den kodierenden Bereich zwischen AS 55 und 56. Intron 3 folgt auf die erste Base des Triplets für AS 155. Um einen Vergleich zwischen den Intronpositionen von *Bl-Spn1* und *Dm-Spn4A* anstellen zu können, wurde die *Bl-Spn1*-Proteinsequenz mit reifem α_1 -Antitrypsin aligniert (Long *et al.*, 1984) (Abschnitt 8.3.4). Bezogen auf die α_1 -Antitrypsin-Nummerierung liegt die Position von Intron 2 bei der Aminosäureposition 75c (die Suffixe a, b bzw. c geben an, ob das Intron nach der ersten, der zweiten oder der dritten Base eines Codons auftritt). Die Position von Intron 3 kann aufgrund von *Alignment*-Unsicherheiten nicht genau angegeben werden (mögliche Positionen: 174a, 175a oder 176a). Trotz dieser Unsicherheit ist klar, dass keine der Intronpositionen des *Bl-Spn1*-Gens mit einer der Positionen des *Dm-Spn4*-Homologs übereinstimmt, dessen Introns, bezogen auf das α_1 -Antitrypsin-Nummerierungssystem, die Positionen 305c bzw. 352a einnehmen (Krüger *et al.*, 2002).

Diese Struktur und die Tatsache, dass die Sequenz-Identität von *Bl-Spn1* und *Dm-Spn4A* nicht signifikant höher ist als die Sequenz-Identität von *Bl-Spn1* und anderen *Dm*-Serpinen, lassen offen, ob es sich bei den beiden Genen um Orthologe handelt.

5.2 SERPINE3 – ein neues humanes Serpin mit dibasischem RSL-Motiv

Die Ergebnisse dieser und einer früheren Arbeit (Oley *et al.*, 2004) hatten gezeigt, dass sowohl *Branchiostoma lanceolatum*, ein enger Verwandter der Wirbeltiere, als auch die Fruchtfliege jeweils ein Serpin exprimieren, das aufgrund seiner PC inhibierenden Aktivität und seiner subzellulären Lokalisation als physiologischer Inhibitor von PCs in Betracht kommt. Damit stellte sich die Frage, ob auch Vertebraten die inhibitorische Aktivität von Serpinen zur Regulation der PC-Aktivität im sekretorischen Pfad nutzen. Während der Durchführung dieser Arbeit wurde eine *Real-Time-PCR*-Studie publiziert, in der untersucht wurde, wie die Expression von Serpinen und Proteasen in verschiedenen gesunden und kranken menschlichen Geweben korreliert (Badola *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Expression von SERPINE3 analysiert, eines bis dato völlig unbekanntes Serpins. Die in der Studie gezeigte SERPINE3-RSL-Sequenz ließ vermuten, dass SERPINE3 ein neuer PC-Inhibitor in Vertebraten ist, da SERPINE3 basische Aminosäuren an den potenziellen Positionen P2/P1 im RSL besitzt. Allerdings verbarg sich hinter der in der Studie angegebenen GenBankTM-Zugangsnummer eine Sequenz, die lediglich aus dem Humangenom abgeleitet worden war. Auch die Primersequenzen, die zur Analyse der Expression von SERPINE3 verwendet wurden, sind in der Studie nicht dargestellt. Weiterhin ergab eine Datenbankrecherche, dass für SERPINE3 zwei unterschiedliche aus dem Humangenom abgeleitete Sequenzen annotiert sind (Abschnitt 5.2.1), deren tatsächliche Expression unklar war. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der Identifikation, Klonierung, Expression und ersten Analysen zur Funktion von SERPINE3.

5.2.1 SERPINE3 ist unter Vertebraten hoch konserviert

Durch Datenbankrecherche unter Nutzung von *BLASTP* (Abschnitt 8.4) konnte die Präsenz von SERPINE3-DNA-Sequenzen in verschiedenen Vertebraten – darunter Mensch, Schimpanse, Hausrind, Maus, Ratte, Pferd, Huhn und Zebrafisch – nachgewiesen werden (Abbildung 17). Allerdings handelt es sich bei fast allen Sequenzen um vorhergesagte, nicht experimentell belegte DNA- und Proteinsequenzen. Lediglich die SERPINE3-Proteinsequenzen von Maus, Hausrind und Zebrafisch wurden aus experimentell belegten cDNA-Sequenzen abgeleitet. Für das menschliche

SERPINE3 sind zwei Sequenzen annotiert, die sich in ihren C-Termini voneinander unterscheiden (GenBankTM-Zugangsnummern: AX407123 bzw. XH_941682). Ein Aminosäure-Alignment dieser vorhergesagten Sequenzen mit den aus cDNAs abgeleiteten Sequenzen von Maus und Rind deutete darauf hin, dass es sich bei der Sequenz mit der GenBankTM-Zugangsnummer AX407123 um die richtige Vorhersage handelte, da der C-Terminus dieser humanen SERPINE3-Sequenz eine höhere Ähnlichkeit zu den Sequenzen von Maus und Rind aufwies (Abbildung 17). Diese Vermutung wurde durch Genstrukturanalysen gestützt (Abschnitt 5.2.4). Die folgenden zwei Abschnitte, die sich mit der Klonierung, Sequenz und Struktur von humanem SERPINE3 beschäftigen, liefern den experimentellen Beweis für die Richtigkeit dieser These.

```

Schimpanse (XM_509786) : GTKASGATALLLKRSRIPIFKADRPFIYFLREPNTG--ITVFFD : 472
Mensch (XM_941682) : GTKASGATALLLKRSRIPIFKADRPFIYFLREPNTG--ITVFFD : 472
Mensch (AX407123) : GTKASGATALLLKRSRIPIFKADRPFIYFLREPNTG--FVFSIG : 397
Rind (BC149709) : GTKASAATALLLKRSRIPIFKADRPFIFFLREPNTA--FVFSIG : 393
Maus (AK053602) : GTRSSAATAVLLRRSRTSAFKADRPFIFFLREHSTG--FVFSIG : 394
Pferd (XP_001488711) : GTKTSAAATALLLKRSRIPIFKADRPFIFFLREPNTG--FVFSIG : 396
Ratte (XP_001073783) : GTKSCAATAVLLRRSRTPAFKADRPFIFFLREHNTG--FVFSIG : 395
Huhn (XM_417070) : GTKASGATAMVLLKRSRTPIFKADRPFTFFLRQANTGTYARFLIQ : 775
Zebrafisch (M_679453) : GTKAASATAMVLLKRSRAVEFKADRPFLFLLRQISTG--SLLFIG : 618

Schimpanse (XM_509786) : RI-----QIIYQCLSSNKGSFVHYPLKNKHSF----- : 499
Mensch (XM_941682) : RI-----QIIYQCLSSNKGSFVHYPLKNKHSF----- : 499
Mensch (AX407123) : R-----VSNPLD----- : 404
Rind (BC149709) : R-----VLNPLH----- : 400
Maus (AK053602) : R-----VSNPLD----- : 401
Pferd (XP_001488711) : R-----VSNPLD----- : 403
Ratte (XP_001073783) : R-----VSNPLD----- : 402
Huhn (XM_417070) : QQNHSQVAPKLLLMKNRIFSDTDLIIQYLVNTEKWKFKKKAK : 819
Zebrafisch (M_679453) : R-----VVNPADMP----- : 627

```

Abbildung 17: C-Termini der verschiedenen Vertebraten-SERPINE3-Proteine. Das Alignment wurde mit *CLUSTALW* erstellt. Identische Aminosäuren sind invertiert (weiß auf schwarz) dargestellt. Die GenBankTM-Zugangsnummern der Sequenzen sind in Klammern neben dem jeweiligen Organismus angegeben. Rote Zugangsnummern bedeuten, dass die Proteinsequenz aus einer cDNA abgeleitet wurde.

5.2.2 Amplifikation und Klonierung der SERPINE3-cDNA

Zur Amplifikation der humanen SERPINE3-cDNA wurde Gesamt-RNA aus der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 isoliert und anschließend revers transkribiert (Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2). Diese Zelllinie wurde gewählt, da in einer Studie gezeigt wurde (Badola *et al.*, 2006), dass das SERPINE3-Expressionsniveau in Lungenkrebsgewebe erhöht ist. Die Amplifikation der SERPINE3-cDNA erwies sich allerdings als schwierig, und es mussten zwei aufeinander folgende Amplifikationsrunden mit 35 bzw. 20 Zyklen durchgeführt werden, um das in Abbildung 18 dargestellte ca. 1200 Bp große Amplifikat zu erhalten, das den

vollständigen kodierenden Bereich der SERPINE3-cDNA repräsentiert. Das erste Primerpaar (E3_5'UTR, E3_3'UTR) war dabei in den hypothetischen untranslatierten Regionen der SERPINE3-cDNA angesiedelt (Abbildung 18). Diese Sequenzbereiche wurden aus der genomischen Sequenz abgeleitet (GenBank™-Zugangsnummer: AL137780). Die Primer für die zweite Amplifikationsrunde (E3_F1+, E3_F2-) waren zum Anfangs- bzw. Endbereich der kodierenden Sequenz von SERPINE3 komplementär. Das 1218 Bp große Amplifikat wurde subkloniert und anschließend sequenziert (Abschnitte 4.3.10 bis 4.3.12). Die Sequenz, die zu 100 % der vorhergesagten Sequenz AX407123 entspricht, wurde bei EMBL unter der Zugangsnummer AM402969 abgelegt. Die Sequenz ist im Anhang dargestellt (Abschnitt 8.3.3).



Abbildung 18: Amplifikation der SERPINE3-cDNA. (A) 1,5 %iges Agarosegel zum Nachweis des 1218 Bp großen SERPINE3-Amplifikats (Spur 1). Relevante Markergrößen sind am rechten Bildrand angegeben (in Bp, Spur M). (B) Ausschnitt aus dem 5'- bzw. 3'-Bereich der SERPINE3-cDNA zur Demonstration der Primer-Bindestellen. Die Primersequenzen der ersten PCR (gelb hervorgehoben) sind komplementär zu Sequenzen in der 5'- bzw. 3'-UTR der cDNA. Die Primersequenzen der nachfolgenden PCR (grün hervorgehoben) sind komplementär zum Anfangs- bzw. Endbereich der kodierenden Sequenz von SERPINE3. Start- und Stopcodon sind durch Fettdruck hervorgehoben.

5.2.3 Analyse der SERPINE3-Aminosäuresequenz und Modellierung des Proteins

Aus der cDNA wurde eine 404 AS lange Proteinsequenz abgeleitet (Abbildung 19). Am N-Terminus konnte mit Hilfe des Programms *SignalP 3.0* (Abschnitt 8.4) ein potenzielles Signalpeptid (Positionen 1–20) und eine entsprechende Signalpeptidase-Spaltstelle zwischen den Positionen 20 und 21 vorhergesagt werden. Das reife SERPINE3-Protein, das nach Abspaltung dieser Signalsequenz entsteht, besitzt eine berechnete Masse von 42,2 kD und einen pI von 6,02. Die Berechnungen wurden mit dem Programm *ProtParam* angestellt (Abschnitt 8.4). Eine Analyse der SERPINE3-

Proteinsequenz mit *ScanPros* deckte eine für Serpine typische Sequenz innerhalb der Aminosäuren 375-385 sowie drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen auf (Positionen 46-48, 136-138, 148-150).

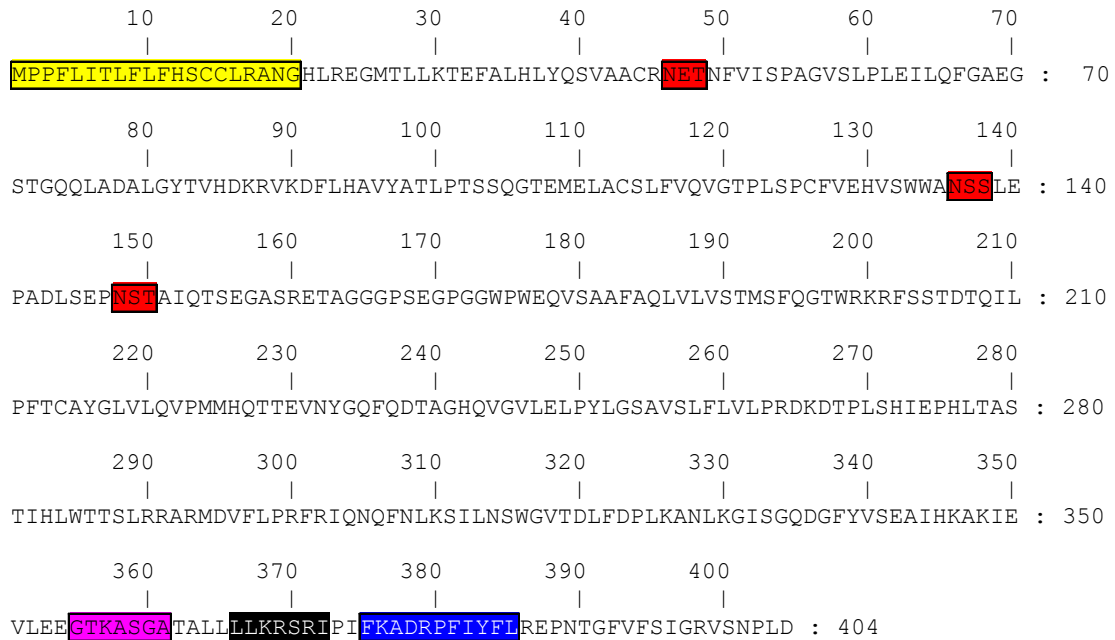


Abbildung 19: Aminosäuresequenz von SERPINE3. Hervorgehoben sind Signalpeptid (gelb), drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen (rot), die *Hinge*-Region (pink), das reaktive Zentrum (Positionen P4-P3', schwarz) sowie die Serpin-Signatur (blau).

Durch den Vergleich der RSL-Sequenzen von SERPINE3 und anderen Serpinen (Abbildung 20) konnte die Präsenz einer konservierten *Hinge*-Region (P15-P9) nachgewiesen werden. Diese Region weist viele kleine Aminosäuren auf, was typisch für inhibitorische Serpine ist (Gettins, 2002b). Der Vergleich deutet ebenso darauf hin, dass Lys³⁶⁹ und Arg³⁷⁰ die Positionen P2 bzw. P1 des Proteins repräsentieren.

	P15	P12	P9		P1	P2'														
SERPINE3	G	T	K	A	S	G	A	T	A	L	L	L	L	K	R	S	R	I	P	I
SERPINE2	G	T	K	A	S	A	A	T	T	A	I	L	I	A	R	S	S	P	P	W
SERPINA1	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P	E
SERPINI1	G	S	E	A	A	A	V	S	G	M	I	A	I	S	R	M	A	V	L	Y
SERPINE10	G	T	E	A	A	A	G	S	G	S	E	I	D	I	R	I	R	V	P	S
SERPINE1	G	T	V	A	S	S	S	T	A	V	I	V	S	A	R	M	A	P	E	E
SERPINE8	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	V	R	N	S	R	C	S	R	M	E
SERPINE1	G	S	E	A	A	A	S	T	A	V	V	I	A	G	R	S	L	N	P	N
Bl-Spn1	G	S	E	A	A	A	A	T	A	V	N	M	M	K	R	S	L	D	G	E
SERPINE1	G	T	Q	A	T	T	V	T	T	V	G	F	M	P	L	S	T	Q	V	R
SERPINE9	G	T	E	A	T	A	A	T	T	T	K	F	I	V	R	S	K	D	G	P

Abbildung 20: Alignment der RSL-Sequenzen von SERPINE3 und anderen Serpinen. Vergleich der (mutmaßlichen) Positionen P15 bis P5' von SERPINE3, neun anderen humanen Serpinen und *Bl*-Spn1. Aminosäuren sind wie folgt hervorgehoben: basische, blau; saure, rot; polare, orange; nicht polare, grün.

Der C-Terminus von SERPINE3 weist im Gegensatz zu *Bl-Spn1* und *Dm-Spn4A* kein ER-Retentionssignal auf, was auf eine extrazelluläre Lokalisation des Serpins hindeutet. Zusammengefasst deuten diese Sequenzmotive darauf hin, dass es sich bei SERPINE3 um ein sekretiertes Protein handelt, dessen Zielproteasen möglicherweise PCs oder Trypsin-ähnliche Proteasen sind.

Mit Hilfe des Programms *Swiss-Model* (Abschnitt 8.4) wurde auf Basis der bekannten Kristallstrukturdaten des humanen Serpins Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1, Synonym: SERPINE1, PDB-Code: 1db2A, Auflösung: 2,7 Å, Homologie-Score: 2e-49) eine Tertiärstruktur von SERPINE3 modelliert. Die in Abbildung 21 dargestellte Struktur beinhaltet die Positionen 28-401. Die ersten acht sowie die drei letzten Aminosäuren des reifen Proteins konnten aufgrund fehlender Vergleichsdaten nicht modelliert werden.

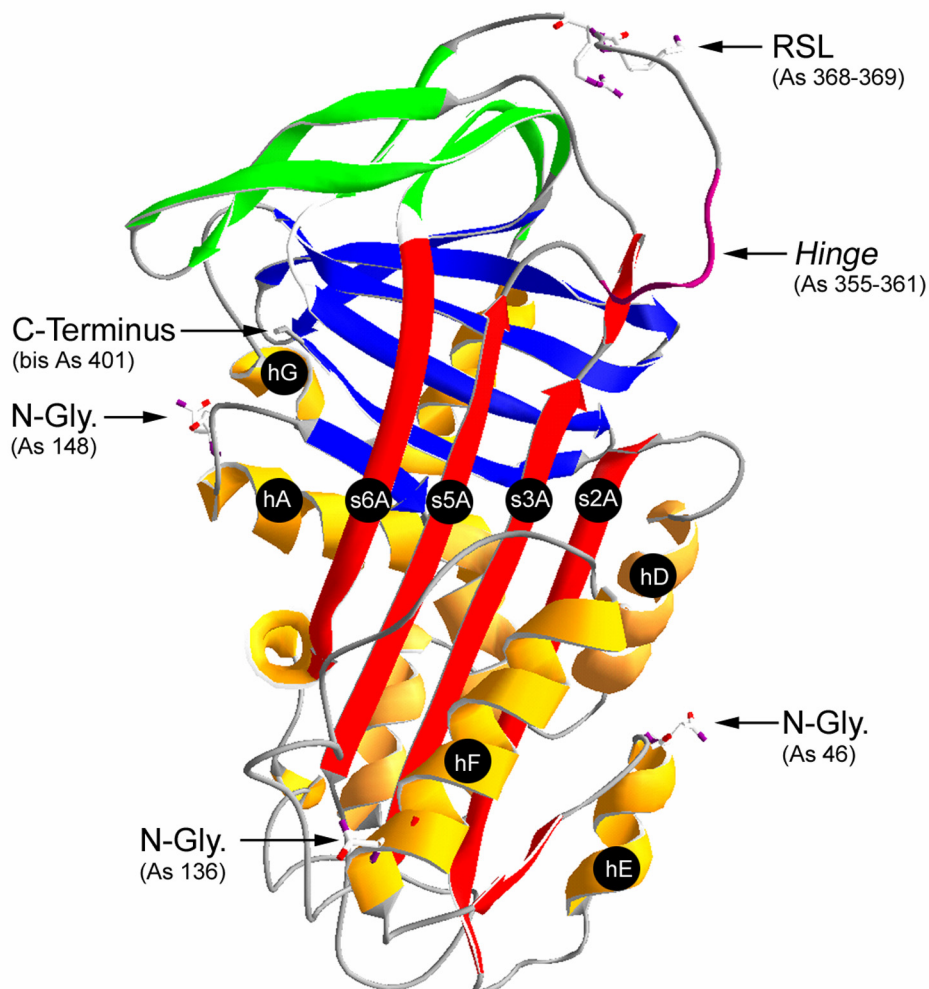


Abbildung 21: Modell der Tertiärstruktur von SERPINE3. Helices sind gelb, β -Faltblätter rot (sA), blau (sB) und grün (sC) gekennzeichnet. Die *Hinge*-Region (P15-P9) ist lila eingefärbt. Der C-Terminus, die mutmaßlichen P2/P1-Positionen im RSL sowie die drei Asparagin-Reste der potenziellen N-Glykosylierungsstellen sind jeweils gekennzeichnet.

Das Modell, das neun α -Helices und drei β -Faltblätter zeigt, korreliert mit der typischen Struktur von Serpinen. Alle drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen sind auf der Oberfläche exponiert, weshalb eine Glykosylierung des nativen Proteins möglich ist. In Helix A, den β -Faltblättern s2A und s4C sowie am Übergang zu Helix E befindet sich jeweils ein Cystein. Die Abstände zwischen den einzelnen Cystein-Resten übersteigen in jedem Fall 2 Å, was für die Ausbildung von Disulfidbrücken zu groß ist (Holleman-Wieberg, 1995).

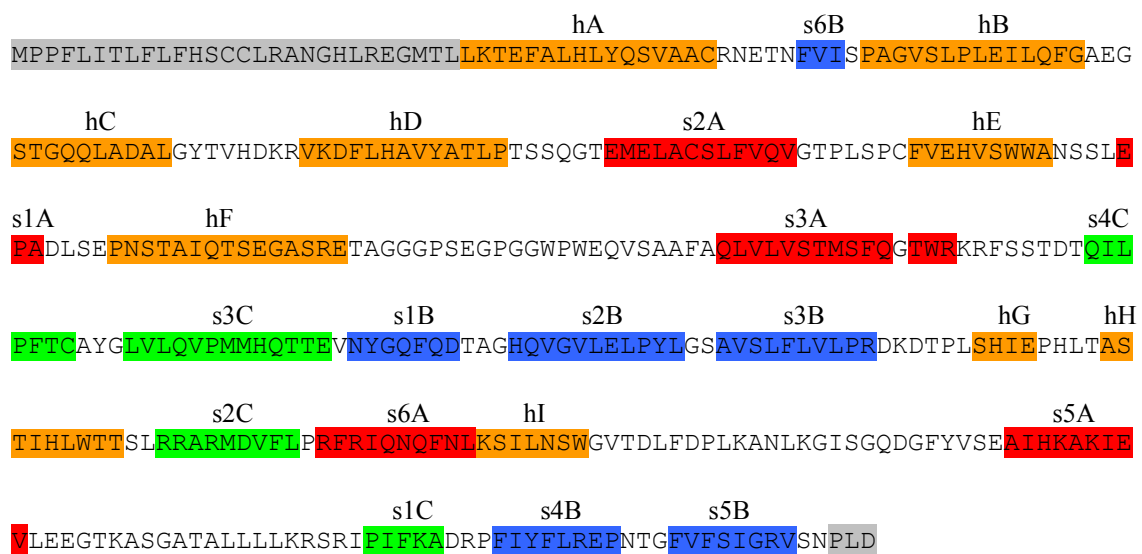


Abbildung 22: Sekundärstrukturelemente von SERPINE3. Die Bezeichnung der Strukturelemente orientiert sich am Modell von α_1 -Antitrypsin (Abschnitt 2.3). Bereiche, die nicht modelliert werden konnten, sind grau eingefärbt (Farbgebung: siehe Abbildung 21).

5.2.4 Organisation des SERPINE3-Gens

Für die phylogenetische Klassifikation von Serpinen existieren unterschiedliche methodische Ansätze. Eines der Klassifikationssysteme teilt die Vertebraten-Serpine auf der Basis ihrer Genstrukturen und Intronpositionen innerhalb des konservierten Bereichs in sechs verschiedene Genfamilien ein (Ragg *et al.*, 2001).

Zur Klassifikation von SERPINE3 wurde zunächst die Organisation des Gens durch ein *Alignment* der SERPINE3-cDNA-Sequenz (AM402969) und der Sequenz der genomischen DNA ermittelt (Programm *Spidey*, Abschnitt 8.4) Der Protein kodierende Bereich des Gens setzt sich aus acht Exons und sieben Introns zusammen. Diese Strukturanalyse lieferte den ersten Hinweis dafür, dass es sich bei SERPINE3 um ein Vertebraten-Serpin der Gruppe 3 handelt, da eine solche genomische Organisation charakteristisch für die Serpine dieser Gruppe ist (Abbildung 23). Eine eindeutige

Zuordnung von SERPINE3 zur Gruppe 3 der Vertebraten-Serpine erfolgte schließlich durch Vergleich der Intronpositionen von SERPINE3 mit denen von Gruppe 3-Serpinen im α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem. Im α_1 -Antitrypsin-Nummerierungssystem weisen die Serpine der Gruppe 3 insgesamt sechs konservierte Intronpositionen auf (Introns 2-7: Positionen 167a, 230a, 290b, 323a, 352a und 380a). Die Position des ersten Introns dieser Serpine (~90a) kann aufgrund von *Alignment*-Unsicherheiten in dieser Region nicht genau angegeben werden (Ragg *et al.*, 2001). Ein Aminosäure-*Alignment* von SERPINE3 und reifem α_1 -Antitrypsin zeigte, dass die Positionen und Phasen der Introns 2-7 von SERPINE3 exakt mit denen von Gruppe 3-Serpinen übereinstimmen. Die Position des ersten Introns liegt bei Position 89a (α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem). Das entsprechende *Alignment* ist im Anhang dargestellt (Abschnitt 8.3.4). Durch diese Strukturanalysen konnte daher nachgewiesen werden, dass SERPINE3 zur Gruppe 3 der Vertebraten-Serpine gehört. In Abbildung 23 sind die Genstrukturen aller bekannten Serpine dieser Klasse dargestellt.

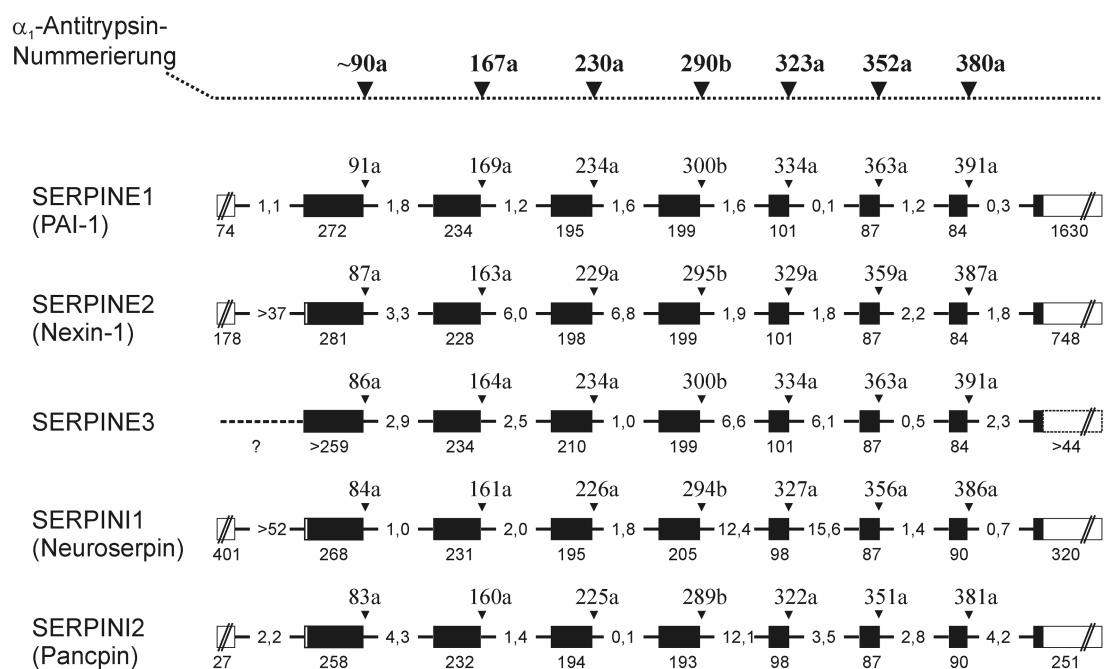


Abbildung 23: Organisation der Gene von Gruppe 3-Serpinen. Translatierte Bereiche sind als schwarze, untranslatierte Bereiche als weiße Kästchen dargestellt. Introns sind durch Linien gekennzeichnet. Die Größe von Exons ist in Bp, die von Introns in kb angegeben. Für alle Serpine sind die genspezifischen Intronpositionen mit ihren Phasen angegeben (schwarze Dreiecke). Am oberen Bildrand sind weiterhin die α_1 -Antitrypsin-spezifischen Intronpositionen angegeben, die mit Ausnahme des ersten Introns bei allen dargestellten Serpinen gleich sind. Für SERPINE3 liegen noch keine Sequenzdaten für die UTRs vor (unterbrochene Linien und Kästchen). Die Genstrukturen basieren auf folgenden cDNA-Sequenzen: SERPINE1 (NM_000602), SERPINE2 (NM_006216), SERPINI1 (NM_005025), SERPINI2 (NM_006217).

In diesem Zusammenhang sei kurz erwähnt, dass die Strukturanalysen auch dazu beitragen, die richtige Vorhersage für die C-terminale Sequenz von SERPINE3 zu treffen (siehe Abschnitt 5.2.1). Bei der Strukturanalyse der beiden unterschiedlich annotierten SERPINE3-Sequenzen fiel auf, dass die Sequenz mit der GenBankTM-Zugangsnummer: XH-9486XX im Gegensatz zu der Sequenz mit der GenBankTM-Zugangsnummer AX407123 kein Intron an der konservierten Position 380a (α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem) aufwies. Ansonsten teilten beide Sequenzen alle Positionen mit denen der Gruppe 3-Serpine.

5.2.5 Bakterielle Expression und Reinigung von His₆-GST-SERPINE3

Für Untersuchungen der biologischen Aktivität und zur Gewinnung von Antikörpern musste SERPINE3 in rekombinanter Form gewonnen werden. Da es bereits mehrfach gelungen war, Serpine in aktiver Form und in großen Mengen in Bakterien zu produzieren (Oley *et al.*, 2004; Tödtmann, 2004), wurde ein bakterielles, auf dem Vektor pKM-263 basierendes Expressionsplasmid konstruiert (pKM-INA-E3, Abschnitt 4.3.11) Dieses Konstrukt kodiert für ein His₆-GST-SERPINE3-Fusionsprotein und ist nahezu identisch aufgebaut wie das Plasmid pUT19 (Tödtmann, 2004), das für His₆-GST-Bl-Spn1 kodiert (Abbildung 24). Auf die N-terminalen *Tags* und die Erkennungssequenz für die TEV-Protease folgt die Sequenz für das reife SERPINE3-Protein (AS 18-404)

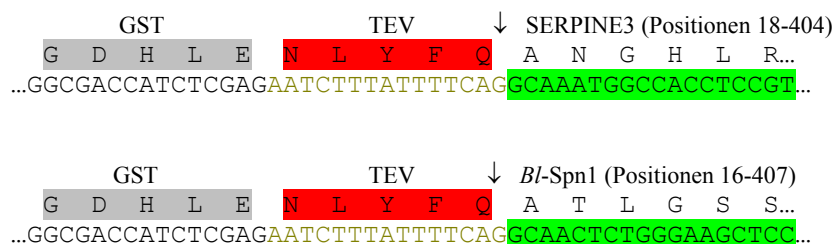


Abbildung 24: Aufbau des His₆-GST-SERPINE3-Fusionskonstruktes. Das Plasmid pKM-INA-E3 (oben) kodiert für ein His₆-GST-SERPINE3-Fusionsprotein und ist nahezu identisch aufgebaut wie das Plasmid pUT19 (unten), das für His₆-GST-Bl-Spn1 kodiert. Auf den N-terminalen His₆-GST-Tag (nur partiell dargestellt) und die TEV-Erkennungssequenz (rot) folgen die Sequenzen für die reifen Serpine (grün). Die TEV-Spaltstelle ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Konstruktion von pKM-INA-E3 ist in Abschnitt 4.3.11 beschrieben.

His₆-GST-SERPINE3 wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (Abschnitt 4.4). Zur Analyse der Expression wurde jeweils vor IPTG-Induktion und bei der Ernte eine Probe genommen und durch SDS-PAGE (4.7.1) analysiert. Abbildung 25 A zeigt, dass das Fusionsprotein erfolgreich exprimiert werden konnte. Am Ende der Induktionsphase

(Spur 2), nicht aber vor Induktion (Spur 1), tritt ein starkes Signal bei ca. 70 kD auf (berechnete Größe des Fusionsproteins: 69,7 kD).

Nach erfolgter Expression wurden die Bakterien mechanisch aufgeschlossen und das Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose gereinigt (Abschnitt 4.4). Die Prozedur erfolgte im *Batch*-Verfahren bei 4 °C, wenn das Protein für Aktivitätsstudien eingesetzt werden sollte. Für die Gewinnung von Anti-GST-SERPINE3-Antikörpern waren große Mengen an rekombinantem Protein erforderlich, weshalb die Reinigung in diesem Falle mit Hilfe einer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Das in Abbildung 25 B dargestellte SDS-Gel zeigt die ersten sieben Elutionsfraktionen einer FPLC-Reinigung. Neben der Fusionsprotein-Bande bei ca. 70 kD treten im Bereich um 55 kD noch weitere Signale auf. Zur näheren Charakterisierung dieser Nebenprodukte wurden die Elutionsfraktionen im Western-Blot mit Anti-GST- bzw. Anti-SERPINE3-Antikörpern analysiert.

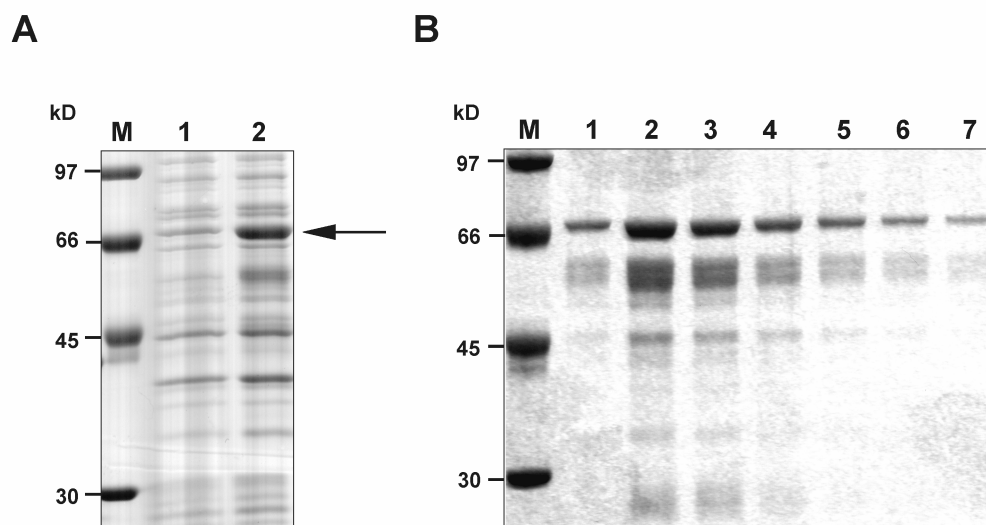


Abbildung 25: Bakterielle Expression und Reinigung von His₆-GST-SERPINE3. (A) Dokumentation der Expression von His₆-GST-SERPINE3 in *E. coli* BL21(DE3). Vor Induktion (Spur 1) und bei Zellernte (Spur 2) wurden die Bakterien durch Aufkochen in Probenpuffer lysiert und die Proteine nach SDS-PAGE (10 %-Gele) mit Coomassie gefärbt. Das Fusionsprotein ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (B) Nach Aufschluss der Bakterien wurde das freigesetzte His₆-GST-SERPINE3 an Glutathion-Sepharose gebunden und anschließend eluiert. Das dargestellte Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt die ersten sieben Elutionsfraktionen einer FPLC-Reinigung (jeweils 20 µL einer 0,5 mL Fraktion, Spuren 1-7). Die Größen von Markerproteinen (Spuren M) sind jeweils am linken Bildrand angegeben.

Die Proteine im Bereich von 50-60 kD reagierten mit beiden Antikörpern (nicht gezeigt). Diese Befunde und die Tatsache, dass die Proteine auch durch *IMAC* nicht angereichert werden konnten, deuteten darauf hin, dass die Nebenbanden C-terminale Abbauprodukte von SERPINE3 repräsentieren. Das SDS-Gel zur Dokumentation der

Expression von His₆-GST-SERPINE3 (Abbildung 25 A) zeigt, dass die partielle Degradation von His₆-GST-SERPINE3 möglicherweise bereits während der Expression in *E. coli* verursacht wird, da in der Probe der Zellernte (Spur 2) deutlich stärkere Signale im Bereich um 55 kD zu sehen sind als vor Induktion.

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde ein Bradford-Assay durchgeführt (Abschnitt 4.4). Aus einer 200 mL-Bakterienkultur konnten durchschnittlich 300 µg des rekombinanten His₆-GST-SERPINE3-Fusionsproteins gereinigt werden. Im Falle von His₆-GST-*Bl*-Spn1 wurden deutlich höhere Ausbeuten erzielt (ca. 5 mg pro 200 mL Kultur, Abschnitt 5.1.1). Eine SDS-PAGE-Analyse, bei der prozentual gleiche Mengen der löslichen und nicht-löslichen Fraktion nach *French-Press*-Aufschluss verglichen wurden, zeigte, dass der überwiegende Teil des Fusionsproteins in der unlöslichen Fraktion vorlag, was die geringen Ausbeuten erklärt (nicht dargestellt).

Um sicherzustellen, dass die 70 kD-Bande tatsächlich His₆-GST-SERPINE3 repräsentierte, wurde die Bande einer Peptidmassen-*Fingerprint*-Analyse unterzogen (Abschnitt 4.9). Durch Abgleich der erhaltenen Massen mit der NCBIInr-Datenbank konnten sowohl GST als auch SERPINE3 eindeutig identifiziert werden. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide sind in Abbildung 26 dargestellt.

```

MHHHHHHASFMSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKKYEEHLYERDEGDKWRNKFELGLEFPNLPYY
IDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEI SMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKL
PEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLK
          *
SSKYIAWPLQGWQATFGGGDHLENLYFQANGHLREGMTLLKTEFALHLYQSVAACRNETNFVISPAGV
SLPLEILQFGAEGSTGQQLADALGYTVHDKRVKDFLHAVYATLPTSSQGTEMELACSLFVQVGTPLSP
CFVEHVSWWANSLEPADLSEPNSTAIQTSEGASRETAGGGPSEGPGGWPWEQVSAAFQQLVLVSTMS
FQGTWRRKRFSSTDTQILPFTCAYGLVLQVPMHQTTTEVNYGQFQDTAGHQVGVLELPLGSAVSLFLV
LPRDKDTPLSHIEPHLTASTIHLWTTSLRRARMDVFLPRFRIQQFNLKSILNSWGVTDLFDPLKANL
KGISGQDGFYVSEAIHKAKIEVLEEGTKASGATALLLLKRSRIPIFKADRPFIYFLREPNTGFVFSIG
RVSNPLD
  
```

Abbildung 26: Peptidmassen-*Fingerprint*-Analyse von His₆-GST-SERPINE3. His₆-GST-SERPINE3 wurde tryptisch verdaut und die Fragmente anschließend durch MALDI-TOF-MS vermessen. Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz von His₆-GST-SERPINE3. Die erste Aminosäure der SERPINE3-Proteinsequenz ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Lysin- und Argininreste sind fett hervorgehoben. Durch Abgleich der erhaltenen Massen mit der NCBIInr-Datenbank mit Hilfe der Mascot-Software konnten die schwarz gekennzeichneten Fragmente nachgewiesen werden. Der Mascot-Score für GST und SERPINE3 übersteigt mit 137 bzw. 98 den Signifikanz-Schwellenwert von 80. Die Sequenzabdeckung liegt bei 54 % (GST) bzw. 28 % (SERPINE3).

Durch Inkubation mit TEV-Protease wurde versucht SERPINE3 aus dem Fusionsprotein freizusetzen (Abschnitt 4.4.1). Während die Kontrollprobe (His₆-GST-*Bl*-Spn1) vollständig gespalten wurde, konnte im Falle von His₆-GST-SERPINE3 keinerlei Spaltung nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 4 °C auf 37 °C bei gleicher Inkubationszeit führte zu keiner Freisetzung von SERPINE3.

5.2.6 Antikörpergewinnung und Reinigung der Antikörper

Zur immunologischen Charakterisierung von SERPINE3 wurden Antiseren produziert. Die Immunisierung eines Kaninchens erfolgte mit dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen gereinigten His₆-GST-SERPINE3-Fusionsprotein durch die Firma Eurogentec (Abschnitt 4.5). Serumproben wurden 37, 65 und 85 Tage nach Start der Immunisierung entnommen. Zur Qualitätsprüfung der Antiseren wurden jeweils verschiedene Verdünnungen des His₆-GST-SERPINE3-Fusionsproteins geblottet und die Blots mit verschiedenen Serumproben analysiert. In Abbildung 27 A ist eine Blot dargestellt, der mit einer 1:5000-Verdünnung des Antiserums vom 66. Immunisierungstags analysiert wurde. Es ist zu sehen, dass 4,25 ng des Fusionsproteins noch gut mit dem Antiserum nachweisbar sind. Aus Abbildung 27 B geht allerdings hervor, dass ein beträchtlicher Anteil des Signals (ca. 30 %) auf die Präsenz von Anti-GST-Antikörpern zurückzuführen ist, da das Antiserum ebenso das His₆-GST-*Bl*-Spn1-Fusionsprotein detektiert.

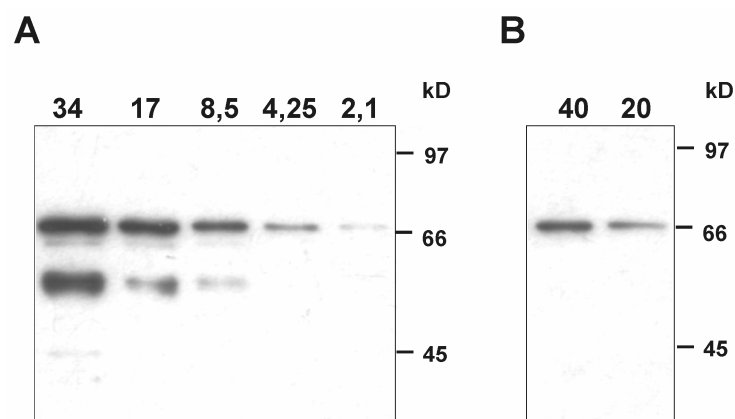


Abbildung 27: Analyse des Anti-GST-SERPINE3-Antiserums. Western-Blot-Analyse (10 %-Gele) verschiedener Verdünnungsstufen von His₆-GST-SERPINE3 (A) bzw. His₆-GST-*Bl*-Spn1 (B). Die Proteinmengen (in ng) sind oberhalb der jeweiligen Spur angegeben. Für die Entwicklung wurde Anti-GST-SERPINE3-Antiserum des 66. Immunisierungstages in einer 1:5000-Verdünnung eingesetzt (Belichtungszeit: 1 min). Die Größen von Markerproteinen (LMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

Zur Abreicherung der Anti-GST-Antikörper und zur spezifischen Anreicherung von Anti-SERPINE3-Antikörpern wurde das Anti-GST-SERPINE3-Antiserum durch Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 4.10.1). Dazu wurde das Antiserum des 86. Immunisierungstages verwendet, das etwas stärkere Signale lieferte als das Antiserum von Tag 66 (nicht gezeigt). In einem ersten Schritt wurden gegen GST gerichtete Antikörper durch Inkubation des Antiserums mit immobilisiertem GST abgereichert. Die Reinigung und Anreicherung SERPINE3-spezifischer Antikörper erfolgte dann durch Bindung dieses partiell gereinigten Antiserums an immobilisiertes His₆-GST-SERPINE3 und anschließender Elution bei saurem pH. In Abbildung 28 A ist ein SDS-Gel dargestellt, das die Immobilisierung von SERPINE3-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose zeigt. Das in Abbildung 28 B dargestellte reduzierende SDS-Gel beschreibt den Verlauf der Antikörper-Reinigung. Während das Ausgangsserum (Spur 1), das GST-bereinigte Serum (Spur 2) und der Überstand nach Inkubation mit der His₆-GST-SERPINE3-Sepharose (Spur 3) noch beträchtliche Mengen an Kaninchen-Serumalbumin (66 kD Bande) aufweisen, ist dieses in den Elutionsfraktionen (Spuren 4 und 5) kaum mehr nachweisbar. Stattdessen tritt in den Elutionsfraktionen ein deutliches Signal bei 55 kD auf. Dieses Signal repräsentiert die schwere Kette der Immunglobuline.

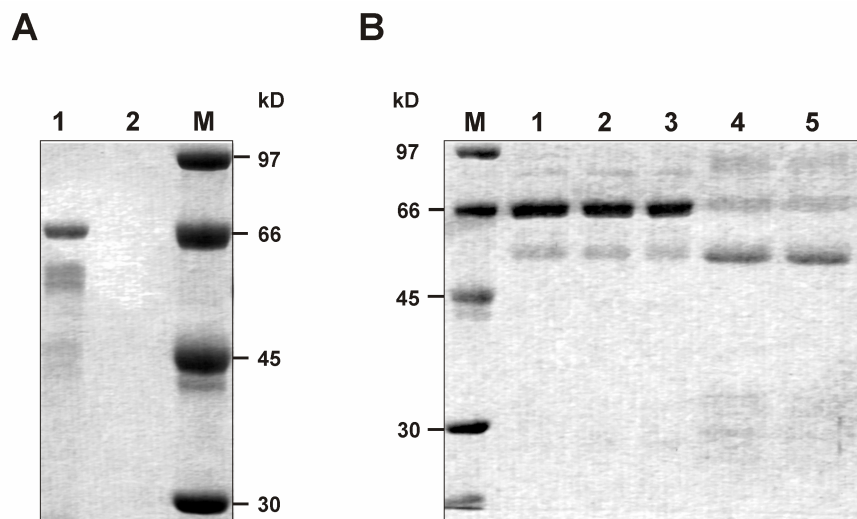


Abbildung 28: Reinigung des polyklonalen Anti-SERPINE3-Antiserums. (A) Zur Reinigung von Anti-SERPINE3-Antikörpern wurde His₆-GST-SERPINE3 kovalent mit DMP an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Jeweils vor Kopplung (Spur 1) und nach Kopplung (Spur 2) wurde ein Anteil der Sepharose-Beads in Lämmli-Puffer aufgekocht und die Überstände durch SDS-PAGE (10 %iges Gel) analysiert. Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht (B) 10 %iges, mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel, das die spezifische Anreicherung von Anti-SERPINE3-Antikörpern zeigt. Ausgangsserum und GST-bereinigtes Serum (jeweils 550 ng) sind in den Spuren 1 bzw. 2 dargestellt. Spur 3 zeigt den Überstand (550 ng) nach Inkubation mit immobilisierter His₆-GST-SERPINE3-Sepharose. In den Spuren 4 und 5 sind jeweils 550 ng Gesamtprotein der ersten beiden Elutionsfraktionen dargestellt. Die Größen von Markerproteinen (Spuren M) sind am rechten bzw. am linken Bildrand angegeben.

Die Charakterisierung der Antikörper erfolgte anschließend durch unterschiedliche Western-Blot-Analysen. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass das gereinigte Antiserum nach wie vor sehr gut das SERPINE3-Fusionsprotein erkennt, gleichzeitig aber nicht mehr *Bl*-Spn1-Fusionsprotein detektiert (nicht dargestellt). Diese Analysen zeigten, dass die Abreicherung der GST-Antikörper erfolgreich war und die Funktionalität der Antikörper durch die Reinigungsprozedur nicht beeinträchtigt wurde (nicht gezeigt). Abschnitt 5.2.12 zeigt, dass das Antiserum ebenso mit endogenem, nicht-denaturiertem SERPINE3 reagiert.

5.2.7 Versuche zum Nachweis der Aktivität von His₆-GST-SERPINE3

Die Ansammlung vieler kleiner Aminosäuren im Bereich der *Hinge*-Region von SERPINE3 und die Präsenz basischer Aminosäuren an den mutmaßlichen Positionen P2 und P1 deuteten darauf hin, dass SERPINE3 ein inhibitorisches Serpin ist, das ein ähnliches Zielprotease-Spektrum wie *Bl*-Spn1 aufweist. Mit Hilfe von Komplexierungsversuchen und/oder kinetischen Tests wurde eine mögliche Interaktion von His₆-GST-SERPINE3 mit den Serinproteasen Trypsin, Furin und PC1/3 untersucht (Abschnitt 4.8). Da eine Abspaltung des His₆-GST-Tags nicht möglich war (Abschnitt 5.2.5), mussten alle Studien mit dem Fusionsprotein durchgeführt werden.

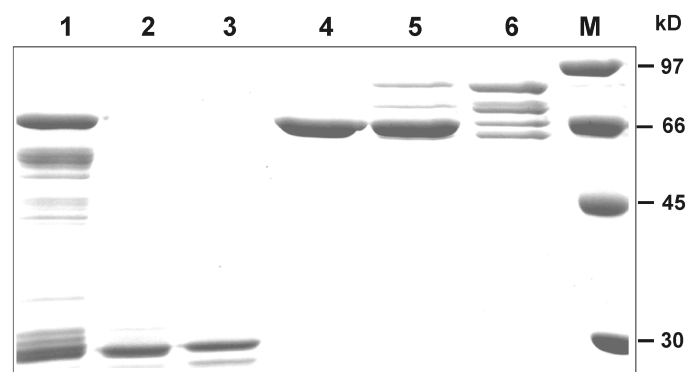


Abbildung 29: His₆-GST-*Bl*-Spn1 bildet Komplexe mit Trypsin; His₆-GST-SERPINE3 wird durch Trypsin degradiert. His₆-GST-SERPINE3 und His₆-GST-*Bl*-Spn1 (jeweils 3 µg) wurden jeweils für 20 min mit unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %-Gele) wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: His₆-GST-SERPINE3; Spuren 2 und 3: His₆-GST-SERPINE3 mit 0,5 µg bzw. 2 µg Trypsin; Spur 4: His₆-GST-*Bl*-Spn1; Spuren 5 und 6: His₆-GST-*Bl*-Spn1 mit 0,5 µg bzw. 2 µg Trypsin. Die Trypsin-Kontrolle (2 µg Trypsin mit Wasser statt Serpin) lieferte nur ein schwaches 23 kD-Signal (nicht dargestellt). Die Größen von Markerproteinen (LMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

Weder mit Trypsin noch mit Furin konnten SDS-stabile Komplexe nachgewiesen werden. Während nach 1-stündiger Inkubation mit Furin noch nicht einmal RSL-gespaltene Formen des SERPINE3-Fusionsproteins detektiert werden konnten (nicht gezeigt), führte eine 20-minütige Inkubation mit Trypsin (23 kD) zu einer vollständigen Degradation des Serpins (Abbildung 29, Spuren 2 und 3). His₆-GST-*Bl*-Spn1, das unter den gleichen Bedingungen mit Trypsin inkubiert wurde, bildete dagegen SDS-stabile Komplexe (ca. 90 kD) mit der Protease (Abbildung 29, Spuren 5 und 6). Unterhalb der 90 kD-Komplexbanden sind noch weitere Signale zu sehen. Diese Signale sind in Spur 6 (equimolares Serpin-Protease-Verhältnis) deutlich ausgeprägter als in Spur 5 (3-facher Serpin-Überschuss). Vermutlich handelt es sich bei diesen Banden um partiell degradierte Komplexe. Die in der Abbildung nicht dargestellte Kontrolle, bei der Trypsin mit Wasser anstelle von Serpin inkubiert wurde, lieferte außer einem schwachen Signal bei 23 kD (Trypsin) keine weiteren Signale.

Anschließend wurde mit Hilfe der *Progress-Curve*-Methode eine mögliche Interaktion von His₆-GST-SERPINE3 mit mPC1/3 untersucht. Als Positivkontrolle diente wiederum das *Bl*-Spn1-Fusionsprotein. Während die proteolytische Aktivität der Protease in Gegenwart von *Bl*-Spn1-Fusionsprotein (215 bzw. 584 nM) sehr schnell abnahm (nach 50 min noch 27 % bzw. 14 % Restaktivität), konnte keinerlei Reduktion der Proteaseaktivität durch His₆-GST-SERPINE3 (360-1584 nM) nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Ebenso wenig konnte eine Verminderung der proteolytischen Aktivität von Furin durch His₆-GST-SERPINE3 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies bestätigt das Ergebnis des zuvor durchgeführten Komplexierungstests.

Zusammengefasst zeigten diese Untersuchungen, dass His₆-GST-SERPINE3 mit keinem der Interaktionspartner von *Bl*-Spn1 reagierte. Für *Bl*-Spn1 wurde im Rahmen dieser Studien mit Trypsin ein weiteres Zielenzym identifiziert.

5.2.8 Herstellung und Charakterisierung einer *Bl*-Spn1-Mutante mit SERPINE3-RSL-Sequenz

Da keinerlei inhibitorische Aktivität des SERPINE3-Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte, musste in Betracht gezogen werden, dass das rekombinant in Bakterien produzierte Material biologisch inaktiv ist. Die vollständige proteolytische Degradation des Serpins durch Trypsin und die Tatsache, dass sich der N-terminale His₆-GST-Tag nicht abspalten ließ, stützten diese Vermutung. Andererseits konnte ebenso wenig ausgeschlossen werden, dass die getesteten Proteasen – allesamt Zielenzyme von *Bl*-Spn1 – keine Zielenzyme von SERPINE3 sind. Die RSL-Sequenzen von SERPINE3 und *Bl*-Spn1 weisen mehrere Unterschiede auf (Abbildung 30), wobei zwei Unterschiede besonders markant sind: (1) Während *Bl*-Spn1 im Bereich der Positionen P3 bis P6 mit Asparagin (P5) immerhin noch eine geladene Aminosäure aufweist, sind

diese Positionen bei SERPINE3 durchweg mit der Aminosäure Leucin besetzt. (2) An der Position P2' besitzt SERPINE3 die basische Aminosäure Lysin, *Bl-Spn1* dagegen die Aminosäure Leucin. In der Folge wurde eine *Bl-Spn1*-Mutante („LuckyLoop“) hergestellt, deren RSL-Sequenz im Bereich der Positionen P9 bis P2' der RSL-Sequenz von SERPINE3 entspricht. Hierfür wurden die Positionen P3 bis P6 zu Leucin und die Position P2' zu Lysin mutiert (Abbildung 30). Ziel war es herauszufinden, ob sich diese Veränderungen auf die inhibitorische Aktivität/Spezifität des Serpins auswirken.

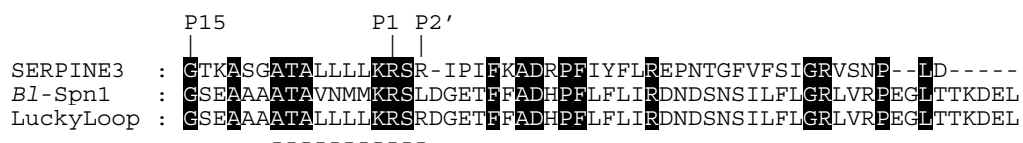


Abbildung 30: Aminosäure-Alignment der RSL-Sequenzen von SERPINE3, *Bl-Spn1* und der Mutante „LuckyLoop“. Das *Alignment* wurde mit *CLUSTALW* erstellt. Identische Aminosäuren sind invertiert dargestellt (weiß auf schwarz). Die RSL-Sequenz der *Bl-Spn1*-Mutante „LuckyLoop“ stimmt im Bereich der Positionen P9 bis P2' (gestrichelte Linie) mit der von SERPINE3 überein. Vom Wildtyp-*Bl-Spn1*-Protein unterscheidet sich die Mutante an fünf Positionen (P6 bis P3 und P2').

Das entsprechende Expressionskonstrukt (pLuckyLoop) wurde durch Mutagenese-PCR hergestellt (Abschnitte 4.3.4 und 4.3.11). Als Ausgangsplasmid diente pUT19, das für das Wildtyp-*Bl-Spn1*-Fusionsprotein kodiert. Die „LuckyLoop“-Variante wurde als His₆-GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (nicht gezeigt) und anschließend an Glutathion-Sepharose gereinigt. Zur Abtrennung des His₆-GST-Tags wurde das Fusionsprotein mit TEV-Protease inkubiert und der *Tag* sowie die TEV-Protease über Metallionenchromatographie abgereichert (Abschnitt 4.4).

Das Fusionsprotein konnte in hoher Reinheit gewonnen werden (Abbildung 31 A). Auch die Abspaltung und Abreicherung des N-terminalen *Tags* gelang (Abbildung 31 B). Insgesamt ließ sich die Mutante sehr gut reinigen. Die Ausbeuten waren zwar im Vergleich zum *Bl-Spn1*-Wildtyp-Protein geringer (ca. 30 %), überstiegen aber deutlich die Werte von His₆-GST-SERPINE3.

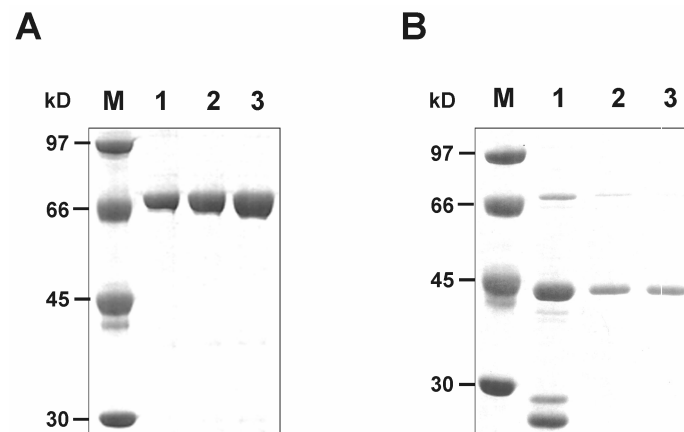


Abbildung 31: Reinigung der *Bl-Spn1*-Mutante „LuckyLoop“. (A) His₆-GST-LuckyLoop wurde in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose gereinigt. Das 10 %ige, mit Coomassie gefärbte Gel zeigt die ersten drei Elutionsfraktionen einer *Batch*-Reinigung (Spuren 1-3). (B) Das gereinigte Fusionsprotein wurde zur Abtrennung des N-terminalen His₆-GST-*Tags* mit TEV-Protease inkubiert und der *Tag* sowie die TEV-Protease durch *IMAC* abgereichert. TEV-Spaltansatz: Spur 1; Durchlauf: Spur 2; Elutionsfraktion 1: Spur 3. Die Größen von Markerproteinen (Spuren M) sind jeweils am linken Bildrand angegeben.

Nach erfolgreicher Reinigung der Mutante wurde durch Komplexierungstests die Bildung SDS-stabile Komplexe mit den Proteasen Trypsin und Furin untersucht (siehe Abschnitt 5.2.7). Für die Reaktion mit Trypsin wurde Fusionsprotein eingesetzt, für die Reaktion mit Furin die Mutante ohne *Tags*. Als Kontrolle diente das Wildtyp *Bl-Spn1*-Protein. Interessanterweise bildete die Mutante SDS-stabile Komplexe mit Trypsin (Abbildung 32, Spuren 5 und 6), nicht aber mit Furin (nicht gezeigt).

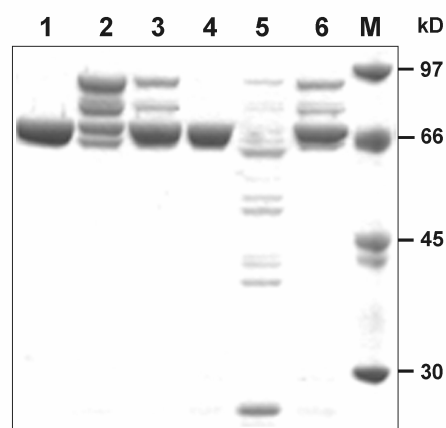


Abbildung 32: Die „LuckyLoop“-Variante bildet SDS-stabile Komplexe mit der Protease Trypsin. His₆-GST-LuckyLoop (3 µg) und die Kontrolle His₆-GST-*Bl-Spn1* (3 µg) wurden jeweils für 20 min mit unterschiedlichen Trypsin-Konzentrationen inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %ige Gele) wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: His₆-GST-*Bl-Spn1*; Spuren 2 und 3: His₆-GST-*Bl-Spn1* mit 2 µg bzw. 0,5 µg Trypsin; Spur 4: His₆-GST-LuckyLoop; Spuren 5 und 6: His₆-GST-LuckyLoop mit 2 µg bzw. 0,5 µg Trypsin. Die Größen von Markerproteinen sind am rechten Bildrand angegeben.

Was die Interaktion mit Trypsin anbelangt, so fungierte die Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein etwas stärker als Substrat der Protease. Dies zeigt der Vergleich der Spuren 2 und 5 in Abbildung 32, in denen das Ergebnis der Komplexierungsreaktionen equimolarer Mengen von *Bl*-Spn1 bzw. der Mutante mit Trypsin dargestellt ist.

Die Tatsache, dass eine *Bl*-Spn1-Mutante mit SERPINE3-RSL-Sequenz (Positionen P9-P2') SDS-stabile Komplexe mit Trypsin, nicht aber mit Furin bildete, deutete darauf hin, dass SERPINE3 möglicherweise ein anderes Zielprotease-Spektrum als *Bl*-Spn1 aufweist. Darüber hinaus stützte der Nachweis SDS-stabiler Komplexe zwischen der Mutante und Trypsin die Vermutung, dass das bakteriell gereinigte His₆-GST-SERPINE3, das durch Trypsin vollkommen degradiert wurde, biologisch inaktiv ist.

5.2.9 Lokalisation von SERPINE3

Mit Hilfe des bakteriellen Expressionssystems war es gelungen, SERPINE3 in Form eines Fusionsproteins zu produzieren. Dieses Fusionsprotein ermöglichte die Gewinnung eines Anti-SERPINE3-Antiserums, womit ein wichtiges Werkzeug zur weiteren Charakterisierung von SERPINE3 zur Verfügung stand. In der Folge wurde das COS-7-System dazu genutzt, die Expression und Lokalisation von SERPINE3 zu untersuchen. Die Analyse der Sequenz von SERPINE3 hatte ergeben, dass das Protein an seinem N-Terminus ein potenzielles Signalpeptid aufweist. Da gleichzeitig keinerlei Signale identifiziert werden konnten, die auf eine intrazelluläre Lokalisation/Retention von SERPINE3 hingedeutet hätten (Abschnitt 5.2.3), wurde eine extrazelluläre Lokalisation von SERPINE3 postuliert. Zur Analyse dieser Fragestellung wurde ein eukaryotisches, auf dem Plasmid pcDNA3.1 basierendes Konstrukt hergestellt, das den vollständigen kodierenden Bereich der SERPINE3-cDNA-Sequenz beinhaltet (pFUK_E3, Abschnitt 4.3.11). Durch Mutagenese-PCR (4.3.4) wurde nachträglich eine Kozak-Konsensussequenz in das Konstrukt eingeführt, um eine optimale Expression zu gewährleisten. Das Konstrukt wurde pKKS-E3 genannt (Abschnitt 4.3.11).

COS-7-Zellen wurden anschließend mit dem Plasmid pKKS-E3 transfiziert (Abschnitt 4.6.5). Als Negativkontrolle diente der leere pcDNA3.1-Vektor. Als Positivkontrolle wurden COS-7-Zellen mit dem Konstrukt pWTBI1 transfiziert, das für das sezernierte Serpin Heparinkofaktor II (HCII) kodiert. 36 h nach der Transfektion wurden prozentual gleiche Mengen der Kulturüberstände und Zellextrakte geblottet und die Blots mit gereinigten Anti-SERPINE3-Antikörpern bzw. Anti-HCII-Antikörpern analysiert (Abschnitt 4.7.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

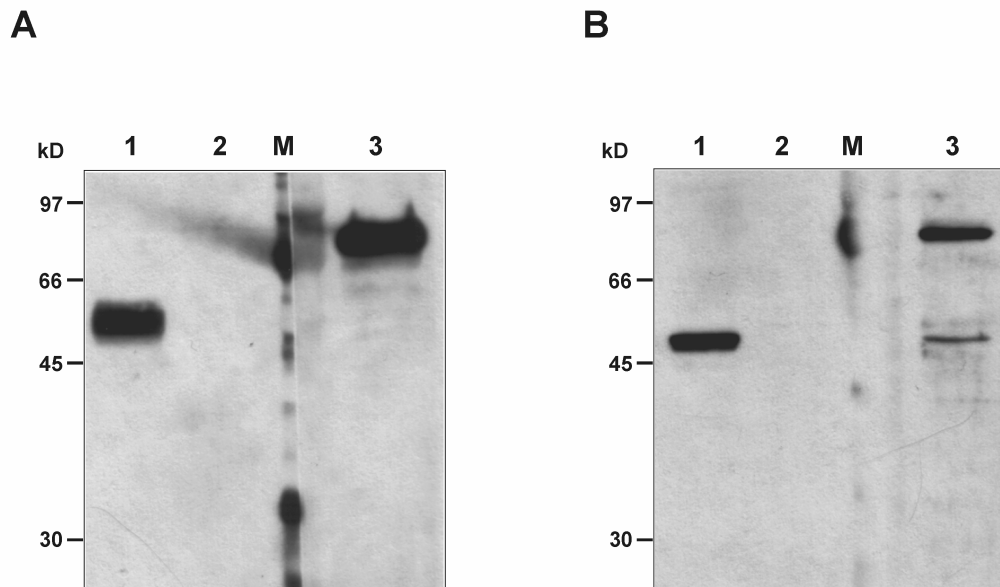


Abbildung 33: SERPINE3 wird von COS-7-Zellen sekretiert. COS-7-Zellen wurden mit Plasmiden für SERPINE3 bzw. HCII transfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden gleiche prozentuale Anteile von Überständen (**A**) und Extrakten (**B**) durch Western-Blot (10 %ige Gele) mit Anti-SERPINE3 bzw. Anti-HCII-Antikörpern analysiert. Spuren 1: SERPINE3; Spuren 2: pcDNA3.1-Kontrolle; Spuren 3: HCII. Die Größen von Markerproteinen sind jeweils am linken Bildrand angegeben. Spur M: PageRuler-Marker.

Abbildung 33 A zeigt die Analyse der Überstände, Abbildung 33 B die Analyse der Extrakte. Das Serpin HCII ist wie erwartet sowohl in den Überständen als auch in den Extrakten als 76 kD großes Protein nachweisbar (Spuren 3). Diese Größe ist charakteristisch für dieses Glykoprotein (Kamp *et al.*, 2001). In den Extrakten tritt weiterhin ein Signal bei ca. 55 kD auf. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine nicht-glykosylierte Variante von HCII. Ebenso konnte SERPINE3 sowohl in den Überständen als auch in den Zellextrakten nachgewiesen werden (Spuren 1). In den Überständen ist SERPINE3 als singuläre Bande bei ca. 57 kD detektierbar. Das Signal der Extrakte läuft bei einer etwas niedrigeren Größe. Insgesamt ist die Signalstärke in den Überständen deutlich stärker als in den Extrakten. Es fällt auf, dass das im Überstand nachgewiesene SERPINE3-Protein mit ca. 57 kD deutlich größer ist als berechnet (42,2 kD, Abschnitt 5.2.3). Dies deutet darauf hin, dass SERPINE3 posttranslational modifiziert ist. Mittlerweile wurde im Rahmen einer Diplomarbeit nachgewiesen, dass SERPINE3 N-glykosyliert ist (Feicht, nicht veröffentlichte Daten). Zusammenfassend bestätigt dieses Experiment die Vermutung, dass SERPINE3 eine extrazelluläre Lokalisation aufweist.

5.2.10 Expression von SERPINE3-Varianten in der Zelllinie HEK-293-EBNA

Für zukünftige Analysen zur Funktion von SERPINE3 musste ein System etabliert werden, das eine rekombinante Expression von SERPINE3 in biologisch aktiver Form und in ausreichenden Mengen gewährleistet. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der Etablierung und Charakterisierung rekombinanter HEK-293-EBNA-Zelllinien, die unter Selektionsdruck kontinuierlich SERPINE3 ins Medium sezernieren.

HEK-293-EBNA-Zellen exprimieren konstitutiv das EBNA-1-Gen des Epstein-Barr-Virus (EBV). Dieses Protein bewirkt über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus die episomale Replikation von Plasmiden, die den EBV-Replikationsursprung aufweisen (Yates *et al.*, 1985; Horlick *et al.*, 1997). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Expressionsvektor pCEP4 verfügt über diesen Replikationsursprung und weist darüber hinaus eine Hygromycin-Resistenzkassette auf (Abschnitt 4.6.5).

Ausgangspunkt für die Herstellung eines SERPINE3-Expressionskonstruktes für HEK-293-EBNA-Zellen war das Plasmid pTerminator3C, das von O. Krämer im Rahmen seiner Bachelorarbeit hergestellt worden war (Abschnitt 4.3.11). Dieses Konstrukt basiert auf dem Plasmid pSecTag2B (Abschnitt 8.1) und kodiert für ein SERPINE3-Protein mit N-terminalem His₆-Tag. Die SERPINE3-eigene Signalsequenz wurde bei diesem Plasmid durch das im Vektor kodierte IgG κ -Sekretionssignal der Maus ersetzt, da zum damaligen Zeitpunkt die Funktionalität des SERPINE3-Signalpeptids noch nicht geklärt war. Der Aufbau des Konstrukts ist in Abbildung 34 dargestellt. Im Rahmen der oben genannten Bachelorarbeit gelang es, pTerminator3C erfolgreich in COS-7-Zellen zu exprimieren (Krämer, 2007). Zur Herstellung eines Expressionskonstruktes für HEK-293-EBNA-Zellen wurde die SERPINE3-cDNA-Sequenz inklusive der IgG κ -Signalsequenz in den Vektor pCEP4 umklontiert. Das resultierende Plasmid wurde pCEP4-T3C genannt (Abschnitt 4.3.11).

Zur schnellen Analyse der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pCEP4-EGFP konstruiert, das für das grün-fluoreszierende Protein (EGFP) kodiert. Darüber hinaus wurden für weitere Analysen zur Funktion von SERPINE3 zwei Plasmide hergestellt, die für RSL-Mutanten des Serpins kodieren (Abbildung 34). Während das Plasmid pCEP4-T3C-P1A für eine SERPINE3-Mutante mit einem Alanin an Position P1 kodiert (SERPINE3-P1-Ala), kodiert pCEP4-T3C-P2A für eine SERPINE3-Variante mit einem Alanin an Position P2 (SERPINE3-P2-Ala). Die Plasmide wurden durch Mutagenese-PCR auf pTerminator3C hergestellt (Abschnitt 4.3.11). Die mutierten Sequenzen wurden anschließend in den Vektor pCEP4 umklontiert.

A



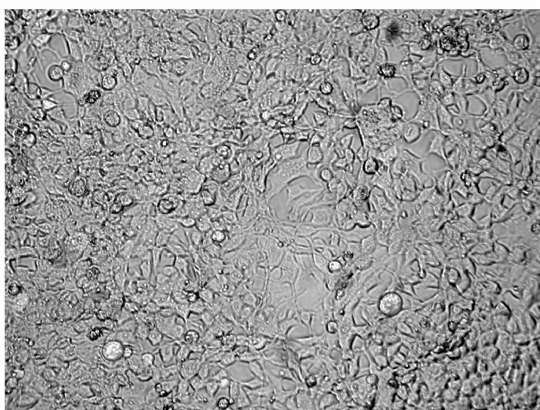
B

	P15		P1
pCEP4-T3C	:	GTKASGATALLLLKRSRIPIFKADRPFIYFLREPNTGFVFSIGRVSNPLD	
pCEP4-T3C-P1A	:	GTKASGATALLLLKASRIPIFKADRPFIYFLREPNTGFVFSIGRVSNPLD	
pCEP4-T3C-P2A	:	GTKASGATALLLLARSRIPIFKADRPFIYFLREPNTGFVFSIGRVSNPLD	

Abbildung 34: SERPINE3-Expressionsplasmide für HEK-293-EBNA-Zellen. (A) Schematische Darstellung des Plasmids pTerminator3C, das Ausgangspunkt für die Herstellung der verschiedenen Expressionsplasmide für HEK-293-EBNA-Zellen war. (B) Vergleich der RSL-Sequenzen der verschiedenen SERPINE3-Varianten, die durch die Konstrukte pCEP4-T3C, pCEP4-T3C-P1A und pCEP4-T3C-P2A kodiert werden. Die in den Mutanten veränderten Aminosäuren sind rot hervorgehoben.

Da das HEK-293-EBNA-Expressionssystem noch nicht etabliert war, wurden zunächst mit Hilfe des pCEP4-EGFP-Konstruktes die Transfektionseffizienz und das Wachstum der transfizierten Zellen untersucht. Die Transfektion von insgesamt $2,2 \times 10^6$ Zellen erfolgte, wie unter Abschnitt 4.6.5 beschrieben, mit Hilfe von Polyethylenimin. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert. Anschließend wurde die Selektion durch Zugabe von Hygromycin (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gestartet.

A



B

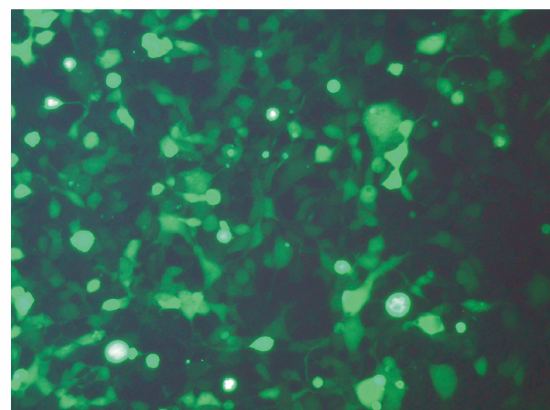


Abbildung 35: Nachweis der EGFP-Produktion in transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen. HEK-293-EBNA-Zellen wurden mit dem Vektor pCEP4-EGFP transfiziert. Die Analyse der Bildung von EGFP erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. (A) Durchlicht-Aufnahme. (B) Aufnahme nach Anregung mit monochromatischem Licht (395 nm).

Nach einer kurzen Absterbephase konnte ein starkes Wachstum der transfizierten Zellen festgestellt werden. Nach elf Tagen betrug die Gesamtzellzahl bereits 1×10^7 Zellen. Zur Analyse der Transfektionseffizienz wurde ein Teil der Zellen auf Schalen ausgesät und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die in Abbildung 35 dargestellten Photos zeigen, dass ca. 80-90 % der Zellen EGFP produzierten.

Zur Expression von SERPINE3 wurden 2×10^6 Zellen mit pCEP4-T3C transfiziert. Als Kontrolle diente das Plasmid pCEP4-EGFP. Bei der mit pCEP4-EGFP transfizierten Zellpopulation betrug die Transfektionseffizienz wiederum 80-90 %. Im Falle der pCEP4-T3C-Population setzte unmittelbar nach Start der Selektion ein massives Zellsterben ein. Nach wenigen Tagen waren weniger als 1 % der Zellen der Ausgangspopulation adhärent. Nach drei Wochen konnten zwölf einzelne Klone identifiziert werden (Abbildung 36). Diese wurden vereinzelt und weiter expandiert. Drei der Klone stellten ihr Wachstum während der Expansionsphase ein.

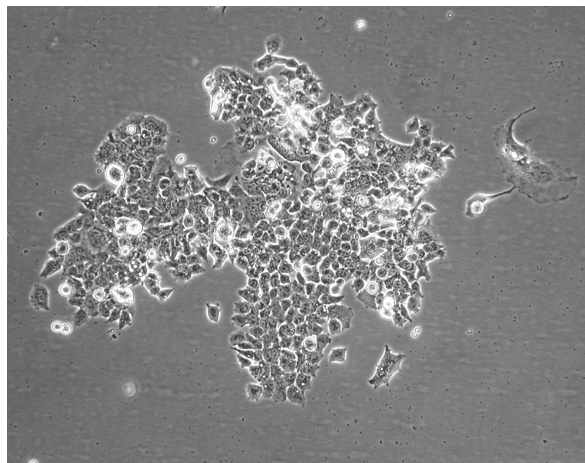


Abbildung 36: Darstellung eines mit pCEP4-T3C transfizierten HEK-293-EBNA-Klons.

Zur Analyse des SERPINE3-Expressionsniveaus wurden die verbliebenen neun Klone für vier Tage in serumfreiem Medium kultiviert. Nach drei und vier Tagen wurden Proben des Kulturüberstandes genommen, geblottet und die Blots mit Anti-SERPINE3-Antikörpern analysiert. SERPINE3 konnte in den Überständen aller Klone nachgewiesen werden. Insgesamt schwankte das Expressionsniveau zwischen den verschiedenen Klonen. In Abbildung 37 ist ein Western-Blot der Kulturüberstände von vier Klonen mit mittlerem und hohem Expressionslevel dargestellt. Die anderen Klone produzierten deutlich weniger (nicht gezeigt).

Alle Klone wurden durch Kryokonservierung gesichert. Eine erneute Kultivierung einzelner Klone und nachfolgende Analysen der Expression zeigten, dass sich der

Einfrier- und Auftauvorgang nicht negativ auf das SERPINE3-Expressionsniveau auswirkt (nicht gezeigt).

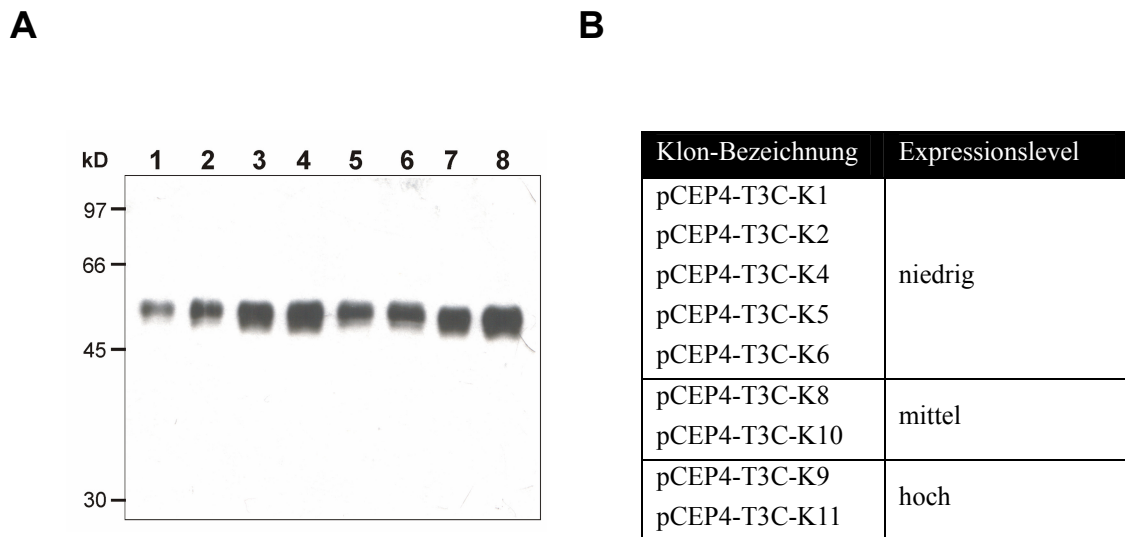


Abbildung 37: Analyse der SERPINE3-Expression in verschiedenen HEK-293-EBNA-Klonen. (A) HEK-293-EBNA-Klone wurden für vier Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und die Überstände durch Western-Blot mit Anti-SERPINE3-Antikörpern analysiert. Dargestellt sind die Überstände der Klone pCEP4-T3C-K8 (Spuren 1 und 2), pCEP4-T3C-K9 (Spuren 3 und 4), pCEP4-T3C-K10 (Spuren 5 und 6) und pCEP4-T3C-K11 (Spuren 7 und 8) nach drei bzw. vier Tagen. (B) Übersicht über das Expressionsniveau verschiedener SERPINE3 exprimierender Klone.

Während der ersten Tage der Selektion wurde ein massives Absterben der mit pCEP4-T3C transfizierten Zellen (>99 %) beobachtet. Im Gegensatz dazu starb im selben Zeitraum nur ein geringer Teil der pCEP4-EGFP-Population (Abbildung 38). Daher wurde vermutet (eine vergleichbare Transfektionseffizienz vorausgesetzt), dass das massive Absterben der pCEP4-T3C-Population möglicherweise auf eine toxische Wirkung des produzierten Serpins zurückzuführen ist.

Wie bereits erwähnt, kommt SERPINE3 aufgrund seines dibasischen RSL-Motivs als Inhibitor von PCs in Frage. Da PCs eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen aktivieren (Seidah & Chretien, 1999; Thomas, 2002), wurde vermutet, dass das massive Absterben der Zellen möglicherweise auf eine Hemmung von PCs durch SERPINE3 zurückzuführen ist. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen SERPINE3-Varianten pCEP4-T3C-P1A und pCEP4-T3C-P2A konstruiert (Abbildung 34), die für die RSL-Mutanten SERPINE3-P1-Ala bzw. SERPINE3-P2-Ala kodieren. Da diese Mutanten keine dibasische RSL-Sequenz mehr aufweisen, ist zu vermuten, dass eine Interaktion mit PCs nicht mehr möglich ist.

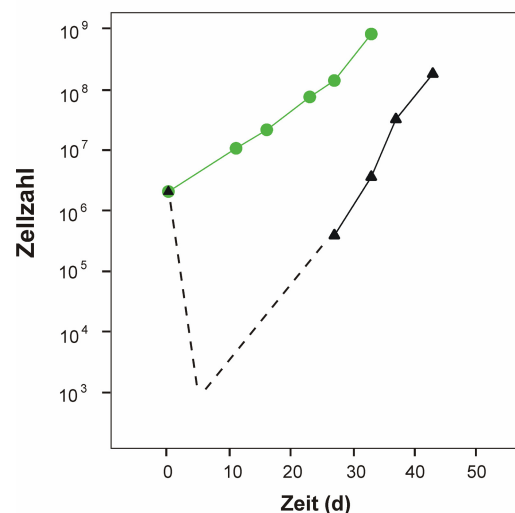


Abbildung 38: Wachstum transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen. 2×10^6 HEK-293-EBNA-Zellen wurden mit Plasmiden für SERPINE3 (pCEP4-T3C, ▲-▲) bzw. EGFP (pCEP4-EGFP, ●-●) transfiziert (d=0). Nach drei Tagen wurden die Zellen abtrypsiniert und die Selektion durch Zugabe von Hygromycin gestartet. Anschließend wurde zur Dokumentation des Zellwachstums vor jeder Passagierung die Lebendzellzahl bestimmt. Im Falle der SERPINE3-Population erfolgte die erste Passagierung während der Selektionsphase erst an Tag 27, da zuvor die Zellzahl sehr niedrig war (gestrichelte Linie).

HEK-293-EBNA Zellen wurden mit den Plasmiden für die Mutanten bzw. für Wildtyp-SERPINE3 transfiziert. Nach Start der Selektion setzte bei allen transfizierten Populationen ein vergleichbar hohes Absterben der Zellen ein. Nach drei Wochen konnten im Falle der Wildtyp-SERPINE3-Population zwölf Klone und im Falle der Mutanten-Populationen drei (SERPINE3-P1-Ala) bzw. fünf (SERPINE3-P2-Ala) Klone gezählt werden. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der verschiedenen Populationen festgestellt werden. Durch dieses Experiment konnte daher gezeigt werden, dass das anfängliche Absterben der mit pCEP4-T3C transfizierten Zellen nicht auf eine Inhibition von PCs durch SERPINE3 zurückzuführen ist.

5.2.11 Versuche zum Nachweis der Aktivität von rekombinantem SERPINE3 aus HEK-293-EBNA-Zellen

Nachdem es gelungen war, SERPINE3 in einem eukaryotischen System zu produzieren, wurde in Komplettierungsexperimenten eine mögliche Interaktion von SERPINE3 mit den Serinproteasen Trypsin, Thrombin und Furin untersucht. Da noch kein geeignetes Reinigungsverfahren für SERPINE3 etabliert war, wurden die Komplettierungsversuche mit Kulturüberständen der SERPINE3 produzierenden HEK293-EBNA-Zellen durchgeführt. Die Überstände wurden, wie in Abschnitt 4.8.2 beschrieben, mit den oben genannten Proteasen inkubiert und die Reaktionsprodukte durch Western-Blot analysiert. Während bei allen Positivkontrollen (HCII-Thrombin, *Bl*-Spn1ΔKDEL-

Trypsin/Furin) SDS-stabile Komplexe nachgewiesen werden konnten, konnten keine Komplexe von SERPINE3 mit den untersuchten Proteasen detektiert werden. Ebenso wenig konnte ein proteolytischer Abbau von SERPINE3 durch die Proteasen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

5.2.12 Analysen zur endogenen Expression von SERPINE3 in Zelllinien und Geweben

Bislang konnte keine inhibitorische Aktivität von SERPINE3 nachgewiesen werden, weshalb die Funktion dieses neuen Serpins weiterhin unklar war. Die Untersuchungen der 2006 veröffentlichten *Real-Time-PCR*-Studie hatten gezeigt, dass die Expression von SERPINE3 auf bestimmte Gewebe beschränkt ist (Badola *et al.*, 2006). Das höchste SERPINE3-Expressionsniveau wurde in neuronalen Geweben wie Gehirn, Hirnanhangdrüse und Rückenmark nachgewiesen, aber auch Herz-, Niere- und Brustgewebe zeigten hohe Transkriptlevel (Badola *et al.*, 2006).

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit dem Nachweis der endogenen Expression von SERPINE3 in Geweben und Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene. Ziel dieser Untersuchungen war es, durch die Analyse des Expressionsprofils Hinweise auf die Funktion von SERPINE3 zu erhalten.

Western-Blot-Analyse humaner menschlicher Gewebe

Zur immunologischen Analyse der Präsenz von SERPINE3 in humanen Geweben sowie in Plasma wurden Lysate verschiedener humaner Gewebe sowie Standard-Human-Plasma unter reduzierenden Bedingungen denaturiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend geblottet (Abschnitt 4.7.2). Zur Detektion von SERPINE3 wurde die Membran mit gereinigtem SERPINE3-Antiserum inkubiert (Abbildung 39). In den Gewebeproben von Gehirn, Herz und Milz konnte nach 10-minütiger Belichtung ein immunreaktives Protein von ca. 90 kD nachgewiesen werden. In den Gehirnextrakten konnte weiterhin ein ca. 72 kD großes Protein detektiert werden. In den Extrakten von Leber, Milz, Plazenta sowie Plasma konnten keine Signale nachgewiesen werden. Interessanterweise sind die mit Anti-SERPINE3-Antiserum reagierenden Proteine deutlich größer als das rekombinant in Säugerzellen exprimierte SERPINE3 (ca. 57 kD, Abschnitt 5.2.9). Möglicherweise repräsentieren die Signale SERPINE3 in komplexierter Form.

Als Kontrolle wurde eine identisch beladene Membran mit Anti-HCII-Antiserum analysiert. Das Ergebnis stimmt sehr gut mit der in dieser Arbeitsgruppe publizierten Studie zur Expression von HCII überein (Kamp *et al.*, 2001). HCII konnte in den Extrakten von Leber, Herz, Niere, Plazenta und Plasma, nicht aber in Gehirnextrakten

als 72 kD großes Protein nachgewiesen werden. Ebenso konnte in Plazentaextrakten der 110 kD große HCII-Thrombin-Komplex (Kamp *et al.*, 2001) detektiert werden.

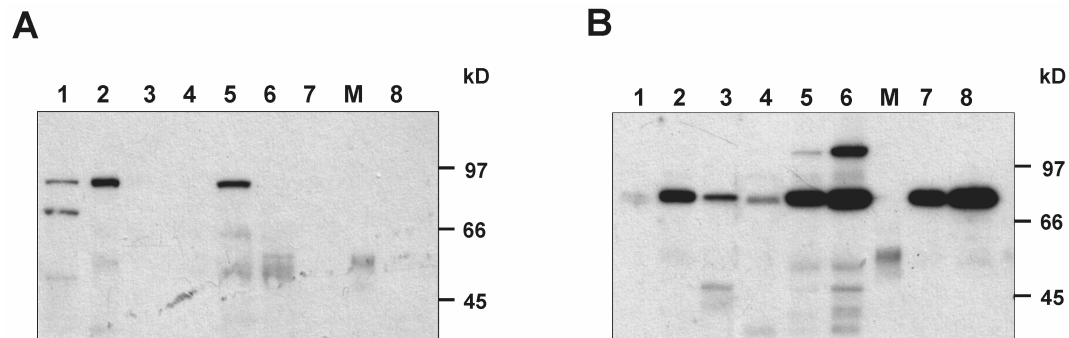


Abbildung 39: Western-Blot-Analyse der SERPINE3- und HCII-Expression in verschiedenen humanen Geweben und in Plasma. Humanes Plasma (0,5 bzw. 1 µg Gesamtprotein) und Extrakte verschiedener menschlicher Gewebe (20 µg Gesamtprotein) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden anschließend mit Anti-SERPINE3-Antiserum (A) bzw. mit Anti-HCII-Antiserum (B) analysiert. Spur 1: Gehirn; Spur 2: Herz; Spur 3: Milz; Spur 4: Leber; Spur 5: Niere; Spur 6: Plazenta; Spuren 7 und 8: Plasma (0,5 bzw. 1 µg). Die Größen von Markerproteinen sind jeweils am rechten Bildrand angegeben (Spuren M).

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass das Anti-SERPINE3-Antiserum in den Extrakten von Gehirn, Herz und Niere mit Proteinen von ca. 90 bzw. 72 kD reagiert. In Plasma sowie in den Extrakten von Leber, Milz und Plazenta konnten diese Proteine nicht nachgewiesen werden. Die mit Anti-HCII-Antiserum durchgeführte Kontrolle zeigt darüber hinaus, dass Gewebe und Plasma intakt waren, da das Ergebnis exakt mit den bereits publizierten Experimenten übereinstimmt.

Nachweis der SERPINE3-mRNA in verschiedenen Zelllinien

Die bisherigen Analysen zur endogenen Expression von SERPINE3 beschränkten sich auf humane Gewebe. In der Folge wurde erstmals die Expression von SERPINE3 in Zelllinien untersucht. Primäres Ziel dieser Untersuchung war es, Zelllinien zu identifizieren, die sich aufgrund ihrer SERPINE3-Expression zur funktionellen Charakterisierung von SERPINE3 eignen. Eine erste Expressionsanalyse erfolgte durch semi-quantitative RT-PCR. Hierfür wurde aus den humanen Zelllinien A549, HEK-293T, Ramos, MCF-7, HL60 und HepG2 Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert (Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2). Zur Überprüfung der cDNA-Integrität und zur Vergleichbarkeit der Proben wurde eine Kontroll-PCR mit den Primern Rib+ und Rib- durchgeführt. Diese Primer flankieren ein 215 Bp großes Fragment aus dem Gen für das *acidic ribosomal protein p0* (ARP) (Oberkofler *et al.*, 2004). Die Analyse der Expression von humanem SERPINE3 erfolgte mit den Primern E3_782+ /E3_1072-, die ein 297 Bp großes Fragment der SERPINE3-cDNA flankieren. Dieses Fragment

schließt ein Intron ein. In drei der sechs analysierten Zelllinien konnte das erwartete 297 Bp große Fragment nachgewiesen werden (Abbildung 40).

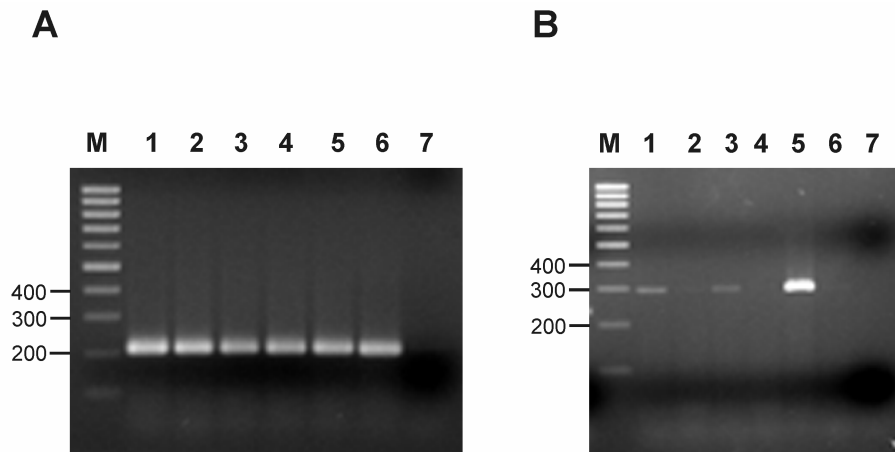


Abbildung 40: Analyse der SERPINE3-mRNA-Expression in humanen Zelllinien. Aus den humanen Zelllinien A549 (Spuren 1), HEK-293T (Spuren 2), HepG2 (Spuren 3), HL60 (Spuren 4) MCF-7 (Spuren 5) und Ramos (Spuren 6) wurde Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurden PCR-Reaktionen mit ARP- bzw. SERPINE3-spezifischen Primern durchgeführt und die Amplifikate über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse der Kontroll-PCR mit ARP-spezifischen Primern (25 Zyklen) sind in (A) dargestellt, die Ergebnisse der PCRs mit SERPINE3-spezifischen Primern (35 Zyklen) in (B). Die Spuren 7 zeigen die Kontrolle ohne cDNA. Größen relevanter Markerfragmente sind an den linken Bildrändern angegeben (Spuren M).

Das stärkste Signal wurde durch RT-PCR auf MCF-7-cDNA erzielt (Abbildung 40 B, Spur 5). Deutlich schwächer wurde das Fragment in den cDNAs der Zelllinien A549 und HepG2 nachgewiesen (Abbildung 40 B, Spuren 1 bzw. 3). In den Zelllinien HEK-293T, HL60 und Ramos konnte die SERPINE3-mRNA nicht detektiert werden (Spuren 2, 4 und 6 in Abbildung 40 B). Die Kontroll-PCR mit ARP-spezifischen Primern zeigt, dass für alle PCRs vergleichbare Mengen an cDNA eingesetzt wurden, da die Stärke des ARP-Amplikons in allen Fällen vergleichbar ist (Abbildung 40 A).

Durch die RT-PCR-Analyse konnte daher gezeigt werden, dass SERPINE3 in den untersuchten humanen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird, wobei die Expression in der Brustkrebszelllinie MCF-7 am höchsten ist.

Nachweis des SERPINE3-Proteins in der Brustkrebszelllinie MCF-7

Die RT-PCR-Studie zur Expression von SERPINE3 in humanen Zelllinien zeigt, dass die MCF-7-Zelllinie am meisten SERPINE3-mRNA bildet. Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde die Expression von SERPINE3 durch immunologische Methoden untersucht. Hierfür wurden die Zellen für vier Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und die Kulturüberstände durch Western-Blot mit Anti-SERPINE3-

Antikörpern analysiert. Nachdem SERPINE3 weder in unbehandelten noch in 5-fach-ankonzentrierten Überständen detektiert werden konnte, wurde versucht, die Präsenz von SERPINE3 durch Immunoaffinitätschromatographie und anschließendem Western-Blot nachzuweisen. Hierfür wurden 20 mL der geklärten Überstände mit immobilisierten Anti-SERPINE3-Antikörpern inkubiert und gebundene Proteine unter sauren Bedingungen in 100 µL-Fractionen eluiert (Abschnitt 4.10.3). Die Elutionsfraktionen wurden durch Western-Blot mit Anti-SERPINE3-Antikörpern charakterisiert (Abbildung 41). In allen drei Elutionsfraktionen konnte ein ca. 57 kD großes Signal detektiert werden (Spuren 4-6). Die Größe dieses immunreaktiven Proteins stimmt mit der Größe von rekombinantem SERPINE3 überein. Interessanterweise konnten durch die Affinitätschromatographie noch weitere Proteine mit einem deutlich höheren Molekulargewicht angereichert werden. Die Größe dieser Proteine liegt bei etwa 110, 170 bzw. 190 kD. Am stärksten sind die Signale in der ersten Elutionsfraktion (Spur 4). Möglicherweise repräsentieren diese Banden SERPINE3 in komplexierter Form. Unter dieser Prämisse hätten die Interaktionspartner eine ungefähre Größe von etwa 50 bzw. 110-130 kD.

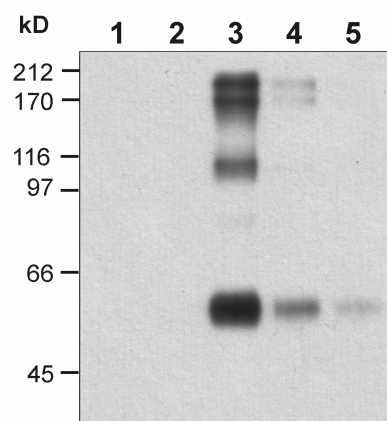


Abbildung 41: Nachweis von SERPINE3 in der MCF-7-Zelllinie. MCF-7-Kulturbedingungen (20 mL) wurden mit immobilisierten Anti-SERPINE3-Antikörpern inkubiert und gebundene Proteine unter sauren Bedingungen eluiert ($3 \times 100 \mu\text{L}$). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt (10 %ige Gele) und mit Western-Blot (Anti-SERPINE3-Antikörper) analysiert. Nicht konzentrierter Überstand: Spur 1; 5-fach-ankonzentrierter Überstand: Spur 2; Elutionsfraktionen 1-3: Spuren 3-5; die Größen von Markerproteinen sind am linken Bildrand angegeben (PageRuler, LMW).

Anschließend wurde versucht, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Während mit den Überständen der gleichen Charge das vorherige Ergebnis reproduziert werden konnte (freies Serpin und hochmolekulare Banden), konnte mit Überständen neuer Chargen immer nur das freie Serpin angereichert werden (57 kD Bande). Erst im Rahmen einer Diplomarbeit, bei der die MCF-7-Zellen unter Zusatz des Protease-Inhibitors Pefabloc

(1 mM) kultiviert wurden, konnten die hochmolekularen Banden wieder angereichert werden (Feicht, nicht publizierte Daten).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das SERPINE3-Protein in der Brustkrebszelllinie MCF-7 gebildet wird. Allerdings erfordert der Nachweis eine 100-fache Anreicherung des Serpins durch Affinitätschromatographie. Die spezifische Anreicherung von höhermolekularen Proteinen (>57 kD) durch Anti-SERPINE3-Antikörper deutet auf eine inhibitorische Aktivität des Serpins hin.

6 Diskussion

6.1 *Bl-Spn1*, ein neuer Proproteinkonvertase-Inhibitor im sekretorischen Pfad

Das Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* wird nach den Tunicaten als der engste noch lebende Verwandte der Vertebraten angesehen (Delsuc *et al.*, 2006), weshalb es ein wichtiger Organismus zur Erforschung der Evolution von Vertebraten ist. *Branchiostoma lanceolatum* exprimiert mindestens fünf verschiedene Serpine, wobei zwei dieser Serpine (*Bl-Spn1* und *Bl-Spn2*) ein N-terminales Signalpeptid und ein C-terminales KDEL-Signal aufweisen (Abschnitt 2.4). Aufgrund dieser Sequenzmotive kommen die beiden Serpine als Wächter des sekretorischen Pfades in Frage. In dieser Arbeit wurde das Serpin *Bl-Spn1* näher untersucht, von dem zuvor schon gezeigt werden konnte, dass es SDS-stabile Komplexe mit der Serinprotease Thrombin bildet (Tödtmann, 2004). Allerdings fungierte das Serpin bei dieser Reaktion hauptsächlich als Substrat der Protease, weshalb vermutet wurde, dass Thrombin nicht das natürliche Zielenzym des Serpins ist. Die Präsenz basischer Aminosäuren an den postulierten Positionen P2/P1 im RSL deutete darauf hin, dass PCs natürliche Zielenzyme des Inhibitors sind. Durch biochemische und kinetische Analysen konnte gezeigt werden, dass *Bl-Spn1* humanes Furin und mPC1/3 mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit inhibiert (Abschnitt 5.1.2). Der Inhibitor bildet mit beiden Zielenzymen (und auch mit humanem PC1/3) SDS-stabile Komplexe (Abschnitt 5.1.1), wobei ein Teil der Inhibitor-moleküle als Substrat der Proteasen fungieren. Zur Quantifizierung des relativen Verhältnisses von Hemm- zu Substratreaktion wurden die SI-Werte bestimmt. Während für die Interaktion mit Furin ein SI-Wert von 2,9 bestimmt wurde, wurde für die Interaktion mit mPC1/3 ein SI-Wert von 3,5 ermittelt (Abschnitt 5.1.2). Da die meisten physiologisch relevanten Serpin-Protease-Interaktionen (z. B. Antithrombin-Thrombin oder α_1 -Antitrypsin-Elastase) einen SI-Wert von ~ 1 aufweisen (Gettins, 2002b), stellt sich die Frage, ob PCs natürliche Zielenzyme des *Branchiostoma* Serpins sind. In diesem Zusammenhang sollte zunächst erwähnt werden, dass SI-Werte von verschiedenen Parametern, wie z. B. den Reaktionsbedingungen (pH, Ionenstärke, Temperatur) oder der Qualität der Serpin-Präparation abhängen (Gettins, 2002b). Die Tatsache, dass RSL-gespaltene Formen von *Bl-Spn1* immer erst nach Inkubation des Serpins mit einer Protease detektierbar waren (Abschnitt 5.1), lässt vermuten, dass die Qualität der Serpin-Präparation gut war. Weiterhin darf nicht außer Acht gelassen

werden, dass Serpine dazu bestimmt sind, ihre natürlichen Zielenzyme zu inhibieren. *Branchiostoma* exprimiert mindestens drei verschiedene PCs (Oliva *et al.*, 1995; Oliva *et al.*, 2000). Daher wäre es interessant zu untersuchen, wie *Bl*-Spn1 mit seinen postulierten natürlichen Zielenzymen reagiert.

6.1.1 *Bl*-Spn1 im Vergleich mit anderen PC inhibierenden Serpinen

Bl-Spn1 ist nach *Dm*-Spn4A/E und PI8 erst das dritte natürliche Serpin, von dem gezeigt wurde, dass es *in vitro* SDS-stabile Komplexe mit Furin bildet. *Bl*-Spn1 inhibiert Furin mit physiologisch relevanter Geschwindigkeit (Abschnitt 5.1.2), allerdings ist die Hemmkonstante (k_{ass}) kleiner als die, die für die Interaktion von *Dm*-Spn4A/E und Furin ermittelt wurde (ca. Faktor 100, Tabelle 30). Die RSL-Sequenzen von *Dm*-Spn4A/E und *Bl*-Spn1 weisen mehrere Unterschiede auf: *Bl*-Spn1 besitzt nur an den Positionen P2 und P1 basische Aminosäuren, während der RSL von *Dm*-Spn4A/E eine ganze Ansammlung von basischen Aminosäuren enthält (Positionen P4 bis P1, Abbildung 42). Wie in Abschnitt 2.1.2 erwähnt, benötigt Furin für eine effiziente Spaltung von Substraten mehr als zwei basische Aminosäuren. Neben den Positionen P1 und P2, ist vor allem die Position P4 entscheidend (Nakayama, 1997; Rockwell *et al.*, 2002).

Tabelle 30: Kinetische Parameter natürlicher PC inhibierender Serpine

	Furin	PC1/3	PC2	<i>Dm</i> -PC2
<i>Bl</i> -Spn1	SI: 2,9 k_{ass} : $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	SI: 3,5 k_{ass} : $2,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	keine Inhibition (Abschnitt 5.1.1)	nicht untersucht
<i>Dm</i> -Spn4A/E	SI: 3,5 k_{ass} : $5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Oley <i>et al.</i> , 2004)	Inhibition (Diskussion, dieser Abschnitt)	Inhibition (Abschnitt 5.1.1)	SI: 1 k_{ass} : $9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Richer <i>et al.</i> , 2004)
PI8	SI: ~10 k_{ass} : $6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Dahlen <i>et al.</i> , 1998)	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Während P4 bei *Dm*-Spn4A/E mit Arginin besetzt ist, besitzt *Bl*-Spn1 an dieser Position ein Methionin. Aufgrund der Tatsache, dass der RSL von *Bl*-Spn1 lediglich ein dibasisches Motiv aufweist, ist es ohnehin erstaunlich, dass *Bl*-Spn1 Furin inhibiert. Die nachgewiesene Hemmung von Furin durch das *Branchiostoma*-Serpine zeigt, dass ein Inhibitor nicht unbedingt alle Eigenschaften eines Substrats aufweisen muss. Gleichwohl scheint die Position P4 die Geschwindigkeitskonstante zu beeinflussen. Dies wurde im Rahmen einer Diplomarbeit demonstriert, in der verschiedene *Bl*-Spn1-Mutanten hinsichtlich ihrer Furin-Hemmung charakterisiert wurden (Mischo, 2007). Es

konnte nachgewiesen werden, dass eine *Bl*-Spn1-Variante mit einem Arginin an Position P4 (*Bl*-Spn1-P4R, Abbildung 42) im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine 20 × höhere Furin-Inhibitionskonstante aufweist. Allerdings geht diese Geschwindigkeitserhöhung mit einer sinkenden Effizienz des Inhibitors einher, da der SI-Wert um den Faktor drei steigt.

<i>Bl</i> -Spn1	GSEAAAATAV-NMMKRSLSL----GETFFADHPFLFLIRDNDNSNSILFLGRLVRPEG----LTTKDEL
<i>Bl</i> -Spn1-P4R	GSEAAAATAV-NRMKRSLSL----GETFFADHPFLFLIRDNDNSNSILFLGRLVRPEG----LTTKDEL
<i>Bl</i> -Spn1-P6A	GSEAAAATAVANMMKRSLSL----GETFFADHPFLFLIRDNDNSNSILFLGRLVRPEG----LTTKDEL
<i>Dm</i> -Spn4A/E	GTEAAAATGMVRRKRAIMSPPEPIEFFADHPPTYVLVHOK-DLPLFWGSVVRLEENTFASSEHDEL
<i>Dm</i> -Spn4A/E-ΔA	GTEAAAATGM-VRRKRAIMSPPEPIEFFADHPPTYVLVHOK-DLPLFWGSVVRLEENTFASSEHDEL
α_1 -Antitrypsin	GTEAAGATVV-EAVPMSLP----PQVKF-DHPFIFMIVESETQSPLFVGKVIDP-----TR---
α_1 -PDX-AVRR	GTEAAGATVV-EAVRRSLP----PQVKF-DHPFIFMIVESETQSPLFVGKVIDP-----TR---
α_1 -PDX-RVRR	GTEAAGATVV-ERVRRSLP----PQVKF-DHPFIFMIVESETQSPLFVGKVIDP-----TR---

Abbildung 42: Vergleich der RSL-Sequenzen von PC inhibierenden Serpinen. Die Aminosäuren der Positionen P2/P1 sind durch ein Kästchen markiert. Mutationen sind in roter Schrift hervorgehoben. Bei den Serpinen α_1 -PDX-AVRR und α_1 -PDX-RVRR handelt es sich um PC hemmende RSL-Varianten des Serpins „Ratten“- α_1 -Antitrypsin, dessen RSL-Sequenz ebenso dargestellt ist.

Die RSLs von *Dm*-Spn4A/E und *Bl*-Spn1 unterscheiden sich nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sondern auch in ihrer Länge (Abbildung 42). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden, dass die Acylierung des *Branchiostoma*-Serpins durch Furin und PC1/3 an der Aminosäureposition Arg³⁶⁴ erfolgt (Abschnitte 5.1.3 und 8.3.1). Somit ist der N-terminale Bereich des *Bl*-Spn1-RSLs 17 Aminosäuren lang (gezählt wird beginnend mit dem konservierten Glutamat an P17 in C-terminaler Richtung). Diese Länge ist charakteristisch für die meisten Serpine (Gettins, 2002b). Der N-terminale Teil des RSLs von *Dm*-Spn4A/E ist dagegen 18 Aminosäuren lang (Oley *et al.*, 2004; Richer *et al.*, 2004). Aber auch die Hypothese, dass die RSL-Länge die Interaktion mit Furin beeinflusst, kann durch Untersuchungen der vorstehend genannten Diplomarbeit verworfen werden, da gezeigt werden konnte, dass eine *Bl*-Spn1-Mutante mit einem zusätzlichen Alanin zwischen den Positionen P5 und P6 (*Bl*-Spn1-P6A, Abbildung 42) vergleichbare Furin-Hemmeigenschaften wie das Wildtyp-Protein aufweist (Mischo, 2007). Dennoch könnte die RSL-Länge für die Inhibition anderer Mitglieder der PC-Familie von Bedeutung sein, da gezeigt wurde, dass sich eine Verkürzung des RSLs von *Dm*-Spn4A/E um eine Aminosäure (*Dm*-Spn4A/E-ΔA, Abbildung 42) zwar nicht auf die Inhibition von Furin auswirkt, wohl aber auf die des PC2-Homologs aus *Drosophila melanogaster* (*Dm*-PC2). Das verkürzte *Dm*-Spn4A/E-Protein inhibiert *Dm*-PC2 nur noch schwach (Richer *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die verlängerte *Bl*-Spn1-Variante PC2 hemmt, da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Wildtyp-*Bl*-Spn1 keine inhibitorische Aktivität gegenüber mPC2 zeigt. Gleichzeitig

konnte aber nachgewiesen werden, dass *Dm-Spn4A/E* die proteolytische Aktivität von mPC2 stark reduziert (Abschnitt 5.1.1). Um zu belegen, dass die Inhibition von mPC2 durch *Dm-Spn4A/E* auf dem charakteristischen Serpin-Mechanismus beruht, müsste noch der Nachweis erbracht werden, dass das *Drosophila*-Serpins-SDS-stabile Komplexe mit der Protease bildet. Da *Dm-Spn4A/E* aber SDS-stabile Komplexe mit *Dm-PC2* bildet (Richer *et al.*, 2004), ist davon auszugehen, dass solche auch mit dem Säuger-Homolog nachzuweisen sind.

In jedem Fall wäre der Nachweis einer Inhibition von mPC2 durch ein verlängertes *Bl-Spn1*-Protein ein interessanter Befund, da dadurch untermauert werden könnte, dass die RSL-Länge von PC inhibierenden Serpinen wichtig für deren Selektivität ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass *Dm-Spn4A/E* ebenso wie *Bl-Spn1* ein Inhibitor von mPC1/3 ist. *Dm-Spn4A/E* bildet SDS-stabile Komplexe mit mPC1/3 und kinetische Analysen zeigen, dass die proteolytische Aktivität der Protease in Gegenwart des Inhibitors stark abnimmt (Bentele, nicht dargestellte Daten).

Selektive PC-Inhibitoren sind vor allem aus wissenschaftlicher Sicht interessant, da sie dazu genutzt werden können, die unterschiedlichen Funktionen der PC-Mitglieder zu untersuchen. Gleichzeitig sind sie auch von pharmazeutischem Interesse, da eine generelle Blockade dieser physiologisch wichtigen Enzymfamilie mit hoher Wahrscheinlichkeit zu schweren Schäden führt (Bergeron *et al.*, 2000). Bislang wurde noch nicht untersucht, ob *Bl-Spn1* und *Dm-Spn4A/E* PACE4, PC5 und PC7 hemmen. Studien einer japanischen Arbeitsgruppe, in der verschiedene α_1 -Antitrypsin-Varianten hinsichtlich ihrer Selektivität für Furin, PC5 und PACE4 getestet wurden, deuten darauf hin, dass ein Arginin an Position P4 die Selektivität von Serpinen reduziert, da eine Serpin-Variante mit basischen Aminosäuren an den Positionen P1, P2 und P4 (α_1 -PDX-RVRR, Abbildung 42) sowohl mit Furin und PC5 als auch mit PACE4 SDS-stabile Komplexe bildet. Eine Variante, die lediglich eine dibasische Sequenz aufweist (α_1 -PDX-AVRR, Abbildung 42), bildet Komplexe mit Furin und PC5, nicht aber mit PACE4 (Tsuji *et al.*, 2002).

6.1.2 Hemmung von Proproteinkonvertasen durch ER-residente Serpine

Proteine, die für den Export oder für die Kompartimente des sekretorischen Pfades bestimmt sind, werden am rauen ER synthetisiert und kotranslational über den heterotrimeren Sec61-Komplex in das Lumen des ER verfrachtet (Osborne *et al.*, 2005). Im ER interagiert die reifende Proteinkette mit verschiedenen Chaperonen, wie z. B. BiP, Calnexin oder Calreticulin. Diese Chaperone unterstützen nicht nur die korrekte Faltung des Proteins, sondern sie sind auch wichtiger Bestandteil der ER-Qualitätskontrolle

(Trombetta & Parodi, 2003; Kleizen & Braakman, 2004). Proteine, die die Qualitätskontrolle bestehen, werden in COPII-Vesikel gepackt und zum ER-Golgi-Intermediat (ERGIC, *ER-Golgi-intermediate compartment*) verfrachtet (Rothman & Wieland, 1996). Die Proteine erreichen schließlich den Golgi-Apparat und später das TGN. Hier finden wichtige Sortierungsprozesse statt, die letztlich dazu führen, dass die Proteine zu ihrem finalen Bestimmungsort (z. B. Zelloberfläche, Endosomen oder Lysosomen) geleitet werden (Rodriguez-Boulan & Müsch, 2005). Manche Proteine werden ausgehend vom ERGIC oder von frühen Golgi-Kompartimenten zum ER zurücktransportiert (Allan & Balch, 1999). Lösliche ER-Proteine besitzen oftmals ein C-terminales KDEL- oder HDEL-Signal, das vom KDEL-Rezeptor in post-ER-Kompartimenten erkannt wird. Der Rezeptor fördert schließlich den retrograden Transport der Proteine zum ER (Munro & Pelham, 1987; Pelham, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das KDEL-Signal von *Bl-Spn1* essenziell für die intrazelluläre Retention des Serpins ist. Eine Deletion des Signals führt dazu, dass der Inhibitor von transfizierten COS-7-Zellen sekretiert wird (Abschnitt 5.1.4). Diese Untersuchung zeigt eindeutig, dass das KDEL-Signal des Serpins funktionell ist. Neben *Bl-Spn1* wurden bislang nur zwei Serpine mit C-terminalem Retentionssignal näher charakterisiert. Eines davon ist der Furin-Inhibitor *Dm-Spn4A*, ein anderes ist das humane Serpin Hsp47 (*heat shock protein 47*). Hsp47 ist ein nicht inhibitorisches Serpin, das als Chaperon wirkt und die korrekte Faltung von Typ I und Typ IV Prokollagenen fördert (Tasab *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 2006). Immunfluoreszenzstudien deuten darauf hin, dass beide Serpine im ER lokalisiert sind. (Saga *et al.*, 1987; Oley *et al.*, 2004). Obwohl im Falle von *Bl-Spn1* keine Immunfluoreszenzstudien durchgeführt wurden, deuten die Untersuchungen der vorstehend genannten Serpine und Lokalisationsstudien anderer Proteine mit ER-Retentionssignal darauf hin, dass der natürliche Aufenthaltsort von *Bl-Spn1* das ER oder ein frühes Golgi-Kompartiment ist. Daher stellt sich die Frage, wie diese Lokalisation mit einer Inhibition von PCs konform geht, da viele Studien zeigen, dass PCs erst im TGN oder in späteren Kompartimenten aktiv sind (Abschnitt 2.1.1) (Anderson *et al.*, 1997; Mayer *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang sei zunächst erwähnt, dass sich die Lokalisation von KDEL/HDEL-Proteinen nicht zwingend auf das ER oder das frühe Golgi-Netzwerk beschränkt. Das multifunktionelle KDEL-Protein Calreticulin wurde z. B. an der Zelloberfläche oder sogar extrazellulär nachgewiesen (Xiao *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001). Auch andere Proteine mit ER-Rückführungssignal, wie z. B. Proteindisulfidisomerase (PDI) oder das Glukose-regulierte Protein Grp94 konnten an der Zelloberfläche detektiert werden (Xiao *et al.*, 1999). Bislang ist unklar, wie diese Proteine so weit in den sekretorischen Pfad vordringen können. Allerdings gibt es viele Theorien, die diese Lokalisation erklären könnten: Eine relativ simple Erklärung ist die proteolytische Abspaltung des ER-Retentionssignals. Eine andere Hypothese besagt,

dass die ER-Retentionsmaschinerie unter bestimmten (patho)-physiologischen Bedingungen abgesättigt sein könnte (Johnson *et al.*, 2001). Letztere Erklärung ist vor allem deshalb interessant, weil sie eine Verbindung zwischen den PC inhibierenden Serpinen *Bt-Spn1* und *Dm-Spn4A* und der Pathogenabwehr herstellt: Mehrere PC-Substrate wie z. B. das *Pseudomonas*-Endotoxin oder das Diphtherie-Toxin besitzen ein KDEL-Signal. Die Toxine werden über Endocytose in die Zelle aufgenommen und in den Endosomen von Furin aktiviert. Die Toxine nutzen schließlich den retrograden Transport, um ins ER zu gelangen, von wo aus sie über den Sec61-Kanal ins Cytosol gelangen (Thomas, 2002). Es ist daher vorstellbar, dass ER-residente Serpine unter solchen oder ähnlichen pathologischen Bedingungen die retrograde (blockierte) Transportmaschinerie umgehen und dann die proteolytische Aktivierung der Toxine durch Inhibition der prozessierenden Enzyme unterbinden. Ohnehin scheint die KDEL-Rezeptor-abhängige Rückführungsmaschinerie sehr sensibel auf äußere Stresseinwirkungen zu reagieren. In Studien mit Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass der KDEL-Rezeptor bis ins TGN vordringt, wenn die Zellen einer Virusinfektion oder Temperaturschwankungen ausgesetzt sind (Griffiths *et al.*, 1994).

Andererseits könnten die Serpine *Bt-Spn1* und *Dm-Spn4A* auch dann ihre inhibitorische Wirkung entfalten, wenn eine vorzeitige Aktivierung von PCs vorliegt. Unter physiologischen Bedingungen sind PCs im ER inaktiv, da das transient gebundene Propeptid die katalytische Aktivität der Proteine unterbindet. Für Furin wurde gezeigt, dass die niedrigeren pH-Werte und die höheren Kalziumkonzentrationen im TGN eine weitere autokatalytische Prozessierung begünstigen, was schließlich zur Freisetzung der Prodomäne führt (Abschnitt 2.1.1). Abberante pH- oder Kalziumbedingungen im ER könnten daher eine vorzeitige Aktivierung von Furin bewirken. Tatsächlich zeigen einige Studien, dass Furin bereits im ER aktiv sein kann (Bass *et al.*, 2000; Salvat *et al.*, 2005). Es wurde z. B. beschrieben, dass eine natürliche Mutante des Pro-Insulinrezeptors durch Chaperone im ER zurückgehalten wird und dort von Furin gespalten wird. Diese Spaltung beschleunigt den Abbau des mutierten Rezeptors durch die ER-assoziierte Degradation (Bass *et al.*, 2000). Warum Furin in diesem speziellen Fall bereits im ER aktiv ist, ist bislang unklar. Dagegen ist es leicht vorstellbar, dass die Aktivität von Furin im ER zeitlich begrenzt sein muss, da alle PC-Substrate das ER passieren. Eine unkontrollierte Furin-Aktivität im ER würde zur vorzeitigen Aktivierung vieler Proproteine führen, wodurch das zelluläre System aus dem Gleichgewicht geraten würde.

Möglicherweise sind PC inhibierende Serpine im ER weiter verbreitet als bislang vermutet. Die jüngsten Fortschritte der Genom-Sequenzierprojekte deuten darauf hin, dass gerade Insekten die inhibierende Eigenschaft von Serpinen dazu nutzen, die Aktivität von PCs im sekretorischen Pfad zu kontrollieren. Sowohl die Genomsequenz der Malaria-Mücke (*Anopheles gambiae*) als auch die des Gelbfieber-Moskitos (*Aedes*

aegypti) und der Honigbiene (*Apis mellifera*) kodieren für ein solches Serpin (Ragg, 2007) (Tabelle 31).

Tabelle 31: Serpine mit ER-Retentionssignal und basischem RSL-Motiv

Spezies	Serpin	Sp	RSL-Sequenz	Rs
<i>B. lanceolatum</i>	<i>Bl</i> -Spn1 (AJ548509)	+	GSEAAAATAVNMM <u>K</u> RSLDGET-----FFADHP	KDEL
<i>D. melanogaster</i>	Spn4A (AJ428880)	+	GTEAAAATGMAVRR <u>K</u> RAIMSPEEPIEFFADHP	HDEL
<i>Apis mellifera</i>	(XM_395991)	?	GTEAAATTAVSLRL <u>R</u> RCIYPEETEK-FIVDRP	RDEL
<i>Anopheles gambiae</i>	SRPN10 (Q8WSX7)	?	GTEAAAATAAVVRV <u>K</u> RALINRLKV---RLDHP	HEEL
<i>Aedes aegypti</i>	serpin-4 (EAT40508)	?	GAEAAAATGTVVRM <u>K</u> SAPFPPTL--FRADHP	HDEL
<i>S. purpuratus</i>	XM_001186705	+	GTEAAAATGVTMT <u>K</u> RSISKRYR----LRFDHP	HEEL
<i>Homo sapiens</i>	α_1 -Antitrypsin (P01009)	+	GTEAAGAMFLEAIP <u>M</u> SIPPEVK-----FNKP	-

Die Tabelle wurde aus der Literatur übernommen und abgewandelt (Ragg, 2007); GenbankTM-Zugangsnummern sind in Klammern angegeben. Experimentell verifizierte oder potenzielle P2/P1-Positionen sind unterstrichen. Die RSL-Sequenz des Serpins α_1 -Antitrypsin ist zum Vergleich dargestellt. Abkürzungen: (Sp) Signalpeptid; (Rs) ER-Retentionssignal.

Allerdings konnte bei diesen potenziellen PC-Inhibitoren bislang kein N-terminales Signalpeptid identifiziert werden, was möglicherweise auf eine nicht korrekte Genvorhersage zurückzuführen ist (Ragg, 2007). Auch der Seeigel (*Strongylocentrotus purpuratus*) scheint ein PC inhibierendes, ER-lokalisiertes Serpin zu exprimieren. (Tabelle 31).

Aus den Genomsequenzen von *Ciona* und *Branchiostoma* konnten weiterhin Sequenzen abgeleitet werden, die für ER-residente Serpine mit anderer Proteasespezifität oder nicht inhibitorischer Funktion kodieren (Ragg, 2007). Interessanterweise konnte in Vertebraten bislang nur ein ER-residentes Serpin (Hsp47) mit nicht inhibitorischer Aktivität identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass Vertebraten möglicherweise andere Mechanismen zur Regulation der PC-Aktivität im sekretorischen Pfad nutzen. In diesem Zusammenhang ist die Analyse der *Bl*-Spn1-Genstruktur von Interesse (Abschnitt 5.1.5). Die Strukturanalyse deutet nämlich nicht nur an, dass sich das *Branchiostoma*-Serpin *Bl*-Spn1 und das Fruchtfliegen-Serpin *Dm*-Spn4A unabhängig voneinander entwickelt haben, sondern sie impliziert auch, dass sich *Bl*-Spn1 unabhängig von anderen Vertebraten-Serpinen entwickelt hat, da keine einzige Intronposition mit der von Vertebraten-Serpinen übereinstimmt.

6.2 SERPINE3, ein neues humanes Serpin der Gruppe 3

Nachdem vieles darauf hindeutete, dass PC-hemmende Serpine in Invertebraten weit verbreitet sind (Abschnitt 6.1.2), stellte sich die Frage, ob auch Wirbeltiere solche Serpine exprimieren. Im Mai 2006 wurde im Rahmen einer *Real-Time*-PCR-Studie die Expression des neuen humanen Serpins SERPINE3 postuliert, das wie *Bl-Spn1* ein dibasisches Motiv an den potenziellen Positionen P2/P1 im RSL aufweist (Badola *et al.*, 2006). Aus der Studie ging nicht hervor, wie (mit welchen Primern) die Expression dieses neuen Serpins untersucht wurde und nachfolgende Datenbankrecherchen ergaben, dass für humanes SERPINE3 zwei unterschiedliche Sequenzen annotiert sind, die lediglich aus dem Humangenom abgeleitet wurden. Daher war unklar, welche dieser SERPINE3-Sequenzen exprimiert werden bzw. ob SERPINE3 überhaupt exprimiert wird. Zwei Ansätze führten schließlich zur richtigen Sequenz-Vorhersage für SERPINE3: (1) Zunächst einmal zeigte eine BLASTP-Analyse mit anschließendem Aminosäure-*Alignment*, dass SERPINE3 unter Vertebraten hoch konserviert ist und dass eine der postulierten humanen SERPINE3-Sequenzen eine höhere Ähnlichkeit zu den aus cDNAs abgeleiteten SERPINE3-Sequenzen von Maus und Rind aufweist (Abschnitt 5.2.1, Abbildung 17). (2) Weiterhin konnte durch Genstrukturanalysen nachgewiesen werden, dass die Sequenz XH_941682 im Gegensatz zur Sequenz AX407123 an Position 380a (α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem) kein Intron aufweist (Abschnitt 5.2.4). Dieser Befund lieferte letztlich den entscheidenden Hinweis darauf, dass die vorhergesagte Sequenz AX407123 korrekt annotiert ist, da die Genstrukturanalysen zeigten, dass beide postulierten Sequenzen sonst alle Intronpositionen und Phasen mit denen von Vertebraten-Serpinen der Gruppe 3 teilen (α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem). Die Richtigkeit dieser Hypothese wurde schließlich durch Amplifikation und Sequenzierung des kodierenden Bereichs der SERPINE3-cDNA bestätigt (Abschnitt 5.2.2). Die Sequenz wurde bei EMBL unter der Zugangsnummer AM402969 abgelegt. Somit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass dieses neue humane Serpin exprimiert wird. Gleichzeitig gelang die eindeutige Zuordnung von SERPINE3 zur Gruppe 3 der Vertebraten-Serpine.

Bioinformatische Analysen zeigten, dass SERPINE3 ein N-terminales Signalpeptid aber kein C-terminales ER-Retentionssignal besitzt (Abschnitt 5.2.3). Daher wurde postuliert, dass SERPINE3 sezerniert wird. Diese Hypothese konnte durch rekombinante Expression des Serpins in COS-7-Zellen bestätigt werden (Abschnitt 5.2.9). Das Serpin konnte in den Überständen der transfizierten Zellen deutlich stärker nachgewiesen werden als in den Extrakten. Zum Nachweis des Serpins wurden Antikörper verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden (Abschnitte 5.2.6, 6.2.1). Weiterhin zeigte dieses Experiment, dass SERPINE3 posttranslational

modifiziert ist, da das Protein größer war (ca. 57 kD) als berechnet (Abschnitt 5.2.9). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde gezeigt, dass SERPINE3 N-glykosyliert ist, was mit der bioinformatischen Vorhersage dreier N-Glykosylierungsstellen (Abschnitt 5.2.3) übereinstimmt (Feicht, nicht veröffentlichte Daten). Eine genauere Betrachtung der RSL-Sequenz implizierte weiterhin, dass SERPINE3 ein inhibitorisches Serpin ist, da die *Hinge*-Region des RSLs viele kleine Aminosäuren aufweist, was essenziell für die Einlagerung des RSLs in das β -Faltblatt A ist (Gettins, 2002b). Aufgrund der basischen Aminosäuren an den postulierten Positionen P2/P1 wird weiterhin vermutet, dass PCs oder Trypsin-ähnliche Proteasen natürliche Zielenzyme des Serpins sind. Diese Hypothese konnte bislang nicht bestätigt werden. Die möglichen Gründe werden im weiteren Verlauf diskutiert.

6.2.1 Rekombinante Expression von SERPINE3

SERPINE3 wurde rekombinant in *E. coli* B121(DE3) als His₆-GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose gereinigt. Die Identität des ca. 70 kD großen Fusionsproteins wurde durch Massenspektrometrie bestätigt (Abschnitt 5.2.5). Die Ausbeuten des SERPINE3-Fusionsproteins lagen deutlich unter denen von His₆-GST-*Bl-Spn1*, was darauf zurückzuführen ist, dass ein beträchtlicher Anteil des Proteins unlöslich war. Dennoch konnte genügend Fusionsprotein gereinigt werden, was die Gewinnung funktioneller Antikörper ermöglichte, die nicht nur mit bakteriell exprimiertem SERPINE3, sondern auch mit endogenem, nicht denaturiertem SERPINE3 aus MCF-7-Zellen reagierten (Abschnitte 5.2.6, 5.2.12).

Obwohl für die Konstruktion des bakteriellen SERPINE3-Expressionsplasmids eine ähnliche Klonierungsstrategie wie für *Bl-Spn1* angewandt wurde (Tödtmann, 2004), ließ sich der N-terminale His₆-GST-*Tag* nicht abspalten (Abschnitt 5.2.5). Gleichwohl wurde das Fusionsprotein für Aktivitätsstudien eingesetzt, da vielfach gezeigt wurde, dass Serpine mit N-terminalem Fusions-*Tag* biologisch aktiv sind (Schick *et al.*, 1997; Oley *et al.*, 2004; Tödtmann, 2004). In Komplexierungsversuchen und/oder kinetischen Tests wurde die biologische Aktivität des Serpins mit einem Spektrum potenzieller Zielproteasen (Trypsin, Furin und PC1/3) untersucht. In keinem der Tests konnte eine inhibitorische Aktivität des Serpins nachgewiesen werden (Abschnitt 5.2.7). Auch wenn viele humane Serpine in aktiver Form in Bakterien produziert werden können (Bird *et al.*, 2004), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die mangelnde inhibitorische Aktivität auf eine nicht korrekte Faltung des Serpins oder fehlende posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist, da Bakterien nicht über die eukaryotischen Faltungshelfer und Modifikationssysteme verfügen (Alberts *et al.*, 2002; Bird *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass sich der N-terminale His₆-GST-*Tag* nicht abspalten ließ und ebenso der Befund, dass das SERPINE3-Fusionsprotein durch Trypsin vollkommen

degradiert wurde (während *Bl*-Spn1 SDS-stabile Komplexe bildete), stützten die Hypothese einer fehlerhaften Faltung.

Für weitere Funktionsanalysen musste daher ein System etabliert werden, das die rekombinante Expression des Serpins in biologisch aktiver Form und in ausreichenden Mengen gewährleistet. Da COS-7-Zellen kein geeignetes System zur Produktion größerer Mengen eines rekombinanten Proteins darstellen (Geisse & Henke, 2005), wurde SERPINE3 in HEK-293-EBNA-Zellen produziert. Mit dem HEK-293-EBNA-System konnten bereits viele Säugerproteine in aktiver Form und in ausreichenden Mengen hergestellt werden (Chen *et al.*, 2003; Baldi *et al.*, 2005; Geisse & Henke, 2005). Die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien sezernieren unter Selektionsdruck kontinuierlich SERPINE3 mit N-terminalem His₆-Tag ins Medium. Der Nachweis des Proteins durch Western-Blot erfordert keine Ankonzentrierung der Überstände und auch keine langen Belichtungszeiten (Abschnitt 5.2.10). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde versucht, das Serpin durch Metallionenaffinitätschromatographie zu reinigen. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass der His₆-Tag nicht frei zugänglich sind, da bereits geringe Konzentrationen an Imidazol (1 mM) eine Elution des Proteins bewirken (Kutzner, nicht veröffentlichte Daten). Daher wurden die Untersuchungen zur Aktivität von SERPINE3 mit den Überständen der rekombinanten Zellen durchgeführt (Abschnitt 5.2.11). Auch in diesen Experimenten konnte keine Aktivität von SERPINE3 gegenüber Trypsin und Furin nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnte eine Hemmung der Trypsin-ähnlichen Protease Thrombin nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für diese mangelnde inhibitorische Aktivität werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

6.2.2 SERPINE3 zeigt keine inhibitorische Aktivität *in vitro*

Inhibitorische Serpine besitzen im N-terminalen Bereich ihres RSLs eine hoch konservierte Region (*Hinge*-Region, Abbildung 3), die vornehmlich aus kleinen Aminosäuren besteht. Dieser Bereich ermöglicht die Einlagerung des RSLs in das β -Faltblatt A des Serpins, die mit einer irreversiblen Hemmung der gebundenen Zielprotease einhergeht (Hopkins *et al.*, 1993; Gettins, 2002b). Trotz der Tatsache, dass auch SERPINE3 eine für inhibitorische Serpine typische *Hinge*-Region aufweist (Abschnitt 5.2.3), konnte keine inhibitorische Aktivität des Serpins nachgewiesen werden. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, die im Folgenden gesondert diskutiert werden.

(1) Furin oder Trypsin-ähnliche Proteasen sind keine Zielproteasen von SERPINE3

Bei den meisten inhibitorischen Serpinen ist der N-terminale Bereich des RSLs bis zur Protease-Spaltstelle 17 Aminosäuren lang (Gettins, 2002b). Da die Sequenz im Bereich der Positionen P17 bis P9 bei inhibitorischen Serpinen hoch konserviert ist

(Abbildung 20), kann die Proteasespaltstelle vorhergesagt werden. Für SERPINE3 ist daher anzunehmen, dass Lys³⁶⁸ und Arg³⁶⁹ die Position P2 bzw. P1 repräsentieren, weshalb Proteasen vom Trypsintyp oder PCs als Zielenzyme in Frage kommen (Abschnitt 5.2.3). Wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben, ist der RSL von *Dm-Spn4A/E* nach Spaltung durch Furin aber z. B. 18 Aminosäuren lang (Oley *et al.*, 2004) und es gibt auch Beispiele für Serpine, deren RSL nach Protease-Spaltung eine Länge von 16 Aminosäuren aufweist (Gettins, 2002b). Im Falle von SERPINE3 würde das bedeuten, dass Serin³⁷⁰ (RSL-Länge: 18 AS) oder Lysin³⁶⁸ (RSL-Länge: 16 AS) die P1-Position repräsentieren würde, was wiederum mit einer veränderten Proteasespezifität einherginge. Sollten Leucin³⁶⁷ und Lysin³⁶⁸ die Positionen P2/P1 repräsentieren, so kämen z. B. papainähnliche Cysteinproteasen der C1A-Subfamilie als Zielproteasen in Frage, da diese Enzyme Substrate mit großen hydrophoben Aminosäuren (z. B. Leucin) an Position P2 bevorzugen und an Position P1 fast jede Aminosäure akzeptieren (Rawlings & Barrett, 2004). Bei einer RSL-Länge von 16 AS kämen aufgrund eines P1-Lysins weiterhin Trypsin-ähnliche Proteasen als Zielenzyme in Frage, aber aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mehr PCs, da diese bevorzugt nach mehreren basischen Aminosäuren spalten (Rockwell *et al.*, 2002). Tatsächlich deuten die Aktivitätsuntersuchungen der SERPINE3-RSL-Mutante „LuckyLoop“ darauf hin, dass SERPINE3 eine andere Zielprotease-Spezifität als *Bl-Spn1* besitzt (Abschnitt 5.2.8). Die Mutante „LuckyLoop“ basiert auf dem Serpin *Bl-Spn1*, wobei einzelne Aminosäuren im RSL von *Bl-Spn1* so verändert wurden, dass die Aminosäuren im Bereich der Positionen P9 bis P2' identisch zu den entsprechenden Positionen von SERPINE3 sind. „LuckyLoop“ bildet SDS-stabile Komplexe mit Trypsin, aber nicht mit Furin. Da die Mutante „LuckyLoop“ Trypsin hemmt, wurde vermutet, dass auch SERPINE3 Trypsin inhibiert, da die Spezifität von Serpinen maßgeblich durch die Aminosäuren in der benachbarten Umgebung der Proteasespaltstelle bestimmt wird (Gettins, 2002b). Gleichwohl konnte keine Hemmung von Trypsin durch das in HEK293-EBNA-Zellen produzierte SERPINE3 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der bislang nicht gelungene Nachweis einer inhibitorischen Aktivität von SERPINE3 nicht auf einer falschen Wahl von Zielproteasen beruht. Vielmehr müssen andere Gründe dafür verantwortlich sein, dass SERPINE3 keine der getesteten Zielproteasen hemmt.

(2) SERPINE3, ein nicht inhibitorisches Serpin?

Nicht inhibitorische Serpine, wie z. B. Maspin, Angiotensinogen, Ovalbumin oder PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) können ihren RSL nach Protease-Spaltung nicht in das β -Faltblatt A einlagern (kein S \rightarrow R-Übergang), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die *Hinge*-Region dieser Serpine viele große und geladene Aminosäuren enthält (Gettins, 2002b). Andere nicht inhibitorische Serpine, wie z. B. CBG (*corticosteroid binding globulin*) oder TBG (*thyroxine binding globulin*) gehen

dagegen nach Spaltung des RSLs von der S- in die R-Konformation über (Pemberton *et al.*, 1988) wobei auffällt, dass TBG eine konservierte *Hinge*-Region besitzt (GTEAAAV) (Gettins, 2002b). Letzteres Beispiel zeigt, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, dass SERPINE3 ein nicht inhibitorisches Serpin ist. Eine in jüngster Zeit veröffentlichte Studie zum humanen SERPINB11 und dessen Maus-Homolog Serpinb11 zeigt, dass nicht nur der RSL, sondern auch das Gerüst von Serpinen von entscheidender Bedeutung für deren inhibitorische Aktivität ist (Askew *et al.*, 2007). Während Serpinb11 Trypsin-ähnliche Proteasen inhibiert, zeigt SERPINB11 keine inhibitorische Aktivität, obwohl der RSL des humanen Serpins fast identisch zu dem des Maus-Homologs ist. Durch Austausch der RSLs (Maus-RSL auf humanes SERPINB11-Gerüst und umgekehrt) konnten die Autoren zeigen, dass das Gerüst des humanen Serpins eine Inhibition von Proteasen verhindert. Während eine Hemmung von Trypsin durch das Maus-Serpin mit humanem RSL nachgewiesen werden konnte, zeigte ein chimäres Serpin aus humanem Gerüst und Maus-RSL keine inhibitorische Aktivität. Ein ähnliches Transplantationsexperiment (z. B. SERPINE3-RSL auf *Bl-Spn1*-Gerüst und umgekehrt) könnte auch im Falle von SERPINE3 Aufschluss darüber geben, ob das Gerüst von SERPINE3 eine Inhibition von Proteasen beeinträchtigt. Ein Befund dieser Arbeit deutet tatsächlich darauf hin, dass SERPINE3 eine Funktion unabhängig von der Hemmung von Proteasen erfüllen könnte: Bei der Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen mit dem für SERPINE3 kodierenden Plasmid pCEP4-T3C fiel auf, dass die Zellen kurz nach Start der Selektion mit Hygromycin ihr Wachstum für einen gewissen Zeitraum einstellen (Abschnitt 5.2.10). Dieser kurzfristige Wachstumsstop ist vermutlich nicht auf eine Inhibition von PCs zurückzuführen, da sich die Zellen, die mit Plasmiden für SERPINE3-Mutanten (P1-Alanin- bzw. P2-Alanin-Mutanten) transfiziert wurden, ebenso verhielten (Abschnitt 5.2.10). Warum die Zellen vorübergehend ihr Wachstum einstellen, ist unklar. Eine Vermutung ist, dass eine Überexpression des Serpins toxisch ist und dass nur Zellen überleben, die ein moderates SERPINE3-Expressionsniveau zeigen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Mutanten andere für das Wachstum essenzielle Proteasen inhibieren.

Beim Vergleich der humanen SERPINE3-Aminosäuresequenz mit anderen humanen Serpinen fällt auf, dass in der Umgebung des Helix F-Bereichs bei SERPINE3 eine einzigartige Insertion vorliegt (Abbildung 43 und Abbildung 44). Diese Insertion könnte einen Einfluss auf die Sekundärstruktur von SERPINE3 haben. Dem SERPINE3-Modell zufolge liegt dieser Bereich des Serpins stark gewunden vor (Abbildung 44). Möglicherweise führt diese Insertion daher zur Ausbildung einer zusätzlichen α -Helix, die aufgrund ihrer Lokalisation (oberhalb von s5A) die Einlagerung des RSLs in das Faltblatt A beeinträchtigen könnte. Weiterhin fällt auf, dass der Bereich, der bei α_1 -Antitrypsin und anderen Serpinen die Helix F bildet, nicht konserviert ist

(Abbildung 43). Dieser Befund ist deshalb interessant, da vermutet wird, dass diese Helix eine essenzielle Rolle beim Inhibitionsmechanismus von Serpinen spielt (Gettins, 2002a). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser für SERPINE3 charakteristische Bereich die Inhibition von Proteasen beeinträchtigt.

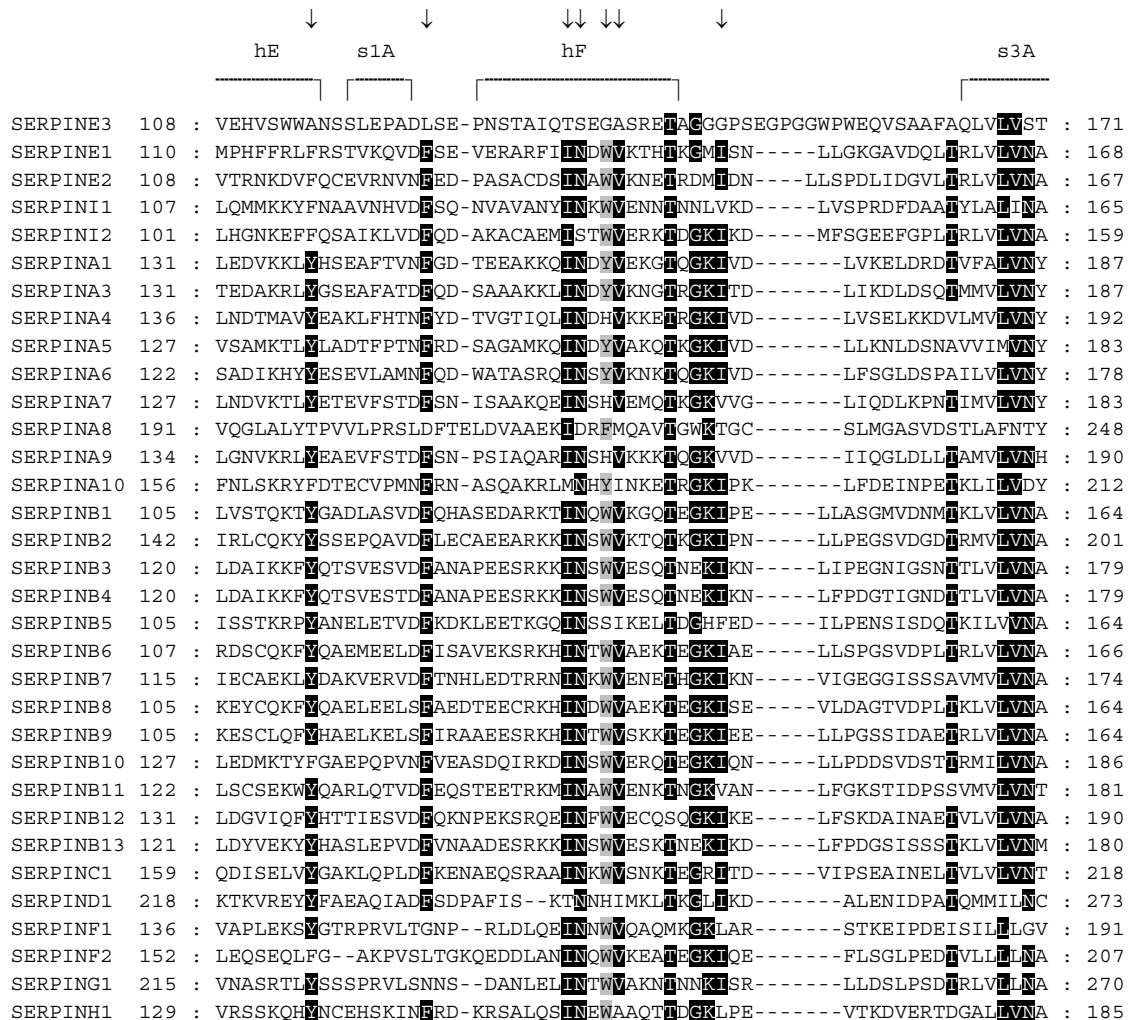


Abbildung 43: Ausschnitt aus einem *Alignment* humaner Serpine. Für das CLUSTALW-*Alignment* wurden die reifen Sequenzen humaner Serpine verwendet. Aminosäuren, die in >70 % der Serpinsequenzen identisch sind, sind invertiert (weiß auf schwarz) dargestellt. Eine Position, die bei der Mehrzahl der Serpine mit Trp oder Phe besetzt ist, ist grau hervorgehoben. Oberhalb des *Alignments* sind die von α_1 -Antitrypsin abgeleiteten Sekundärstrukturelemente dargestellt (Whisstock *et al.*, 2000). Interessante Substitutionen in der SERPINE3-Sequenz sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (siehe auch Tabelle 32). Das vollständige *Alignment* ist im Anhang dargestellt (Abschnitt 8.3.5).

Die Aminosäuresequenz von SERPINE3 weicht noch an weiteren Positionen von der Konsensussequenz der anderen humanen Serpine ab. Die markantesten Unterschiede sind in Tabelle 32 aufgelistet. Mehrere Substitutionen treten an Positionen auf, die in α_1 -Antitrypsin Teil der *Shutter*-Region sind. Diese Region, die auch Bereiche der Helix F umfasst, liegt in der Nähe des Zentrums von β -Faltblatt A und beeinflusst/ermöglicht

die Öffnung des β -Faltblatts A, so dass der RSL inserieren kann (siehe Abbildung 3) (Irving *et al.*, 2000; Whisstock *et al.*, 2000). Interessant ist hierbei, dass Substitutionen in diesem Bereich häufig nur bei nicht inhibitorischen Serpinen auftreten (Tabelle 32, Abschnitt 8.3.5). Position S³⁷⁵ in der *Shutter*-Region fällt weiterhin deshalb auf, weil sie mit einer für SERPINE3 charakteristischen Aminosäure besetzt ist. Während 32 von 33 Serpinen an der entsprechenden Stelle ein Phenylalanin besitzen, enthält SERPINE3 an dieser Position ein Serin (Tabelle 32).

Tabelle 32: Substitutionen in der Aminosäuresequenz von SERPINE3

SERPINE3	Konservierte Aminosäuren	Bereich	Auffälligkeit
F ³⁰	V, L, I, M (31/33; 94 %)	s6B	SERPINA8: T ⁹⁹
F ⁴⁶	L, M, V (31/33; 94 %)	Übergang von hB nach hC	SERPINA7: F ⁶²
A ¹¹⁵	F, Y (31/33; 94 %)	Ende von hE	SERPINA8: T ¹⁹⁸
L ¹²⁴	F (28/33; 85 %)	Übergang von s1A nach hF	
T ¹³⁴	I (30/33; 91 %)	hF (<i>Shutter</i> -Region)	
S ¹³⁵	N (30/33; 91 %)	hF (<i>Shutter</i> -Region)	
G ¹³⁷	W, Y, F (27/33; 82 %)	hF (<i>Shutter</i> -Region)	
A ¹³⁸	V, M, I (31/33; 94 %)	hF (<i>Shutter</i> -Region)	SERPINH1: A ¹⁵⁹
G ¹⁴⁶	I, L, V (30/33; 91 %)	Übergang von hF nach s3A (<i>Shutter</i> -Region)	SERPINA8: T ²³⁰ SERPINB5: F ¹⁴⁴
S ¹⁷⁰	N, D (30/33; 91 %)	s3A (<i>Shutter</i> -Region)	SERPINA8: T ²⁴⁷ SERPINF1: G ¹⁹⁰
W ²⁹⁶	L, M (31/33; 94 %)	hI	SERPINA8: A ³⁶⁶
F ³¹⁸	L, I, V (32/33; 97 %)	Übergang von hI nach s5A	
F ³⁷⁴	L (27/33; 82 %)	s5B (<i>Shutter</i> -Region)	
S ³⁷⁵	F (32/33; 97 %)	s5B (<i>Shutter</i> -Region)	

In der ersten Spalte ist angegeben, an welchen Positionen die SERPINE3-Aminosäuresequenz von der Konsensussequenz der anderen humanen Serpine abweicht. Die Nummerierung bezieht sich auf das reife SERPINE3. Das entsprechende Alignment ist im Anhang (8.3.5) dargestellt. Die zweite Spalte zeigt, welche Aminosäuren an dieser Position konserviert sind und wie häufig sie unter den 33 analysierten Serpinen auftreten. Spalte drei gibt an, in welchem Strukturelement die entsprechende Position bei α_1 -Antitrypsin lokalisiert ist (Irving *et al.*, 2000; Whisstock *et al.*, 2000). An manchen Positionen treten nur bei nicht inhibitorischen Serpinen Substitutionen auf. Diese Serpine und die entsprechenden Substitutionen sind in der vierten Spalte genannt.

Manche Substitutionen treten in Bereichen auf, die nicht Teil des zentralen Gerüsts des Serpins sind. Auch hierbei fällt auf, dass an diesen Stellen neben SERPINE3 häufig nur nicht inhibitorische Serpine von der Serpin-Konsensussequenz abweichen. Viele der in Tabelle 32 aufgelisteten Substitutionen sind in Abbildung 44 gekennzeichnet.

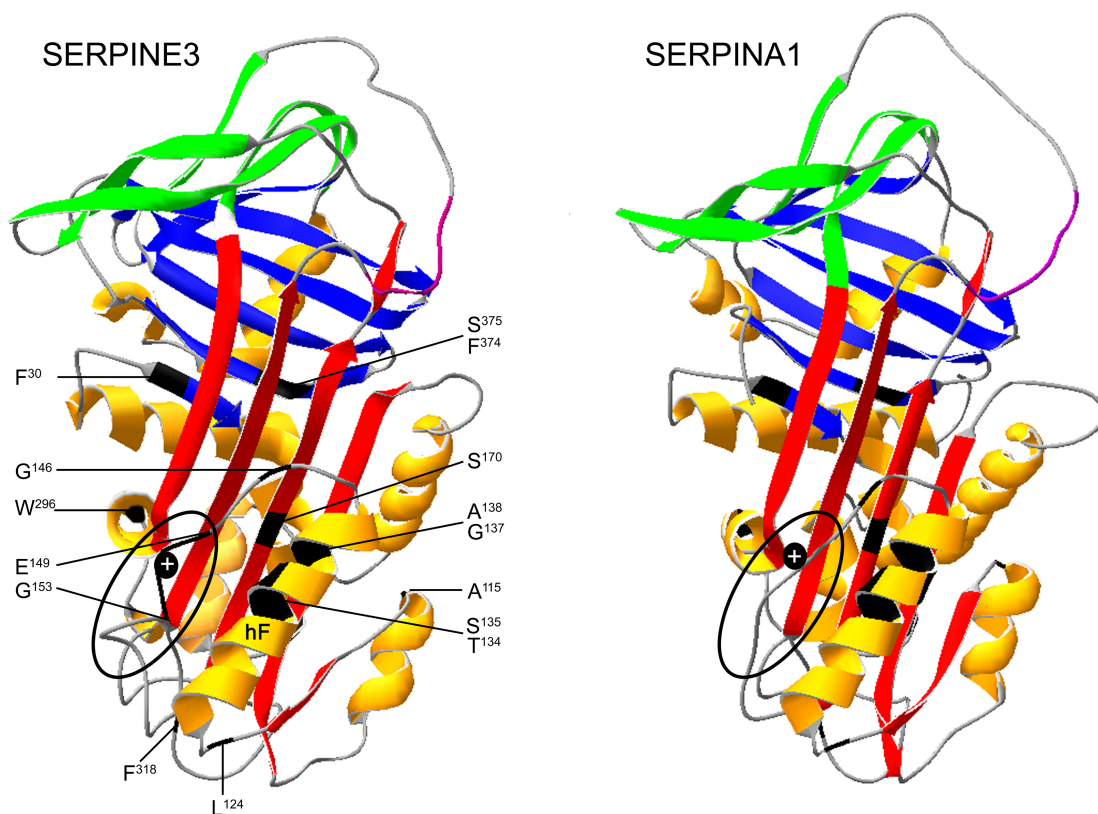


Abbildung 44: Substitutionen bei SERPINE3. Links dargestellt ist SERPINE3 in der RSL-exponierten Konformation. Ausgewählte Positionen, an denen die SERPINE3-Aminosäuresequenz von der Konsensussequenz der anderen Serpine abweicht, sind schwarz gefärbt (siehe auch Tabelle 32). Die Aminosäuren der Insertion (E¹⁴⁴GPGG¹⁵²) in der Nähe der Helix F (hF) sind ebenfalls schwarz markiert und gekennzeichnet (+). Der Bereich um die Insertion ist stark gewunden und durch eine Ellipse markiert. Das Modell wurde wie beschrieben erstellt (Abschnitt 5.2.3). Zum Vergleich ist rechts ein Modell der RSL-exponierten Konformation von α_1 -Antitrypsin dargestellt (siehe auch Abschnitt 2.3). Schwarz eingefärbt sind diejenigen Positionen, an denen in SERPINE3 Substitutionen auftreten. Die Farbgebung der Modelle ist wie in Abbildung 3 und Abbildung 21 beschrieben.

(3) SERPINE3 benötigt für die Inhibition von Zielproteasen einen Kofaktor

Mehrere Serpine, wie z. B. Antithrombin, HCII oder Nexin-1 benötigen für eine effiziente Inhibition bestimmter Zielproteasen die Bindung eines Kofaktors (z. B. Heparin). Die durch den Kofaktor induzierte Steigerung der inhibitorischen Aktivität kann durch Konformationsänderung des Serpins oder durch Brückenbildung zwischen dem Serpin und dem ebenso an den Kofaktor bindenden Zielenzym erfolgen (Gettins, 2002b; Huntington, 2006). Möglicherweise ist die Bindung von Heparin

und/oder anderen Kofaktoren für die inhibitorische Aktivität von SERPINE3 erforderlich.

(4) SERPINE3, ein latentes Serpin?

Die Studien mit der Mutante „LuckyLoop“ deuten darauf hin, dass Trypsin eine Zielprotease von SERPINE3 sein könnte. Das in HEK293-EBNA-Zellen produzierte SERPINE3 bildete aber keine SDS-stabilen Komplexe mit der Protease. Ebenso wenig konnten RSL-gespaltene Formen von SERPINE3 detektiert werden. Generell fiel bei den Versuchen mit dem in eukaryotischen Zellen produzierten Serpin auf, dass nie RSL-gespaltene Formen des Serpins auftraten (Abschnitt 5.2.11). Dieser Befund lässt vermuten, dass der RSL des Serpins möglicherweise nicht frei zugänglich ist, was bedeutet, dass SERPINE3 in einer latenten Konformation vorliegen könnte (Abbildung 45). Bislang ist nur ein Serpin bekannt (PAI-1), das unter physiologischen Bedingungen spontan in die latente Konformation übergeht. PAI-1 fungiert durch Inhibition der Proteasen tPA (*tissue-type plasminogen activator*) und uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) als zentraler Inhibitor der Fibrinolyse (Gils & Declerck, 2004). Obwohl der Transkriptspiegel des PAI-1-Gens in Hepatozyten und Endothelzellen sehr hoch sind, ist die Aktivität von PAI-1 im Plasma niedrig, da das Serpin innerhalb von wenigen Stunden eine latente Konformation einnimmt (Levin & Santell, 1987). Durch Bindung an Vitronectin wird die aktive Form des Serpins stabilisiert (De Taeye *et al.*, 2004). Möglicherweise ist auch der RSL von SERPINE3 nur in Gegenwart eines Kofaktors exponiert.

Im Zusammenhang mit der Hypothese, dass der bislang nicht mögliche Nachweis einer inhibitorischen Aktivität von SERPINE3 auf einen inserierten RSL zurückzuführen ist, ist wiederum der Befund interessant, dass der Bereich um Helix F nicht konserviert ist. Für die Einlagerung des (nicht-gespaltenen) RSLs zwischen die Stränge s3A und s5A des Serpins ist, wie auch bei der Komplexbildung, eine temporäre Verschiebung der Helix F erforderlich (Gettins, 2002a).

Die Tatsache, dass die im folgenden Abschnitt diskutierten *in-vivo*-Untersuchungen zur endogenen Expression von SERPINE3 auf eine inhibitorische Aktivität des Serpins hindeuten (Abschnitt 6.2.3), lässt vermuten, dass der bislang nicht gelungene Nachweis der inhibitorischen Aktivität *in vitro* auf das Fehlen eines Kofaktors und/oder eine latente Konformation des Serpins zurückzuführen ist.

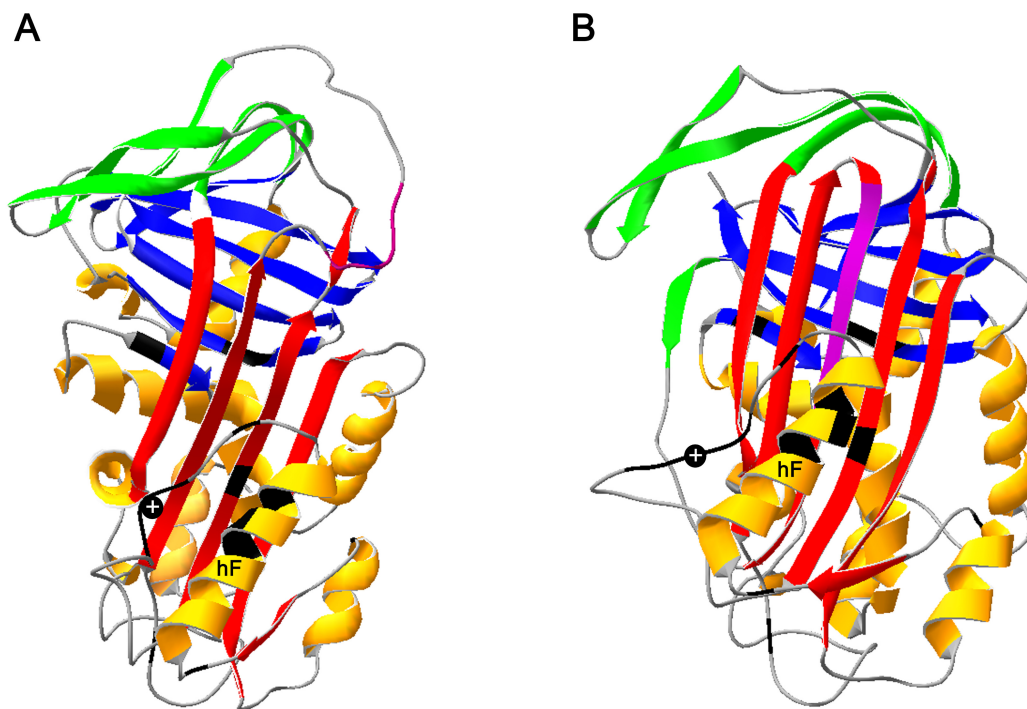


Abbildung 45: SERPINE3 in latenter Konformation. Links dargestellt ist die RSL-exponierte Konformation von SERPINE3 (siehe Abbildung 44). Rechts dargestellt ist SERPINE3 in der latenten Konformation. Das Modell basiert auf den Kristallstrukturdaten von latentem PAI-1 (PDB-Code: 1dvnA) und RSL-gespaltenem Maus-Neuroserpin (PDB-Code: 1jjoD). Die Farbgebung der Modelle ist wie in Abbildung 44 beschrieben.

6.2.3 Studien zur endogenen Expression von SERPINE3 – Hinweise auf eine inhibitorische Aktivität

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die endogene Expression von SERPINE3 auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abschnitt 5.2.12). Durch Immunoaffinitätschromatographie gelang es, SERPINE3 spezifisch aus den Kulturüberständen der Brustkrebszelllinie MCF-7 anzureichern. In dieser Zelllinie war zuvor ein hoher SERPINE3-Transkriptspiegel nachgewiesen worden (Abschnitt 5.2.12). Zur Anreicherung des Serpins wurden Antikörper gegen SERPINE3 verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und durch Affinitätschromatographie gereinigt wurden (Abschnitt 5.2.6). Das sezernierte Serpin (57 kD) hat die gleiche Größe wie das rekombinant in HEK293-EBNA Zellen produzierte Serpin. Neben dem freien Serpin wurden mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie noch weitere, deutlich größere Proteine angereichert (110, 170 und 190 kD). Die Tatsache, dass die Anreicherung dieser Proteine mit affinitätsgereinigten Anti-SERPINE3 Antikörpern erfolgte, unterstreicht die Spezifität des Nachweises. Es ist daher wahrscheinlich, dass die hochmolekularen Proteine SERPINE3 in komplexierter Form repräsentieren, wobei die

potenziellen Interaktionspartner eine Größe von 50 bzw. 110-130 kD aufweisen. Interessanterweise konnte dieses Ergebnis erst wieder verlässlich reproduziert werden, nachdem die Zellen unter Zusatz des Serinprotease-Inhibitors Pefabloc kultiviert wurden (Feicht, nicht veröffentlichte Daten). Dieser Befund unterstreicht zunächst einmal die Vermutung, dass es sich bei den zusätzlich angereicherten Proteinen um Komplexbanden handelt, da Serpin-Protease-Komplexe sehr anfällig für einen proteolytischen Abbau sind (Gettins, 2002b). Weiterhin ist dieses Ergebnis im Zusammenhang mit möglichen Zielproteasen von SERPINE3 interessant: Die Größe der potenziellen 170-190 kD großen Komplexe lässt vermuten, dass es sich bei den Interaktionspartnern um PCs wie PACE4 oder PC5A (ca. 115 Da) handeln könnte, da nur diese Enzyme (soweit bekannt) ein solch großes Molekulargewicht aufweisen (Creemers *et al.*, 1993; Nour *et al.*, 2005; Rawlings *et al.*, 2006). Aufgrund der Ergebnisse einer RT-PCR-Studie, bei der die Expression verschiedener PCs in Brustkrebszelllinien untersucht wurde (Cheng *et al.*, 1997), ist es allerdings unwahrscheinlich, dass es sich bei dem 115 kD großen Interaktionspartner um PC5 handelt, da keine PC5-Transkripte in der MCF-7-Zelllinie detektiert werden konnten. Allerdings wurde PACE4-mRNA in MCF-7-Zellen nachgewiesen, weshalb der 115 kD große Interaktionspartner tatsächlich PACE4 repräsentieren könnte. Bei dem ca. 50 kD großen Interaktionspartner könnte es sich ebenso um eine PC handeln, da viele PCs auch in verkürzten Formen existieren (Denault *et al.*, 2002; Nour *et al.*, 2005). Andererseits könnte es sich bei dem nachgewiesenen 110 kD großen Protein auch um ein Abbauprodukt der größeren Komplexe handeln. Mehrere Studien zeigen, dass Pefabloc die Aktivität von PCs nur wenig beeinflusst (Cieplik *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2005), was die Hypothese untermauert, dass es sich bei den mutmaßlichen Komplexpartnern um PCs handelt. PACE4 (und PC5) kommen weiterhin aufgrund ihrer Lokalisation als Zielenzyme von SERPINE3 in Frage. Es wurde gezeigt, dass beide PCs an der extrazellulären Matrix lokalisiert sind und direkt oder indirekt an Heparinproteoglycane der ECM binden (Tsuji *et al.*, 2003; Nour *et al.*, 2005). Möglicherweise ist SERPINE3 ebenso wie diese PCs in der ECM lokalisiert. Diese Hypothese wird durch einen Befund dieser Arbeit untermauert: Bei der Analyse der SERPINE3-Expression in verschiedenen humanen Geweben und Plasma konnten mit affinitätsgereinigtem Anti-SERPINE3-Antiserum immunreaktive Proteine (72 kD bzw. 90 kD) in Gehirn, Herz und Niere nachgewiesen werden, nicht aber in Milz, Plazenta, Leber und Plasma (Abschnitt 5.2.12). Der Befund, dass SERPINE3 nicht im Plasma detektiert werden konnte, gleichzeitig aber mehrfach gezeigt wurde, dass SERPINE3 sekretiert wird (Abschnitte 5.2.9 und 5.2.12), spricht dafür, dass das Protein in der ECM lokalisiert sein könnte. Allerdings stellt sich die Frage, ob das in Gehirn, Niere und Herz detektierte Protein wirklich SERPINE3 repräsentiert, da das dort nachgewiesene Protein wiederum deutlich größer ist als berechnet. Im Gegensatz zur MCF-7-Zelllinie konnte

in Gewebsextrakten kein Protein detektiert werden, dessen Größe der des freien Serpins entspricht. Die Tatsache, dass immunreaktive Banden in genau den Geweben nachgewiesen wurden, in denen der *Real-Time*-PCR-Studie zu Folge eine hohe SERPINE3-Expression vorliegt (Badola *et al.*, 2006), deutet darauf hin, dass die 90 kD-Bande SERPINE3 in komplexierter Form repräsentiert. Laut dieser Studie liegt eine sehr starke SERPINE3-Expression u. a. in Gehirn, im Herz und in der Niere vor. In der Milz ist die Expression etwas schwächer und in der Leber sehr schwach. Plazentagewebe wurde nicht untersucht. Die Tatsache, dass freies SERPINE3 nicht detektiert werden konnte, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass SERPINE3 in allen Geweben komplexiert vorliegt. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass z. B. auch humanes PI8 innerhalb von sehr kurzer Zeit nach der Aktivierung von Blutplättchen nur noch in Form eines Komplexes mit Furin nachweisbar ist (Leblond *et al.*, 2006). Allerdings fällt auf, dass der mutmaßliche Komplexpartner von SERPINE3 in den humanen Geweben eine deutlich geringere Größe (ca. 30 kD) aufweist als die postulierten Interaktionspartner in den Kulturüberständen von MCF-7-Zellen. Dieser Befund lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass viele Serpine unterschiedliche Proteasen inhibieren. Das naheliegendste Beispiel ist wohl *Bl-Spn1*, das *in vitro* Furin, PC1/3 und Trypsin inhibiert.

Zusammenfassend deuten die Expressionsstudien darauf hin, dass SERPINE3 ein inhibitorisches Serpin ist, das möglicherweise in der ECM lokalisiert ist. Eine massenspektrometrische Analyse der hochmolekularen Banden aus MCF-7 Kulturständen könnte Aufschluss darüber geben, ob und welche Proteasen SERPINE3 hemmt. Der Nachweis potenzieller Komplexe *in vivo* und die bislang nicht gelungene Nachweis einer inhibitorischen Aktivität *in vitro* deuten darauf hin, dass SERPINE3 für seine Aktivität einen Kofaktor benötigt oder dass das Serpin wie PAI-1 sehr schnell in eine latente, nicht inhibitorische Konformation übergeht.

6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Serpine charakterisiert, die aufgrund ihrer RSL-Sequenz und ihrer postulierten Lokalisation als physiologische Inhibitoren von PCs in Frage kommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass *Bl-Spn1* Furin und PC1/3 hemmt und dass der Inhibitor aufgrund seines ER-Retentionssignals im sekretorischen Pfad zurückgehalten wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Bl-Spn1* die Aktivität von PCs in *Branchiostoma* reguliert. Um diese Hypothese zu erhärten, wäre es interessant zu untersuchen, ob und wie *Bl-Spn1* mit seinen postulierten Zielenzymen, den *Branchiostoma*-PCs, reagiert. Zur Untersuchung dieser Fragestellung müssten die verschiedenen PCs rekombinant exprimiert werden. Da das Genomprojekt von

Branchiostoma californiensis mittlerweile sehr weit fortgeschritten ist, ist es ebenso vorstellbar, dass diese Fragestellung durch die Analyse von Proteinextrakten von *Branchiostoma* untersucht werden kann. Die spezifische Anreicherung von *Bl*-Spn1-Proteinen über Immunoaffinitätschromatographie mit *Bl*-Spn1-spezifischen Antikörpern, verbunden mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse, ist hierfür ein zielführender Ansatz. Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass *Bl*-Spn1 im Gegensatz zu *Dm*-Spn4A/E keine inhibitorische Aktivität gegenüber PC2 zeigt. Da selektive PC-Inhibitoren sowohl von wissenschaftlicher als auch von medizinischer Relevanz sind, wäre es interessant zu untersuchen, ob und wie *Bl*-Spn1 mit den anderen PCs (PACE4 PC5 und PC7) reagiert. In diesem Zusammenhang wäre auch die Analyse der bestehenden RSL-Mutanten von *Bl*-Spn1 von Interesse.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Expression des humanen Serpins SERPINE3 auf Proteinebene nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass SERPINE3 sekretiert wird und die Analysen zur Gewebsexpression von SERPINE3 deuten darauf hin, dass das Serpin möglicherweise in der ECM lokalisiert ist. Die Vermutung, dass SERPINE3 ein Hemmstoff von PCs ist, konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden. Die Studien zur Mutante „LuckyLoop“ und weitere Befunde implizieren, dass SERPINE3 in einer latenten Konformation vorliegt und/oder dass es für seine Aktivität die Bindung eines Kofaktors benötigt. Daher ist die Aufklärung der SERPINE3-Konformation (durch Thermostabilitätstests, denaturierende Harnstoffgradientengelelektrophorese und/oder andere Tests) wichtig. Sollte sich herausstellen, dass SERPINE3 tatsächlich in dieser stabileren Konformation vorliegt, so kann das Serpin durch Denaturierung und Renaturierung wieder in die RSL-exponierte Form umgewandelt werden und anschließend erneut auf seine inhibitorische Aktivität (z. B. in Komplexierungsversuchen mit Trypsin) getestet werden. Eine massenspektrometrische Analyse der aus den Kulturüberständen der MCF-7-Zelllinie angereicherten hochmolekularen Proteine könnte darüber hinaus ein interessanter Ansatz zur Klärung der Funktion von SERPINE3 sein.

7 Literaturverzeichnis

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, **282**, 615-616.
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A.M. & Langer, R. (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*, **7**, 657-663.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. Garland Publishing, New York.
- Allan, B.B. & Balch, W.E. (1999) Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science*, **285**, 63-66.
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S. & Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem*, **268**, 24887-24891.
- Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F. & Thomas, G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *Embo J*, **16**, 1508-1518.
- Askew, D.J., Cataltepe, S., Kumar, V., Edwards, C., Pace, S.M., Howarth, R.N., Pak, S.C., Askew, Y.S., Bromme, D., Luke, C.J., Whisstock, J.C. & Silverman, G.A. (2007) SERPINB11 is a new noninhibitory intracellular serpin. Common single nucleotide polymorphisms in the scaffold impair conformational change. *J Biol Chem*, **282**, 24948-24960.
- Badola, S., Spurling, H., Robison, K., Fedyk, E.R., Silverman, G.A., Strayle, J., Kapeller, R. & Tsu, C.A. (2006) Correlation of serpin-protease expression by comparative analysis of real-time PCR profiling data. *Genomics*, **88**, 173-184.
- Baldi, L., Muller, N., Picasso, S., Jacquet, R., Girard, P., Thanh, H.P., Derow, E. & Wurm, F.M. (2005) Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production. *Biotechnol Prog*, **21**, 148-153.
- Bar-Peled, M. & Raikhel, N.V. (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem*, **241**, 140-142.
- Basak, A. (2005) Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med*, **83**, 844-855.
- Basak, A., Toure, B.B., Lazure, C., Mbikay, M., Chretien, M. & Seidah, N.G. (1999) Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4. *Biochem J*, **343 Pt 1**, 29-37.
- Bass, J., Turck, C., Rouard, M. & Steiner, D.F. (2000) Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11905-11909.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R. & Klein-Szanto, A.J. (2005) Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog*, **44**, 151-161.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783-795.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M. & Seidah, N.G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3564-3568.

- Bergeron, E., Vincent, M.J., Wickham, L., Hamelin, J., Basak, A., Nichol, S.T., Chretien, M. & Seidah, N.G. (2005) Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun*, **326**, 554-563.
- Bergeron, F., Leduc, R. & Day, R. (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol*, **24**, 1-22.
- Bertrand, S., Camasses, A., Paris, M., Holland, N.D. & Escriva, H. (2006) Phylogenetic analysis of Amphioxus genes of the proprotein convertase family, including aPC6C, a marker of epithelial fusions during embryology. *Int J Biol Sci*, **2**, 125-132.
- Bieth, J.G. (1995) Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods Enzymol*, **248**, 59-84.
- Bird, P.I., Pak, S.C., Worrall, D.M. & Bottomley, S.P. (2004) Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. *Methods*, **32**, 169-176.
- Boudreault, A., Gauthier, D. & Lazure, C. (1998) Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem*, **273**, 31574-31580.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7297-7301.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brüning, M., Lummer, M., Bentele, C., Smolenaars, M.M., Rodenburg, K.W. & Ragg, H. (2007) The Spn4 gene from *Drosophila melanogaster* is a multipurpose defence tool directed against proteases from three different peptidase families. *Biochem J*, **401**, 325-331.
- Cain, B.M., Vishnuvardhan, D., Wang, W., Foulon, T., Cadel, S., Cohen, P. & Beinfeld, M.C. (2002) Production, purification, and characterization of recombinant prohormone convertase 5 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, **24**, 227-233.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A. & Lindberg, I. (2000) Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem*, **275**, 36741-36749.
- Chen, J.W., Ledet, T., Orskov, H., Jessen, N., Lund, S., Whittaker, J., De Meyts, P., Larsen, M.B., Christiansen, J.S. & Frystyk, J. (2003) A highly sensitive and specific assay for determination of IGF-I bioactivity in human serum. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, E1149-1155.
- Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chretien, M. & Shiu, R.P. (1997) Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*, **71**, 966-971.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. & Thompson, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3497-3500.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532-534, 536-537.
- Cieplik, M., Klenk, H.D. & Garten, W. (1998) Identification and characterization of *Spodoptera frugiperda* furin: a thermostable subtilisin-like endopeptidase. *Biol Chem*, **379**, 1433-1440.

- Collins, S.J., Gallo, R.C. & Gallagher, R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, **270**, 347-349.
- Constam, D.B., Calfon, M. & Robertson, E.J. (1996) SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol*, **134**, 181-191.
- Constam, D.B. & Robertson, E.J. (2000) SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev*, **14**, 1146-1155.
- Cornwall, G.A., Cameron, A., Lindberg, I., Hardy, D.M., Cormier, N. & Hsia, N. (2003) The cystatin-related epididymal spermatogenic protein inhibits the serine protease prohormone convertase 2. *Endocrinology*, **144**, 901-908.
- Creemers, J.W., Groot Kormelink, P.J., Roebroek, A.J., Nakayama, K. & Van de Ven, W.J. (1993) Proprotein processing activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS Lett*, **336**, 65-69.
- Dahlen, J.R., Jean, F., Thomas, G., Foster, D.C. & Kisiel, W. (1998) Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem*, **273**, 1851-1854.
- Dalton, W.T., Jr., Ahearn, M.J., McCredie, K.B., Freireich, E.J., Stass, S.A. & Trujillo, J.M. (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*, **71**, 242-247.
- Day, R., Lazure, C., Basak, A., Boudreault, A., Limperis, P., Dong, W. & Lindberg, I. (1998) Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. *J Biol Chem*, **273**, 829-836.
- De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M. & Seidah, N.G. (1996) The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol*, **135**, 1261-1275.
- De Castro, E., Sigrist, C.J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*, **34**, W362-365.
- De Taeye, B., Gils, A. & Declerck, P.J. (2004) The story of the serpin plasminogen activator inhibitor 1: is there any need for another mutant? *Thromb Haemost*, **92**, 898-924.
- Dean, F.B., Borowiec, J.A., Eki, T. & Hurwitz, J. (1992) The simian virus 40 T antigen double hexamer assembles around the DNA at the replication origin. *J Biol Chem*, **267**, 14129-14137.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. & Philippe, H. (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, **439**, 965-968.
- Dementiev, A., Dobo, J. & Gettins, P.G. (2006) Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem*, **281**, 3452-3457.
- Denault, J., Bissonnette, L., Longpre, J., Charest, G., Lavigne, P. & Leduc, R. (2002) Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Lett*, **527**, 309-314.
- Dikeakos, J.D., Mercure, C., Lacombe, M.J., Seidah, N.G. & Reudelhuber, T.L. (2007) PC1/3, PC2 and PC5/6A are targeted to dense core secretory granules by a common mechanism. *Febs J*, **274**, 4094-4102.

- Dubois, C.M., Blanchette, F., Laprise, M.H., Leduc, R., Grondin, F. & Seidah, N.G. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol*, **158**, 305-316.
- Eckert, R. (2005) Die N-terminale Domäne von Heparinkofaktor II: Konformation und Bedeutung für die Hemmung von Thrombin. *Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld*.
- Edwards, C.P. & Aruffo, A. (1993) Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr Opin Biotechnol*, **4**, 558-563.
- Essalmani, R., Hamelin, J., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Mbikay, M., Chretien, M., Seidah, N.G. & Prat, A. (2006) Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol Cell Biol*, **26**, 354-361.
- Farrell, P.J., Allan, G.J., Shanahan, F., Vousden, K.H. & Crook, T. (1991) p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *Embo J*, **10**, 2879-2887.
- Fermentas (2004) RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit.
- Fermentas (2006) GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit.
- Finnerty, J.R. (2000) Evolutionary developmental biology. Head start. *Nature*, **408**, 778-779, 781.
- Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, L.A. & Douglass, J. (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci*, **20**, 639-648.
- Furlong, R.F. & Holland, P.W. (2002) Were vertebrates octoploid? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**, 531-544.
- Furuta, M., Yano, H., Zhou, A., Rouille, Y., Holst, J.J., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H. & Steiner, D.F. (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6646-6651.
- Furuta, M., Zhou, A., Webb, G., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L. & Steiner, D.F. (2001) Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J Biol Chem*, **276**, 27197-27202.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. & Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **54**, 713-733.
- GE Healthcare (2006) ECL Western blotting detection reagents and analysis system.
- Geisse, S. & Henke, M. (2005) Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. *J Struct Funct Genomics*, **6**, 165-170.
- Gettins, P.G. (2002a) The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism. *FEBS Lett*, **523**, 2-6.
- Gettins, P.G. (2002b) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, **102**, 4751-4804.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. & Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1417-1423.
- Gils, A. & Declerck, P.J. (2004) The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-I in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-I inhibitors. *Thromb Haemost*, **91**, 425-437.

- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H.D., Tang, B.L., Wong, S.H. & Hong, W. (1994) Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol*, **127**, 1557-1574.
- Gyamera-Acheampong, C., Tantibhedhyangkul, J., Weerachatanukul, W., Tadros, H., Xu, H., van de Loo, J.W., Pelletier, R.M., Tanphaichitr, N. & Mbikay, M. (2006) Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit accelerated capacitation, precocious acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability. *Biol Reprod*, **74**, 666-673.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. & Garten, W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*, **360**, 358-361.
- Hekman, C.M. & Loskutoff, D.J. (1985) Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem*, **260**, 11581-11587.
- Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G.P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W. & Than, M.E. (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol*, **10**, 520-526.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W. & Than, M.E. (2005) Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol*, **345**, 211-227.
- Holland, L.Z., Laudet, V. & Schubert, M. (2004) The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2290-2308.
- Holleman-Wieberg (1995) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101. Auflage, de Gruyter, Berlin.
- Hopkins, P.C., Carrell, R.W. & Stone, S.R. (1993) Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*, **32**, 7650-7657.
- Horlick, R.A., Sperle, K., Breth, L.A., Reid, C.C., Shen, E.S., Robbins, A.K., Cooke, G.M. & Largent, B.L. (1997) Rapid generation of stable cell lines expressing corticotropin-releasing hormone receptor for drug discovery. *Protein Expr Purif*, **9**, 301-308.
- Huntington, J.A. (2006) Shape-shifting serpins - advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci*, **31**, 427-435.
- Huntington, J.A., Read, R.J. & Carrell, R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **407**, 923-926.
- Invitrogen (2003) AcTEV Protease.
- Invitrogen (2006) TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing.
- Irving, J.A., Pike, R.N., Lesk, A.M. & Whisstock, J.C. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*, **10**, 1845-1864.
- Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H.P. & Nagata, K. (2006) Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell*, **17**, 2346-2355.

- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J. & Thomas, G. (1998) alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7293-7298.
- Jean, F., Thomas, L., Molloy, S.S., Liu, G., Jarvis, M.A., Nelson, J.A. & Thomas, G. (2000) A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2864-2869.
- Jin, W., Fuki, I.V., Seidah, N.G., Benjannet, S., Glick, J.M. & Rader, D.J. (2005) Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem*, **280**, 36551-36559.
- Johanning, K., Mathis, J.P. & Lindberg, I. (1996) Role of PC2 in proenkephalin processing: antisense and overexpression studies. *J Neurochem*, **66**, 898-907.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M. & Eggleton, P. (2001) The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol*, **11**, 122-129.
- Kamp, P., Strathmann, A. & Ragg, H. (2001) Heparin cofactor II, antithrombin-beta and their complexes with thrombin in human tissues. *Thromb Res*, **101**, 483-491.
- Kapust, R.B., Tozser, J., Copeland, T.D. & Waugh, D.S. (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 949-955.
- Khatib, A.M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. & Seidah, N.G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, **160**, 1921-1935.
- Kibler, K.V., Miyazato, A., Yedavalli, V.S., Dayton, A.I., Jacobs, B.L., Dapolito, G., Kim, S.J. & Jeang, K.T. (2004) Polyarginine inhibits gp160 processing by furin and suppresses productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Biol Chem*, **279**, 49055-49063.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J.S. & Mumford, D. (1975) An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*, **5**, 319-334.
- Kleizen, B. & Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 343-349.
- Knight, C.G. (1995) Active-site titration of peptidases. *Methods Enzymol*, **248**, 85-101.
- Knowles, B.B., Howe, C.C. & Aden, D.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **209**, 497-499.
- Kopatz, I., Remy, J.S. & Behr, J.P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med*, **6**, 769-776.
- Krämer, O. (2007) Einführung eines N-terminalen His₆-Tags am humanen SERPINE3 und eukaryotische Expression in COS-7 Zellen. *Bachelorarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld*.
- Krüger, O., Ladewig, J., Koster, K. & Ragg, H. (2002) Widespread occurrence of serpin genes with multiple reactive centre-containing exon cassettes in insects and nematodes. *Gene*, **293**, 97-105.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamango, N.S., Zhu, X. & Lindberg, I. (1996) Purification and enzymatic characterization of recombinant prohormone convertase 2: stabilization of activity by 21 kDa 7B2. *Arch Biochem Biophys*, **330**, 238-250.

- Lambert, C., Couto, L.B., Weiss, W.A., Schultz, R.A., Thompson, L.H. & Friedberg, E.C. (1988) A yeast DNA repair gene partially complements defective excision repair in mammalian cells. *Embo J*, **7**, 3245-3253.
- Langone, J.J. (1982) Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J Immunol Methods*, **55**, 277-296.
- Law, R.H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., Rosado, C.J., Langendorf, C.G, Pike, R.N., Bird, P.I. & Whisstock, J.C. (2006) An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*, **7**, 216.
- Leblond, J., Laprise, M.H., Gaudreau, S., Grondin, F., Kisiel, W. & Dubois, C.M. (2006) The serpin proteinase inhibitor 8: an endogenous furin inhibitor released from human platelets. *Thromb Haemost*, **95**, 243-252.
- Levin, E.G. & Santell, L. (1987) Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells. *Blood*, **70**, 1090-1098.
- Lindl, T. (2002) *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 5.
- Lissitzky, J.C., Luis, J., Munzer, J.S., Benjannet, S., Parat, F., Chretien, M., Marvaldi, J. & Seidah, N.G. (2000) Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J*, **346** 133-138.
- Long, G.L., Chandra, T., Woo, S.L., Davie, E.W. & Kurachi, K. (1984) Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*, **23**, 4828-4837.
- Luke, C.J., Pak, S.C., Askew, Y.S., Naviglia, T.L., Askew, D.J., Nobar, S.M., Vetica, A.C., Long, O.S., Watkins, S.C., Stolz, D.B., Barstead, R.J., Moulder, G.L., Bromme, D. & Silverman, G.A. (2007) An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell*, **130**, 1108-1119.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. & Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, **108**, 1-6.
- Martens, G.J., Braks, J.A., Eib, D.W., Zhou, Y. & Lindberg, I. (1994) The neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone convertase PC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5784-5787.
- Mayer, G., Hamelin, J., Asselin, M.C., Pasquato, A., Marcinkiewicz, E., Tang, M., Tabibzadeh, S. & Seidah, N.G. (2007) The regulated cell-surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J Biol Chem*.
- Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., Gagnon, C. & Simpson, E.M. (1997) Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6842-6846.
- Melcher, K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Anal Biochem*, **277**, 109-120.
- Mischo, A. (2007) Production and characterization of proprotein convertase-inhibiting serpin variants. *Diplomarbeit, AG Zelluläre Genetik, Universität Bielefeld*.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F. & Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol*, **9**, 28-35.

- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. & Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *Embo J*, **13**, 18-33.
- Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R.M., Danley, D.E., Geoghegan, K.F., Gerard, R.D. & Goldsmith, E.J. (1992) Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*, **355**, 270-273.
- Muller, L. & Lindberg, I. (1999) The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **63**, 69-108.
- Muller, L., Zhu, X. & Lindberg, I. (1997) Mechanism of the facilitation of PC2 maturation by 7B2: involvement in ProPC2 transport and activation but not folding. *J Cell Biol*, **139**, 625-638.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899-907.
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M. & Seidah, N.G. (1997) *In vitro* characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem*, **272**, 19672-19681.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*, **327 (Pt 3)**, 625-635.
- New England Biolabs (2006) Quick Ligation™ Kit.
- Nour, N., Basak, A., Chretien, M. & Seidah, N.G. (2003) Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A. *J Biol Chem*, **278**, 2886-2895.
- Nour, N., Mayer, G., Mort, J.S., Salvat, A., Mbikay, M., Morrison, C.J., Overall, C.M. & Seidah, N.G. (2005) The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biol Cell*, **16**, 5215-5226.
- Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F. & Patsch, W. (2004) Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha. *Biochem J*, **381**, 357-363.
- Oley, M. (2006) Identifizierung von Zielproteasen für das multifunktionelle Serpin-Gen Spn4. *Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld*.
- Oley, M., Letzel, M.C. & Ragg, H. (2004) Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **577**, 165-169.
- Oliva, A.A., Jr., Chan, S.J. & Steiner, D.F. (2000) Evolution of the prohormone convertases: identification of a homologue of PC6 in the protochordate amphioxus. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 338-348.
- Oliva, A.A., Jr., Steiner, D.F. & Chan, S.J. (1995) Proprotein convertases in amphioxus: predicted structure and expression of proteases SPC2 and SPC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3591-3595.
- Ornstein, L. (1964) Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann NY Acad Sci*, **121**, 321-349.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A. & van den Berg, B. (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 529-550.
- Osterwalder, T., Kuhnen, A., Leiserson, W.M., Kim, Y.S. & Keshishian, H. (2004) *Drosophila* serpin 4 functions as a neuroserpin-like inhibitor of subtilisin-like proprotein convertases. *J Neurosci*, **24**, 5482-5491.

- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H. & Carrell, R.W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med*, **309**, 694-698.
- Pelham, H.R. (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct*, **21**, 413-419.
- Pemberton, P.A., Stein, P.E., Pepys, M.B., Potter, J.M. & Carrell, R.W. (1988) Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature*, **336**, 257-258.
- Promega (2007) pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems.
- Qiagen (2002) QIAquick Spin Handbook.
- Qiagen (2004) Purification of Total DNA from Animal Tissues.
- Qiagen (2005) HiSpeed® Plasmid Purification Handbook.
- Rabah, N., Gauthier, D.J., Gauthier, D. & Lazure, C. (2004) Improved PC1/3 production through recombinant expression in insect cells and larvae. *Protein Expr Purif*, **37**, 377-384.
- Ragg, H. (2007) The role of serpins in the surveillance of the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2763-2770.
- Ragg, H., Lokot, T., Kamp, P.B., Atchley, W.R. & Dress, A. (2001) Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Mol Biol Evol*, **18**, 577-584.
- Rawlings, N. & Barrett, A.J. (2004) The clans and families of cysteine peptidases. *Handbook of proteolytic enzymes (Abschnitt: The clans and families of cysteine peptidases)* Elsevier Academic Press, London, pp. 1051-1069.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R. & Barrett, A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, **34**, D270-272.
- Richer, M.J., Keays, C.A., Waterhouse, J., Minhas, J., Hashimoto, C. & Jean, F. (2004) The Spn4 gene of *Drosophila* encodes a potent furin-directed secretory pathway serpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10560-10565.
- Roche (2007) Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in a glass vial.
- Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T. & Fuller, R.S. (2002) Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev*, **102**, 4525-4548.
- Rodriguez-Boulan, E. & Musch, A. (2005) Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 455-464.
- Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J. & Constam, D.B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development*, **125**, 4863-4876.
- Rothman, J.E. & Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**, 227-234.
- Rouille, Y., Martin, S. & Steiner, D.F. (1995) Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem*, **270**, 26488-26496.
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W.T. & Yamada, K.M. (1987) pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol*, **105**, 517-527.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

- Salvas, A., Benjannet, S., Reudelhuber, T.L., Chretien, M. & Seidah, N.G. (2005) Evidence for proprotein convertase activity in the endoplasmic reticulum/early Golgi. *FEBS Lett*, **579**, 5621-5625.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Scamuffa, N., Calvo, F., Chretien, M., Seidah, N.G. & Khatib, A.M. (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *Faseb J*, **20**, 1954-1963.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-162.
- Schechter, N.M. & Plotnick, M.I. (2004) Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods*, **32**, 159-168.
- Schick, C., Kamachi, Y., Bartuski, A.J., Cataltepe, S., Schechter, N.M., Pemberton, P.A. & Silverman, G.A. (1997) Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem*, **272**, 1849-1855.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3381-3385.
- Seidah, N.G. & Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, **848**, 45-62.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W. & Chretien, M. (1992) Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol*, **6**, 1559-1570.
- Seidah, N.G., Khatib, A.M. & Prat, A. (2006) The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol Chem*, **387**, 871-877.
- Siezen, R.J. & Leunissen, J.A. (1997) Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci*, **6**, 501-523.
- Sigma (2001) *ProteoMass Protein MALDI-MS Calibration Kit*.
- Sigma (2006) Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J. & Whisstock, J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*, **276**, 33293-33296.
- Smeeckens, S.P., Montag, A.G., Thomas, G., Albiges-Rizo, C., Carroll, R., Benig, M., Phillips, L.A., Martin, S., Ohagi, S., Gardner, P. & et al. (1992) Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8822-8826.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Stratagene (2004) QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.
- Stratikos, E. & Gettins, P.G. (1999) Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4808-4813.

- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. & Cox, N. (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, **279**, 393-396.
- Subramanian, A.R., Weyer-Menkhoff, J., Kaufmann, M. & Morgenstern, B. (2005) DIALIGN-T: an improved algorithm for segment-based multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, **6**, 66.
- Sucic, J.F., Moehring, J.M., Inocencio, N.M., Luchini, J.W. & Moehring, T.J. (1999) Endoprotease PACE4 is Ca²⁺-dependent and temperature-sensitive and can partly rescue the phenotype of a furin-deficient cell strain. *Biochem J*, **339** 639-647.
- Tasab, M., Batten, M.R. & Bulleid, N.J. (2000) Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *Embo J*, **19**, 2204-2211.
- Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. & Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *Faseb J*, **17**, 1215-1227.
- Tennant, J.R. (1964) Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation*, **2**, 685-694.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-766.
- Tödttmann, U. (2004) Klonierung, rekombinante Expression und Charakterisierung von Serpin1 aus *Branchiostoma lanceolatum*. *Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld*.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trombetta, E.S. & Parodi, A.J. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 649-676.
- Tsuji, A., Ikoma, T., Hashimoto, E. & Matsuda, Y. (2002) Development of selectivity of alpha1-antitrypsin variant by mutagenesis in its reactive site loop against proprotein convertase. A crucial role of the P4 arginine in PACE4 inhibition. *Protein Eng*, **15**, 123-130.
- Tsuji, A., Sakurai, K., Kiyokage, E., Yamazaki, T., Koide, S., Toida, K., Ishimura, K. & Matsuda, Y. (2003) Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*, **1645**, 95-104.
- Ulloa, L., Creemers, J.W., Roy, S., Liu, S., Mason, J. & Tabibzadeh, S. (2001) Lefty proteins exhibit unique processing and activate the MAPK pathway. *J Biol Chem*, **276**, 21387-21396.
- Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H.D. & Garten, W. (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol*, **127**, 1829-1842.
- Whisstock, J.C., Skinner, R., Carrell, R.W. & Lesk, A.M. (2000) Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of alpha(1)-antitrypsin. *J Mol Biol*, **295**, 651-665.
- Xiao, G., Chung, T.F., Pyun, H.Y., Fine, R.E. & Johnson, R.J. (1999) KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, **72**, 121-128.

- Yates, J.L., Warren, N. & Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, **313**, 812-815.
- Zaluzec, E.J., Gage, D.A. & Watson, J.T. (1995) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expr Purif*, **6**, 109-123.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. & Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem*, **273**, 11107-11114.
- Zhou, Y. & Lindberg, I. (1994) Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion. *J Biol Chem*, **269**, 18408-18413.
- Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J. & Steiner, D.F. (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10293-10298.

8 Anhang

8.1 Vektorkarten

In Abbildung 46 bzw. Abbildung 47 sind die Karten der Vektoren pKM-263, pCEP4, pcDNA3.1+ und pSecTag2B dargestellt. Die Vektoren wurden zur Herstellung von Expressionskonstrukten für die Serpine *Bl-Spn1* und SERPINE3 verwendet (Abschnitt 4.3.11).

Der bakterielle Expressionsvektor pKM-263 (Euroscarf, Frankfurt) kodiert für GST aus *Schistosoma japonicum* mit einem N-terminalen His₆-Tag. Zwischen der *multiple cloning site* (MCS) und der His₆-GST-Sequenz befindet sich die Spaltsequenz der TEV-Protease. Die Expression von His₆-GST-Fusionsproteinen steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Melcher, 2000).

pCEP4 (Invitrogen) ist ein sich episomal replizierender Säuger-Expressionsvektor mit einem starken Cytomegalovirus-Promotor (CMV). Der EBV Replikationsursprung (ori P) und das EBNA-1-Gen (kodiert für das nukleäre Antigen) erlauben die extrachromosomale Replikation des Plasmids. pCEP4 trägt eine Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion transfizierter Säugerzellen. Zur Replikation in *E. coli* besitzt pCEP4 den pUC Replikationsursprung (pUC ori).

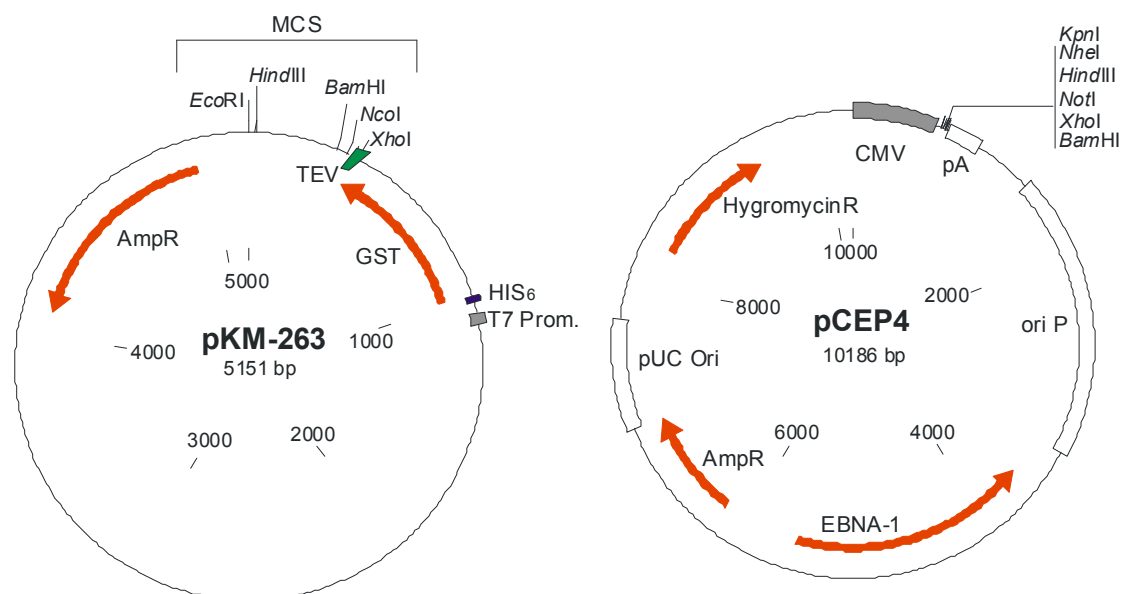


Abbildung 46: Die Vektoren pKM-263 und pCEP4

Die Vektoren pcDNA3.1+ und pSecTag2B (Invitrogen) eignen sich zur transienten und stabilen Expression von Fremdgenen in Säugerzelllinien. Beide Vektoren besitzen den Replikationsursprung von SV40 (SV40 ori) und werden in Zelllinien, die das große T-Antigen des SV40 Virus exprimieren (z. B. COS-7), episomal repliziert. Die Expression von Fremdgenen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Zur Herstellung von stabilen Zelllinien besitzt pSecTag2B ein Zeocin-Resistenzgen (ZeocinR), pcDNA3.1+ ein Neomycin-Resistenzgen (NeomycinR). Beide Vektoren lassen sich in *E. coli* vervielfältigen, da sie über einen pUC ori verfügen. Der Vektor pSecTag2B ist ein Derivat von pcDNA3.1+. Er enthält stromaufwärts der MCS die IgG κ -Signalsequenz der Maus, die eine effiziente Sekretion des exprimierten Fremdgens bewirken soll. Stromabwärts von der MCS befindet sich eine *c-myc*-Sequenz, auf die direkt eine His₆-Sequenz folgt. Der Vektor ermöglicht daher die Expression von Proteinen, die C-terminal einen *c-myc*- und His₆-Tag enthalten.

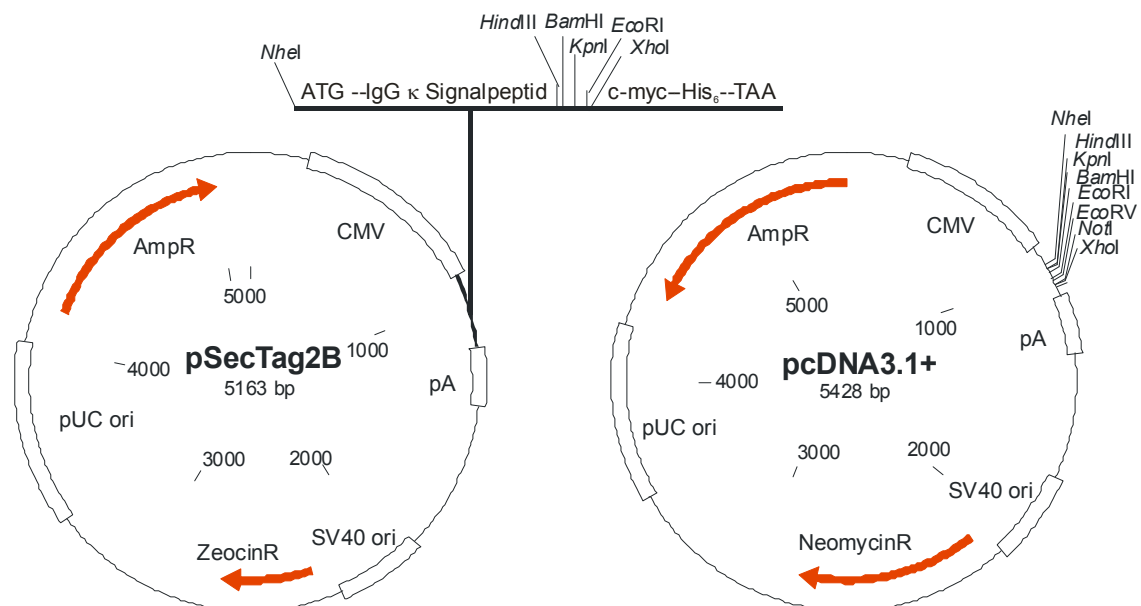


Abbildung 47: Die Vektoren pSecTag2B und pcDNA3.1+

8.2 Primer

In den folgenden Tabellen sind die in der Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. Die Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech und Invitrogen bezogen. Die Orientierung der Primer ist durch „+“ (*forward*) bzw. „-“ (*reverse*) angezeigt.

Tabelle 33: Primer zur Analyse der *Bl-Spn1* Genstruktur

Nr.	Name	+/-	Sequenz (5' → 3')	Bindeposition (AJ548509)
1	BLSp1_6+	+	CATTGCAGACAAAGCACCGC	49-68 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
2	BLS1c-nes2	-	CCTCAAACCTTGCGTTCAGCT	709-730 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
3	BLSp1_8-	-	TGCGCCCTCTGTGTTTCC	568-585 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
4	BLSp1_9-	-	ATGGCCAGACAGGTGGAGA	299-317 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
5	BLSp1_2+	+	TATCTCCACCTGTCTGGCCAT	297-317 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
6	BL2_f5+	+	CCCGTGGACTTCAGTGGA	553-570 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
7	BLSp1_4-	-	CCTTGATACGGACTGGAGTTC	1462-1482 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
8	BLS1c+nes2+	+	AGCTGGGAACGCAAGTTGAGG	709-730 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA);
9	BLSpW_1+	+	GTGACCTTCACGTCAGC	3329-3345 (<i>Bl-Spn1</i> Gen)
10	BLSp3#UTR_2-	-	GCAACAAAGGTGATTCTCATAATGC	1827-1851(<i>Bl-Spn1</i> cDNA)
11	BLSp3#UTR_3-	-	GGCAGAAGGGCTGACTGTTG	2061-2080 (<i>Bl-Spn1</i> cDNA)

Zur Amplifikation überlappender Teilfragmente des *Bl-Spn1*-Gens wurden folgende Primerpaare verwendet: 1/2, 1/3, 1/4, 5/3, 6/7, 8/7, 9/10, 9/11. Die Bindepositionen der Primer beziehen sich auf die in Klammern angegebene Genbank[™]-Zugangsnummer.

Tabelle 34: Primer zur Herstellung von Expressionskonstrukten

Nr.	Name	+/-	Sequenz (5' → 3')	Zur Herstellung von
12	BLSp1oKDEL-	-	CGGGAATTCTTATGTAGTTAATCCTTCTGGTC	pCB3.1Spn1Mut
13	E3_5'UTR	+	CCTGCATCTCTCCCTCTGAA	pTOPO_E3
14	E3_3'UTR	-	GCATTGATGAAAGTGGAGAACATGC	pTOPO_E3
15	E3_F1+	+	TCCATGCCGCTTTCCTGA	pTOPO_E3
16	E3_F2-	-	TTAGTCTAGGGGATTTGAAACTCTCC	pTOPO_E3
17	pKM ^{Xho} E3+neu	+	CATCTCGAGAATCTTTATTTTCAGGCAAATGGCCA CCTCCGTGAA	pKM_INA_E3
18	pKM ^{Nco} E3- neuCT	-	GGGGCCATGGTTAGTCTAGGGGATTTGAAACTCT CC	pKM_INA_E3
19	LuckyLoop+	+	GGCGACGGCGCTGCTTTGTTGAAACGATCACGG GATGGGGAGACG	pLuckyLoop
20	LuckyLoop-	-	CGTCTCCCCATCCCGTGATCGTTTCAA CAAGAGCAGCGCCGTCGCC	pLuckyLoop

Fortsetzung der Tabelle 34

Nr.	Name	+/-	Sequenz (5' → 3')	Zur Herstellung von
21	pSecE3+	+	AAAG <u>GT</u> ACCCACCTCCGTGAAGGAATGAC	pTerminator3A
22	Sec_E3_Frame-	-	CCTC <u>CT</u> CGAGCGTCTAGGGGAT	pTerminator3A
23	E3_Kozak+	+	GGTGAATT <u>CGCGCC</u> ACCATGGCGCCTTTCCTG	pKKS-E3
24	E3_Kozak-	-	CAGGAAAGGCGCCATGGTGGCGGAATTCCACC	pKKS-E3
25	E3_P1Mut+	+	CTGTTGTTATTGAAA <u>GC</u> GTCTCGGATTCC	pT3C-P1A
26	E3_P1Mut-	-	GGAATCCGAGAC <u>GC</u> TTTCAATAACAACAG	pT3C-P1A
27	E3_P2Mut+	+	CTCTGTTGTTATTG <u>GC</u> AAGGTCTCGGATTC	pT3C-P2A
28	E3_P2Mut-	-	GAATCCGAGACCTT <u>GC</u> CAATAACAACAGAG	pT3C-P2A

Zur Herstellung der aufgeführten Expressionskonstrukte (Spalte 5) wurden die Primer, wie in Abschnitt 4.3.11 angegeben, miteinander kombiniert. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; die mit Hilfe von Mutageneseprimern eingeführten Nukleotidveränderungen sind rot hervorgehoben.

Tabelle 35: Primer zur Analyse der SERPINE3 mRNA Expression

Nr.	Name	+/-	Sequenz (5' → 3')	Bindeposition
29	E3_782+	+	TGCTGCCCCGTGACAAAGAC	785-804 (AM402969) (Abschnitt 8.3.3)
30	E3_1078-	-	CAGATGCCTTGGTGCCTTCC	1062-1081 (AM402969) (Abschnitt 8.3.3)
31	Rib+	+	GGCACCATTGAAATCCTGAGTGAT	625-648 (NM_0010012)
32	Rib-	-	TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC	818-839 (NM_0010012)

Die Bindepositionen der Primer beziehen sich auf die in Klammern angegebenen Genbank[™]-Zugangsnummern.

Tabelle 36: Primer für Sequenzierreaktionen

	Name	+/-	Sequenz (5' → 3')	Kommentar
A	IRD800-M13for	+	GTAAAACGACGGCCAGT	Flankieren die MCS von pGEM-T und pCR [®] 4_Topo [®]
B	IRD800-M13rev	-	AACAGCTATGACCATG	
C	pKMSeq+	+	ACCCAATGTGCCTGGATG	Flankieren die MCS von pKM-263
D	T7 Term	-	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	
E	pcDNA+		TCTGGCTAACTAGAGAACC	Flankieren die MCS von pcDNA3.1+ und pSecTag2B
F	pcDNA-		GCTGGCAACTAGAAGGCA	
G	M13for		GTAAAACGACGGCCAG	Flankieren die MCS von pCR [®] 4_Topo [®]
H	M13rev		CAGGAAACAGCTATGAC	

Die Primer A und B sind mit der Farbstoffmarkierung IRD-800 (*Infrared dye* 800 nm) versehen und wurden für die Sequenzierung mit dem LiCor-System eingesetzt. Alle weiteren Primer sind nicht markiert und wurden für Sequenzierungen außer Haus verwendet. Die hier aufgelisteten Primer flankieren die MCS von Vektoren. Zur Sequenzierung von SERPINE3-cDNA-Sequenzen wurden zusätzlich Primer verwendet, die direkt an die cDNA des Serpins binden (Primer 15, 16, 29, 30).

8.3 Sequenzen und *Alignments*

8.3.1 cDNA-Sequenz von *Bl-Spn1*

Dargestellt ist die vollständige cDNA-Sequenz von *Bl-Spn1* (GenbankTM-Zugangsnummer: AJ548509) und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

```

1 ATATAGCTAGCTTTTCCACACTGTGTTCTTATGACATGTTAAACTAAACATTGCAGACAA
61 AGCACCGCTTGTACAGCTAAAGAGGGAACCGATTCCCAGTTTGTGCCTCAGGGACAGTGA

1      M P G H S Y S L F G L L V A M A T L G
121 ACCATGCCAGGACACAGTTACAGCCTCTTTGGCCTCCTGGTTGCCATGGCAACTCTGGGA

20     S S A S Q E S T P L A D I N S E F A L E
181 AGCTCCGCATCACAAGAGTCCACCCATTGGCTGACATCAACAGCGAGTTTGCCCTGGAG

40     L Y K T L H K D H P E N I F F S P F S I
241 CTGTACAAGACGCTACACAAGGATCATCCCGAGAACATCTTCTTCTCACCCCTTCAGTATC

60     S T C L A M A Y L G A R N D T A Q Q M S
301 TCCACCTGTCTGGCCATGGCTTACCTGGGGGCAAGGAACGATACAGCACAACAGATGAGT

80     R V L R F H K M D A S D L H V L F H D L
361 CGAGTGCTTCGCTTTCACAAGATGGATGCCTCCGACCTTCACGTGTTGTTCCACGACCTT

100    L T Q L H H S D R P Y T L K T A N R L F
421 CTGACCCAGCTGCACCACTCAGACAGGCCCTACACACTCAAGACCGCAAACCGGCTCTTC

120    G Q N S F E F S Q K F L D E T S R H Y R
481 GGTCAAGAACTCATTTCGAGTTTTTCGCAAAAGTTTCTGGATGAAACGTCCAGACATTACAG

140    A Q L A P V D F S G N T E G A R Q T I N
541 GCGCAGTTGGCTCCCGTGGACTTCAGTGGAAACACAGAGGGCGCACGGCAAACCTATCAAC

160    S W V E E Q T E N K I Q D L L A P G T V
601 AGCTGGGTAGAGGAACAAACAGAGAACAAAATCCAAGATCTTTTAGCACCAGGAACCGTG

180    T P A T M L V L V N A I Y F K G S W E R
661 ACCCCTGCTACCATGTTAGTACTGGTCAACGCCATCTACTTCAAAGGCAGCTGGGAACGC

200    K F E E S R T R L G T F H I S R D E K V
721 AAGTTTGAGGAGTCGCGTACGAGGCTCGGTACCTTCCACATCAGCCGCGACGAGAAGGTC

220    E V P M M H Q Q G R F K L A Y D E D L N
781 GAGGTACCCATGATGCATCAGCAAGGCCGTTCAAACCTCGCCTACGACGAGGACCTCAAC

```


240 C Q I L E M P Y Q G K H L S M L L V L P
 841 TGCCAAATCCTAGAGATGCCTTACCAAGGCAAACATCTTAGCATGCTGTTGGTGTGCGC

260 E K M D A L S T I E T S L T P D I L R R
 901 GAAAAGATGGACGCTCTGAGCACCATCGAGACGTCCTTGACGCCAGACATACTCCGTCGC

280 W Q K S M D E V S T M V Q I P K F K L V
 961 TGGCAGAAGTCTATGGACGAGGTTTCCACCATGGTCCAAATCCCCAAGTTCAAGCTCGTC

300 H D F V L N E K L A D M G M T D L F S M
 1021 CACGATTTTCGTCTGAATGAAAAGCTGGCGGATATGGGGATGACGGACCTGTTTCAGCATG

320 A D A D L S G I T G S R D L H V S Q V I
 1081 GCGGACGCCGACCTGTCCGGGATCACGGGTTTCGCGTGACCTTCACGTACAGTCAGGTCATC

340 H K A F V E V N E E G S E A A A A T A V
 1141 CATAAGGCGTTTGTGGAGGTCAACGAGGAGGGTAGCGAGGCCGCGGCGGACGGCGGTG

360 N M M K R S L D G E T F F A D H P F L F
 1201 AACATGATGAAACGATCACTGGATGGGAGACGTTCTTTGCCGACCACCCTTCCTGTTC

380 L I R D N D S N S I L F L G R L V R P E
 1261 CTGATCAGAGACAATGACTCAAACCTATCCTGTTTCTTGGTCGACTGGTGCGACCAGAA

400 G L T T K D E L
 1321 GGATTAAC TACAAAGGATGAACTGTAAAGCAAAAAAACCATTTCATGTTTTTCATTTTTCA

1381 TTAGATTATCTTTATTAGTCTGAATTAGAGTTAAACTGCAATTTCCAACACAAGAATTTG
 1441 ATCTTACACAAATTTTCAACTGAACTCCAGTCCGTATCAAGGAATGTAATTAATCCTTAT
 1501 CATTACTTGATAAGGACTGAAGCTGATGGTCAAAAATTTGCAGTAACTGTTTAACTTTG
 1561 ATTAAGAATGACTTCTACCAACACAGATGAACTTTCAAGTGAATTTCTTTATTAGTTGAT
 1621 AAAGGTTAGACATCTAGGTAATAAGATATGTCAAATAGCAGGTACAGTGTGCTGACGAA
 1681 AGGTAGTGGATGCTACTTGAAACATCTGACGTTTCCAAAATCATATCCAGTTTCTGCTAT
 1741 TTGGCAAATATCTTTATTGTTTAAAAGTTTGAAGCTTCAGAGATACACGAGTATCAATCA
 1801 TCATAATTATGATCATATGATAAATGCATTATGAGAATCACCTTTGTTGCATTTCTTTA
 1861 TGTGTGCAAACATAAGATAAATTGGCTAATTGACATACTGGAAAGACTAGAAAATTGATG
 1921 AAAAAAATCATGGTGAGGAATATTGTATAACCACGTGTTAACTGTAGTATTATTAGACAA
 1981 GTATCATAGTATATTAATCTATATATTATCATAGTATATGTGATATCATAGTATCATTTTCAG
 2041 TACTAGTACCCAAGTAAAGACAACAGTCAGCCCTTCTGCCATAACATTTATTTCTTTTGA
 2101 AATCATATGTTACTCATTAGATTGAAACAGCCTTTGTATGATGTGACTTAAGTTCTGCTT
 2161 TATGTCAATAGGTTTCTTAACCACAAATACAACATGTAAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 2221 AAAAAAAAAA

8.3.2 *Alignment* der cDNA und der genomischen DNA von *Bl-Spn1*

Zur Bestimmung der Organisation des *Bl-Spn1*-Gens wurde die genomische Sequenz von *Bl-Spn1* mit der cDNA-Sequenz des Serpins aligniert (Abschnitt 5.1.5). Die Introngrenzen sind im *Alignment* invertiert dargestellt. Die angegebene Aminosäuresequenz wurde aus der *Bl-Spn1*-cDNA abgeleitet.

```

Bl-Spn1-cDNA : CATTGCAGACAAAGCACCGCTTGTACAGCTAAAGAGGGAACCGATTCCCAG--- : 51
Bl-Spn1-Gen  : CATTGCAGACAAAGCACCGCTTGTAGAGCTAAAGAGGGAAGTATTCCAGGTA : 54
              *****
Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : TGTATTACATAATAGAAGCTGGGGAGGGGGCTATCAGCATAATGAAGTTTCTC : 108

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : TCTTTGCTTTCACATCAATTTACATGTATATACTGTGACAGACACAAATGGGGG : 162

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : AGGATTATGGCTTGTGTGCATTGGAAAGGTTGCCTATAAGCGGTATAATGTACT : 216

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : GTACACATGTTGTGGCTTATGTGAGGCCCTGAGACATGAACAAATACTTTAAA : 270

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : ATCCTAAGGATATATGGTGTCAAGCCAAGTGAAGTGAACAAGTTAGGGGCCT : 324

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : TCACATTTGACCTTGTGCATGCACAACCTCAAACCACAAACCATGTTTGTGATTA : 378

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : GATTAGCCACCCAGGAAATGAATATTTATCTATACAACCTGTATTACAATATGAG : 432

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : ATATATGAGACGTTTCAGATGTCCATCCGACATCTTTCATCAGCAAACAGAAGG : 486

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : AAGGAAGGACATCTAAAATGCCTGGTATTTCTCAAATGCCTTGAATCCATGAA : 540

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : CTCAACAGGGTACTAGTAAATACTGTAAAATTATGCATTTAAGTTTGCATGGTT : 594

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : TTTGTTTCACACTAAGGGGAAAATGGACTGTTCCCTGTGGTTTAAAGTTCGCGG : 648

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen  : CAGTGCATAGTCACATACTGCTACAGTATTGAACAAATATGTTTCGCGGTGGTT : 702

```

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTCTGTTCGCAGTGAAACGGTCGCCGGAACATAAAACCACCGTGAACATTTCT : 756

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GCATTTACAGTATATTATTCAAACGACAACCTTCAATCAAGCAATGTCTGGAA : 810

Bl-Spn1-cDNA : -----TTTGTGCCT : 60
Bl-Spn1-Gen : CATTGATTTTTCGCCTGTTAAATTTTCACATGTCTCCTTAA**CAG**TTTGTACCT : 864

M P G H S Y S L F G L L V

Bl-Spn1-cDNA : CAGGGACAGTGAACCATGCCAGGACACAGTTACAGCCTCTTTGGCCTCCTGGTT : 114
Bl-Spn1-Gen : TAGGAACAGTGAACAATGCCAGGACACAGCTACTGCCTCTTTGGCCTCCTGGTT : 918
 *** *****

A M A T L G S S A S Q E S T P L A D

Bl-Spn1-cDNA : GCCATGGCAACTCTGGGAAGCTCCGCATCACAAGAGTCCACCCATTGGCTGAC : 168
Bl-Spn1-Gen : GCCATGGCAACTCTGGGAAGCTCCGCATCACAAGAGTCCACCCATTGGCTGAC : 972

I N S E F A L E L Y K T L H K D H P

Bl-Spn1-cDNA : ATCAACAGCGAGTTTGCCCTGGAGCTGTACAAGAGCGCTACACAAGGATCATCCC : 222
Bl-Spn1-Gen : ATCAACAGCGAGTTTGCCCTGGAGCTGTACAAGCGCTCCACAAGGATCATCCC : 1026

E N I F F S P F S I S T C L A M A Y

Bl-Spn1-cDNA : GAGAACATCTTCTTCTCACCCCTCAGTATCTCCACCTGTCTGGCCATGGCTTAC : 276
Bl-Spn1-Gen : GAGAACATCTTCTTCTCACCCCTCAGTATCTCCACCTGTCTGGCCATGACTTAC : 1080

L G A R N D T A Q Q

Bl-Spn1-cDNA : CTGGGGCAAGGAACGATACAGCACAAACAG----- : 306
Bl-Spn1-Gen : CTGGGGCAAGGAATGATACAGCACAAACAG**CTI**GAGTTACTCTAGTAAAAGACTC : 1134

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTCTTTATCTTCTGGGTTTTTAGGATCATCATTTTCAGGGTACTTGATTAAAAAA : 1188

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TAGGATCATCATTTTCAGGGTACTTGATTAAAAAATAGGATCATCATTTTCAGGGT : 1242

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ACTTGATTAAAAAATAGGATCATCATTTTCAGGGTACTTGATTAAAAAATAGGAT : 1296

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : CATCATTTTCAGGGTACTTGATTAAAGAAATAGGATCATCATTTTCAGGGTACTTGA : 1350

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTAATAAATAGGATCATCATTTTCAGGGTACTTGATTAAAAAATAACTGAATACC : 1404

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TGGTCACAAGTGGTTGTTAATGATGGGGGGTATTGCAATTGGATGCTGTTTTTT : 1458

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : AGAATCTGCTGGAAAAAATTACTGGGGTACATCTGGATCTGTACAGCATCTGTA : 1512

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ATGGTGAATGACTTAGCAATAGTAGTATACTGTACATGATGCCATTCCTGTTA : 1566

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : CCTCCACGAAAAATGGAGGTATAGTTTGGGCCTGTCTGTGTGTGTGTTGTGG : 1620

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GTTTGCGTGTGTTGCTTCTTTGTGTTTCTGGATGTGATACTACTATCATAGCTA : 1674

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GTATTTGGTATGTTGGTAGGTCTTGAAGGACAAAGGTCAAGGTCAAGTTTGGG : 1728

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ACCCTTTATTGTGTGRCCCTGTTCTACAAGCTTGTCCAAGTACTATAAGAA : 1782

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GAAGGTCAGCTTCCATTGCGAAACATTCCACCTGTTATGAGGGGGGGGTCTGA : 1836

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TATGATATTGATACCAACTTGCTGGGGATGTAGGGGTGATGTCTGAAGACCTAG : 1890

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ACCATCTTATGGCGGACCATGACCCCTGGAGGGAGAGAGCAACCTTAGCCCGGG : 1944

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : CAAGCCGCCGATTTGATGATGATGATGATATGATATATTGGCTTTTCGATACT : 1998

Bl-Spn1-cDNA : ----- M S R V L R F H K
 -----ATGAGTCGAGTGCTTCGCTTTCACAAG : 333
Bl-Spn1-Gen : GTAACCTCAGTGTGTAAGTTTTCACATGAGTCGAGTGCTTCGCTTTCACAAG : 2052

M D A S D L H V L F H D L L T Q L H
Bl-Spn1-cDNA : ATGGATGCCTCCGACCTTCACGTGTTGTTCCACGACCTTCTGACCCAGCTGCAC : 387
Bl-Spn1-Gen : ATGGATGCCTCCGACCTTCACGCGTTGTTCCACGACCTTCTGACCCAGCTGCAC : 2106

H S D R P Y T L K T A N R L F G Q N
Bl-Spn1-cDNA : CACTCAGACAGGCCCTACACACTCAAGACCGCAAACCGGCTCTTCGGTCAGAAC : 441
Bl-Spn1-Gen : CACTCAGACAGGCCCTACACACTCAAGACCGCAATCGGCTCTTCGGTCAGAAC : 2160
 ***** ** *****

S F E F S Q K F L D E T S R H Y R A
Bl-Spn1-cDNA : TCATTCGAGTTTTCGCAAAGTTTCTGGATGAAACGTCCAGACATTACAGGGCG : 495
Bl-Spn1-Gen : TCATTCGAGTTTTCGCAAAGTTTCTGGATGAAACGTCCAGACATTACAGGGCG : 2214

Q L A P V D F S G N T E G A R Q T I
Bl-Spn1-cDNA : CAGTTGGCTCCCGTGGACTTCAGTGGAAACACAGAGGGCGCACGGCAAACCTATC : 549
Bl-Spn1-Gen : CAGTTGGCTCCCGTGGACTTCAGTGGAAACACAGAGGGCGCACGGCAAACCTATC : 2268

N S W V E E Q T E N K I Q D L L A P
Bl-Spn1-cDNA : AACAGCTGGGTAGAGGAACAAACAGAGAACAAAATCCAAGATCTTTTAGCACCA : 603
Bl-Spn1-Gen : AACAGCTGGGTAGAGGAACAAACAGAGAACAAAATCCAAGATCTTTTAGCACCA : 2322

Bl-Spn1-cDNA : G----- : 604
Bl-Spn1-Gen : GCTATAAGGAGACAGTTCATTTCATTTCATTGTTCTTTATTCTTTGTTTCATTTG : 2376
 *

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTTTATGGTTCATTCGTTTCATTCATTCATTCATAGTTAGACCATGTTGATTTGA : 2430

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTATATGAATGACATACCCCTCTCGCGCATTAATTTTTGTCCGTTAAAAAAAAA : 2484

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : AATTGTTTTCAACCATACTGTAAATCGTACATAGTAAATTTTCATCAGAAATATC : 2538

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GGAAAAACGGATACTAATTTTGTAGAATGCCAATAAGTCAATTCCAAAGTCAAA : 2592

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : GAAGAAGATGTGAAAGAACAAAAATGAAGAAATGTGTTTTGTTATTTCGTTTAAAC : 2646

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : CTTCATGACCACCTTTGATTTTTTCATAATGAAGGCAACTTTTTTGTTCCTCTTT : 2700

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : TTCATTCGCACGCTCGCATCAGTTTTTAGATGCCCAGAAGATGCATCCATACA : 2754

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ATCAAATCAACATTGCCTTTAGATAGCATGGCATTTTTTTCCAATGGAGTTTACA : 2808

Bl-Spn1-cDNA : -----
Bl-Spn1-Gen : ATCTTTGTCAATTTTGAACTTTTCTTAGATTGACGTCTTACATTTTCATTTCTT : 2862

G T V T P A T M L V L V N A I Y F
Bl-Spn1-cDNA : ----GAACCGTGACCCCTGCTACCATGTTAGTACTGGTCAACGCCATCTACTTC : 654
Bl-Spn1-Gen : AAAGGAACCGTGACCCCTGCTACCATGTTAGTACTGGTCAACGCCATCTACTTC : 2916

K G S W E R K F E E S R T R L G T F
Bl-Spn1-cDNA : AAAGGCAGCTGGGAACGCAAGTTTGGAGAGTCGCGTACGAGGCTCGGTACCTTC : 708
Bl-Spn1-Gen : AAAGGCAGCTGGGAACGCAAGTTTGGAGAGTCGCGTACGAGGCTCGGTACCTTC : 2970

H I S R D E K V E V P M M H Q Q G R
Bl-Spn1-cDNA : CACATCAGCCGCGACGAGAAGGTCGAGGTACCCATGATGCATCAGCAAGGCCGG : 762
Bl-Spn1-Gen : CACGTCAGCCGCGACGAGAAGGTTGAGGTACCCATGATGCATCAGCAAGGCCGG : 3024
 *** *****

F K L A Y D E D L N C Q I L E M P Y
Bl-Spn1-cDNA : TTCAAACTCGCCTACGACGAGGACCTCAACTGCCAAATCCTAGAGATGCCTTAC : 816
Bl-Spn1-Gen : TTCAAACTCGCCTACGACGAGGACCTCAACTGCCAAATCCTAGAGATGCCTTAC : 3078

Q G K H L S M L L V L P E K M D A L
Bl-Spn1-cDNA : CAAGGCAAACATCTTAGCATGCTGTTGGTGTGGCCGAAAAGATGGACGCTCTG : 870
Bl-Spn1-Gen : CAAGGCAAACATCTGAGCATGCTGTTTGTGTTACCGAAAAGATGGACGCTCTG : 3132

S T I E T S L T P D I L R R W Q K S
Bl-Spn1-cDNA : AGCACCATCGAGACGTCCTTGACGCCAGACATACTCCGTCGCTGGCAGAAGTCT : 924
Bl-Spn1-Gen : AGCACCATCGAGACGTCCTTAACGCCAGACTTACTCCGTCGCTGGCAGAAGTCT : 3186

```

      M D E V S T M V Q I P K F K L V H D
Bl-Spn1-cDNA : ATGGACGAGGTTTCACCATGTGCCAAATCCCAAGTCAAGCTCGTCCACGAT : 978
Bl-Spn1-Gen  : ATGGACGAGGTTTCACCATGTGACAAATCCCAAGTCAAGCTCGTCCACGAT : 3240
*****

      F V L N E K L A D M G M T D L F S M
Bl-Spn1-cDNA : TTCGTCCTGAATGAAAAGCTGGCGGATATGGGGATGACGGACCTGTTTCAGCATG : 1032
Bl-Spn1-Gen  : TTCGTCCTGAATGAAAAGCTAGCGGACATGGGGATGACGGACCTGTTTCAGCATG : 3294
*****

      A D A D L S G I T G S R D L H V S Q
Bl-Spn1-cDNA : GCGGACGCCGACCTGTCCGGGATCACGGGTTGCGGTGACCTTCACGTCAGTCAG : 1086
Bl-Spn1-Gen  : GCGGACGCCGACCTGTCTGGGATCACGGGTTTTCGCTGACCTTCACGTCAGCCAG : 3348
*****

      V I H K A F V E V N E E G S E A A A
Bl-Spn1-cDNA : GTCATCCATAAGGCGTTCGTGGAGGTCAACGAGGAGGGTAGCGAGGCCGCGGCG : 1140
Bl-Spn1-Gen  : GTCATCCACAAAGCGTTCGTGGAGGTCAACGAGGAGGGCAGCGAGGCTGCGGCA : 3402
*****

      A T A V N M M K R S L D G E T F F A
Bl-Spn1-cDNA : GCGACGCGCGTGAACATGATGAAACGATCACTGGATGGGGAGACGTTCTTTGCC : 1194
Bl-Spn1-Gen  : GCGACGCGCGTGAACATGATGAAGCGTCCCTGGACGGGGAGACGTTCTTTGCC : 3456
*****

      D H P F L F L I R D N D S N S I L F
Bl-Spn1-cDNA : GACCACCCTTCCTGTTCCTGATCAGAGACAATGACTCAAACCTATCCTGTTC : 1248
Bl-Spn1-Gen  : GACCACCCTTCCTATTCCTGATCAGAGACAATGACTCAAACCTATCCTGTTC : 3510
*****

      L G R L V R P E G L T T K D E L
Bl-Spn1-cDNA : CTTGGTTCGACTGGTGCACAGAAAGGATTAACACAAAGGATGAACTGTAAAGC : 1302
Bl-Spn1-Gen  : CTAGGTTCGACTGGTGCACAGAAAGGACTAACAAGGATGAACTGTAGATC : 3564
** *****

Bl-Spn1-cDNA : AAAAAAACCATTCATGTTTTTCATTTTCATTAGATTATCCTTTATTAGTCTGAA : 1356
Bl-Spn1-Gen  : TAAAAAACCATTCATGTTTTTCATTTTCATGAGAATATCCTTTATTAGTCAGAA : 3618
*****

Bl-Spn1-cDNA : TTAGAGTTAAACTGCAATTTCCAACACAAGAATTTGATCTTACACAAATTTTCA : 1410
Bl-Spn1-Gen  : TTAGAGTTAAACCGCAATTTCTAAAACRAGAAATTTGATCTTATCCAAATTTTCA : 3672
*****

Bl-Spn1-cDNA : ACTGAACTCCAGTCCGATCAAGGAATGTAATTAATCCTTATCATTACTTGATA : 1464
Bl-Spn1-Gen  : ACTGAACTCCAGTCCATATCAAGGAATGTAATTAATCCTTATCATTCTTGATA : 3726
*****

Bl-Spn1-cDNA : AGGACTGAAGCTGATTGGTCA-AAAATTGTCAGTAACTGTTTAACTTTGATTAA : 1517
Bl-Spn1-Gen  : AGGACTGGAAGCTGATTGGTAAAAAAATTTGTCAGTAACTTAACTTTGATTAA : 3780
*****

Bl-Spn1-cDNA : GAATGACTTCTACCAACACAGATGAACTTTCAAGTGAATTTCTTTATT--AGTT : 1569
Bl-Spn1-Gen  : GAATGACTTCTACCAACACAGATGAACTTTCAAGTGAATTTCTTTATT--AGTT : 3834
*****

Bl-Spn1-cDNA : GATAAAGGTTAGACATCTA-----GGTAATAAGATATGTCAAATAGCAGG : 1614
Bl-Spn1-Gen  : GATGAAAGTTAGACATCTAACGTTACTAGGTAATAAGATATGCCAAATAGCAGG : 3888
*** *****

Bl-Spn1-cDNA : TACAGTGTGCTGACGAAAGGTAGTGGATGCTACTTGAAACATCTGACGTTTCC : 1668
Bl-Spn1-Gen  : TACAGTGTCACTAACGAAAGGTAGTGGATGCTACTTGAAACGCTGACGTTTCC : 3942
*****

Bl-Spn1-cDNA : AAAATCATATCCAGTTTCTGCTATTTGGCAAATATCTTTATTGTT----- : 1713
Bl-Spn1-Gen  : AAAATCATATCCAGTTTCTGCTATTTGGCAAATATCTTTATTGTTTATATAAT : 3996
*****

```

Bl-Spn1-cDNA : ----TAAAAGTTTGAAGCTTCAGAG--ATACACGAGTATCAATCATCATAATT : 1760
Bl-Spn1-Gen : AAAAGTCAGACTTTGAAGCTTCTATTGAATACGCGAGTATCAATCATCATAATT : 4050
 * * * ***** * * * * *

Bl-Spn1-cDNA : ATGATCATTATGATAAATGCATTATGAGAATCACCTTTGTTGCATTTCTTTATG : 1814
Bl-Spn1-Gen : ATGATCATTATGATAAATGCATKATGAGAATCACCTTTGTTGCATTT---TTTA : 4101
 ***** * * *

Bl-Spn1-cDNA : TGTGCAAACATAAGATAAAT---TGGCTAATGACATACTGGAAAGACTAGAA : 1864
Bl-Spn1-Gen : TGTGCAAACATATCAAAGATAAATGGCTAATGACATACTGGAAAGACTAGAA : 4155
 ***** * * *

Bl-Spn1-cDNA : AATTGATGAAAAAATCATGGTGAGGAATATTGTATAACCACGTGTTAACTGTA : 1918
Bl-Spn1-Gen : AATTGATGAA-----AAAGTGAGGAATACTGTATAACCACGTGTTAACTGTA : 4202
 ***** * * *

Bl-Spn1-cDNA : -GTATTATTAGACAAGTATCATAGTATATTACTATATATTATCATAGTATATGT : 1971
Bl-Spn1-Gen : AGTATTATT-----AGTATCATAGTATG-----TATAATCATAGTATATGT : 4243
 ***** * * *

Bl-Spn1-cDNA : GATATCATAGTATCATTTTCAGTACTAGTACCCAAGTAAAGACAACAGTCAGCCC : 2025
Bl-Spn1-Gen : GATATCATAGTATCATTTTCAGC-----ACCCAAATAAAGACAACAGTCAGTCC : 4291
 ***** * * *

Bl-Spn1-cDNA : TTCTGCC : 2032
Bl-Spn1-Gen : TTCTGCC : 4298

8.3.3 cDNA-Sequenz von SERPINE3

Dargestellt ist die in Abschnitt 5.2.2 besprochene cDNA-Sequenz von SERPINE3. Die Sequenz wurde bei EMBL unter der Zugangsnummer AM402969 abgelegt.

```

1      M P P F L I T L F L F H S C C L R A N
1  TCCATGCCGCCTTTCTGATCACCCCTTCTCTTTCACTCTTGCTGCCTCCGAGCAAAT

20     G H L R E G M T L L K T E F A L H L Y Q
61  GGCCACCTCCGTGAAGGAATGACATTGCTGAAGACTGAGTTTGCACCTCACCTCTACCAG

40     S V A A C R N E T N F V I S P A G V S L
121 AGTGTGGCCGCGTGTAGAAATGAGACGAACTTTGTTCATCTCTCCTGCTGGTGTGTCCCTC

60     P L E I L Q F G A E G S T G Q Q L A D A
181 CCCCTGGAGATCCTGCAGTTTGGAGCAGAAGGGAGCACTGGTCAGCAGCTGGCAGATGCC

80     L G Y T V H D K R V K D F L H A V Y A T
241 CTGGGGTACACTGTCCATGACAAAAGGGTGAAGATTTCTTGATGCTGTTTATGCCACA

100    L P T S S Q G T E M E L A C S L F V Q V
301 CTACCCACCTCCAGCAAGGCACCGAGATGGAGCTGGCCTGCAGCCTTTTTGTGCAAGTG

120    G T P L S P C F V E H V S W W A N S S L
361 GGAACGCCACTGTCCCCTGCTTTGTGGAGCACGTCTCCTGGTGGGCTAACAGCAGCCTG
    
```

140 E P A D L S E P N S T A I Q T S E G A S
421 GAACCAGCCGACCTCAGTGAGCCCAATAGCACCGCCATCCAGACTAGCGAAGGGGCTCC

160 R E T A G G G P S E G P G G W P W E Q V
481 AGAGAGACTGCAGGTGGGGGCCCCAGTGAGGGCCCTGGTGGCTGGCCGTGGGAGCAAGTC

180 S A A F A Q L V L V S T M S F Q G T W R
541 AGTGCAGCATTTGCTCAGCTTGTGCTTGTGAGCACCATGTCTTCCAAGGCACTTGGCGA

200 K R F S S T D T Q I L P F T C A Y G L V
601 AAGAGATTCTCCTCCACAGACACACAGATCCTGCCTTTCACCTGTGCCTATGGCCTCGTC

220 L Q V P M M H Q T T E V N Y G Q F Q D T
661 CTTCAGGTCCCCATGATGCACCAAACGACCGAGGTCAACTACGGTCAGTCCAGGACACT

240 A G H Q V G V L E L P Y L G S A V S L F
721 GCAGGCCATCAGGTGGGGTGCTGGAGCTTCTTACCTGGGAAGTGCAGTGAGTCTGTTC

260 L V L P R D K D T P L S H I E P H L T A
781 CTGGTGCTGCCCCGTGACAAAGACACCCCCCTGAGCCACATCGAGCCACACCTCACAGCC

280 S T I H L W T T S L R R A R M D V F L P
841 AGCACCATCCACCTCTGGACCACCAGCCTGAGGAGAGCCAGGATGGATGTGTTCTGCC

300 R F R I Q N Q F N L K S I L N S W G V T
901 AGGTTTAGGATCCAAAATCAATTCAACTTAAAAAGCATTTTAAATCTTGGGGAGTCACC

320 D L F D P L K A N L K G I S G Q D G F Y
961 GATCTTTTGGATCCACTCAAAGCTAACTTGAAGGAATTTAGGCCAAGATGGCTTTTAT

340 V S E A I H K A K I E V L E E G T K A S
1021 GTTTCTGAAGCAATCCACAAGGCCAAGATTGAAGTTTGGAGGAAGGCACCAAGGCATCT

360 G A T A L L L L K R S R I P I F K A D R
1081 GGAGCCACAGCTCTGTTGTTATTGAAAAGGTCTCGGATTCCTATTTTTAAAGCAGATCGG

380 P F I Y F L R E P N T G F V F S I G R V
1141 CCATTCATCTATTTCTGAGAGAACCTAACACAGGGTTTGTCTTCAGTATTGGGAGAGTT

400 S N P L D
1201 TCAAATCCCCTAGACTAA

8.3.4 Alignment zur Bestimmung von Intronpositionen

Zur Bestimmung der Intronpositionen von *Bl*-Spn1 und SERPINE3 im α_1 -Antitrypsin-Referenzsystem wurden die Aminosäuresequenzen dieser Serpine mit der von reifem α_1 -Antitrypsin (SERPINA1) aligniert (Abschnitte 5.1.5 und 5.2.4). In das *Alignment* wurden weiterhin die Sequenzen aller bekannten Gruppe 3-Serpine aufgenommen. Aminosäuren, die durch ein Intron unterbrochen sind bzw. auf die ein Intron folgt, sind invertiert dargestellt. Die Intronpositionen und Phasen von SERPINE3 und von *Bl*-Spn1 sind oberhalb bzw. unterhalb der entsprechenden Intron-Markierung in der α_1 -Antitrypsin-Nummerierung angegeben.

```

SERPINA1 : -----EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPPVSIATAFAMLS : 65
SERPINE1 : MQMSPALTCLVLGLALVFGEGSAVHHPPSYVAHLASDFGVRVFOQVAQASKDRNVVFSYPGVASVLAMLQ : 70
SERPINE2 : --MNWHLPLFLL--ASVTLPSICSHFNPLSLEELGSNTGIQVFNQIVKSRPHDNIVISPHGIASVLGMLQ : 66
SERPINE3 : -----MPPFLITLFLFHSCCLRANGHLREGMTLLKTEFALHLYQSVAAACRNETNFVISPAGVSLPLEILQ : 65
SERPINI1 : -----MAFLGLFSLLLVQSMATGATFP----EEAIADLSVNMYNRLRATGEDENILFSPLSIALAMGME : 61
SERPINI2 : -----MDTIFLWSLLLLFFGSQASRCS----AQKNTEFAVDLYQEVSLSHKD-NIIFSPLGITLVLEMVQ : 60
Bl-Spn1 : --MPGHYSYSLFGLLVAMATLGSSASQESTPLADINSEFALELY-KTLHKDHPENIFFSPFSISTCLAMAY : 67
    
```

```

                89a
                ↓
SERPINA1 : LGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRLTNQPDSQLQLTTGNGFLFLSEGLKLVDFLEEDVK : 135
SERPINE1 : LTTGGETQQQIQAAAG--FKIDDKGMAPALRHLYKELMGPNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFF : 137
SERPINE2 : LGADGRTKKQLAMVMR---YGVN--GVGKILKKINKAIVSKKNKDIVTVANAVFVKNASEIEVPFVTRNK : 131
SERPINE3 : FGAEGSTGQQLADALG---YTVHDKRVKDFLHAVYATLPTSSQGTEMELACSLFVQVGTPLSPCFVEHVS : 132
SERPINI1 : LGAQGSTQKEIRHSMGY--DSLKNCIEEFSFLKEFSNMVTAKESQYVMKIANSLFVQNGFHVNEEFQMMK : 129
SERPINI2 : LGAKGKAQQQIRQTLKQ--QETSACIEEFFVLKSFSAISEKKQEFTFNLANALYLQEGFTVKEQYLHGK : 128
Bl-Spn1 : LGARNDTAQMSRVLR--HKMDASDLHVLFDLLTQLHHSRDPYTLKTANRLFGQNSFEFSQKFLDETS : 135
    
```

```

                ↑
                75c
                167a
                ↓
SERPINA1 : KLYHSEAF TVNFG-DTEEAKQINDYVEKGTQG----KIVDLVK--ELD-RDTVFALVNYIFKKGWERP : 197
SERPINE1 : RLFRSTVKQVDFS-EVERARFIINDVVKTHTKG----MISNLLGKGAVD-QLTRLVLVNALYFNGQWKTP : 201
SERPINE2 : DVFQCEVRNVNFE-DPASACDSINAWVKNETRD----MIDNLLSPDLIDGVLTRLVLVNAVYFKGLWKS : 196
SERPINE3 : WWANSSLEPADLS-EPNSTAIQTSEGASRETACGGPSEGGPGWPWEQVSAAFQLVLVSTMSFQGTWRKR : 201
SERPINI1 : KYFNAAVNHVDFS-QNVAVANYINKWVENNTNN----LVKDLVSPRDFD-AATYLALINAVYFKGNWKSQ : 193
SERPINI2 : EFFQSAIKLVDFQ-DAKACAEMISTWVERKTDG----KIKDMFSGEEFG-PLTRLVLVNAVYFKGDWKQK : 192
Bl-Spn1 : RHRYAQLAPVDFSGNTEGARQTINSWVEEQTEN----KIQDLLAPGTVT-PATMLVLVNAVYFKGSWERK : 200
    
```

↑
174/175/176a?

230a



SERPINA1 : FEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSW-----VLLMKYLGNATAIFFLPDE---G : 258
 SERPINE1 : FPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYHFEFTTPDGH---YYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEV : 268
 SERPINE2 : FQPENTKKRTFVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSGTSAPNDL---WYNFIELPYHGESISMLIALPTESST : 263
 SERPINE3 : FSSTDTQILPFTCAYGLVLQVPMHQTEVNYGQFQDTAGH---QVGVLELPYLGSVLSFLVLPDKDT : 268
 SERPINI1 : FRPENTRTFSFTKDDSEVQIPMMYQQGEFYHGEFSDGSNEAGGIYQVLEIPEGDEISMMLVLSRQ-EV : 262
 SERPINI2 : FRKEDTQLINFTKKNGSTVKIPMMKALLRTKYCYFSESSLN---YQVLELSYKGFSLIILPAE-GM : 257
 Bl-Spn1 : FEESRTRLGTFHISRDEKVEVPMHQGRFKLAYDEDLNCQ-----ILEMPYQGHLSMLLVLPK-MD : 263

290b



323a



SERPINA1 : KLOHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFNSG-ADLSGVTE-EAP : 326
 SERPINE1 : PLSALTNILSAQLISHWGNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSH-QEP : 337
 SERPINE2 : PLSAIIPHISTKTIDSWMSIMVPRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLGITDMFSSKANFAKITGSEN : 333
 SERPINE3 : PLSHIEPHLTASTIHLWTTSLRRARMDFVLPKFRIQNQFNLSILNSWGVTDLFDPLKANLKGISC-QDG : 337
 SERPINI1 : PLATLEPLVKAQLVEEWANSVKKQKVEVYLPKFTVEQEIDLKDVLLKALGITEIFIK-DANLTGLSH-NKE : 330
 SERPINI2 : DIEEVEKLITAQQILKWLSEMQEEVEISLPHFKVEQKVDKDVLYSLNITEIFSG-GCDLSGITD-SSE : 325
 Bl-Spn1 : ALSTIETSLTPDILRRWQKSMDEVSTMVQIPKFKLVHDFVLNEKLADMGMTDLFSMADADLSGITG-SRD : 332

352a



380a



SERPINA1 : LKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMS-IPPEVKFN-KPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK : 394
 SERPINE1 : LHVAQALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARM--APEEIIIMDRPFLFVVRHNPTCTVLFMGQVMPEP--- : 402
 SERPINE2 : LHVSHILQKAKIEVSEDTKASAATIAALIARS--SPPWFIVDRPFLFFIRHNPTCAVLFMGQINKP--- : 398
 SERPINE3 : FYVSEAIHKAKIEVLEEGTKASGATALLLLKRS--RIPIFKADRPFYFLREPNTCFVFSIGRVSNPDL- : 404
 SERPINI1 : IFLSKAIHKSFLEVNEEGSEAAAVSMIAISRMAVLYPQVIVDHPFFLIRNRRTCTILFMGRVMHPETM : 400
 SERPINI2 : VYVSQVTQKVFFEINEDGSEAAATSTCIHIPVIMSLAQSQFIANHPFLFIMKHNPTCSILFMGRVTNPDTQ : 395
 Bl-Spn1 : LHVSQVIHKAFVEVNEEGSEAAAATAVNMKRS-LDGETFFADHPFLFLIRDNSNSILFLGRLVRPEGL : 401

SERPINA1 : ----- :
 SERPINE1 : ----- :
 SERPINE2 : ----- :
 SERPINE3 : ----- :
 SERPINI1 : NTSGHDFEEL : 410
 SERPINI2 : EIKGRDLDSL : 405
 Bl-Spn1 : TTKDEL---- : 407

8.3.5 Aminosäure-Alignment humaner Serpine

Für das CLUSTALW-Alignment wurden die reifen Sequenzen von 33 humanen Serpinen verwendet. Positionen, die in >70 % der Serpine identisch sind, sind invertiert (weiß auf schwarz) dargestellt. Sekundärstrukturelemente (abgeleitet aus α_1 -Antitrypsin) sind oberhalb des Alignments angegeben (Whisstock *et al.*, 2000). Interessante, in Abschnitt 6.2.2 besprochene Positionen, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

```

SERPINE3      : ----- :
SERPINE1      : ----- :
SERPINE2      : ----- :
SERPINI1      : ----- :
SERPINI2      : ----- :
SERPINA1      : ----- :
SERPINA3      : ----- :
SERPINA4      : ----- :
SERPINA5      : ----- :
SERPINA6      : ----- :
SERPINA7      : ----- :
SERPINA8      1 : -----DRVYIHPFHLVIHNESTC : 18
SERPINA9      : ----- :
SERPINA10     : ----- :
SERPINB1      : ----- :
SERPINB2      : ----- :
SERPINB3      : ----- :
SERPINB4      : ----- :
SERPINB5      : ----- :
SERPINB6      : ----- :
SERPINB7      : ----- :
SERPINB8      : ----- :
SERPINB9      : ----- :
SERPINB10     : ----- :
SERPINB11     : ----- :
SERPINB12     : ----- :
SERPINB13     : ----- :
SERPINC1      : ----- :
SERPIND1      1 : -----GSKGPLDQLEKGGETAQSADPQWEQLNKNLSMPLLPADFKENTVTNDWIP : 52
SERPINF1      : ----- :
SERPINF2      : ----- :
SERPING1      1 : NPNATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNSTNSATKITANTTDEPT : 65
SERPINH1      : ----- :

```

SERPINE3	1	:	-----HLREGMTLLKTE	ALH	:	16						
SERPINE1	1	:	-----VHHPPSYVAHLASD	E	GVR	: 18						
SERPINE2	1	:	-----SHFNPLSLEELGSNTGIQ			: 18						
SERPINI1	1	:	-----ATFPPEAIALDSVN			: 14						
SERPINI2	1	:	-----QKNTE	AVD		: 9						
SERPINA1	1	:	-----EDPQG--DAAQKTDTS	SHHDQDHPTFNKITPNLAE	E	AFS : 36						
SERPINA3	1	:	-----HPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASAN-VD	E	AFS : 36							
SERPINA4	1	:	-----QLHVEHDGESCNSSSHQQLLETGEGSPSLKIAPAN-AD	E	AFR : 41							
SERPINA5	1	:	-----HRHHPREMKRVEDLHV	GAT		: 32						
SERPINA6	1	:	-----MDPN---AAYVNMSNHHR			: 27						
SERPINA7	1	:	-----ASPEGKVTACH--SSQP	NAT		: 32						
SERPINA8	19	:	EQLAKANAGPKDPTFI	PAPIQAKTSPVDEKALQDQLVLVAAKLDTE	D	DKLRAAMVGMLANFLGFR : 83						
SERPINA9	1	:	-----APIYCVSPANAPSA	YPRPSSTKSTP		: 39						
SERPINA10	1	:	---PSPQSPETPAPQNQTSRVVQAPREEEDEQEASEEKAGEEEKAWLMASRQQLAKETS	N	E	GFSS : 62						
SERPINB1	1	:	-----MEQLSSANTR	E	ALD : 14							
SERPINB2	1	:	-----MEDLCVANTL	E	ALN : 14							
SERPINB3	1	:	-----MNSLSEANTK	E	MFD : 14							
SERPINB4	1	:	-----MNSLSEANTK	E	MFD : 14							
SERPINB5	1	:	-----MDALRLANSA	E	AVE : 14							
SERPINB6	1	:	-----MDVLAEANGT	E	ALN : 14							
SERPINB7	1	:	-----MASLAAANA	E	CFN : 14							
SERPINB8	1	:	-----MDDLCEANGT	E	AIS : 14							
SERPINB9	1	:	-----METLSNASGT	E	AIR : 14							
SERPINB10	1	:	-----MDSLATSINQ	E	ALE : 14							
SERPINB11	1	:	-----MGSLSANVE	E	CLD : 14							
SERPINB12	1	:	-----MDSLVTANTK	E	CFD : 14							
SERPINB13	1	:	-----MDSLGA	VSTR	LGFD : 14							
SERPINC1	1	:	----HGSPVDICTAKPRDI	PMNPMCIYRSP	PEKKATEDEGSE	QKIPEATNRVWELSKANSR	E	ATT : 61				
SERPIND1	53	:	EGEEDDDYLDEKIFSEDDDY	IDIVDSLVSPTDS	DVSAGN	ILQLFHGKSRIQLN	LN	AKA	E	AFN : 117		
SERPINF1	1	:	-----QNPASPEEGSPDP	STGALVEEEDP	FFKVPVNKLAAVSN	E	GYD : 45					
SERPINF2	1	:	MEPLGRQLTSGPNQE	QVSPLTLKLNQ	EPGGQTALKSP	PGVCSRDP	TP	EQ	THR	LARAMMA	E	TAD : 65
SERPING1	66	:	TQPTTEPTTQPTIQPTQPTT	QLPTDSPTQPT	TGSF	CGPVTLCSDLESH	STEAVLGDALVD	E	SLK : 130			
SERPINH1	1	:	-----AEVKKPAAAAAPG	TAEKLSPKAATLAERSAG	L	A	F	S : 35				

			↓		↓																																			
			s6B		hB		hC																																	
SERPINE3	17	:	LYQSVAAACR--NETNFVI	SPAGVSLP	EILQF	GAEGST	GQQLADAL	LG	YTVHDK	-----	:	67																												
SERPINE1	19	:	VFQQVAQAS--KDRNVVF	SPYGVASV	LAMLQ	TTGGGT	QQQIQAAMG	-FKI	DDK	-----	:	69																												
SERPINE2	19	:	VFNQIVKSR--PHDNIVI	SPHGIASV	LMLOL	GADGRT	KKQLAMVMR	-YGVN		-----	:	67																												
SERPINI1	15	:	MYNRLRATG--EDENLFS	SPISIALAMGMML	GAQGS	TOKE	IRHSMGYDSLKNG			-----	:	66																												
SERPINI2	10	:	LYQEVSLSH--KD-NIIF	SPLGITLV	EMVOL	GAKGKAQQ	IRQT	LKQ	QETSAG	-----	:	60																												
SERPINA1	37	:	LYRQLAHQS--NSTNIF	SPVSIATAF	AML	SLG	TKAD	THDE	ILEGLNFNLTEIP	-----	:	88																												
SERPINA3	37	:	LYKQLVLKA--PDKNVIF	SPSISITAF	FLSL	GAHN	TILTE	ILKGLKFNLTETS		-----	:	88																												
SERPINA4	42	:	FYYLIASET--PGKNLFF	SPSISIAAYAML	SLG	ACSHRS	QILEGL	GFNLTELS		-----	:	93																												
SERPINA5	33	:	LYRALASAA--PSQNIFF	SPVSI	SMSL	AML	SLG	AGSST	KMQL	ILEGLNLQKSS	-----	:	84																											
SERPINA6	28	:	LYKHLVALS--PKKNIFI	SPVSI	SMAL	AML	SLG	TCG	HTRAQL	LQGLGFNLTERS	-----	:	79																											
SERPINA7	33	:	LYRRFTVET--PDKNIF	SPVSI	SAAL	VML	SLG	ACCST	QTEIVET	LGFNLTDP	-----	:	84																											
SERPINA8	84	:	IYGMHSELWGVVHGATVLS	PTAVFGT	ASLYL	GALDHT	ADR	LQA	ILG	VPWKDKN	-----	:	137																											
SERPINA9	40	:	LYRRLVLET--PSQNIFF	SPVSV	STSL	AML	SLG	AH	SVTK	QIL	QGLGFNLTHTP	-----	:	91																										
SERPINA10	63	:	LLRKISMRH--DGNMVF	SPFGMSL	AMTGL	MLG	ATG	PTET	QIKRGL	HLQAL	KPT	-----	:	113																										
SERPINB1	15	:	LFLALSENN--PAGNIFI	SPSISISSAM	AVL	LG	TRGNT	AAQL	SKTFHF	N	TVE	-----	:	64																										
SERPINB2	15	:	LFKHLAKAS--PTQNLFS	SPSISSTM	AMVY	MS	RGST	EDQ	MAK	VLF	QNEVGANAVTPMTPENFT	-----	:	77																										
SERPINB3	15	:	LQQFRKS---KENNIFY	SPSITS	ALGM	VLL	GAK	DN	TAAQ	IKK	VLF	HFDQVTEN	-----	:	65																									
SERPINB4	15	:	LQQFRKS---KENNIFY	SPSITS	ALGM	VLL	GAK	DN	TAAQ	IKK	VLF	HFDQVTEN	-----	:	65																									
SERPINB5	15	:	LFKQLCEKE--PAGNIF	SPICL	STSL	LAQ	VGAK	GD	TANE	IGQV	LHFENVK	-----	:	64																										
SERPINB6	15	:	LLKTLGK-D--NSKNVFF	SPMSM	SCAM	VY	GAK	NTAAQ	MAQ	IL	SFNKSGG	-----	:	64																										
SERPINB7	15	:	LFREDDNQ--GNGNVFF	SSL	LFAAL	ALV	RLGA	QD	DSLS	QID	KLHVNTAS	-----	:	64																										
SERPINB8	15	:	LFKILGEED--NSRNVFF	SPSIS	SA	AMV	FM	GAK	GSTAAQ	MSQAL	CLYKDG	-----	:	64																										
SERPINB9	15	:	LLKILQDN--PSHNVFC	SPVSI	SSAL	AMV	LG	A	KN	TAT	MAQ	ALSLNTEE	-----	:	64																									
SERPINB10	15	:	LSKLLAES--QGNLFF	SSW	SIST	STIV	YL	GAK	GTAAQ	MAQ	VLF	QFNRDGVKCDPES	-----	:	72																									
SERPINB11	15	:	VFKELNSNN--IGDNIFF	SSL	LLYAL	SMV	LG	ARG	ETAE	Q	LEK	VLF	HFSHTVDS	-----	:	66																								
SERPINB12	15	:	LFQEIGKDD--RHKNIF	SPSLS	SAAL	GMV	RLG	ARS	DS	AH	Q	DEV	LHFNEFSQNESKEPD	-----	:	72																								
SERPINB13	15	:	LFKELKKT---NDGNIF	SPVGI	LTA	IGM	VLL	G	TRG	ATAS	Q	LEE	VFHSEKETS	-----	:	65																								
SERPINC1	62	:	FYQHLADSKN-DNDNIF	LSP	SIS	TAFAM	VY	LG	AC	ND	TLQ	L	MEV	FK	DTISEK	-----	:	114																						
SERPIND1	118	:	LYRVLKDQVN-TFDNIF	IAPV	GI	STAM	GMI	SL	LK	GET	THE	Q	VHS	IL	HFKDFVNAS	-----	:	171																						
SERPINF1	46	:	LYRVRSSTS--PTTNVLL	SPLSV	ATA	S	ALS	LG	A	E	Q	R	TES	I	H	R	AL	Y	D	L	I	S	P	-----	:	97														
SERPINF2	66	:	LFSLVAQTS--TCPNLL	SPLS	VAL	DL	SHL	AL	G	A	Q	N	H	L	Q	R	L	Q	Q	V	L	H	A	G	S	G	P	-----	:	115										
SERPING1	131	:	LYHAFSAMKK-VETNMA	FS	PI	S	I	AS	L	T	Q	V	L	G	A	G	E	N	T	K	N	L	E	S	I	L	S	Y	P	K	D	F	T	C	-----	:	183			
SERPINH1	36	:	LYQAMAKDQ--AVENIL	V	S	P	V	V	A	S	L	G	L	V	S	L	G	G	K	A	T	A	S	Q	A	K	A	V	L	S	A	E	Q	L	R	D	E	-----	:	87

```

                hD                      s2A
                |-----|              |-----|
SERPINE3  68 : -----RVKDFLHAYATLP-TSSQGTMEELACSLFFVQVGTPLSPCF : 107
SERPINE1  70 : -----GMAPALRHLYKELM-GPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGF : 109
SERPINE2  68 : -----GVGKILKKINKAIV-SKKNKDIVTVANAVFVKNAIEIVPFF : 107
SERPINI1  67 : -----EEFSFLKEFSNMVVT-AKESQYVMKIANSLFVQNGFHVNEEF : 106
SERPINI2  61 : -----EEFFVLKSFSSAIS-EKKQEFTFNLANAYLQEGFTVVKEQY : 100
SERPINA1  89 : -----EAQIHGEGFQDLRLTLN-QPDSLOQLTTGNGELFSEGLKLVDF : 130
SERPINA3  89 : -----EAELHQSFQHLRLTLN-QSSDELOQLSMGNAMFVKEQLSLLDRF : 130
SERPINA4  94 : -----ESDVHRGFQHLHLTLN-LPGHGLETTRVGSALFLSHNLKFLAKF : 135
SERPINA5  85 : -----EKELHRGFQQLQELN-QPRDGFQSLGNALEFDLVDLQDTF : 126
SERPINA6  80 : -----ETEIHQGFQHLHQLFA-KSDTSLEMTMGNAFLDGSLELLESEF : 121
SERPINA7  85 : -----MVEIQHGFQHLICSLN-FPKKELEFQIGNALEFIGHKLKPLAKF : 126
SERPINA8  138 : -----CTSRDLAHKVLASALQAVQGLLVAQGRADSAQLLSTVVGVEFAPGLHLKQFF : 190
SERPINA9  92 : -----ESAIHQGFQHLVHSLT-VPKDLTFLKMGSALEFVKKELQLQANF : 133
SERPINA10 114 : -----KPGLLPSLFLKRETLN--RNLELGFSSQGSFAFIHKDFDVLETF : 155
SERPINB1  65 : -----EVHSRFSQNLADIN-KRGASYILKLANRLEYGEKTYNFLPEF : 104
SERPINB2  78 : SCGFMQQIQKGSYPDAILQAQAADKIHSFRSLSSAIN-ASTGNYLLESVNFLEGEKSASFREY : 141
SERPINB3  66 : -----TTGKAATYHVDR-SGNVHHQFQHLTEFN-KSTDAYEFLKIANKLEGEKTYFLQEQY : 119
SERPINB4  66 : -----TTEKAATYHVDR-SGNVHHQFQHLTEFN-KSTDAYEFLKIANKLEGEKTYFLQEQY : 119
SERPINB5  65 : -----DVPFGFKPITSDVN-KLSSFYSFKLIKRLFYIDKSLNLSLETF : 104
SERPINB6  65 : -----GGDIHQGFQHLTEFN-KTGTQYFLRMANRLEGEKSCDFLLSEF : 106
SERPINB7  65 : -----GYGNSS-NSQSG-LQSOLKRVFSDIN-ASHKDYDLSIVNGLFAEKVYGFHKDY : 114
SERPINB8  65 : -----DIHRGFQHLSEVN-RTGTQYFLRTANRLEGEKTCDFLPDF : 104
SERPINB9  65 : -----DIHRAFQSLTEFN-KAGTQYFLRTANRLEGEKTCQFLSTF : 104
SERPINB10 73 : -----EKKRK----MEFNLSNSEEIHSDFQHLISEIL-KPNDLYLKTANALEGEKTYAFHNKY : 126
SERPINB11 67 : -----LKPFGKDPKCSQAGRIHSEFGVFEFSQIN-QPDSNCTLSIANRLEYGKTMAFHQQY : 121
SERPINB12 73 : -----PCLKSNKQKAGSLNNESEGLVSCYFGQLLSKLD-RIKTDYFLSIANRLEYGEQEFPIQEQY : 130
SERPINB13 66 : -----SRIKAEKEVIENTEAVHQFQKFLTEIS-KLTNDYELNITNRLFGEKTYFLQKY : 120
SERPINF1  98 : -----TSDQHFFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLEGDKSLTFNFTY : 158
SERPIND1  172 : -----SKYEITTHNLFRKLTFRHF--RRNFGYTLRSVNDLYIQKQFLLDL : 217
SERPINF1  98 : -----DIHGTYKELDFTVT--APQKNLKSASRIVFEEKLRIKSSF : 135
SERPINF2  116 : -----CLPHLLSFLCQDLG----PGAFRLAARMYLVKQGFPIKEDF : 151
SERPING1  184 : -----VHQAALGFTTCKV-----TSVSOLEHSPDLAIRDTF : 214
SERPINH1  88 : -----EVHAGLGEFLRLSLSNSTARNVTWKLGSRLFYGPSSVSFADDF : 128
    
```

```

                ↓      ↓      ↓↓ ↓↓      ↓
                hE      s1A      hF      s3A
                |-----|-----|-----|-----|
SERPINE3  108 : VEHVSWWANSLEPADLSE-PNSTAIQTSEGASRETAGGGPSEGGGWPEVQSAAFAQLVAVST : 171
SERPINE1  110 : MPHFFRLFRSTVKQVDSE-VERARFTINDWVKTHTKCMISN----LLGKAVDQTLRLVLVNA : 168
SERPINE2  108 : VTRNKDVFCQEVNRNVNED-PASACDSINAWVKNETRDMIDN----LLSPDLIDGVLRLVLVNA : 167
SERPINI1  107 : LQMMKKYFNAAVNHVDFSQ-NVAVANYINKWVENNTNNLVKD----LVSPRDFDAAYLALVNA : 165
SERPINI2  101 : LHGNKEFFQSAIKLVDFQD-AKACAEMISTWVERKTDGKIKD----MFSGEEFGPTRLVLVNA : 159
SERPINA1  131 : LEDVKKLYHSEAFVNFQD-TEEAKKINDYVEKGTQCKIVD----LVKELDRDVFALVNY : 187
SERPINA3  131 : TEDAKRLYGSEAFATDFQD-SAAAKKINDYVKNGTGKIID----LIKDLDSDAMMLVNY : 187
SERPINA4  136 : LNDTMAVYEAKLFHTNFYD-TVGTIQLINDHVKKEFRGKIIVD----LVSELKDVLMVLVNY : 192
SERPINA5  127 : VSAMKTYLADTFPTNFRD-SAGAMKQINDYVAKOTGCKIVD----LLKNLDSNAVVMVNY : 183
SERPINA6  122 : SADIKHYEYSEVFLAMNFQD-WATASRQINSYVKNKTGKIVD----LFGSLDSPAIVLVNY : 178
SERPINA7  127 : LNDVKTLYETEVEFSTDFSN-ISAAKQENSHVEMQTRGKIVG----LIQDLKPNIMVNVNY : 183
SERPINA8  191 : VQGLALYTPVVLPRSLDFTELDVAEAKIDRFMQAVTGWKTGC----SLMGASVDSTLAFNTY : 248
SERPINA9  134 : LGNVKRLYEAEVFSTDFSN-PSIAQARINSHVKKKTGKIVD----IIQGLDLLAMVNVNH : 190
SERPINA10 156 : FNLSKRYFDTECPVPMNFRN-ASQAKRLMNYINKEFRGKIPK----LFDEINPEKILVLDY : 212
SERPINB1  105 : LVSTQKTYGADLASVDFOHASEDARKTINQWVKGOTGCKIPE----LLASGMVDNMLKVLVNA : 164
SERPINB2  142 : IRLCQKYYSSPEQAVDFLECAEEARKKINSWVKQTGKIPN----LLPEGSVDGDRMVLVNA : 201
SERPINB3  120 : LDAIKKFYQTSVESVDFANAPEESRKKINSWVESQINEKIKN----LIPEGNIGSNITLVVNA : 179
SERPINB4  120 : LDAIKKFYQTSVESVDFANAPEESRKKINSWVESQINEKIKN----LFPDGTIGNDITLVVNA : 179
SERPINB5  105 : ISSTKRIFYANELETVDFFKDKLEETKQGINSSIKELTDGHFED----ILPENSISSDKILVNA : 164
SERPINB6  107 : RDSCQKFYQAEEMEELDFISAVEKSRKHINTWVAEKTGKIAE----LLSPGSVDPLTRVLVNA : 166
SERPINB7  115 : IECAEKLYDAKVERVDFTNHLEDTRRNINKWVENETGCKIKN----VIGEGISSAVMVLVNA : 174
SERPINB8  105 : KEYCQKFYQAELEELSEAEDETECRKHINDWVAEKTGKISE----VLDAGTVDPITKVLVNA : 164
SERPINB9  105 : KESCLQFYHAELEKELSEIRAAEESRKHINTWWSKKTGKIEE----LLPGSSIDAEITRVLVNA : 164
SERPINB10 127 : LEDMKTYFGAEPQPVNFVEASDQIRKDNSWVEROTGCKIQN----LLPDDSVSDTIRMILVNA : 186
SERPINB11 122 : LSCSEKWAYQARLQTVDFEQSTBEETRMINAWVENKINGKVAN----LFGKSTIDPSSVMVNVNT : 181
SERPINB12 131 : LDGVIQFYHTTIESVDFOKNPEKSROEINFWVEEQSQCKIKIE----LFSKDAINAEITVLVNA : 190
SERPINB13 121 : LDYVEKYYHASLEPVDVFNAADESRRKINSWVESKINEKIKD----LFPDGSISSSKVLVNM : 180
SERPIND1  159 : QDISELVYGAKLQPLDFKENAEQSRALINKWVSNKTEGRITD----VIPSEAINELITVLVNVNT : 218
SERPIND1  218 : KTKVREYYFAEAQIADSDPAFIS--KTNNHIMKLTGKLIKD----ALENIDPATQMMILNC : 273
SERPINF1  136 : VAPLEKSYGTRPRVLTGNP--RLDLQELTNWVQAQMRGKTLAR----STKEIPDEISILLGV : 191
SERPINF2  152 : LEQSEQLFG--AKPVSALTGKQEDDLANINQWYKEATGKIQE----FLSGLPEDITVLLVNA : 207
SERPING1  215 : VNASRTLYSSSPRVLNSNS--DANLELINTWVAKNITNKNISR----LLDSLPSDITRVLVNA : 270
SERPINH1  129 : VRSSKQHYNCEHSKINFRD-KRSALQSTINEWAQTDGKILPE----VTKDVERTDGALLVNA : 185
    
```

		s4C	s3C	s1B	s2B		
SERPINE3	172	MSFQGTWRKR	SSSTD	QIL-PT	CAYGLVLOV	PMMHQTTEVNYGQFQDTAGH---QVGVLELPL	232
SERPINE1	169	LYFNGQWKTP	PDSS	HRR-L	HKSDGSTVS	VPMMQAQTNKFNYTEFTTPDGH---YDILLELPHY	229
SERPINE2	168	VYFKGLWKSRT	QOPEN	KKR-T	VVAADGKSYQ	VPMLAQLSVFRCGSTSAPNDL---WYNFIELPHY	228
SERPINI1	166	VYFKGNWKSQ	RPEN	RTF-S	TKDDESEVQ	IPMMYQQGEFYGFSDGSNEAGGIYQVLEIPYE	229
SERPINI2	160	IYFKGDKQK	RKED	QLI-N	FTKKNGSTVK	IPMMKALLRRTKYGYFSESSLN---YQVLELSYK	219
SERPINA1	188	IFFKGRWERP	EVKDT	EEE-D	FHVDQVTTVK	VPMM-KRLGMFNIQHCKK----LSSWVLMKYL	245
SERPINA3	188	IFFKAKWEMP	DPQD	HQS-R	FYLSKSKKWVM	VPMMSLHHLTIPYFRDEE----LSCTVVELKYT	246
SERPINA4	193	IYFKALWEKP	LSSR	TPK-D	FYVDENTTVR	VPMMQLDQEHHWYLHdry----LPCSVLRMdYK	251
SERPINA5	184	IFFKAKWETS	FNHKG	TEQ-Q	Dfyvtsetvvr	VPMMsre-dQYHYLLDRN----LSCRvVGVpYQ	241
SERPINA6	179	IFFKGIWTP	EDLAS	TREE-N	FYVDETTvvk	VPMM-LQSSITSYLHDAE----LPQQLVQMMYV	236
SERPINA7	184	IHFKAQWANP	EDPSK	EDSSS	FLIDKTTTVQ	VPMMHQm-eQYHYHLVDME----LNCTVLMQdYS	242
SERPINA8	249	VHFQCKMKG	ESLLA	EPQE-F	WVDNstsvs	VPMLSGMGTFOHWSDIQD----NFSVTQVPFT	304
SERPINA9	191	IFFKAKWEKP	PHPEY	TRKNF	PLVGEQVTVH	VPMMHQK-EQFAFGVDTE----LNCfVLQMDYK	249
SERPINA10	213	ILFKGKWLTP	DPVF	TEVD-T	HLDKYKTI	KVPMMyGAGKFASTFDKN----FRCHVILKLEPYK	270
SERPINB1	165	IYFKGNWKKD	KMKEA	TNA-P	RLNKKDRKT	VKMMYQKKKFAYGYIED----LKCRVLELPHYQ	222
SERPINB2	202	VYFKGRWKT	PEEK	KLNGLY-P	RVNSAQRT	VPQMMYLREKLNIGYIED----LKAQILELPHYA	259
SERPINB3	180	IYFKGQWEK	KNKED	KEE-K	WPNKNTYKS	VQMMRQYTSFHFALED----VQAKVLEIPYK	237
SERPINB4	180	IYFKGQWENK	EKKENT	KEE-K	WPNKNTYKS	VQMMRQYNSFNfALLED----VQAKVLEIPYK	237
SERPINB5	165	AYFVGRWMMK	PESE	TKEC-P	RINKTDTKP	VQMMNLEATFCLGNIDD----INCKIIElPFQ	222
SERPINB6	167	VYFRGNWDEQ	EDKEN	TEER-L	FKINGEQR	VPQMMFKQSTFKKTYIGE----LNCTVLMQdYV	224
SERPINB7	175	VYFKGRWQSA	FTKSE	TINC-H	FKSPKCSGKA	VAMMHQERKFNLSVIED----PSMKILELRYN	232
SERPINB8	165	IYFKGRWNEQ	EDRKY	TRGM-L	EKTNE-EKKT	VQMMFKAEAKFMGYADE----VHTQVLELPHYV	221
SERPINB9	165	IYFKGRWNEP	EDETY	TREM-P	KINGEQR	VPQMMYQeATFKLAHVGE----VRAQLLELPHYA	222
SERPINB10	187	LYFKGIWEHQ	ELVON	TTEK-P	RINETTSKP	VQMMFMKKKLHIFHIEK----PKAVGLQLLYK	244
SERPINB11	182	IYFKGRONK	EQVRE	TVKS-P	QLSEGNVT	VEMMYQIGTFKLAfVKE----PQMQVLELPHYV	239
SERPINB12	191	VYFKAKWETY	EDHEN	TVDA-P	CLNANENKS	VKMMTKQGLYRIGFIEE----VKAQILEMRYT	248
SERPINB13	181	VYFKGQWDR	EKKENT	KEE-K	WPNKNTYKS	VQMMTQSHSFSFTFLED----LQAKILGIPYK	238
SERPINC1	219	IYFKGLWKS	KSPEN	TRKE-L	FYKADGES	CSASMMYQEGKFRYRVAE----G-TQVLELFPK	275
SERPIND1	274	IYFKGSWVNK	EPVEM	THNH-N	RLNEREVVK	VSMMQTKGNFLAANDQE----LDCDILQLEBYV	331
SERPINF1	192	AHFKGQWVT	KEDSR	KISLE-D	FYLDEERT	VVRVPMMSDPKAVLRYGLDSD----LSCKIAQLPLT	250
SERPINF2	208	IHFQGRWNR	KEDPSL	TQDR-S	HLDEQFTV	VPVEMMQARTYPLRWFLLEQ----PEIQVAHFPPK	266
SERPING1	271	IYLSAKWKT	EDPK	KTRME-P	HFKN-SVI	KVPMMSKkYPVAHFIDQT----LKAkvGLQLS	328
SERPINH1	186	MFFKPHWDEK	HHKM	VMDNR-G	MVTRSytVg	VMMHRTGLYNYDDEKE----KLQIVEMPLA	243

		s3B	hG	hH	s2C	s6A			
SERPINE3	233	GSAVSLFVLPRDK	---DTP	SHIEPH	TASTIHL	WT--SLRRAR--MDVSLPRFR	RIQNOFNLK	290	
SERPINE1	230	GDTLSMFIAPYEK	---EVP	SALTNIL	SAQLISH	WKG--NMTRLR--RLLVLPKFS	LETEVDLR	287	
SERPINE2	229	GESISMLIALPTES	---STP	SAILPHI	ISTKTIDS	WMS--IMVPKR--VQVILPKF	TAVAQTDLK	286	
SERPINI1	230	GDEISMMLVLSRQ	---EVP	ATLEPL	VKAVLVEE	WAN--SVKKQK--VEVYLPRFT	VEQEDILK	286	
SERPINI2	220	GDEFSLIILPAE	---GMD	IEBEVKL	ITAQILK	WLS--EMQEEE--VEISLPRF	KVEQVDfK	276	
SERPINA1	246	GNATAIFFLPDEG	---KIQ	HLBNEI	THDITK	FLenedRRSAS---LHLPLKLS	ITGTyDfK	300	
SERPINA3	247	GNASALFILPDQD	---KME	EVAMIL	LPETLKR	WRDSLEFREIG---ELYLPKFS	ISRDYNLN	302	
SERPINA4	252	GDAVTFVILPQGG	---KMR	IEEVL	TPMLMR	NNLLRKRNFYKLEHLPKFS	ISGSYVLD	310	
SERPINA5	242	GNATALFILPSEG	---KM	QVBNGL	SEKTLR	KWLMFKKR---QLELYL	PKFSIEGSYQLE	296	
SERPINA6	237	GNGTVFFILPDKG	---KM	NTVIAAL	SRDTIN	RWSAGLTSSQV---DLYIPKVT	ISGSYVDLG	291	
SERPINA7	243	KNALALFVLPKEG	---QMS	VEAAMS	SKTLKKNR	LLQKGVVD---LFPKFS	ISATYDLG	297	
SERPINA8	305	ESACLLLIQPHYAS	---D	DKVEGL	TFQONS	LNMMKLSPRTIH---LTMPLQL	VLQGSYDLQ	360	
SERPINA9	250	GDAVAFVFLPSKG	---KMR	QLEQAL	SARTLR	KWHSLOKRWIE---VFIPRFS	ISASYNLE	304	
SERPINA10	271	GNATMLVVLMKMG	---DHL	ALEDYL	TTDLVET	WLRNMKTRNME---VFPKFS	KLDQKYEMH	326	
SERPINB1	223	GEELSMVILLPDD	IEDESTG	EKKIEQ	LLEKLH	EWTKPENLDFIE--VNVSLPRF	KLEESYTLN	285	
SERPINB2	260	G-DVSMFLLL	PDEIADVSTG	ELLESE	ITYDKLN	KWTSKDMAEDE--VEYIIP	QFKLEEHYBLR	321	
SERPINB3	238	GKDLSMIVLLP	---NE	IDGQKLE	EKI	TAEKLM	WTSLQNMRETR--VDLHLPRF	KVEESYDLK	296
SERPINB4	238	GKDLSMIVLLP	---NE	IDGQKLE	EKI	TAEKLM	WTSLQNMRETC--VDLHLPRF	KMEESYDLK	296
SERPINB5	223	NKHLMLIVLPK	DVEDESTG	EKIEKQ	LNPTLLO	TNPSTMANAK--VKLSL	PKFKVEKMIDPK	285	
SERPINB6	225	GKELNMIIMLPD	---ETT	DERTVE	KELTYE	KFVEWTRLDMMDEEE--VEVSLPRF	KLEESYDME	283	
SERPINB7	233	G-GINMYVLLPE	---ND	SEIENK	LTFQNL	MWETNPRRMTSKY--VEVFP	QFKIEKNYEMK	288	
SERPINB8	222	EEELSMVILLPD	---DNT	DVAVBE	KALTYE	KFKAWTNSKLTKSK--VQVSLPRL	KLEESYDLE	280	
SERPINB9	223	RKELSLVLLPD	---DG	VESTVE	KSITFE	KLTAWTKPDCMKSTE--VEVSLPKF	KLDQEDYDME	281	
SERPINB10	245	SRDLSLLILLPEDIN	---GL	EQLKAI	TYEKLNE	WTSADMMELYE--VQLHLPRF	KFLLEDYDLK	303	
SERPINB11	240	NNKLSMILLPVG	---IAN	KQIBKQ	LNSGTF	HEWTSSSNMERE--VEVSLPRF	KLEIKYBLN	298	
SERPINB12	249	KGKLSMFVLLP	SHSKDNLKG	EELEBK	IITYEK	MVAWSSENMSSEES--VVLSFPRF	LEDYSYDLN	311	
SERPINB13	239	NNDLSMFVLLP	---ND	IDGQEKI	IDKISPE	KLVEWTS	SPGHMEERK--VNLHLPRF	EVEDGYDLE	297
SERPINC1	276	GDDITMVLILPK	---PE	KSAAVBE	KLTPEV	LQEWLD--ELEEMM--LVVHM	PRFRIEDGFSLK	332	
SERPIND1	332	GDISMLIVVPHKMS	---GM	KTLAQ	LTPRV	VERWQKSM	TNRTRE---VLPRK	KLEKNVNLV	387
SERPINF1	251	GSMSIIFFLPLKVT	---QN	TLIEES	LTFSEF	IHDIDRELKTVQAV---LTVPKL	KLSYEGEVT	307	
SERPINF2	267	NNMSFVVLVPTHF	---EWN	VSQVLAN	SWDTH	LHPPLVWERPTKVR---LPLK	LYLKHQMDIV	321	
SERPING1	329	HNLSLVILVPQNLK	---HR	EDMEQAL	SPSVFKA	IMEKLEMSKfQP-TLLTLPR	KRIKVTTSQDML	388	
SERPINH1	244	HKLSSLIILMPHH	---VEP	ERLEKL	TKEQLKI	MGMKMQKKAVA---ISLPRK	GVVEVTHDLQ	300	

		↓		↓	
		hI		s5A	
SERPINE3	291	:	SILNSWCVTDLFDPLKANKLSISG--QDGFVYSEAIHKAKIEVLEEECTKASGATALLLLKRS---	:	350
SERPINE1	288	:	KPLENLCMTDMFRQFOADFTSLSD--QEPLHVAQALQVKIEVNESCTVASSSTAVIVSARM---	:	347
SERPINE2	287	:	EPLKVLGITDMFDSSKANFAKITTG--SENLVHSHILQAKIEVSEDECTKASAAITAILIARS---	:	347
SERPINI1	287	:	DVLKALCITEIFIK-DANLTGLSD--NKEIFLSKAIHKSFLEVNNEECSEAAAVSGMIAISRMVA-	:	347
SERPINI2	277	:	DVLYSLNITEIFSG-GODLSGITD--SSEVYVSQVTKVFFELINEDCSEEAATSTGIHIPVIMSL-	:	337
SERPINA1	301	:	SVLQQLGITKVFNS-GADLSGVTE--EAPLKLKSAVHKAVLTIIDEKCTEAAGAMFLEAIPMS---	:	359
SERPINA3	303	:	DILLQIGIEEAFST-KADLSGITG--ARNLAVSQVHKAVALDVFEECTEASAAATAVKITLLSALV-	:	364
SERPINA4	311	:	QILPRLCFTDLFSK-WADLSGITK--QQKLEASKSFHKATLDVDEACTEAAAATSFVKFFSAQ-	:	371
SERPINA5	297	:	KVLPSLGISNVFTS-HADLSGLSN--HSNIQVSEMVKAVVEVDESGTRAAAATGTFITFRSAR-	:	357
SERPINA6	292	:	DVLEEMGIADLFTN-QANFSRITQ--DAQKSKSVVHKAVLQLNNEECVDTAGSTGVTLNLT---	:	350
SERPINA7	298	:	ATLLKMGCIQHAYSE-NADFSCLTE--DNGLKLSNAAHKAVLHIGEKCTEAAAVPEVLSQPENT-	:	359
SERPINA8	361	:	DLLAQAEPLAILHT-ELNLQKLSN--DRIRYGEVLSIFFLEADEREPTTESTQQLNKPEVLE-	:	420
SERPINA9	305	:	TILPKMCIQNVFDK-NADFSCLAK--RDSLQVSKATHKAVLDVSEECTEATAATTTKFIVRSKDG-	:	366
SERPINA10	327	:	ELLRQMGIRRIIFSP-FADLSSELSAT--GRNLQVSRVLRRTVIEVDERCTEAVAGILSEITAYSMP-	:	388
SERPINB1	286	:	SDLARLGVQDLFNSSKADLSMSG--ARDIFISKIVHKSFVFNNEECTEAAAATAGIAT-FCMLM-	:	347
SERPINB2	322	:	SILRSMGEMDAFNKGRANFSGMSE--RNDLFLSEVFOAMVDVNEECTEAAACTGGVMTGRTGH-	:	383
SERPINB3	297	:	DTLRTRMGVDFNG-DADLSGMTG--SRGLVSLGVLHKAFFVEVTEECAEAAAATAVVGFSGSSPTS-	:	358
SERPINB4	297	:	DTLRTRMGVDFNG-DADLSGMTW--SHGLVSVKVLHKAFFVEVTEECVFAAAAATAVVVELLSSPS-	:	358
SERPINB5	286	:	ASLESLGLKSLFNESSTDFSGMSE--TKGVSVSNVIRVCLLETEDCGDSIEVPG----SRILQ-	:	343
SERPINB6	284	:	SVLRNLGMTDAFELGKADFSGMS--QTDLSLSKVVHKSFVFNNEECTEAAAATAAIMMMRCAR-	:	344
SERPINB7	289	:	QYLRALGLKDFDESKADLSGLAS--GGRLYISRMHKSYSIEVTEECTEATAATGSNIVEKQLP-	:	350
SERPINB8	281	:	PFLRRICMIDAFDEAKADFSGMST--EKNVPLSKVAHCKFVFNNEECTEAAAATAVVRNRSRCSR-	:	342
SERPINB9	282	:	SVLRHLGIVDAFQGGKADLSGMSA--ERDLCLSKFVHKSFVFNNEECTEAAAASSCFVVAECME-	:	344
SERPINB10	304	:	STLSSMGMSDAFSQSKADFSGMS--ARNLFLSNVHKAFFVEVTEECVFAAAGSGSEIDIRIV-	:	365
SERPINB11	299	:	SLLKPLCVTDLFDNOVKADLSGMS--TKGLYLSKAIHKSFLYLDVSEECTEAAAATGDSIAVKSLLP-	:	360
SERPINB12	312	:	SILQDMGITDIFDETRADLTCLSP--SPNLYLSKIHKTFFVEVDENCTQAAAATG-AVVSERSLR-	:	373
SERPINB13	298	:	AVLAAMGMDAFSEHKADYSGMS--GSLYLAQKFLHSSFVAVTEECTEAAAATG-IGFTVTSAP-	:	359
SERPINC1	333	:	EQLQDMGLVDLRSPEKSKLPCIVAEGRDDLVSDAFHKAFLVNEECSEAAAATAVVIAGRSLNP-	:	397
SERPIND1	388	:	ESLKLMGIRMLFDK-NGNMAELSD--QRIADLFLKQGTITVNEECTQATTVTIVGFMPLS---	:	445
SERPINF1	308	:	KSLQEMKQLQSLFDS--PDFSKITG--KPKILTQVEFRAGFEWNEDCAGTTPSPGLQPAHLTFP-	:	366
SERPINF2	322	:	ATLSQLGLQELHQA--PDLRCISE--QSLVVSQVQSTLLESEVVEAAAATAIAMSRLSLS-	:	380
SERPING1	389	:	SIMEKLEFFDFSYD--LNLCELTE--DPDLQVSAHQTVLELLETVEFAAASAI SVARTLLV-	:	448
SERPINH1	301	:	KHLAGLGLTEAIDKKNADLSRMSG--KKDLYLASVFEATAFELDTDCNPFQDIYGREELRSPK-	:	362

			↓ ↓		
		s1C	s4B	s5B	
SERPINE3	351	:	-RIPIFKADRPFIYFLREPNTGFVFSICRVSNPLD-----	:	384
SERPINE1	348	:	-APEELIMDRPFLFVVRHNPITGVLFMQVMMP-----	:	379
SERPINE2	348	:	-SPPWFIVDRPFLFFIRHNPIGAVLFMQVINKP-----	:	379
SERPINI1	348	:	-LYPQVIVDHPFFFLIRNRRGTILFMCRVMHPEMNTSGHDFEEL-----	:	392
SERPINI2	338	:	-AQSQFIANHPFLFIMKHNPESILFMCRVNPEDTQETIKGRDLDL-----	:	382
SERPINA1	360	:	-IPPEVKFNKPFFVFLMIEQNKSPFMGKVVNPTQK-----	:	394
SERPINA3	365	:	ETRTIVRFNRPFLMIVPTDQNIFFMSKVNTPKQA-----	:	400
SERPINA4	372	:	TNRHILRFNRPFLVVFSTSIQSVLFLGKVVNPTK-----	:	407
SERPINA5	358	:	LNSQRLVFNRPFLMFIVDN--NILFLGKVNRP-----	:	387
SERPINA6	351	:	-KPIILRFNQPHIIMFDHFVWSSFLARVMNPFV-----	:	383
SERPINA7	360	:	FLHPIIQIDRSFMLLLERSIRSIILFLGKVVNPTK-----	:	395
SERPINA8	421	:	-----VTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA-----	:	452
SERPINA9	367	:	PSYFTVSFNRPFLMMITNKAIDGILFLGKVENPTKS-----	:	402
SERPINA10	389	:	---PVIKVDRPFFHFMVYEETSGMLLFLGRVVMPTLL-----	:	421
SERPINB1	348	:	-PEENFTADHPFLFFIRHNSSGSILFLGRFSSE-----	:	379
SERPINB2	384	:	-GGPQFVADHPFLFLIMHKINICILFCGRFSSE-----	:	415
SERPINB3	359	:	-TNEEFHCNHPPFLFFIRONKINSILFCGRFSSE-----	:	390
SERPINB4	359	:	-TNEEFCCNHPPFLFFIRONKINSILFCGRFSSE-----	:	390
SERPINB5	344	:	-HKDEFKADHPFLFIVRHNKIRNIVFLCKFSSE-----	:	375
SERPINB6	345	:	-FVPRFCADHPFLFFIQHSKINGILFCGRFSSE-----	:	376
SERPINB7	351	:	-QSTLFRADHPFLFVIRK--DDIILFSGKVSCP-----	:	380
SERPINB8	343	:	-MEPRFCADHPFLFFIRHHKINICILFCGRFSSE-----	:	374
SERPINB9	345	:	-SGPRFCADHPFLFFIRHNRANSILFCGRFSSE-----	:	376
SERPINB10	366	:	-PSIEFNANHPFLFFIRHNKINTILFCGRFSSE-----	:	397
SERPINB11	361	:	-MRAQFKANHPFLFFIRHHTINTILFCCKLASE-----	:	392
SERPINB12	374	:	-SWVEFNANHPFLFFIRHNKIQITILFCGRVCSPE-----	:	405
SERPINB13	360	:	-GHENVHCNHPPFLFFIRHNESNSILFCGRFSSE-----	:	391
SERPINC1	398	:	-NRVTFKANRPFLVFLREVPLNTIIFMCRVANPCVK-----	:	432
SERPIND1	446	:	-TQVRFVDRPFLFLVYEHRTSCLFLMCRVANPSRS-----	:	480
SERPINF1	367	:	---LDYHLNQPHIFVLRDTHGALLFTGKILDRG-----	:	398
SERPINF2	381	:	---SFSVNRPPFLFFIFEDTIGLPLVGSVRNPNPSAPRELKEQDQSPGNKDFLQSLKGFPRGDK-	:	441
SERPING1	449	:	----FEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVVDPERA-----	:	478
SERPINH1	363	:	----LFYADHPHIFLVRDTQSGSLFLFCRLVREKGDKMRDEL-----	:	400

```

SERPINE3      : ----- :
SERPINE1      : ----- :
SERPINE2      : ----- :
SERPINI1      : ----- :
SERPINI2      : ----- :
SERPINA1      : ----- :
SERPINA3      : ----- :
SERPINA4      : ----- :
SERPINA5      : ----- :
SERPINA6      : ----- :
SERPINA7      : ----- :
SERPINA8      : ----- :
SERPINA9      : ----- :
SERPINA10     : ----- :
SERPINB1      : ----- :
SERPINB2      : ----- :
SERPINB3      : ----- :
SERPINB4      : ----- :
SERPINB5      : ----- :
SERPINB6      : ----- :
SERPINB7      : ----- :
SERPINB8      : ----- :
SERPINB9      : ----- :
SERPINB10     : ----- :
SERPINB11     : ----- :
SERPINB12     : ----- :
SERPINB13     : ----- :
SERPINCL1     : ----- :
SERPIND1      : ----- :
SERPINF1      : ----- :
SERPINF2      : 442 : LFGPDLKLVPPMEEDYPQFGSPK : 464
SERPING1      : ----- :
SERPINH1      : ----- :

```

8.4 Computer-Programme

Programm	Verwendung	Hersteller/Webadresse
Mascot	MALDI-TOF-MS, Massenabgleich	http://www.matrixscience.com/
<i>Oligo Analyzer 3.0</i>	Primer-Design	http://eu.idtdna.com/home/welcome.aspx
CLUSTALW	DNA-Alignments	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/ (Chenna <i>et al.</i> , 2003)
DIALIGN	DNA-Alignments	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/ (Subramanian <i>et al.</i> , 2005)
SignalP 3.0	Signalpeptid-Vorhersage	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ (Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)
Spidey	Alignment von cDNA und genomischer DNA	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/
BLAST	Homologie-Suche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
ScanProsite	Protein-Analyse	http://www.expasy.org/tools/scanprosite/ (De Castro <i>et al.</i> , 2006)
Swiss-Model	Homologie-Modellierung	http://swissmodel.expasy.org/ (Schwede <i>et al.</i> , 2003)
Swiss PDB-Viewer 3.7	3D-Strukturen von Proteinen	http://www.expasy.org/spdbv/

8.5 Abkürzungsverzeichnis

α_1 -PDX	α_1 -Antitrypsin-Portland
ACN	Acetonitril
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ARP	<i>acidic ribosomal protein p0</i>
AS	Aminosäure
<i>Bl</i>	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>
Bp	Basenpaar
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CRES	<i>cystatin-related epididymal spermatogenic protein</i>
CRR	Cystein-reiche Region
<i>cv</i>	<i>column volume</i>
dec-RVKR-cmk	Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Reinstwasser
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMP	Dimethylpimelimidatdihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi-intermediate compartment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FPLC	<i>fast permormance liquid chromatography</i>
<i>g</i>	Erdschleunigung (9,81 m/s ²)
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k_{ass}	apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

LMW	<i>low molecular weight</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Proteinkonvertase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEI	Polyethylenimin
<i>Pfu</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
<i>ppm</i>	<i>parts per million</i>
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
RSL	<i>reactive site loop</i> , reaktive Schleife
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Serpin	Serin-Protease-Inhibitor
SF	serumfrei
SI	Stöchiometrie der Inhibierung
Sp	Signalpeptid
T _A	Primer- <i>Annealing</i> -Temperatur
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
U	<i>Units</i>
ÜN	über Nacht
v/v	<i>volume / volume</i>
w/v	<i>weight / volume</i>

8.6 Serpinnomenklatur

Serpin	Synonym/Erklärung
SERPINA1	α_1 -Antitrypsin
SERPINA3	α_1 -Antichymotrypsin
SERPINA6	<i>corticosteroid binding globulin</i> , CBG
SERPINA7	<i>thyroxine binding globulin</i> , TBG
SERPINA8	Angiotensinogen
SERPINB5	Maspin
SERPINB8	Proteinase-Inhibitor 8, PI8
SERPINC1	Antithrombin
SERPIND1	Heparinkofaktor II, HCII
SERPINE1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, PAI-1
SERPINE2	Nexin-1
SERPINF1	<i>pigment epithelium-derived factor</i> , PEDF
SERPINH1	<i>heat shock protein 47</i> , Hsp47
SERPINI1	Neuroserpin
SERPINI2	Pancrepin
<i>Dm-Spn4A</i>	Furin hemmende Splicevariante des Spn4-Gens, besitzt ein N-terminales Signalpeptid
<i>Dm-Spn4E</i>	Furin hemmende Splicevariante des Spn4-Gens, besitzt kein N-terminales Signalpeptid
<i>Dm-Spn4A/E</i>	Generelle Bezeichnung für Furin hemmende Spn4-Varianten