

# **Identifizierung von Zielproteasen für das multifunktionelle Serpin-Gen Spn4**

genehmigte

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Dipl.-Biochem. Mareke Oley**

Technische Fakultät der Universität Bielefeld

April 2006



*Die ärgsten Feinde der Hauptsache  
sind die wichtigen Nebensachen!*

Friedrich von Bodelschwingh



## **Danksagungen**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermann Ragg für das interessante Thema und die tolle Betreuung, insbesondere für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Das Serpin-Virus hat mich sofort gepackt und bisher nicht losgelassen!

Vielen Dank an Dr. Jörg Bartsch, der sofort zugesagt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen. Ralf, Caterina, Kristian, meine Schwester Grita und meine Eltern haben mir mit ihren Korrekturen in den letzten Monaten sehr geholfen. Danke!

Herzlichen Dank an meine Mädels (Schäfchen) Caterina, Martina und Steffi und alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Zelluläre Genetik und Zellkulturtechnik, es hat Spaß gemacht mit Euch! Heino und Ralf mussten häufig meine neusten Kinetikwirren über sich ergehen lassen. Danke für die hilfreichen Diskussionen! Vielen Dank, Heino, für die Beseitigung von Softwareproblemen und die Bereitstellung des FLUOStar-Spektrometers.

Annemarie möchte ich für die Durchführung der Zellkultivierungen und von zahlreichen Western-Blots danken. Auch die Ehemaligen Ulf und Olaf müssen als freundliche Helfer genannt werden. Sie haben mir einen reibungslosen Einstieg in die Thematik und in die Methoden ermöglicht.

Ohne die Unterstützung von Mitarbeitern anderer Arbeitsgruppen der Universität Bielefeld wäre die Umsetzung mancher Projekte nicht möglich gewesen: Vielen Dank an Dr. Matthias Letzel (Organische Chemie I, Fakultät für Chemie) für die massenspektrometrischen Messungen und an Nickels Jensen und André Roszik (AG Genetik, Fakultät für Biologie) für ihre Unterstützung bei der Immunfluoreszenz. Danke auch an Dr. Kees Rodenburg (Utrecht) und Dr. John Creemers (Leuven) für die Bereitstellung von Vektorkonstrukten und Antikörpern.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Kristian für die gute Laune, bedingungslose Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit. Eigentlich hast Du ein Diplom (h.c) der Biochemie und der Psychologie verdient!

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt vorab veröffentlicht:

Oley, M., Letzel, M.C. & Ragg, H. (2004) Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **577**, 165-169.

Poster, 31th FEBS Congress, Budapest 2005:

Oley, M. & Ragg, H. (2005) Target identification for Spn4, a gene encoding serpin isoforms with alternative reactive site loops. *FEBS J*, **272** (s1), B3-042P.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung und Hintergrund .....	2
2.1	Serpine, irreversible Proteaseinhibitoren.....	2
2.1.1	Struktur und Mechanismus der Serpine .....	2
2.2	Proteasen, Ziele der Serpine .....	6
2.2.1	Serinproteasen der Familien S1 und S8.....	6
2.2.2	Cysteinproteasen der Familie C1.....	8
2.2.3	Serpine als <i>cross-class</i> Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen.....	9
2.3	Das <i>Drosophila</i> Serpin Spn4 .....	10
2.4	Proteinkonvertasen als pharmakologische Ziele .....	12
2.4.1	Domänenstruktur und Funktion von Furin .....	12
2.4.2	Beteiligung von Furin an pathologischen Prozessen und Inhibitoren von Proteinkonvertasen.....	13
2.4.3	Insektenfurine .....	15
3	Ziele der Arbeit.....	18
4	Methoden.....	19
4.1	Material.....	19
4.2	Molekularbiologie .....	19
4.2.1	Plasmidisolierung .....	19
4.2.2	Restriktion .....	20
4.2.3	PCR.....	20
4.2.4	Ortsspezifische Mutagenese .....	20
4.2.5	Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	22
4.2.6	Ligation und T/A-Klonierung.....	23
4.2.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> für Hitzeschocktransformationen .....	23
4.2.8	Transformation und Kultivierung von Bakterien .....	24
4.2.9	Sequenzierung .....	25
4.3	Prokaryotische Expression und Reinigung rekombinanter Serpine .....	26
4.3.1	Expression von Serpinen als Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Tag .....	26
4.3.2	Affinitätsreinigung an Glutathionsepharose.....	26
4.3.3	Abspaltung und Separation der GST-Sequenz mittels TEV-Protease.....	27

4.3.4	Bradford-Test zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
4.4	Zellkultur .....	28
4.4.1	Kultivierung von COS7-Zellen .....	28
4.4.2	Expression rekombinanter Proteine in COS7-Zellen .....	28
4.4.3	Kultivierung von S2- und Sf9-Zellen .....	29
4.4.4	Präparation von S2-Extrakten und -Überständen .....	29
4.4.5	Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen.....	30
4.5	Charakterisierung von Proteinen .....	31
4.5.1	SDS-PAGE .....	31
4.5.2	Western-Blot.....	32
4.5.3	Partielle Reinigung des Anti-GST-Spn4-Antiserums.....	33
4.5.4	Bildung von Serpin/Proteasekomplexen <i>in vitro</i> .....	34
4.5.5	Massenspektrometrie .....	35
4.5.6	Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation von Spn4A.....	36
4.6	Enzymkinetik.....	38
4.6.1	Titration von Proteasen und SI-Bestimmung .....	38
4.6.2	<i>Progress curve</i> -Methode .....	40
	Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten $K_m$ .....	42
	Bestimmung von $k_{assoc}$ .....	43
5	Ergebnisse.....	44
5.1	Konstruktion von Spn4-Expressionsvektoren .....	44
5.1.1	Herstellung der pKM-Varianten für die prokaryotische Expression.....	44
5.1.2	Herstellung von Expressionsplasmiden für die Untersuchung der Lokalisation von Spn4A in COS7-Zellen.....	47
5.1.3	Konstruktion eines Vektors zur Spn4A-Expression in Insektenzellen.....	47
5.2	Prokaryotische Expression und Reinigung der Spn4-Varianten .....	48
5.3	Nachweis der inhibitorischen Aktivität und Protease- <i>Screening</i> .....	53
5.3.1	Bildung SDS-stabiler Komplexe von Spn4E mit der S8-Protease Furin .....	54
5.3.2	Komplexbildung mit Zielproteasen der S1-Serinproteasefamilie .....	55
5.3.3	Komplexbildung mit Cysteinproteasen der Familie C1 .....	58
5.4	Kinetische Charakterisierung der Hemmung von Zielproteasen.....	60
5.4.1	SI-Bestimmung für die Hemmung von Furin durch Spn4E.....	60
5.4.2	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{assoc}$ für die Hemmung von Furin durch Spn4E.....	62



5.4.3	Stöchiometrie der Hemmung von CatS bzw. L durch Spn4F und G .....	64
5.4.4	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{assoc}$ für die Hemmung von CatS bzw. CatL durch Spn4F und G .....	65
5.4.5	Hemmung von Elastase durch Spn4F, G und H.....	69
5.5	Untersuchungen zur Funktion des Furininhibitors Spn4A/E .....	72
5.5.1	Identifikation der Furinspaltstelle.....	72
5.5.2	Signalpeptid und HDEL-Motiv bewirken die Lokalisation von Spn4A im endoplasmatischen Retikulum.....	74
5.5.3	Nachweis von endogenem Spn4A/E in <i>Drosophila</i> Schneider 2-Zellen .....	76
5.5.4	<i>Drosophila</i> Furin1 und 2 als mögliche endogene <i>targets</i> von Spn4A .....	78
5.5.5	Hemmung der Konvertaseaktivität durch Spn4A im Zellkulturmodell .....	80
6	Diskussion .....	82
6.1	Die Spn4-Varianten sind inhibitorische Serpine mit einem breiten Spektrum an Zielproteasen .....	82
6.1.1	Die Reinigung der aktiven Serpine Spn4E, F, G und H.....	82
6.1.2	Hemmung von Proteasen aus drei verschiedenen Peptidaseklassen aufgrund unterschiedlicher RCL-Sequenzen .....	82
6.1.3	Die Spn4-Varianten sind wirksame Inhibitoren, die Proteasen schnell inaktivieren.....	85
6.1.4	Breite zelluläre Lokalisation der Spn4-Varianten .....	88
6.1.5	Mögliche Rolle von Spn4 in der angeborenen Immunität.....	89
6.2	Spn4A als Inhibitor des humanen Furins .....	91
6.2.1	Die Struktur von Furin erklärt die Bindung des Motivs RRKR.....	91
6.2.2	Spn4A und Spn4AΔHDEL als Furininhibitoren im sekretorischen Pfad oder im extrazellulären Raum.....	94
6.3	Hemmung von Insektenfurinen durch Spn4A.....	99
6.3.1	S2-Zellen als Modellsystem für die Hemmung von <i>Drosophila</i> SPCs durch Spn4A.....	99
6.3.2	Spn4A als <i>in vivo</i> -Regulator von Insekten SPCs .....	101
6.4	Fazit .....	102
7	Literaturverzeichnis.....	103
8	Anhang .....	115
8.1	Materiallisten.....	115
8.2	Vektorkarten.....	118

## Inhaltsverzeichnis

---

8.2.1	pKM-263 und Derivate.....	118
8.2.2	pcDNA3.1(+) und Derivate .....	119
8.2.3	pIZ/V5-His und Derivate.....	120
8.3	Codierende Sequenzen der Spn4-Isoformen .....	121
8.3.1	Codierende Sequenz von Spn4A .....	121
8.3.2	Codierende Sequenz von Spn4E .....	123
8.3.3	Individuelle RCL-Sequenzen der Spn4-Varianten B/F, C/G, D/H .....	125
8.3.4	Primer .....	126
8.4	Abkürzungen .....	127

## 1 Zusammenfassung

Serpine sind metastabile Proteaseinhibitoren, die ihre Zielenzyme irreversibel hemmen. Sie besitzen eine exponierte Schleife (*reactive centre loop*, RCL), die der Protease als Substrat präsentiert wird. Auf die Bindung der Protease folgen Konformationsänderungen, die das Enzym deformieren und somit inaktivieren. Die Aminosäuresequenz im RCL der Serpine bestimmt, welche Proteasen gehemmt werden.

Das Spn4-Gen aus *Drosophila melanogaster* wird differenziell gespleißt und codiert Serpinvarianten mit vier unterschiedlichen RCLs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier Spn4-Varianten rekombinant produziert, gereinigt und auf Proteinebene untersucht.

Für alle vier Serpine wurden Proteasen identifiziert, die irreversibel und mit physiologisch relevanten Geschwindigkeiten inhibiert werden. Die aufgrund der großen Unterschiede im RCL postulierten unterschiedlichen Proteasespezifitäten der einzelnen Varianten konnten experimentell bestätigt werden. Variante Spn4A/E inhibiert humanes Furin, eine subtilisinähnliche Proproteinkonvertase der Serinproteasefamilie S8. Die Isoform Spn4D/H inhibiert die S1-Protease neutrophile Elastase. Die Varianten Spn4B/F und C/G hemmen nicht nur die S1-Proteasen Chymotrypsin und Elastase, sondern auch Cysteinproteasen der Familie C1 und sind die ersten bekannten *cross-class* Serpine aus *Drosophila*. Spn4 ist damit das erste beschriebene Gen, welches auf der Basis eines gemeinsamen Serpingerüsts die Expression von Isoformen ermöglicht, die Proteasen aus drei verschiedenen Klassen regulieren können.

Die für die Embryonalentwicklung von Säugern essenzielle Protease Furin ist im sekretorischen Pfad lokalisiert und prozessiert durch Spaltung C-terminal von multibasischen Motiven eine Vielzahl von Vorläuferproteinen. Durch ihre Beteiligung an pathologischen Prozessen wie Tumormetastasierung, HIV-Infektion oder Aktivierung des *Bacillus anthracis*-Toxins ist ihre Hemmung von pharmakologischem Interesse.

Spn4A/E wurde in dieser Arbeit als schnellster bisher bekannter Furininhibitor charakterisiert. Die Sequenzabfolge Arg-Arg-Lys-Arg im RCL des Serpins wurde als reaktives Zentrum für die Interaktion mit Furin bestätigt. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass das Serpin im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und somit als Werkzeug zur Hemmung von Furin *in vivo* dienen kann.

Die RCL-Variante A/E könnte ein natürlicher Inhibitor der Furine 1 und 2 von *Drosophila* sein, denn das rekombinante Serpin bildet kovalente Komplexe mit löslichen Formen von beiden Konvertasen. Weiterhin haben Kotransfektionsstudien gezeigt, dass die Prozessierung des Furinsubstrats Apolipoprotein in Insektenzellen durch das Serpin gehemmt wird.

## 2 Einleitung und Hintergrund

### 2.1 Serpine, irreversible Proteaseinhibitoren

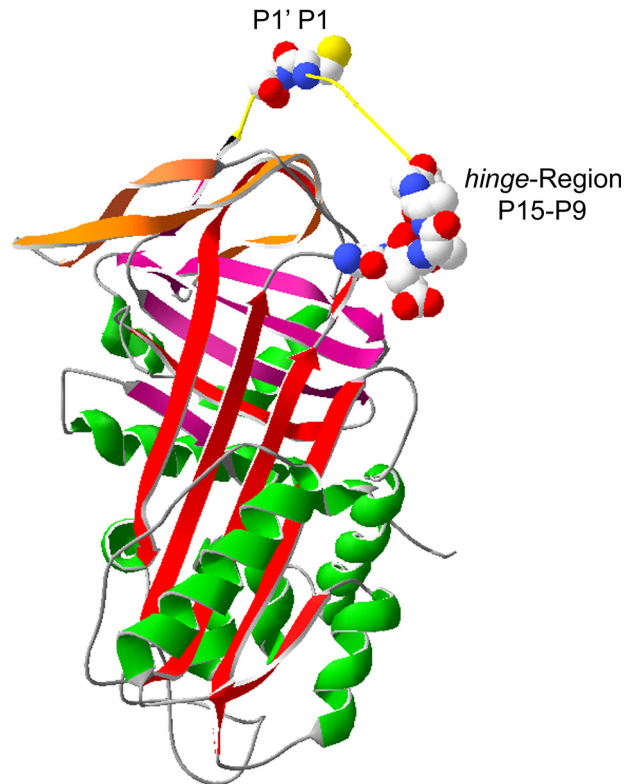
Die sequenzspezifische Hydrolyse von Peptidbindungen durch Proteasen ist eine grundlegende Reaktion vieler gut kontrollierter biologischer Prozesse wie der Embryonalentwicklung, Blutgerinnung oder Komplementaktivierung. Weiterhin ist die proteolytische Prozessierung die wichtigste posttranslationale Modifikation von Proteinen. Damit die Proteolyse räumlich oder zeitlich begrenzt bleibt, sind Regulatoren unerlässlich.

Serpine (Serinproteaseinhibitoren) sind Proteine, die durch einen einzigartigen Mechanismus Proteasen spezifisch und irreversibel hemmen. Sie sind genauso vielfältig wie die Zielenzyme, die von ihnen inaktiviert werden. Serpine bilden die am weitesten verbreitete Superfamilie von Proteaseinhibitoren und kommen in Eukaryoten, Viren, Bakterien sowie Archaeobakterien vor (Hunt and Dayhoff, 1980, Irving *et al.*, 2002c, Rawlings *et al.*, 2004, Roberts *et al.*, 2004).

#### 2.1.1 Struktur und Mechanismus der Serpine

Serpine sind sogenannte Suizid-Inhibitoren, die den Mechanismus der Protease für deren Inhibition nutzen. Nach der initialen Acylierung des Serpins findet nicht, wie bei einem Substrat, eine Deacylierung statt, sondern die Protease wird in diesem kovalenten Acylkomplex gefangen und durch Deformation des reaktiven Zentrums deaktiviert (Huntington *et al.*, 2000, Dementiev *et al.*, 2006). Die stabilen Komplexe werden aus dem Organismus entfernt, so dass eine irreversible Inaktivierung der Protease resultiert. Typische Serpin/Serinprotease-Komplexe sind SDS- und hitzestabil und lassen sich mittels Western-Blotting nachweisen.

Voraussetzung für die gravierenden Konformationsänderungen ist die metastabile Struktur des aktiven Serpins (Abbildung 1), welche im Folgenden am Beispiel des gut charakterisierten Serpins  $\alpha_1$ -Antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT) erläutert wird (Gettins, 2002). Die strukturellen Erfordernisse erklären auch, warum Serpine mit einem Molekulargewicht von 40-60 kDa meist größer sind als die Zielproteasen. Die Tertiärstruktur aller Serpine besteht aus einer einzelnen globulären Domäne aus drei  $\beta$ -Faltblättern (sA-sC) und acht bis neun  $\alpha$ -Helices (hA-hI) (Gettins, 2002). Obwohl diese grundlegenden Strukturelemente konserviert sind, beträgt die Identität der bis zu 480 Aminosäuren einzelner Familienmitglieder nur 30-60 %. Serpine können weiterhin N- oder C-terminale Extensionen oder posttranslationale Modifikationen wie Glykostrukturen aufweisen.



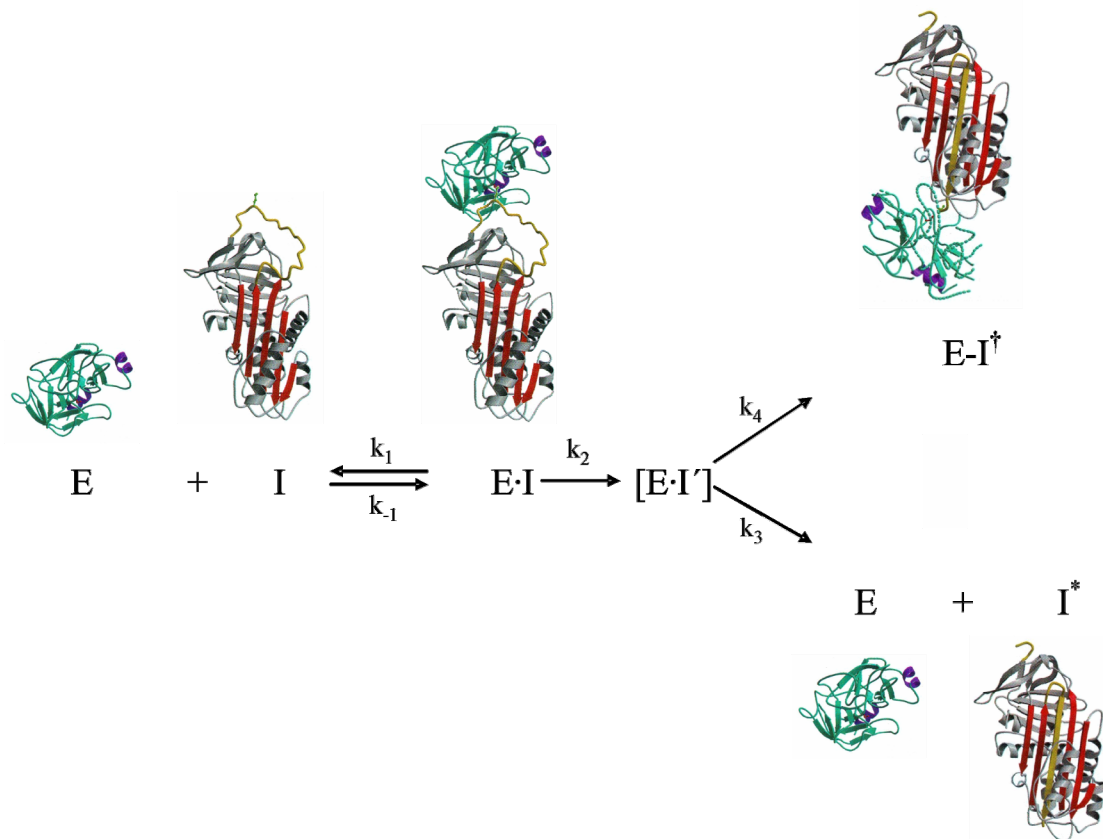
#### Abbildung 1 Serpinstruktur am Beispiel von $\alpha_1$ -Antitrypsin

Wichtige Strukturelemente von Serpinen sind die drei  $\beta$ -Faltblätter (sA-sC, dargestellt in rot, pink bzw. orange), neun  $\alpha$ -Helices (grün) und der exponierte *reactive centre loop* (RCL, dargestellt in gelb). Kleine Aminosäuren im Bereich des Scharniers (*hinge*) ermöglichen ein Einklappen des RCL ins  $\beta$ -Faltblatt A unter Transition von einer gespannten in eine entspannte Konformation (siehe auch Abbildung 2). Zwischen den Aminosäurepositionen P1 und P1' (nach der Nomenklatur von Schechter und Berger) findet die Spaltung des RCL statt (Schechter and Berger, 1967), siehe auch Abschnitt 2.2.1. Die Aminosäuren der *hinge*-Region (GTEAAGA) sowie die Aminosäuren an P1 und P1' (Methionin, Serin) sind in der Kalottendarstellung gezeigt. Die Abbildung wurde mit PDB-viewer (SwissProt) erstellt.

Am wichtigsten für den Inhibitionsmechanismus sind das  $\beta$ -Faltblatt A (dargestellt in rot), welches fast das gesamte Protein überspannt, und die exponierte reaktive Schleife (*reactive centre loop*, RCL, dargestellt in gelb) des Serpins. Die Schleife wird Zielproteasen als Pseudosubstrat präsentiert, und ihre Aminosäuresequenz bestimmt die Proteasespezifität. Bei den meisten Serpinen ist der N-terminale Bereich des RCL bis zur Spaltstelle 17 Aminosäuren lang, und die Aminosäurepositionen (P1, P1') stimmen mit denjenigen von  $\alpha_1$ -AT überein. Im nativen Zustand liegt das Serpin in einer gespannten Konformation vor. Die Spaltung des RCL durch die Zielprotease ermöglicht eine Integration des RCL als weiteren Strang in das  $\beta$ -Faltblatt A, das nun vollständig antiparallel ist. Die Relaxation des Serpins ist mit einer Translokation der Protease verbunden, die kovalent über die Esterbindung an den Inhibitor gebunden bleibt (Abbildung 2). Damit verbunden ist eine Deformation des reaktiven Zentrums der Protease (Huntington *et al.*, 2000, Dementiev *et al.*, 2006).

Inhibitorische Serpine weisen im N-terminalen Bereich des RCL ein hoch konserviertes Peptidmotiv auf, welches vornehmlich aus Alaninresten besteht. Dieser als Scharnier (*hinge*) bezeichnete Sequenzabschnitt kleiner Aminosäuren ermöglicht das Einklappen und somit die Insertion des RCL. Es gibt auch nicht-inhibitorische Serpine, die z. B. als Chaperon bei der Proteinfaltung, dem Hormontransport oder der Blutdruckregulation dienen (Silverman *et al.*, 2001). Sie gehören aufgrund ihrer Tertiärstruktur zur Serpinfamilie, tragen aber andere Aminosäuren in der *hinge*-Region (Gettins, 2002).

Die Geschwindigkeit der *loop*-Insertion ist entscheidend für eine erfolgreiche Inhibition der Protease. Wenn diese Reaktion viel langsamer ist als die konkurrierende Deacylierung (Abbildung 2,  $k_4 \ll k_3$ ), wie z. B. im Fall von mutierten Serpinen oder bei der Interaktion mit unpassenden Proteasen, fungiert ein Großteil der Serpinmoleküle als Substrat. Die Serpine werden gespalten und gehen, ohne die Protease zu hemmen, in den entspannten und somit inaktiven Zustand über. Das Auftreten einer möglichen Konkurrenzreaktion zur Hemmung wird über den *branched-pathway*-Mechanismus beschrieben (Abbildung 2).



**Abbildung 2 *Branched-pathway*-Mechanismus (nach Huntington et al., 2000, Gettins, 2002)**

Bei der Interaktion von Proteasen mit inhibitorischen Serpinen bildet sich zunächst ein nicht-kovalenter Michaelis-Komplex  $E \cdot I$ . Nach der Acylierung unter Abspaltung des C-Terminus des Serpins sind zwei Reaktionswege möglich: Die irreversible Hemmung der Protease unter Bildung eines stabilen Komplexes ( $E \cdot I^\dagger$ ) oder die Deacylierung, verbunden mit der Freisetzung eines inaktiven Serpins und der aktiven Protease. Bei physiologischen Serpin/Proteaseinteraktionen tritt fast nur der Hemmpfad auf, denn  $k_4$  ist viel größer als  $k_3$ . Die Abbildung wurde aus (Krüger, 2003) entnommen und abgewandelt.

---

Das Verhältnis von Hemmreaktion zu Substratreaktion wird Stöchiometrie der Inhibition genannt. Der SI-Wert wird über die in Abbildung 2 angegebenen Geschwindigkeitskonstanten beschrieben:  $SI = (k_3 + k_4) / k_4$ . Bei der quantitativen Hemmung ist  $SI = 1$ , und wenn  $SI = 2$  ist, laufen Hemmung und Deacylierung gleich schnell ab.

## 2.2 Proteasen, Ziele der Serpine

Proteasen werden entsprechend ihres katalytischen Zentrums, der dreidimensionalen Struktur und ihres Mechanismus klassifiziert (Rawlings and Barrett, 1993). Die Einteilung in Familien berücksichtigt weiterhin die Reihenfolge der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren in der Primärstruktur der Enzyme.

Bei Serin- und Cysteinproteasen wird die Proteolyse eines Substrates durch einen nukleophilen Angriff des namensgebenden katalytischen Serins bzw. Cysteins eingeleitet. Bei dieser Reaktion bildet sich ein kovalent an das Enzym gebundenes Ester- bzw. Thioesterintermediat. Diese kovalente Bindung an die Protease ist die Voraussetzung für die Hemmung durch Serpine. Obwohl die meisten Serpine – wie der Name schon sagt – Serinproteasen inhibieren, gibt es aber auch mehrere Beispiele für die Hemmung von Cysteinproteasen. Sowohl Cathepsine als auch Caspasen wurden als Zielproteasen für Serpine beschrieben (Schick *et al.*, 1998, Annand *et al.*, 1999).

Im Folgenden werden kurz die Eigenschaften der Serinproteasenfamilien S1 und S8 sowie die der Cysteinproteasefamilie C1 zusammengefasst, da sie für diese Arbeit von Bedeutung sind.

### 2.2.1 Serinproteasen der Familien S1 und S8

Die größte Peptidasefamilie S1 repräsentiert die chymotrypsinähnlichen Serinproteasen. Die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin sind die bekanntesten und am besten charakterisierten Vertreter dieser Familie und wurden schon in den 30er Jahren aus dem Saft des Pankreas isoliert und kristallisiert (Graf *et al.*, 2004). Das aktive Zentrum wird durch die drei Aminosäuren His 57, Asp 102 und Ser 195 gebildet, die sogenannte katalytische Triade. Während das katalytische Serin direkt mit dem Substrat interagiert, fungiert das Histidin als Protonenakzeptor. Die entstehende positive Ladung wird durch den unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Aspartatrest gepuffert, welcher als Base ein Proton akzeptiert (Hunkapiller *et al.*, 1973, Hunkapiller *et al.*, 1976). Durch den nukleophilen Angriff des Ser 195 am Carbonylkohlenstoff des Peptids bildet sich ein tetraedrisches Intermediat, und die entstehende negative Ladung am Carbonylsauerstoff wird durch Wasserstoffbrücken zu den Peptidaminogruppen von Ser 195 und Glu 193 stabilisiert (Ruhlmann *et al.*, 1973).

Die meisten Familienmitglieder werden mit einem N-terminalen Signalpeptid exprimiert und werden durch Abspaltung eines Propeptids aktiviert (Rawlings and Barrett, 2004b). Dieses kann, wie im Fall von Chymotrypsin, über Disulfidbrücken an das Proteingerüst gebunden bleiben.



Die S1-Proteasen bestehen aus zwei nahezu identisch gefalteten Domänen aus  $\beta$ -Faltblättern, die punktsymmetrisch angeordnet sind. Die Furche zwischen ihnen dient der Substratbindung und enthält die katalytischen Aminosäuren und weist spezifische Bindetaschen (*subsites*) für jeweils einen Aminosäurerest der Peptidsubstrate auf. Die Aminosäurepositionen von Substraten/Inhibitoren von Proteasen werden entsprechend der Nomenklatur von Schechter und Berger N-terminal der Spaltstelle mit P1, P2, ... und die C-terminal mit P1', P2', ... bezeichnet (Schechter and Berger, 1967). Die entsprechenden Bindetaschen der Protease heißen ... S2, S1 S1', S2', ... . Die Mitglieder der Familie S1 sind Endopeptidasen, und ihre Substratspezifität wird häufig über die S1-Tasche determiniert (Sichler *et al.*, 2002). Für eine effiziente Spaltung der Peptidbindung eines Substrats muss die P1-Aminosäure optimal in die S1-Tasche des Enzyms passen. Es gibt drei grundsätzliche P1-Präferenzen von S1-Proteasen. Die bevorzugten Substrate von Enzymen mit Chymotrypsinspezifität tragen an P1 entweder aromatische oder große hydrophobe Aminosäuren, Proteasen vom Trypsintyp basische und die vom Elastasetyp kleine aliphatische Aminosäuren. Elastase ist in der Lage, unlösliches Elastin zu hydrolysieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Modellierung der extrazellulären Matrix. Im extrazellulären Raum wird die Aktivität der neutrophilen Elastase durch das Serpin  $\alpha_1$ -AT eingedämmt, und eine übermäßige Freisetzung des Enzyms ist mit entzündlichen Krankheiten der oberen Luftwege verbunden (Navia *et al.*, 1989, Dahlen *et al.*, 1999). Weitere Beispiele für Krankheiten, die durch ein Missverhältnis von S1-Protease- und regulierenden Serpinmolekülen verursacht werden, sind thrombotische Störungen durch Antithrombin III (ATIII)-Defizienz (Mitchell *et al.*, 1991). Ein Mangel des Inhibitors der Komplementkomponente C1 (C1-I) führt zum erblichen Angioödem. Wasseransammlungen in der Lunge können hierbei zur Erstickung führen (Carugati *et al.*, 2001).

Die zweitgrößte Familie von Serinproteasen ist die der subtilisinähnlichen Enzyme S8. Auch diese Proteasen verfügen über eine katalytische Triade und spalten Substrate über den oben beschriebenen Mechanismus. Die von den S1-Vertretern abweichende Reihenfolge der drei katalytischen Aminosäuren in der Primärstruktur der Proteasen (Asp, His, Ser) und die abweichende Raumstruktur deuten auf die unabhängige Evolution der beiden Familien (Rawlings and Barrett, 1993). Die meisten Mitglieder sind bakteriellen Ursprungs und zeigen eine chymotrypsinähnliche Substratspezifität.

Subtilisin besteht aus einem verdrehten  $\beta$ -Faltblatt aus sieben parallelen  $\beta$ -Strängen und einem antiparallelen  $\beta$ -Strang und aus sieben  $\alpha$ -Helices (Bode *et al.*, 1987). Die S8-Proteasen von Eukaryoten weisen neben der subtilisinähnlichen katalytischen Domäne noch weitere

Strukturelemente auf. Die sogenannten Proproteinkonvertasen aktivieren Proteine durch Spaltung C-terminal von basischen Motiven (Steiner, 1998, Taylor *et al.*, 2003).

Genauerer zur Domänenstruktur und Funktion der am besten charakterisierten humanen Proproteinkonvertase Furin ist in Abschnitt 2.4.1 beschrieben.

### **2.2.2 Cysteinproteasen der Familie C1**

Die Cysteinproteasen der Papainfamilie C1 werden zwei Subfamilien C1A und C1B zugeordnet. Während die große Familie C1A aus sekretorischen und lysosomalen Peptidasen wie Papain aus *Carica papaya* und den mammalischen Cathepsinen B, K, L, S besteht, beinhaltet C1B eine kleine Gruppe intrazellulärer Enzyme (Rawlings and Barrett, 2004a).

Auch Cysteinproteasen katalysieren die Substrathydrolyse über einen Acylierungs-/Deacylierungsmechanismus, der in diesem Fall über den nukleophilen Thiolatschwefel des Cysteins eingeleitet wird. Im Unterschied zu Serinproteasen werden die katalytischen Aminosäuren Cys 25 und His 159 (katalytische Diade) des Papains nicht erst bei Substratbindung ionisiert, sondern liegen bereits als aktives Thiolat-Imidazol-Ionenpaar vor (Storer and Menard, 1994, Otto and Schirmeister, 1997). Die Struktur der C1A-Proteasen ist stark konserviert. Die Enzyme bestehen aus einer rechten Domäne (R), die aus drei  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist und einer linken (L), die von  $\beta$ -Strängen dominiert wird ( $\beta$ -Fass). Die Domänen umschließen eine V-förmige Vertiefung, die der Substratbindung dient. Bevorzugte Substrate für C1-Proteasen tragen an der P2-Position große hydrophobe Aminosäuren (Rawlings and Barrett, 2004a). Die Besetzung der P1-Position ist variabel.

Die Hauptaufgabe der bekanntesten mammalischen Vertreter dieser Familie (Cathepsine B, L und S) liegt in der lysosomalen Proteindegradation. Da Cathepsine in vielen Tumoren überexprimiert werden (Frade *et al.*, 1998) und ihre unkontrollierte Freisetzung ins extrazelluläre Milieu mit Entzündungsreaktionen verbunden ist, werden sie zunehmend als pharmakologisches Ziel betrachtet (Turk *et al.*, 2002). Untersuchungen an *knock out*-Mäusen und Studien zur Gewebsverteilung führten zur Entdeckung spezieller Funktionen. So wird Cathepsin S (CatS) im Gegensatz zu den ubiquitären Cathepsinen B und H hauptsächlich in der Milz und in Lymphknoten produziert und ist an der korrekten Prozessierung von MHC-Klasse-II-Molekülen beteiligt (Kirschke *et al.*, 1986, Riese *et al.*, 1996). Auch Cathepsin L spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation. Weiterhin ist diese Cysteinprotease an der Prohormonkonversion und Spermatogenese beteiligt (Wright *et al.*, 2003, Hook *et al.*, 2004).

Cathepsin B (CatB) unterscheidet sich von den anderen beschriebenen Mitgliedern der Familie C1A. Im Vergleich zu Papain weist das Protein viele Extensionen auf, fungiert auch als Exopeptidase und akzeptiert Arg an der P2-Position von Substraten (Musil *et al.*, 1991, Rawlings and Barrett, 2004a). Aktives CatB konnte nicht nur in Lysosomen, sondern auch extrazellulär nachgewiesen werden (Reddy *et al.*, 1995). Nach Stimulation von Zellen über den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) wird Cathepsin B aus den Lysosomen ins Cytoplasma freigesetzt und fördert die Apoptose von Zellen (Liu *et al.*, 2003). Das Serpin Spi2A ist ein Inhibitor der Protease und kann Zellen somit vor Lysosomen-vermittelter Apoptose schützen.

### 2.2.3 Serpine als *cross-class* Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen

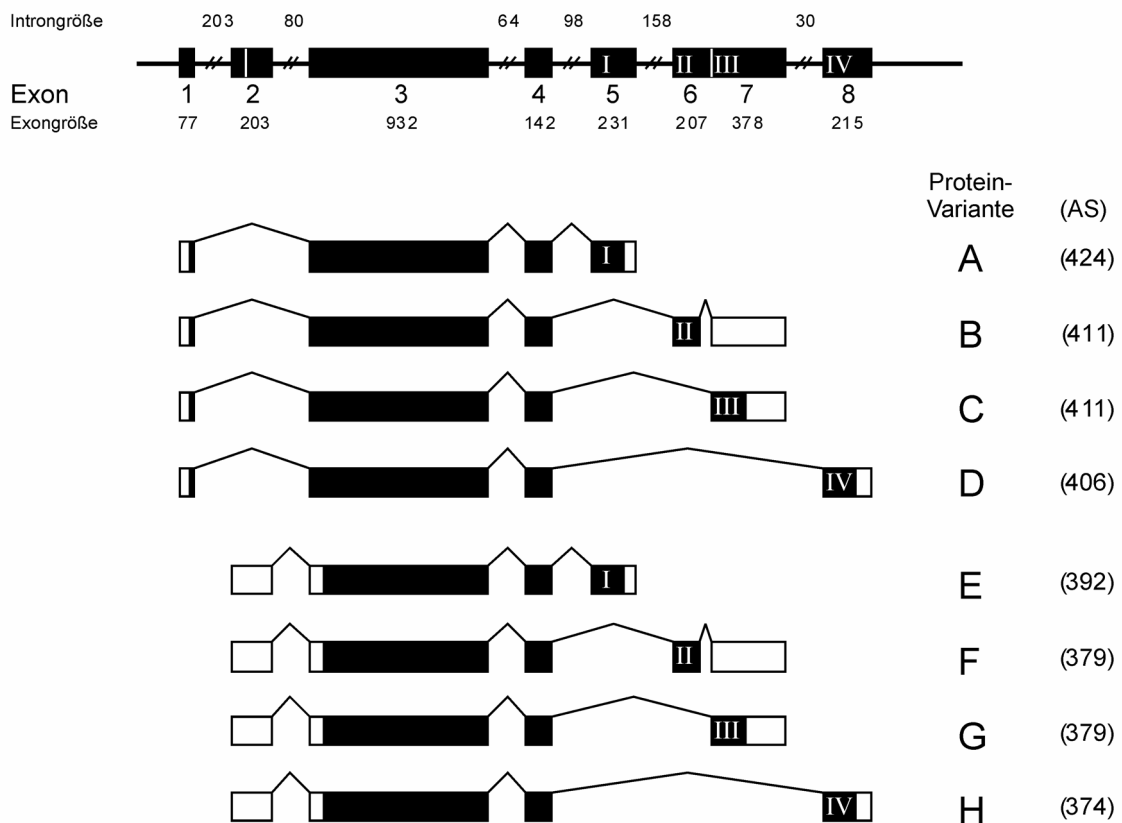
Im Gegensatz zu Spi2A, für das bisher nur eine Hemmung von CatB nachgewiesen wurde, sind Cysteinprotease-inhibierende Serpine vielfach außerdem in der Lage Serinproteasen zu hemmen (Komiya *et al.*, 1994, Schick *et al.*, 1998). Solche sogenannten *cross-class* Inhibitoren wurden bisher in Säugern und Viren gefunden. Wahrscheinlich haben sie sich aus klassischen Serpinen entwickelt, deren Struktur grundsätzlich auch die Hemmung von Cysteinproteasen ermöglicht (Irving *et al.*, 2002a). Hinweise darauf sind die Erhaltung des RCL und des Inhibitionsmechanismus über die Ausbildung eines kovalenten Komplexes (Christeller, 2005). Obwohl Thioesterbindungen unter physiologischen Bedingungen stabil sind, war es dennoch nur in Einzelfällen möglich, Komplexe mittels einer Standard SDS-Gelelektrophorese zu detektieren. Das zum Nachweis von kovalenten Serpin/Serinproteasekomplexen etablierte Aufkochen der Proteinproben unter Zusatz von Reduktionsmitteln wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol kann die labilere Thioesterbindung zerstören. Ein röntgenkristallographisch charakterisierter Thioesterkomplex aus Caspase 8 und dem Inhibitor p35, der ähnlich wie Serpine mittels einer exponierten Schleife mit der Cysteinprotease interagiert, ließ sich nur bei pH 4,6 oder unter Verzicht auf Reduktionsmittel im Probenpuffer nachweisen (Xu *et al.*, 2001). Beispiele für *cross-class* Serpine, die S1- und C1-Proteasen hemmen können, sind das Serpin MENT vom Huhn, murines SQN-5, humanes Hurpin und bovines Endopin 2C. (Irving *et al.*, 2002b, Al-Khunaizi *et al.*, 2002, Welss *et al.*, 2003, Hwang *et al.*, 2005).

## 2.3 Das *Drosophila* Serpin Spn4

*Drosophila melanogaster* ist ein beliebter Modellorganismus zur Untersuchung von entwicklungs- und immunbiologischen Fragestellungen (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Rubin, 1988, Hultmark, 1993).

Eine Suche nach ovarial exprimierten Serpinen, die eine Rolle in der Oogenese oder Embryogenese von *Drosophila* spielen könnten, führte zur Identifikation von 6 cDNAs, darunter die von Spn4 (Han *et al.*, 2000). Durch Hybridisierungsexperimente konnten Spn4-codierende mRNAs in Ammenzellen der Ovarien und in mehreren Gewebetypen des Fliegenembryos nachgewiesen werden. Die Reinigung und Charakterisierung einer bakteriell exprimierten His<sub>6</sub>-markierten Form des Serpins war in dieser Studie nicht gelungen.

Im Rahmen der Doktorarbeit von Olaf Krüger wurde die Struktur des Spn4-Gens untersucht und es wurden verschiedene Spleißisoformen identifiziert (Abbildung 3) (Krüger *et al.*, 2002).



**Abbildung 3** Spleißvarianten des *Drosophila* Serpin-Gens Spn4

Das Spn4-Gen besteht aus acht Exons. Durch alternatives Spleißen werden die konstanten Exons 3 und 4 mit einem von zwei möglichen 5' Exons und einem von vier möglichen 3' Exons (I, II, III, IV) kombiniert. Dies führt zur Expression von mRNAs, die für acht verschiedene Serpine codieren (A-H). Die Längen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (AS) der Spn4-Proteinvarianten sind rechts angegeben (entnommen aus Krüger *et al.*, 2002).

Differenzielles Spleißen unter Kombination von jeweils zwei konstanten Exons mit einem von zwei möglichen 5' Exons und einem von vier alternativen 3' Exons führt zur Expression von mRNAs, die für acht verschiedene Serpine codieren (Abbildung 3, siehe auch Anhang, 8.3).

Die unterschiedlichen 3' Exons bestimmen die Sequenz der jeweiligen RCLs und somit die Proteasespezifität der Serpine. Für die mit Exon 1 beginnenden Varianten A-D wurde ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 28 AS abgeleitet, welches bei den mit Exon 2 beginnenden Varianten E-H fehlt (Krüger *et al.*, 2002). Die Serpinvarianten Spn4A und E, Spn4B und F, Spn4C und G, Spn4D und H weisen jeweils den gleichen RCL auf. Die *hinge*-Region wird durch das konstante Exon 4 codiert (Abbildung 3) und zeigt die für inhibitorische Serpine typische Abfolge kleiner Aminosäuren. Bei Annahme eines RCL von jeweils 17 Aminosäuren Länge lassen sich vier verschiedene potenzielle Proteasespaltstellen (Aminosäurepositionen P1-P1') ableiten: K-R, A-S, T-S, V-A.

Die Sequenz von Spn4A weist neben dem Signalpeptid ein weiteres Motiv auf, welches für die Lokalisation des Serpins wichtig sein könnte. Das C-terminale Motiv HDEL, eine Abwandlung der Sequenz KDEL, ist typisch für Proteine, die vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind (Scott *et al.*, 2004). Die Interaktion dieses Tetrapeptids mit dem ERD2 (*ER-retention defective 2*)-Rezeptor im Golgi-Apparat führt zum Rücktransport solcher Proteine ins ER (Pelham, 1990).

Die Ableitung der Aminosäuresequenzen der Spn4-Varianten führte zu der Vermutung, dass das Spn4-Gen die Hemmung verschiedenster Zielproteasen im ER, im extrazellulären Milieu und im Cytoplasma ermöglicht (Krüger *et al.*, 2002). Neben dem potentiellen ER-Rückführungssignal fiel die RCL-Sequenz der Variante A/E durch das tetrabasische Motiv RRKR auf. Dieses entspricht der Konsensussequenz der Proproteinkonvertase Furin, die Substrate C-terminal von RXR/KR spaltet (Steiner, 1998). Dieses Enzym ist im sekretorischen Pfad lokalisiert (Salvas *et al.*, 2005, Anderson *et al.*, 2002) und kam daher als Zielprotease für Spn4A in Frage.

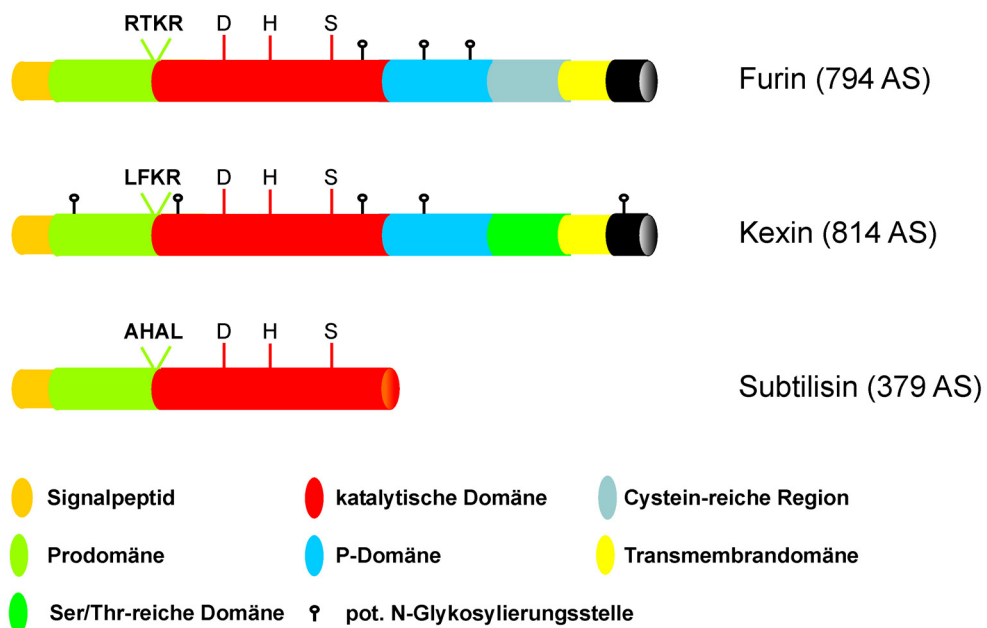
## 2.4 Proproteinkonvertasen als pharmakologische Ziele

Furin gehört zur Familie der subtilisinähnlichen Proproteinkonvertasen (SPCs) (Denault and Leduc, 1996, Steiner, 1998). Diese Calcium-abhängigen Serinproteasen sind verwandt mit dem Hefeprotein Kexin, und die meisten prozessieren im sekretorischen Pfad Proteine durch Spaltungen C-terminal von multibasischen Motiven. Bisher wurden sieben humane SPCs mit dieser Spezifität identifiziert: Furin, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 und PC7 (Fugere and Day, 2005). Da eine Vielzahl von Vorläuferproteinen, bioreaktiven Peptiden aber auch pathogenen Proteinen durch Proteolyse an solchen Motiven aktiviert werden, beeinflussen SPCs fast alle biologischen Prozesse und sind in viele Krankheiten involviert.

Zwei weitere SPCs, NARC-1 und SKI-1, bevorzugen nicht-basische Motive als Substrate (Seidah *et al.*, 2003).

### 2.4.1 Domänenstruktur und Funktion von Furin

Furin, die am besten charakterisierte SPC, ist ein Typ-I Transmembranprotein und wird als Proprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid exprimiert (Abbildung 4).



**Abbildung 4 Domänenstruktur der SPCs**

Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht) der verschiedenen Domänen von humanem Furin, Kexin und Subtilisin Carlsberg. Die katalytischen Aminosäuren und die vier letzten Aminosäuren des Propeptids sind jeweils im Einbuchstabencode gezeigt. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) der Proproteine ist jeweils angegeben. Kexin weist keine Cystein-reiche Region, dafür aber eine Serin/Threonin-reiche Domäne auf. Die autokatalytische Abspaltung des Propeptids erfolgt entsprechend der Substratspezifität bei Furin an einem RXKR-, bei Kexin an einem KR-Motiv und bei Subtilisin C-terminal zu einer großen hydrophoben Aminosäure (vgl. 2.2.1).

Die Prodomäne, die als Chaperon wirkt, wird im ER autokatalytisch abgespalten. Anschließend verbleibt sie nicht-kovalent an die subtilisinähnliche katalytische Domäne gebunden und fungiert als Autoinhibitor (Anderson et al., 2002). Erst nach einer weiteren Prozessierung im Golgi-Apparat dissoziiert das Propeptid ab, und Furin ist vollständig aktiv. Die P-Domäne ist eine Besonderheit der SPCs und kommt in bakteriellen Proteasen der Familie S8 nicht vor. Sie stabilisiert die Proteasen und reguliert die Calcium- und pH-Abhängigkeit (Zhou et al., 1998). Zwischen P- und Transmembrandomäne (TM-Domäne) liegt bei Furin eine Cystein-reiche Domäne (*cystein rich region*, CRR) vor, die für die Freisetzung einer aktiven löslichen Form des Enzyms essenziell ist (Denault et al., 2002). Eine solche proteolytische Abspaltung der extrazellulären/luminalen Domäne von TM-Proteinen (*Shedding*) findet häufig an der Cytoplasmamembran statt, so dass die Proteine ins extrazelluläre Milieu gelangen.

Der nur 56 Aminosäuren lange cytoplasmatische C-Terminus kontrolliert die Lokalisation und Verteilung von Furin im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und im endosomalen System (Thomas, 2002). Furin kann aber auch an der Cytoplasmamembran vorliegen, von wo es vermutlich vermittelt durch die Bindung von Filamin wieder zurück zu den Endosomen transportiert werden kann.

Die weitläufige Verbreitung von Furin im sekretorischen Pfad erklärt die große Anzahl und Diversität von Substraten. Furin ist nicht nur im TGN und in den Endosomen aktiv, sondern auch im ER und an der Cytoplasmamembran. Ob extrazelluläre Proteine von löslichem Furin gespalten werden oder von der membranständigen Form, ist noch umstritten (Denault et al., 2002).

#### **2.4.2 Beteiligung von Furin an pathologischen Prozessen und Inhibitoren von Proproteinkonvertasen**

Nicht nur zelluläre Proteine werden durch Furin-vermittelte Prozessierung aktiviert, sondern SPCs fördern auch die Infektivität von Viren und vermitteln die Aktivierung von bakteriellen Toxinen.

Das Hüllprotein gp160 des *human immunodeficiency virus* (HIV) wird von Furin prozessiert. (Taylor et al., 2003). Die Bildung der Spaltprodukte gp120 und gp41 ist Voraussetzung für die Membranfusion, welche die Virusinfektion einleitet. Auch die Hüllproteine und Fusionsproteine von Influenzaviren werden durch Spaltung an basischen Motiven in die reife Form überführt. Die Virulenz des Vogelgrippevirus H5N1, der auch für Menschen tödlich sein kann, korreliert mit der Präsenz einer zusätzlichen Furinspaltstelle im Vorläufer des

Fusionsproteins HA<sub>0</sub> (Hatta *et al.*, 2001). Bei einem avirulenten Stamm des Vogelgrippevirus, der keine systemische Infektion hervorruft, ist die Furinkonsensussequenz mutiert (Zambon, 2001). Beispiele für Toxine, die durch Furin aktiviert werden sind das Diphtherie-Toxin und das Anthrax-Toxin (Klimpel *et al.*, 1992, Molloy *et al.*, 1992, Thomas, 2002).

Durch ihre Beteiligung an der Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen sind SPCs auch mögliche Ziele für die Krebstherapie. Die Überexpression von Furin führt zu einer verstärkten Aggressivität und Invasivität von Tumoren (Bassi *et al.*, 2001). Ein Mechanismus hierfür wird über die Prozessierung von Membran-Typ I-Matrixmetalloproteinase (MT1-MMP) vermittelt. Das reife Enzym aktiviert Pro-Gelatinase, welche die extrazelluläre Matrix degradiert und Tumorwachstum und die Bildung von Blutgefäßen bewirkt (Thomas, 2002).

Die Beteiligung von SPCs an pathologischen Prozessen hat großes Interesse an der Entdeckung von Inhibitoren geweckt. Die bisher untersuchten inhibitorischen Substanzen sind kurze Peptidylchlormethylketone, auf den inhibitorisch wirkenden Prodomänen basierende Peptide, Poly-Arginin-Peptide und Inhibitoren, die von vollständigen Proteinen abgeleitet wurden. Niedermolekulare, nicht-peptidische Verbindungen haben sich bisher noch nicht als erfolgreich erwiesen (Fugere and Day, 2005).

Peptidylchlormethylketone, deren Aminosäureabfolge von Substraten abgeleitet wurde, können sich in die Substratbindetasche von Serinproteasen einlagern und hemmen diese durch die kovalente Bindung an die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin. Der häufig für Funktionsstudien der SPCs eingesetzte Inhibitor Decanoyl-RVRK-Chlormethylketon (dec-RVKR-cmk) kann aufgrund seines hydrophoben Ankers Zellmembranen passieren und hemmt die Reifung vieler Proproteine in Zellkultursystemen. Die Röntgenstruktur eines Komplexes dieses Inhibitors mit murinem Furin wurde 2003 gelöst (Henrich *et al.*, 2003) und wird in Abschnitt 6.2.1 diskutiert. Auch die Prozessierung von HIV gp160 kann durch cmk-Inhibitoren verhindert werden (Hallenberger *et al.*, 1992). Aufgrund ihrer Cytotoxizität und Instabilität sind Chlormethylketone aber für pharmakologische Anwendungen ungeeignet (Fugere and Day, 2002).

Die gentechnische Modifikation des endogenen Elastaseinhibitors  $\alpha_1$ -AT führte zu einem Serpin mit einer Furinspaltsequenz, das  $\alpha_1$ -Antitrypsin Portland (abgekürzt  $\alpha_1$ -PDX) genannt wurde (Anderson *et al.*, 1993). Durch Austausch der Aminosäure Alanin an Position P4 und von Methionin an P1 jeweils durch Arginin wurde ein effizienter Furinhemmstoff geschaffen, der die Konvertase mit einer physiologisch relevanten Geschwindigkeit hemmt (Dufour *et al.*, 1998). In Kotransfektionsstudien wurde gezeigt, dass  $\alpha_1$ -PDX sowohl die Prozessierung von



Vorläufern im TGN als auch die Aktivität von Furin an der Zelloberfläche eindämmen kann (Anderson et al., 1993).

Natürliche Serpine, die sowohl aufgrund ihrer RCL-Sequenz als auch aufgrund ihrer zellulären Lokalisation als endogene Inhibitoren von SPCs in Frage kommen, waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Ihre Entdeckung könnte zur Entwicklung von pharmakologischen Leitsubstanzen führen und zum Verständnis der Funktion der einzelnen SPCs beitragen.

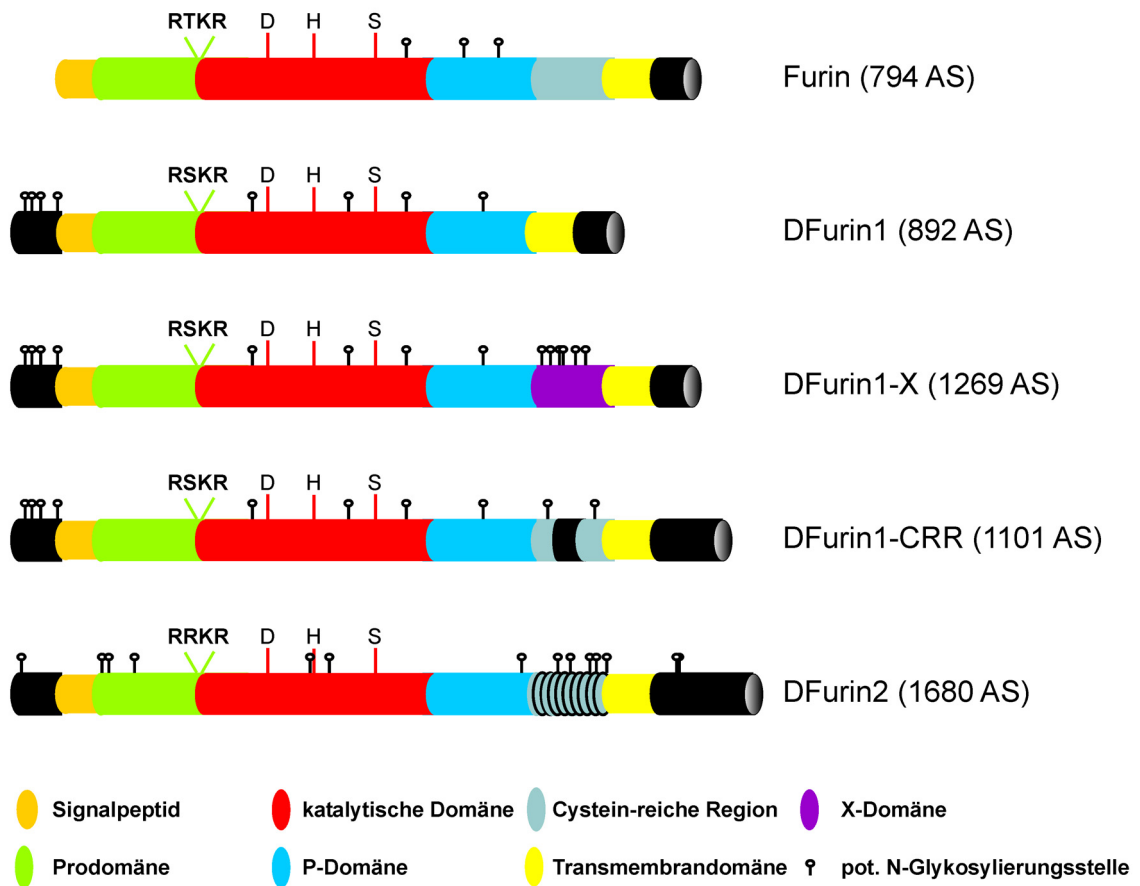
### 2.4.3 Insektenfurine

Ausgehend von den aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Eigenschaften schien das *Drosophila* Serpin Spn4A ein möglicher natürlicher Furininhibitor zu sein, und daher waren auch Proproteinkonvertasen aus Insekten für diese Arbeit von Interesse. Bereits kurz nach der Identifikation des humanen Furins (Fuller et al., 1989) wurden SPCs aus Maus und Ratte aber auch aus *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* beschrieben (Denault and Leduc, 1996). Insektenfurine sind mittlerweile auch aus *Anopheles gambiae* und *Spodoptera frugiperda* bekannt (Cieplik et al., 1998).

Die Gene für die *Drosophila* Furine Dfur1 und Dfur2 liegen auf verschiedenen Chromosomen (Roebroek et al., 1991, Hayflick et al., 1992, Roebroek et al., 1995). Vom Dfur1-Gen werden durch differenzielles Spleißen der mRNA drei Proteinisoformen exprimiert, die sich in ihren C-terminalen Domänen unterscheiden (Roebroek et al., 1993). Abbildung 5 zeigt schematisch die aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Domänenstrukturen der drei Enzyme und von DFurin2.

Wie das humane Furin bestehen die *Drosophila* Furine 1 und 2 jeweils aus Prodomäne, subtilisinähnlicher katalytischer Domäne, P- und TM-Domäne gefolgt von einem kurzen cytoplasmatischen Abschnitt (Abbildung 5). Die *Drosophila* Proteine besitzen aber anstelle eines klassischen Signalpeptids einen hydrophoben Sequenzabschnitt (beginnend etwa bei Aminosäure 100), der den Transport der Proteine ins ER erleichtert und somit als internes Signalpeptid wirkt (Hayflick et al., 1992). DFurin1 ist mit 892 Aminosäuren das kleinste dieser Proteine und weist keine CRR-Domäne auf. DFurin1-X ist eine Spleißvariante von DFurin1 und unterscheidet sich von diesem nur durch die von einem zusätzliche Exon codierte, funktionell bisher nicht charakterisierte X-Domäne. Eine weitere Isoform besitzt einen von den beiden anderen Formen abweichenden C-Terminus mit zwei Cystein-reichen Regionen und heißt DFurin1-CRR (Roebroek et al., 1993) oder alternativ dKLIP-1 (*drosophila kexin-like protein-1*) (Hayflick et al., 1992).

DFurin2 wird von einem anderen Gen codiert und hat zehn Cystein-reiche Regionen N-terminal zur Transmembrandomäne (Roebroek et al., 1995). Die *Drosophila* Furine verfügen über viele potentielle N-Glykosylierungsstellen mit der Sequenzabfolge (Asn-X-Ser/Thr).



#### Abbildung 5 Domänenstruktur und Isoformen der *Drosophila* Furine im Vergleich zu humanem Furin

Die Furine der Fruchtfliege sind länger als das humane Furin. DFurin2 weist eine sehr ausgedehnte Cystein-reiche Region auf. Die N-terminale Region vor dem internen Signalpeptid ist wie die potentielle cytoplasmatische Domäne in schwarz dargestellt. Weitere Informationen sind aus dem Text und aus der Bildunterschrift von Abbildung 4 zu entnehmen.

Durch Northern-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass Transkripte von Dfur1 im Gehirn, im Fettkörper und in Ovarien präsent sind. Starke Signale wurden insbesondere in Ammenzellen und Oocyten erhalten, so dass vermutet wurde, dass die maternale Expression dieses Gens für die frühe Embryogenese relevant ist (Hayflick et al., 1992). DFurin1-CRR und DFurin1-X werden während der gesamten Embryonalentwicklung in nicht miteinander überlappenden Gewebetypen exprimiert, so dass eine unterschiedliche Funktion der Isoformen anzunehmen ist (Roebroek et al., 1993). Auch DFurin2 wird während der gesamten Lebensspanne der Fliege exprimiert (Roebroek et al., 1995).

---

Erste funktionelle Studien mit rekombinanten Formen dieser Proteine wiesen darauf hin, dass die *Drosophila* Furine eine ähnliche Substratspezifität haben wie das humane Furin. Alle vier Enzyme waren in Kotransfektionsexperimenten in der Lage, den von Willebrand-Faktor sowie das murine 7B2 proteolytisch zu spalten (Roebroek *et al.*, 1993, De Bie *et al.*, 1995). Bei Experimenten zur Biosynthese wurden unterschiedlich prozessierte Formen der Proteine in Zellextrakten und im Medium nachgewiesen (De Bie *et al.*, 1995). Weitere Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die DFurine bereits im ER als lösliche Proteine ohne TM-Domäne vorliegen und dass die Prodomänen im TGN abgespalten werden.

Bisher wurden die DFurine nur nach Überexpression in Säugerzelllinien und nicht im homologen System studiert. Seit über 10 Jahren wurden keine neuen Erkenntnisse zu diesem Thema publiziert, und die Proteine wurden bisher weder in Geweben noch in Zelllinien der Fruchtfliege nachgewiesen.

### 3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen seiner Dissertation hat Olaf Krüger auf mRNA-Ebene verschiedene Spleißvarianten des Serpin-Gens Spn4 von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Die mRNAs codieren für Serpinvarianten mit vier verschiedenen reaktiven Schleifen (RCLs), und es werden Isoformen jeweils mit (Spn4A-D) oder ohne ein N-terminales Signalpeptid (Spn4E-H) exprimiert. Die Aminosäuresequenzen der RCLs weisen bei den vier Varianten große Unterschiede auf. Da Sequenzmotive in diesem Bereich die Proteasespezifität von Serpinen bestimmen, wurden verschiedene Zielproteasen für die Spn4-Varianten vorausgesagt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die vier RCL-Varianten rekombinant hergestellt und auf Proteinebene untersucht werden. Zu ihrer Unterscheidung und Charakterisierung sollten Zielproteasen identifiziert werden und die Hemmung durch die Serpine kinetisch analysiert werden.

Der RCL von Spn4A beinhaltet die Erkennungs/Spaltsequenz der im sekretorischen Pfad wirkenden Proproteinkonvertase Furin, und das HDEL-Motiv am C-Terminus des Serpins wies auf eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) hin. Diese beiden Eigenschaften von Spn4A legten nahe, dass Furin eine mögliche Zielprotease des Serpins ist. Die Identifizierung eines wirksamen Furininhibitors ist von pharmakologischem Interesse, und zu Beginn dieser Arbeit war noch kein natürlicher Hemmstoff bekannt.

Die Inaktivierung von humanem Furin durch Spn4A/E sollte nachgewiesen und charakterisiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob das tetrabasische Motiv RRKR das reaktive Zentrum des Serpins für die Interaktion mit Furin darstellt.

Damit Spn4A Furin am Wirkort hemmen kann, müssen beide Proteine im sekretorischen Pfad lokalisiert sein. Daher war ein weiteres Ziel, zu zeigen, dass Spn4A tatsächlich im ER vorliegt.

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von Spn4A/E sollte analysiert werden, ob das *Drosophila*-Serpins die Aktivität von Insektenfurinen inhibiert. Hierzu sollten sowohl *in vitro*-Experimente als auch Studien mit einem Zellkulturmodell durchgeführt werden.

---

## 4 Methoden

### 4.1 Material

Das Wasser für die Herstellung von Puffern wurde mittels einer Milli-Q<sup>®</sup>-Anlage (Millipore, Eschborn) deionisiert und filtriert und wird im Folgenden mit dH<sub>2</sub>O abgekürzt. So behandeltes dH<sub>2</sub>O als Zusatz für enzymatische Reaktionen wurde zusätzlich autoklaviert. Alle verwendeten Chemikalien waren von bester Qualität (zur Analyse) und stammten, wenn nicht anders angegeben, von Merck, Baker oder Roth. Für alle Versuche wurden sterile Gefäße und Pipettenspitzen eingesetzt. Spezialchemikalien, Enzyme, Kits sowie weitere Materialien und Geräte sind im Text erwähnt oder dem Anhang (Abschnitt 8.1) zu entnehmen.

### 4.2 Molekularbiologie

Die im Folgenden beschriebenen Methoden dienen der Herstellung von Vektoren zur Proteinexpression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen.

#### 4.2.1 Plasmidisolierung

Die Gewinnung von Plasmiden aus Bakterienkulturen erfolgte mit dafür vorgesehenen Systemen der Firma Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben. Die analytische Plasmidisolierung aus 3 ml Kultursuspension wurde mit dem *Nucleospin Plasmid<sup>®</sup> Kit* durchgeführt. Nach einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen wurde die Plasmid-DNA in Gegenwart chaotroper Salze an die Silikamatrix einer Säule gebunden und durch eine Erhöhung des pH-Werts auf 8,5 eluiert (Birnboim and Doly, 1979, Vogelstein and Gillespie, 1979). Es wurden Ausbeuten von 5-15 µg erhalten. Für die präparative Plasmidgewinnung aus 50 ml Bakterienkultur wurde das System *Nucleobond<sup>®</sup> AC 100* verwendet. Hier wurde die DNA nach Fällung mit Isopropanol mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen. Die Ausbeuten betrugen 50-200 µg.

Zur Bestimmung der Plasmidkonzentrationen wurde die Absorption einer DNA-Lösung bei 260 nm gemessen (OD<sub>260</sub>). Bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm gilt für die Konzentration einer Lösung doppelsträngiger DNA vereinfacht: 1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 ng/µl.

### 4.2.2 Restriktion

Die Spaltung von Plasmiden für Klonierungen oder analytische Zwecke wurde mit Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs (NEB) nach den Herstellerangaben mit den empfohlenen Puffern durchgeführt. Die entstandenen Fragmentgemische wurden nachfolgend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 4.2.5).

### 4.2.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine effektive Methode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten dar (Saiki *et al.*, 1985). Hierfür werden hitzestabile DNA-Polymerasen (*Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus*, *Pfu*-Polymerase von *Pyrococcus furiosus*) eingesetzt. *Pfu*-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) zeichnet sich durch eine 3'-5' Korrekturlesefunktion aus und wurde für Klonierungen eingesetzt. KlenTherm-Polymerase, ein Derivat der *Taq*-Polymerase, hat eine höhere Prozessivität und wurde für analytische Amplifikationen verwendet (Barnes, 1992). Wie *Taq*-Polymerase fügt Klen-Polymerase unspezifisch ein Adenin an das 3'-Ende neu synthetisierter Stränge an. Für die PCR werden der DNA-Matrizenstrang, zwei kurze Oligonukleotide (Primer), die mit den 3'- bzw. 5'-Enden der Zielsequenz hybridisieren können, und die vier 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dNTPs) benötigt. Die PCR besteht aus einer Folge von Schritten, die etwa 30 Mal wiederholt wird. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung der Nukleinsäure-Doppelstränge bei 95 °C. Anschließend wird auf etwa 50-60 °C abgekühlt, so dass sich die Oligonukleotid-Primer an die Matrize anlagern können (*Annealing*). Bei einer Temperatur von 68-72 °C erfolgt dann die DNA-Replikation (*Elongation*) durch die Polymerase. Hierbei wird der zur Matrize komplementäre DNA-Strang gebildet, der im nächsten Zyklus ebenfalls als Vorlage dient. Auf diese Weise wird die DNA-Zielsequenz exponentiell vervielfältigt.

### 4.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Zum Einfügen von Punktmutationen wurde die PCR-Methode „*QuikChange site-directed mutagenesis*“ von Stratagene adaptiert (Stratagene). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf diese Weise die Sequenz einer Restriktionsschnittstelle mutiert, die nachfolgende Klonierungen gestört hätte, sowie eine *loss of function* Mutante von Spn4A erzeugt.

Bei dieser Methode der ortsspezifischen Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die die gewünschte Mutation tragen. Die etwa 30 Nukleotide langen Primer wurden so gewählt, dass die Mutation jeweils von mindestens 14 Nukleotiden flankiert wird, die perfekt mit der Zielsequenz hybridisieren (Tabelle 1).

Tabelle 1 verwendete Mutageneseprimer

	Primer	Sequenz (5'→3')
1	MutSp4V1-RRKA+	CGGTGCGTAGGAAG <u>G</u> CCGCTATTATGTCGCCTGAGG
2	MutSp4V1-RRKA-	CCTCAGGCGACATAATAGCG <u>G</u> CCTTCCTACGCACCG
3	MutaSp4V1cg+	GCCGGCGCTAGATGCG <u>G</u> ATGGCTCTGGAAGTCCCC
4	MutaSp4V1cg-	GGGCAGTCCAGAGCCAT <u>C</u> GCATCTAGCGCCGGC

Das Primerpaar 1/2 diente zur Herstellung einer Spn4A *loss of function*-Mutante. Das für Arginin an P1 codierende Triplet (CGC) wurde gegen (GCC) ausgetauscht, das für Alanin codiert. Das Primerpaar 3/4 wurde zur Entfernung einer internen *NcoI*-Schnittstelle verwendet. Ausgetauschte Basen sind jeweils fett und unterstrichen dargestellt.

Mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase wird jeder Strang eines zirkulären Vektors ausgehend vom Primer kopiert, so dass die Mutation in die neu synthetisierten DNA-Stänge integriert wird (Abbildung 6). In den nächsten Zyklen wird die veränderte Nukleotidsequenz weitergegeben. Tabelle 2 und Tabelle 3 zeigen den von Stratagene empfohlenen Ansatz und das PCR-Programm.

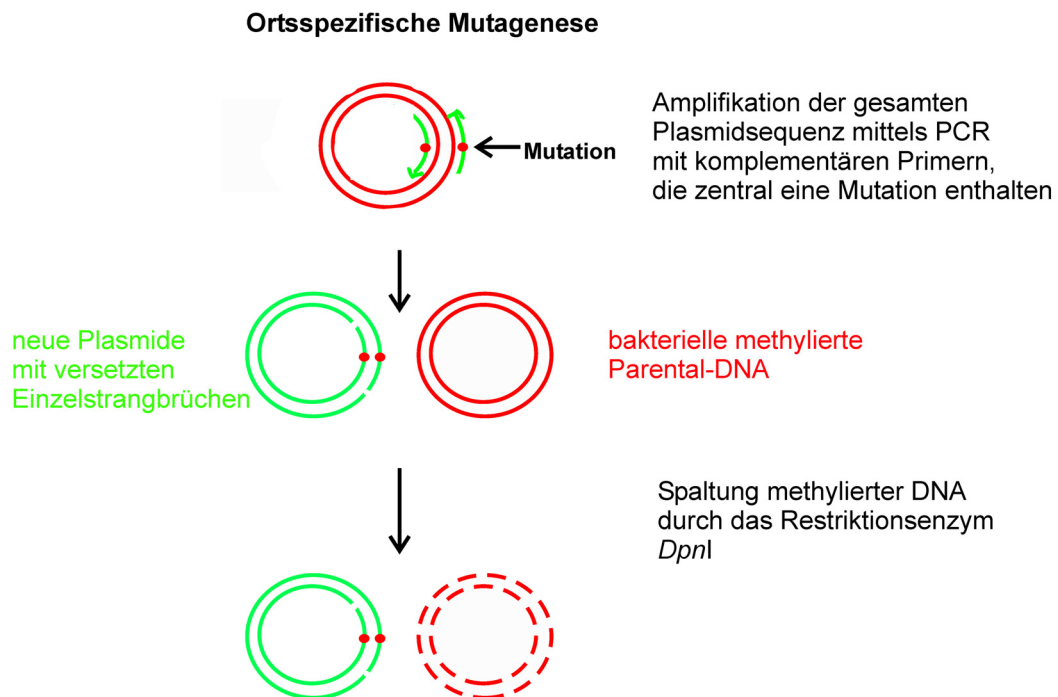


Abbildung 6 Schematische Darstellung der ortsspezifischen Mutagenese nach Stratagene

Tabelle 2 PCR-Ansatz für ortsspezifische Mutagenese

Komponente	Konzentration	Volumen
<i>Pfu</i> -Puffer	10-fach	5 µl
Plasmid	50 ng	
Primer a	125 ng	
Primer b	125 ng	
dNTP-Mix	10 mM / dNTP	1 µl
<i>Pfu</i> - Polymerase	3 IU	1 µl
dH <sub>2</sub> O		auf 50 µl

**Tabelle 3 PCR-Programm für ortsspezifische Mutagenese**

Programmschritt	Temperatur	Dauer
<i>Hot start</i>	95 °C	3 min
Denaturieren der DNA	95 °C	30 s
<i>Annealing</i>	55 °C	1 min
<i>Elongation</i>	68 °C	2 min/kb
Ende der <i>Elongation</i>	68 °C	7 min
Abkühlen	95 °C	bis Ende

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C mit 0,5 µl (5 U) *DpnI* (NEB) inkubiert, wobei die Stränge des bakteriellen methylierten Ausgangsvektors degradiert werden. Die neu synthetisierten nicht methylierten DNA-Stränge, die die Mutation enthalten, werden direkt in kompetente Bakterien (siehe Abschnitt 4.2.7) transformiert, die diese zu zirkulären Plasmiden ligieren. Hierfür wurden 3-10 µl des Reaktionsgemisches in *Epicurian Coli*<sup>®</sup> XL1-Blue MRF' Kan oder *E. coli* Top 10 transformiert. Alle nachfolgend charakterisierten Klone enthielten die gewünschte Mutation.

#### 4.2.5 Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe auftrennen, da die negativ geladenen Moleküle im elektrischen Feld zur Anode wandern. Für die Trennung und zur Größenabschätzung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet, die in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8,0) angesetzt wurden. Die DNA-Proben wurden zur Beschwerung mit 10x DNA-Ladepuffer (50 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M EDTA; in 10 × TAE-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 140 V in TAE-Puffer. Das Gel wurde anschließend in einer wässrigen Lösung von 0,5 % Ethidiumbromid für 5-10 min gefärbt. Durch Interkalation des planaren Fluorophors Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA werden DNA-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht durch Fluoreszenzemission von 590 nm sichtbar.

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Vogelstein and Gillespie, 1979) erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach den Herstellerangaben. Die Fragmente wurden mit 30 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert.



#### 4.2.6 Ligation und T/A-Klonierung

Für die Ligation eines DNA-Fragments (Insert) in einen geschnittenen Vektor (4.2.2) über kohäsive Enden wurde das System *Quick Ligation Kit* (NEB) verwendet. Die Verknüpfung erfolgte nach den Herstellerangaben mit T4-Ligase (Weiss *et al.*, 1968). Unter Zusatz des vom Hersteller bereitgestellten 2-fach *Quick Ligation* Puffers wurde der Ansatz für maximal eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur schnellen Ligation von PCR-Produkten mit einem 3'A-Überhang (siehe auch 4.2.3) wurde entweder das *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing* (Invitrogen) oder das *pGEM<sup>®</sup>-T Vector System* (Promega) gewählt. Hierbei werden die Fragmente enzymkatalysiert über eine einfache TA Basenpaarung in den Zielvektor integriert (Sambrook, 1989).

#### 4.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli* für Hitzeschocktransformationen

Die Kompetenz von Bakterien der Stämme *Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue MRF' Kan* und BL21(DE3) (Tabelle 4) für nachfolgende Hitzeschocktransformationen wurde durch Behandlung mit Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen erreicht (Sambrook, 1989). Zu 250 ml LB-Flüssigmedium wurden 5 ml einer aus einer Einzelkolonie beimpften Vorkultur gegeben und unter Schütteln bei 37 C° bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension zentrifugiert (10 min, 6000 × g, 4 C°) und das Bakterien-Pellet anschließend sukzessive mit eisgekühlten Lösungen von 50 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 ml 85 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 %Glycerin (87 %) behandelt. Die Zellen wurden jeweils vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4000 × g und 4 C°). Die Lösung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde in Portionen von 50 µL aliquotiert und in einem vorgekühlten Gebinde bei -80 C° eingefroren und gelagert.

**Tabelle 4** verwendete Bakterienstämme

Bakterienstämme	Genotyp	Bezugsquelle
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> JM 109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1Δ</i> ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ]	Promega
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrAΔ</i> ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ</i> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue MRF' Kan</i>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> ) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn5</i> (Kan <sup>r</sup> )]	Stratagene

Der OmpT- und Lon-Protease defiziente Bakterienstamm BL21(DE3) wurde für die Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet. Die anderen Stämme wurden für molekularbiologische Arbeiten verwendet. Kompetente JM 109 oder Top 10 sind jeweils Teil der Kloniersysteme *pGEM<sup>®</sup>-T Vector System* (Promega) oder *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing* (Invitrogen).

#### 4.2.8 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden 50 µl einer Suspension transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (4.2.7) auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes (4.2.6) für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock (45 s) bei 42 °C oder bei 37 °C bei Verwendung des *Quick Ligation* Puffers (NEB). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen in 250 µl LB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Ausstreichen auf LB-Agar-Platten folgte eine Inkubation für 16 h bei 37 °C. Die meisten Plasmide (1-14 in Tabelle 5) enthielten das Gen für das Enzym  $\beta$ -Lactamase, so dass mit 100 µg/ml Ampicillin auf erfolgreich transformierte Bakterien selektioniert werden konnte. Der Bakterienstamm *Epicurian Coli*<sup>®</sup> XL1-Blue MRF' Kan (Tabelle 4) wurde standardmäßig für Transformationen verwendet. Bei der Selektion von pIZ/V5-His-Transformanden, die nicht ampicillin-, sondern zeocinresistent sind, wurden 25 µg/ml Zeocin (Invitrogen) eingesetzt. Da der Bakterienstamm *Epicurian Coli*<sup>®</sup> XL1-Blue MRF' Kan das Tn5-Transposon enthält, welches die Zeocinresistenz codiert (Genilloud et al., 1984), schieden diese Zellen für die Selektion pIZ-basierter Plasmide aus. Daher wurden Top10-Zellen mit diesen Plasmiden transformiert. Als Flüssigmedium diente LB-Medium mit den gleichen Antibiotikakonzentrationen (Vektorkarten, siehe Anhang 8.2).

**Tabelle 5** verwendete Plasmide

	Plasmide	Bezugsquelle
1	pKM-263 (Nr. 133)	Karsten Melcher (Melcher, 2000)
2	pcDNA3.1(+) (Nr. 074)	Invitrogen
3	pTOPO-Sp4-V1 $\Delta$ HDEL (Nr. 129)	Julia Ladewig (Diplomarbeit)
4	pSBR-22 (pGEX-V2) (Nr.101)	Stephan Brinkmeier
5	Topo-V3 mutiert	Joseph Schulze-Horsel (Projektarbeit)
6	pGEM-V4 (Nr. 143)	Caterina Bentele (Diplomarbeit)
7	pKM-V1 (Nr. 134)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
8	pKM-V2 (Nr. 139)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
9	pKM-V3 (Nr. 140)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
10	pKM-V4 (Nr. 141)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
11	pKM-V1 <sub>RRKA</sub> (Nr. 138)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
12	pKM-V1 $\Delta$ HDEL (Nr. 135)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
13	pcSpn4A SP (Nr. 151)	Martina Lummer (Projektarbeit)
14	pcSpn4A $\Delta$ HDEL ( Nr. 166)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
15	pIZ-Spn4A (Nr.173)	in dieser Arbeit selbst hergestellt
16	pIZ-ApoLPII/I-38 (Nr.149)	Marcel Smolenaars (Smolenaars <i>et al.</i> , 2005)

Plasmide 1 und 2 sind kommerziell erhältliche Expressionsvektoren. Die Plasmide 3-6 enthalten Sequenzen der Spn4-Varianten. Teile daraus wurden für die Herstellung von Expressionsvektoren umkloniert (Ergebnisse Abschnitt 5.1). Plasmide 7-16 dienten der Proteinexpression: Plasmide 7-12, im Bakterienstamm BL21(DE3), Plasmide 13, 14 in COS7- und Plasmide 15, 16 in Sf9-Zellen. Die internen Plasmidnummern der AG Zelluläre Genetik sind hinter den Namen in Klammern angegeben (Vektorkarten, siehe Anhang, Abschnitt 8.2).

### 4.2.9 Sequenzierung

Die codierende Sequenz wurde für alle hergestellten Expressionsplasmide experimentell verifiziert. Die Sequenzierung erfolgte, wie in (Tödtmann, 2004) beschrieben, nach der von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelten Kettenabbruchmethode. Mit Hilfe des Sequenzierkits *ThermoSequenase labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Biosciences) wurden unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgelisteten Primer die Abbruchfragmente generiert und mit einem LI-COR 4200 (MWG Biotech AG) aufgetrennt und detektiert. Die Daten wurden mit den Softwareprogrammen *Base ImagIR Data Collection* und *Base ImagIR Analysis* (LI-COR Biotechnology Division) aufgezeichnet und ausgewertet. Einzelne Sequenzierungen wurden bei MWG Biotech in Auftrag gegeben.

**Tabelle 6** Zur Sequenzierung der Expressionsvektoren verwendete Primer

	Sequenzierprimer	Sequenz (5'→3')	T <sub>A</sub> [°C]
1	IRD800-Dm SP4 1+	CTCGGCGGCTCAGAGCGTGG	61
2	IRD800-Dm SP4 2+	AAGTTGCGCCTCACGACCCT	61
3	IRD800-Dm SP4 3+	CCTCACGACCCTCTCGCAGATCA	61
4	IRD800-Dm SP4 1-	AGATGGTTGGTGCCTGCTCAA	63
5	IRD800-GST-out-5'+	CTTTGCAGGGCTGGCAAGCC	59
6	IRD800-T7 Promotor+	TAATACGACTCACTATAGGG	59
7	IRD800-T3 Promotor-	AATTAACCCTCACTAAAGGG	58
8	IRD800-BGHrev-	TAGAAGGCACAGTCCAGG	59

Die Sequenzierprimer 1-4 binden innerhalb der invarianten Sequenz von Spn4 und wurden standardmäßig für die Sequenzierung der Spn4-Varianten in unterschiedlichen Konstrukten eingesetzt. Primer 5 wurde für pKM-Vektoren zusätzlich zur Überprüfung von Sequenzbereichen der Proteolysestelle der TEV-Protease und der Fusionsstelle zwischen GST und Serpin eingesetzt. Primer 6-8 sind Standardprimer und flankieren die *multiple cloning site* (MCS) in pCR-TOPO (6,7) oder pcDNA3+ (6,8). Die jeweiligen bei der *cycle sequencing*-Reaktion verwendeten *Annealing*temperaturen T<sub>A</sub> sind angegeben.

### 4.3 Prokaryotische Expression und Reinigung rekombinanter Serpine

Das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) bildet eine hochaffine Bindung zu seinem Substrat Glutathion aus, so dass GST-Fusionsproteine über eine Glutathion-gekoppelte Matrix aus einem komplexen Proteingemisch aufgereinigt werden können.

Ausgehend von Plasmid pKM-263 (Melcher, 2000), welches die DNA für das Leseraster der GST von *Schistosoma japonicum* unter der Kontrolle des T7-Promotors trägt, wurden verschiedene GST-Spn4 Fusionskonstrukte kloniert. Der Stamm BL21(DE3) wurde durch die Integration des DE3-Elements des Phagen  $\lambda$  in das Genom des Expressionsstammes BL21 entwickelt. DE3 codiert für die T7-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors (Studier and Moffatt, 1986). Durch die Verwendung dieses Stammes konnte die Expression der GST-Fusionsserpine durch IPTG induziert werden.

#### 4.3.1 Expression von Serpinen als Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Tag

Für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen wurden 200 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin mit 3 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Expression durch 0,1 mM IPTG erfolgte bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7-1. Nach einer weiteren Kultivierung von 3-4 Stunden bei 27 °C wurde die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt, bei 6000  $\times g$  bei 4 °C abzentrifugiert und anschließend mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,2) gewaschen. Das Pellet wurde bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.2 Affinitätsreinigung an Glutathionsepharose

Vor dem Zellaufschluss wurden zwei Bakterienpellets in 20 ml PBS mit 0,5 % Triton X-100; 2,5 mM EDTA; 1 mM PMSF resuspendiert und insgesamt 200  $\mu\text{l}$  Proteaseinhibitorcocktail (P8849, Sigma) zugefügt. Die löslichen Proteine wurden durch zwei *French Press* (SLM Aminco) Passagen bei 1415 bar freigesetzt. Nach Abtrennung der unlöslichen Zelltrümmer (40 min, 8000  $\times g$ , 4 °C) wurde der Überstand für 3-4 h bei 4 °C mit 500  $\mu\text{l}$  Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBS; 0,5 % Triton X-100 und nachfolgend mit 50 mM HEPES, pH 7.5 (jeweils 3-mal, 10 ml) wurden die Proteine mit 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM HEPES, pH 8,0 eluiert (3-mal, 2 ml).

### 4.3.3 Abspaltung und Separation der GST-Sequenz mittels TEV-Protease

Um die Serpine in möglichst nativer Form für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde der GST-Anteil des Fusionsproteins durch AcTEV-Protease (Invitrogen) abgespalten (Dougherty *et al.*, 1989, Parks *et al.*, 1994, Melcher, 2000). Hierfür wurde jeweils die Eluatfraktion mit der höchsten Proteinkonzentration ohne weitere Zusätze mit 200 Units AcTEV über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da sowohl die verwendete TEV als auch die GST mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen sind, können alle Bestandteile mit Ausnahme des reinen Serpins über die Bindung an eine *Protino*<sup>®</sup> Ni 2000 column (Macherey Nagel) angereichert werden. Dafür wurde der Spaltansatz zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung mit NaCl versetzt (Endkonzentration 300 mM) und auf eine mit 10 ml Waschpuffer (50 mM HEPES; 300 mM NaCl; pH 8,0) äquilibrierte Säule aufgetragen. Die höchste Proteinkonzentration lag - je nach Serpin - entweder im Durchlauf oder in einer der Waschfraktionen vor. Diese Fraktionen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 4.3.4 Bradford-Test zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Gesamtproteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford, 1976) besitzt eine hohe Sensitivität und wird nicht durch Glutathion gestört. Die Bindung von Coomassie G-250 an die Seitenketten basischer und aromatischer Aminosäuren führt zu einem Farbumschlag von braun nach blau durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Für die Bestimmung der Serpinkonzentrationen wurden jeweils 50 µl des Eichstandards (Verdünnungsreihe mit 10-1000 µg/ml BSA), Probe oder Puffer in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 250 µl *Coomassie Protein Assay Reagent* (Pierce) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen und aus der Standardkurve die Konzentration der Serpine abgeleitet. Zur Messung der Konzentration von Spn4D wurde entsprechend den Herstellerangaben ein 1:1 Gemisch aus Reagenz und Proteinlösungen gemessen und BSA-Konzentrationen von 1-25 µg/ml als Eichstandard eingesetzt. Die Verdünnungsreihen der Eichstandards wurden jeweils so gewählt, dass die zu messenden Proben Absorptionswerte im linearen Bereich der Eichkurve aufwiesen.

## 4.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank (Lamine Air HB2448, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten im Brutschrank (Begasungsbrutschrank, Modell 3336, Forma Scientific) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

### 4.4.1 Kultivierung von COS7-Zellen

COS7 Affenepithelzellen (American Type Culture Collection) wurden bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in D-MEM mit Antibiotika und 10 % FCS Gold (PAA) kultiviert (Tabelle 7). Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle drei Tage 1:3 ausverdünnt. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA Lösung (Sigma, T3924) behandelt und durch leichtes Klopfen von der Flasche gelöst. Nach der sofortigen Resuspension in frischem Medium wurden die Zellen in neuen 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät.

**Tabelle 7**      **Lösungen für die COS7-Kultur**

<b>COS7-Medium</b>	<b>Antibiotikalösung 100x</b>
10 g/l D-MEM ( Life Technologies)	6,3 g/L Penicillin G (Biochrom AG)
+ 3,73 g/l NaHCO <sub>3</sub>	10 g/L Streptomycinsulfat (Biochrom AG)
+ 0,47 g/l L-Glutamin	in 10 mM Natriumcitrat, pH 7,4
+ 3 g/l Glukose	
+ 1x Antibiotikalösung	

### 4.4.2 Expression rekombinanter Proteine in COS7-Zellen

COS7-Zellen eignen sich aufgrund ihres genomisch codierten großen T-Antigens zur Überexpression von rekombinanten Proteinen ausgehend von Plasmiden mit einem SV40 Origin. Die Plasmide werden extrachromosomal repliziert und transkribiert (Edwards and Aruffo, 1993).

Zur Analyse der Sekretion oder intrazellulären Retention von Spn4A und der Deletionsmutante Spn4A $\Delta$ HDEL in Säugerzellen wurden COS7-Zellen mit pcDNA3(+)-basierten Plasmiden transfiziert, die jeweils für eins der Serpine codieren. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion mit Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen). Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion 1:2 verdünnt auf kleine T-Flaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Liposomenbildung erfolgte nach Herstellerangabe durch Vereinigung einer Lösung von 4 µg Plasmid-DNA in 200 µl Medium mit einer von 10 µl Lipofectamin™ 2000 in 200 µl Medium pro Ansatz. Eine Transfektion des leeren Vektors pcDNA3(+) diente als Negativkontrolle.

Die Zellen wurden 3-4 h nach der Transfektion 1-mal mit PBS gewaschen und mit serumfreiem COS7-Medium ohne Antibiotika mit Insulin und Transferrin (jeweils 10 mg/l) kultiviert.

Die Zellkulturüberstände und Extrakte wurden nach 24 h mittels Western-Blot auf Spn4-Proteine untersucht. Die Überstände wurden nach Abtrennung von Zelltrümmern ein weiteres Mal durch Zentrifugation geklärt (10 min, 13000 × g, 4 °C) und entweder 5-10-fach konzentriert oder unkonzentriert verwendet.

Zur Präparation von Extrakten wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und die Flaschen nach Zugabe von 300 µl Lysepuffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 0,5 mM EDTA; 1 % (v/v) NP40) für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen lösten sich vollständig von den Schalen, wurden im Lysepuffer resuspendiert und zur vollständigen Lyse für weitere 10 min auf Eis in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Der Extrakt wurde anschließend durch Zentrifugation (10 min, 13000 × g, 4 °C) geklärt.

Für Immunfluoreszenzexperimente wurden konfluente Zellen am Vortag der Lipofektion 1:5 verdünnt in Chamberslides (Nunc) ausgesät und mit jeweils ¼ des oben beschriebenen Ansatzes transfiziert (Lummer, 2005).

#### **4.4.3 Kultivierung von S2- und Sf9-Zellen**

Insektenzellen wurden bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Die S2-Zellen wurden von Invitrogen bezogen und wuchsen semiadhärent in „Schneider’s *Drosophila* Medium“ (Invitrogen) mit 10 % FCS. Die adhärennten Sf9-Zellen (European Collection Of Cell Cultures) wurden in „*InsectExpress*“ (Cambrex) mit 10 % FCS kultiviert und in drei Stufen innerhalb von zwei Wochen an serumfreies Medium adaptiert. Die Insektenzellen wurden alle 3-4 Tage mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner, Sarstedt) von den Kulturflaschen gelöst und 1:3 verdünnt neu ausgesät.

#### **4.4.4 Präparation von S2-Extrakten und -Überständen**

Zum Nachweis der *Drosophila* Furine in Überständen von S2-Zellen wurde der adhärennte Anteil der Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und für 4 Tage in serumfreiem Medium kultiviert. Nach Abtrennung des Zelldebris (10 min, 13000 × g, 4 °C) wurden die Überstände bei -80 °C eingefroren oder mittels Western-Blot (Abschnitt 4.5.2) analysiert. Die Extraktpräparation erfolgte wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben.

#### 4.4.5 Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen

Nach Adaption an serumfreies Medium wurden die Sf9-Zellen zwei bis drei Tage vor der Transfektion auf 12-well Platten (3,5 cm<sup>2</sup>) ausgesät, so dass die Platten einen möglichst hohen Bedeckungsgrad (80-90 %) aufwiesen.

Zur Transfektion der Zellen wurde lineares Polyethylenimin (PEI) mit einer Größe von 25 kDa eingesetzt. Das kationische Polymer kondensiert DNA unter Bildung von PEI/DNA-Komplexen, die endocytiert und dann zum Kern transportiert werden (Godbey et al., 1999). Aufgrund der hohen Pufferkapazität von PEI werden lysosomale Nukleasen inaktiviert (Boussif et al., 1995), so dass die DNA nicht degradiert wird.

10 mg PEI wurden in 9,6 ml dH<sub>2</sub>O aufgenommen und durch Zugabe von 220 µl 1 M HCl gelöst. Die Mischung wurde anschließend durch Zugabe von etwa 180 µl NaOH auf pH 7,0 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Für die Transfektion wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 50 µl serumfreiem InsectXpress Medium vermischt. Dann wurden 5 µl der PEI-Lösung (1 µg/µl) schnell hinzugefügt, und nach vorsichtiger Durchmischung wurde der Transfektionsansatz zur Bildung von DNA/PEI-Komplexen für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden währenddessen mit Medium gewaschen und mit 600 µl Medium überschichtet. Nach tropfenweiser Zugabe der Transfektionsmischung wurden die Schalen vorsichtig geschüttelt und die Zellen für 5 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und nach Zugabe von 2 ml Medium für 2-3 Tage kultiviert.

Die Überstände von transfizierten Sf9-Zellen wurden mit 5 % TCA (Endkonzentration) behandelt, um sekretierte Proteine aufzukonzentrieren (Smolenaars et al., 2005). Nach Sedimentation (10 min, 13000 × g, 4 °C) wurde das Präzipitat in 50 µl Probenpuffer aufgenommen und zur Neutralisierung wurden 5 µl 1 M Tris-HCl; pH 7,5 zugesetzt.

Zur Präparation von Extrakten wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen, und die Zellen wie in 4.3.2 beschrieben durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer auf Eis lysiert.



## 4.5 Charakterisierung von Proteinen

### 4.5.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Shapiro *et al.*, 1967). Bei dieser Methode werden die Proteine in SDS-PAGE Probenpuffer denaturiert und mit SDS beladen. Die Dodecylsulfatanionen wirken als Detergenz und bilden eine negativ geladene Hülle um die Proteine, deren Eigenladungen überdeckt werden. Da alle behandelten Proteine so ein vergleichbares Ladungs / Masse-Verhältnis haben, ist die Wandergeschwindigkeit im kleinporigen 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngel im elektrischen Feld abhängig von der Größe des Proteins. Die Mobilität ist hierbei ungefähr umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Zur Erhöhung der Bandenschärfe wurde das Trenngel mit einem 4 %igen großporigen Sammelgel überschichtet, in dem die Wandergeschwindigkeit der Proteine unabhängig von ihrer Größe ist. Wenn nicht anders angegeben wurde Probenpuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet (125 mM Tris-HCl, 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (v/v) Glycerin; 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 6,8). Hierdurch werden Disulfidbrücken reduziert, so dass die einzelnen Proteinketten separat vorliegen. Bei der Detektion von Komplexen von Serpinen und Cysteinproteasen wurde dem Probenpuffer kein Reduktionsmittel zugesetzt, um die labile Thioesterbindung nicht zu destabilisieren. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung von selbst hergestellten Gelen.

**Tabelle 8** Gellösung für selbst gegossene Acrylamidgele aus Trenn- und Sammelgel.

Komponente	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
40 % Acrylamid / Bis <i>solution</i> , 29:1	2,5 ml	0,49 ml
Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 2,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,4; 1,25 ml
dH <sub>2</sub> O	4,85 ml	3,2 ml
10 % (w/v) SDS	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l

Die Mengenangaben sind jeweils für zwei Gele ausreichend.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 25 mA je Gel (10 cm  $\times$  7 cm  $\times$  0,75 cm) in Laufpuffer (24 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3). Die Spannung stieg während des der Elektrophorese von 70 auf 200V. Die Verwendung von NuPAGE-Bis-Tris-Gelen von Invitrogen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Gele wurden nach dem Lauf nach den Angaben von Amersham Biosciences mit *PhastGel Blue R*, Coomassie R350 gefärbt oder mittels Western-Blot analysiert.

### 4.5.2 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine hochsensitive Nachweismethode (Burnette, 1981), bei der Proteine aus einem Acrylamidgel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Bei Verwendung eines an *horseradish peroxidase* (HRPO)-gekoppelten Sekundärantikörpers kann die Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid unter Emission von Licht zur Entwicklung eines Films genutzt werden, auf welchem die spezifischen Proteinbanden sichtbar werden.

Der Transfer der Proteine erfolgte für 2-2,5 h bei einer konstanten Spannung von 30 V in 96 mM Glycin; 12 mM Tris-HCl; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3 oder bei Verwendung von NuPAGE-Gelen nach den Herstellerangaben. Die *Hybond P* (Amersham Biosciences) PVDF-Membran wurde anschließend mit 3 % (w/v) BSA; 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS abgesättigt (4 °C, über Nacht). Es folgten jeweils einstündige Inkubationen mit Primärantikörper bzw. HRPO-konjugiertem Sekundärantikörper in Antikörperpuffer (1 % (w/v) BSA; 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS), jeweils gefolgt von 3-4 Waschschrritten mit Waschpuffer (0,3 % (w/v) BSA; 0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS). Zur Entwicklung dienten das *ECL Western-Blotting Detection* System und Röntgenfilme des Typs *Hyperfilm ECL* von Amersham Biosciences. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9 Antikörper und ihre Verdünnungen für Western-Blot Experimente**

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-GST-Spn4	polyklonales Kaninchenserum	1:20 000	in Auftrag gegeben bei Pineda
Anti-Spn4	Anti-GST-Spn4 gereinigt (4.5.3)	1:1250	
Anti-Furin	monoklonaler Mausantikörper MON 148, (IgG2a), gegen die katalytische Domäne von humanem Furin	1:1000	Alexis, 803-015-R100 (van Duijnhoven <i>et al.</i> , 1992),
Anti-DFurin 1	polyklonales Kaninchenserum	1:4000	Creemers (Roebroek <i>et al.</i> , 1993)
Anti-DFurin 2	polyklonales Kaninchenserum	1:4000	Creemers (Roebroek <i>et al.</i> , 1993)
Anti-Apolipoprotein II	polyklonales Kaninchenserum	1:4000	Rodenburg (Smolenaars <i>et al.</i> , 2005)
Anti-Kaninchen-HRPO	IgG aus Eselserum	1:4000	Amersham Biosciences, NA934
Anti-Maus-HRPO	IgG aus Schafserum	1:1000	Amersham Biosciences, NA931

### 4.5.3 Partielle Reinigung des Anti-GST-Spn4-Antiserums

Das verwendete Anti-GST-Spn4-Kaninchenantiserum wurde durch Immunisierung mit einem in *E. coli* BL21 exprimierten Fusionsprotein aus GST und Spn4B erzeugt, welches zuvor von Stephan Brinkmeyer über Glutathionsepharose aufgereinigt worden war. Die Vorgehensweise hierbei war vergleichbar mit der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Methode. Nach dieser einstufigen Affinitätsreinigung muss von geringen Verunreinigungen des Antigens mit bakterieneigenen Proteinen ausgegangen werden, gegen die ebenfalls Antikörper gebildet wurden.

Um das Antiserum partiell zu reinigen, wurde eine Sepharosematrix hergestellt, an die GST kovalent gekoppelt war (Bar-Peled and Raikhel, 1996, Brinkmeyer *et al.*, 2004). Hierfür wurde GST in *E. coli* BL21 exprimiert und mitsamt der unerwünschten Begleitproteine an Glutathionsepharose gekoppelt. Durch die nachfolgende Inkubation dieser Matrix mit dem gegen GST-Spn4B gerichteten Antiserum wurden GST-erkennende Antikörper abgereichert. Auch Antikörper gegen Verunreinigungen binden an diese Matrix.

GST wurde (wie in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben) exprimiert und der geklärte Bakterienextrakt an ca. 200  $\mu$ l Glutathionsepharose adsorbiert. Nach intensivem Waschen mit PBS (0,5 % Triton X-100) wurde die Matrix mit Boratpuffer (0,2 M Borsäure-NaOH; pH 9,0) äquilibriert. Eine Lösung aus 22 mg (Endkonzentration 20 mM) Dimethyl-pimelidat-dihydrochlorid (DMP) in 4 ml Boratpuffer wurde angesetzt und sofort zu der Matrix gegeben und das Gemisch 30-40 min bei RT inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde dann durch Inkubation (1 h) mit 0,2 M Ethanolamin-HCl; pH 8,2 gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Glycin; pH 2,5 wurde die Matrix anschließend mit PBS gewaschen.

Zur Klärung wurden 300  $\mu$ l des Anti-GST-Spn4B-Antiserums (Tier 2) 2-mal zentrifugiert (10 min, 13000  $\times$  g, 4 °C), 1:8 mit PBS verdünnt und mit der hergestellten Matrix inkubiert (4 h, 4 °C). Nachfolgend wurde der Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das so von Anti-GST-Antikörpern gereinigte Antiserum wurde bei Western-Blot-Experimenten (Abschnitt 4.5.2) in einer 1:1250 Verdünnung und in der Immunfluoreszenz 1:25 verdünnt eingesetzt (Abschnitt 4.5.6).

#### 4.5.4 Bildung von Serpin/Proteasekomplexen *in vitro*

Die Bildung von SDS-stabilen Komplexen ist ein wichtiges Charakteristikum von physiologischen Serpin/Serinprotease-Interaktionen (Abschnitt 2.1.1). Zur Untersuchung der Zielspezifität der verschiedenen Spn4-Varianten wurden Serinproteasen verschiedener Peptidaseklassen mit den rekombinanten Serpinen zur Bildung von Komplexen inkubiert. Aus der Chymotrypsinfamilie S1, den klassischen Serpintargets, wurden Chymotrypsin und humane neutrophile Elastase (HNE) analysiert. Furin gehört zur Familie S8, den subtilisinähnlichen Serinproteasen. Auch SDS-stabile Serpin/Cysteinprotease-Komplexe konnten bereits unter bestimmten Bedingungen detektiert werden (Luke *et al.*, 2000, Irving *et al.*, 2002a, Hwang *et al.*, 2005). Aus der Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen (C1) wurden Cathepsin S (CatS), Cathepsin L (CatL) und Cathepsin B (CatB) unter nicht reduzierenden Bedingungen getestet, d.h. es wurde auf den Zusatz von DTT bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol in Reaktionspuffer und Probenpuffer verzichtet. Weiterhin erfolgte die Auftrennung der Proteine hier mit dem NuPAGE-System, mit einem Acrylamidgel, das einen leicht sauren pH-Wert von etwa 6,4 hat. Diese Bedingungen sind förderlich für die Komplexstabilität (Hwang *et al.*, 2005).

Für die Komplexierungsreaktionen wurden jeweils 10  $\mu$ l 2x-Reaktionspuffer vorgelegt und mit dH<sub>2</sub>O, Serpin und Protease auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l eingestellt. Nach Inkubation unter den Tabelle 10 angegebenen Bedingungen wurden die Ansätze mit Serinproteasen auf Eis abgekühlt und mit 2x Probenpuffer (Abschnitt 4.5.1) versetzt. Die Reaktionen mit Cysteinproteasen wurden vor der Zugabe des NuPAGE-Probenpuffers durch die Zugabe von 3  $\mu$ M E-64 (Sigma) gestoppt. Alle Proben wurden für 4 min auf 95 °C erhitzt. Die Zusammensetzungen der Komplexierungsansätze sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10** Darstellung der Komplexierungsbedingungen

Protease	Reaktionspuffer (Endkonzentrationen)	T[°C]	t[min]	Konz. Protease	Serpin-überschuss
Chymotrypsin	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 8,0	30	5	50 nM	3x
HNE	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5	30	5	20 nM	4x
Furin	100 mM HEPES; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0.5 % Triton X-100; pH 7,5	25	5	0,5 nM	8x
CatL	50 mM NaAc; 1 mM EDTA; pH 5,5	30	5	50 nM	4x
CatS	50 mM NaAc; 1 mM EDTA; pH 5,5	30	5	70 nM	4x
CatB	50 mM NaAc; 1 mM EDTA; pH 5,5	30	60	70 nM	4x

#### 4.5.5 Massenspektrometrie

Bei der Reaktion von Furin mit Spn4A entsteht entsprechend des *branched pathway*-Mechanismus (Abschnitt 2.1.1, Abbildung 2) neben dem Enzym/Inhibitor-Komplex auch die RCL-gespaltene Form des Serpins. Durch die Bestimmung der Masse dieses C-terminal trunkierten Serpins und/oder der des abgespaltenen Fragments kann die Spaltstelle identifiziert werden.

Bei der MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight* Massenspektrometrie) werden Analyt- und Matrixmoleküle durch Photonenbeschuss eines Lasers ins Vakuum desorbiert und die Analytmoleküle durch  $H^+$  ionisiert (Lottspeich, 1998). Bei dieser schonenden Ionisierung absorbieren die kleinen organischen Matrixmoleküle einen Großteil der Laserenergie, so dass zu untersuchende Peptide und Proteine nicht fragmentiert werden. Die Ionen werden in der Quelle durch ein elektrisches Feld beschleunigt und auf dem Weg zum Detektor in einem Flugrohr aufgetrennt. Das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung ( $m/z$ ) ist dabei proportional zum Quadrat der Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor, so dass ein einfach geladenes Molekül im Spektrum bei seiner Masse +1 erscheint. Für die Generierung der Spaltfragmente wurde der in Tabelle 11 beschriebene Ansatz gewählt und für 2 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Spn4A ohne Furinzusatz auf die gleiche Weise behandelt.

**Tabelle 11      Ansatz zur Identifikation der Furinspaltstelle in Spn4A**

<b>Komponente</b>	<b>eingesetzte Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Spn4E	1,35 µg	750 nM
Furin	0,1 µg	47 nM
Puffer		25 mM HEPES, pH 7,5; 1 mM CaCl <sub>2</sub>

Nach der Inkubation erfolgte die Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proben mit Zip Tips<sup>®</sup> C18 (Millipore). Hierfür wurden die Tips mit Acetonitril befeuchtet, mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert, und die Proteine wurden nach Zugabe von 50 % (v/v) 0,5 % TFA zur Probe durch mindestens 10-maliges Auf- und Abpipettieren gebunden. Nach dem Waschen mit 0,1 % TFA (5-mal, 10 µl) wurden die Proteine sukzessive mit 2 µl 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA und 2 µl 90 % Acetonitril, 0,1 % TFA eluiert. Das Eluat wurde auf dem Targetchip vereinigt und zur Kristallisation mit 1 µl Matrixlösung bestehend aus 10 mg 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) 300 µl Acetonitril und 700 µl 0,1 % TFA 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. Das Gerät ist mit einem *large scale integration* (LSI) Stickstoff-Laser (337 nm) und einem linearen Flugrohr von 1,2 m Länge ausgestattet.

#### 4.5.6 Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation von Spn4A

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können Proteine in Zellen visualisiert werden. Ähnlich wie beim Western-Blot werden die Proteine nach Permeabilisierung der Zellen durch einen spezifischen Primärantikörper gebunden. Dieser ist entweder selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder wird durch Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Zum Nachweis der ER-Lokalisation von Spn4A wurde ein partiell gereinigtes (Abschnitt 4.5.3) polyklonales Anti-Spn4-Antiserum in Kombination mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-markierten Anti-Kaninchen-Antikörpern verwendet (siehe auch (Lummer, 2005)). Der ER-Marker Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (Smirnova et al., 2001) wurde mit einem monospezifischen Maus-Antikörper und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (siehe Tabelle 12). Eine unspezifische Färbung der Zellen wurde durch Kontrollexperimente mit dem Präimmenserum des Kaninchens und durch alleinige Verwendung der Sekundärantikörper ausgeschlossen.

**Tabelle 12** Antikörper und Verdünnungen für Immunfluoreszenzexperimente

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Spn4	Anti-GST-Spn4 partiell gereinigt (4.5.3)	1:25	
Anti-PDI	monoklonaler Mausantikörper gegen das Epitop DDDQKAVKDEL	1:100	Stressgen, SPA-891
Anti-Kaninchen-FITC	IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment aus Ziegenerum	1:100	Sigma, F1262
Anti-Maus-Cy3	IgG aus Eselserum	1:100	Dianova, 715-165-151

Die in Chamberslides ausgesäten (Abschnitt 4.4.2) COS7-Zellen wurden vorsichtig 3-mal mit PBS gewaschen und für 20 min bei -20 °C mit Methanol fixiert. Nach 3-maligem Waschen (PBS, 3 % (w/v) BSA) wurde für 30 min mit der Waschlösung blockiert. Die beiden Primärantikörper wurden 1:25 oder 1:100 verdünnt (siehe Tabelle 12) in Waschlösung aufgenommen und einzeln oder in Kombination für 1 h zu den Zellen gegeben.

---

Nach erneutem 3-maligen Waschen wurde für 1 h mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (1:100) inkubiert. Damit der Anti-Maus-Antikörper die Bindung des Anti-Kaninchen-Antikörpers nicht einschränkt, wurde dieser bei Doppelfärbungen erst 20 min später zugefügt, gefolgt von einer weiteren Inkubation von 30 min. Nach erneutem Waschen (3-mal) wurden die Kammern der Chamberslides abgezogen, die Zellen mit Mowiolreagenz (2,4 g Mowiol 4-88; 6 ml Glycerin; 6 ml dH<sub>2</sub>O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; pH 8,5) überschichtet und eingedeckt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden bei RT ausgeführt.

Die Präparate wurden in der AG Genetik von Prof. Niehaus (Fakultät für Biologie) unter freundlicher Unterstützung von André Roszik und Nickels Jensen mit einem Olympus IX81 Epifluoreszenz Mikroskop (40× Objektiv) untersucht und mit einer Schwarz/Weiß-Kamera (Hamamatsu C8484-05G) abgebildet. Nach Anpassung der Farbe und Intensität der Bilder mit Adobe Photoshop (Version 7) wurde das grüne Bild der FITC-Fluoreszenz mit dem der roten Cy3-Fluoreszenz überlagert. Bei Verwendung der Einstellung „negativ multiplizieren“ erscheinen Bereiche, die durch beide Laser angeregt wurden, gelb, und zeigen eine Kolokalisation der detektierten Zellstrukturen an.

## 4.6 Enzymkinetik

Die Interaktion von Serpinen mit Proteasen lässt sich durch drei Charakteristika beschreiben: Bildung SDS-stabiler Komplexe (Abschnitt 4.5.4), die Stöchiometrie der Hemmung (SI-Wert) und die Geschwindigkeit der Hemmreaktion, ausgedrückt über die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $k_{assoc}$ ). Im Folgenden werden die angewandten Methoden und Hilfsmittel zur Bestimmung kinetischer Parameter beschrieben.

Die Messungen in 100  $\mu$ l-Ansätzen wurden mit einem FLUOstar/POLARstar galaxi Spektrometer (bmg labtechnologies) in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden (Nunc) bei 30 °C durchgeführt. Als Substrate dienten jeweils kurze Peptidderivate, aus denen nach Proteolyse entweder der Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) oder ein Rhodaminderivat (R-110) freigesetzt wird. Diese Fluorophore wurden jeweils durch Licht der Wellenlängen 380 bzw. 485 nM angeregt und die Emission bei 460 bzw. 520 nM gemessen.

Alle verwendeten Substrate und *active site*-Titranten sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

**Tabelle 13 Substrate und *active site*-Titranten**

Substrate und Inhibitoren	Bezugsquelle, Produktnummer
Pyr-RTKR-AMC	Bachem, I-1650
z-FR-AMC*HCl	Alexis, ALX-260-131
(z-FR) <sub>2</sub> -R110	Molecular Probes, R6502
MeOSuc-AAPV-AMC	Calbiochem, 324740
dec-RVKR-cmk	Bachem, N-1505
E-64	Sigma, E3132

Bei den 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)- oder Rhodamin (R-110)-gekoppelten Peptidsubstraten ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode gezeigt. Der Furintitrant dec-RVKR-cmk ist ein Chlormethylketon mit einem Decanoylrest, welcher Membranpassagen ermöglicht. Chlormethylketone binden irreversibel an die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin von Serinproteasen. E-64, trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan, reagiert spezifisch mit Cysteinproteasen, indem die trans-Epoxysuccinylgruppe irreversibel an die aktive Thiolgruppe im reaktiven Zentrum der Protease bindet.

Abkürzungen in dieser Tabelle: pyr = L-Pyroglutamyl, z = Benzyloxycarbonyl, MeOSuc = 3-Methoxysuccinyl, dec = decanoyl, cmk = Chlormethylketon.

### 4.6.1 Titration von Proteasen und SI-Bestimmung

Zur Bestimmung der aktiven Enzymkonzentrationen wurden Furin oder Cysteinproteasen mit irreversiblen Inhibitoren titriert, die die Protease in einem 1:1-Verhältnis hemmen, (Barrett *et al.*, 1982, Knight, 1995, Jean *et al.*, 1998). Bei dem Furintitranten dec-RVKR-cmk wurde der angegebene Peptidgehalt berücksichtigt, und für den niedermolekularen Cysteinproteaseinhibitor E-64 wurde entsprechend den Herstellerangaben eine 100 %ige Aktivität angenommen.



Zur Vermeidung von Fehlern beim Abwiegen wurde die gesamte gelieferte Menge in Lösungsmittel aufgenommen. Die Stammlösungen (5-10 mM) wurden aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Furin (3 units) wurde in 100 mM HEPES; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 % Triton X-100; pH 7,5 mit 0-67 nM dec-RVKR-cmk für 1 h bei 30 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Für Doppelbestimmungen der Restaktivitäten wurden 8 µl der jeweiligen Ansätze zu 92 µl Substratlösung (Tabelle 14) gegeben (Substratkonzentration  $[S] = 200 \mu\text{M}$ ) und die lineare AMC-Freisetzung für 20-60 min verfolgt. Die Steigung der Geraden repräsentiert jeweils die Restaktivität und wurde gegen die InhibitorKonzentration  $[I]$  aufgetragen. Durch Anpassung einer Geraden an die ersten linear abfallenden Funktionswerte wurde die Konzentration der aktiven Protease  $[E_0]$  aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse erhalten (Knight, 1995).

**Tabelle 14 Substratgemisch für die Bestimmung der Restaktivität von Furin**

Komponente	Zusammensetzung	Volumen
2x Puffer	200 mM HEPES, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 % Triton X-100, pH 7,5	50 µl
Substrat	1 mM pyr-RTKR-AMC	20 µl
dH <sub>2</sub> O		22 µl

Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von 8 µl der vorinkubierten Enzym/Inhibitorlösung gestartet.

In analoger Weise wurde die aktive Konzentration von Cysteinproteasen durch Inkubation (30 min) mit 0–500 nM E-64 in 50 mM NaAc; 1 mM EDTA; 4 mM DTT; 0,05 % Brij-35; pH 5,5 erhalten (Barrett et al., 1982). Die Bedingungen zur Messung der Restaktivität sind Tabelle 15 zu entnehmen. Die Substratkonzentrationen  $[S]$  betragen 5 µM bei der CatS-Titration bzw. 18 µM bei CatL.

**Tabelle 15 Substratgemisch für die Bestimmung der Cathepsin-Restaktivitäten**

Komponente	Cathepsin S	Volumen	Cathepsin L	Volumen
2x Puffer	100 mM NaAc; 2 mM EDTA; 8 mM DTT; pH 5,5; 0,1 % Brij-35	50 µl	100 mM NaAc; 2 mM EDTA; 8 mM DTT; pH 5,5; 0,1 % Brij-35	50 µl
Substrat	100 µM (z-FR) <sub>2</sub> -R110	5 µl	0,9 mM z-FR-AMC	2 µl
dH <sub>2</sub> O		43 µl		47 µl

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 2 µl (CatS) oder 1 µl (CatL) der Enzym/Inhibitorlösung gestartet.

Der SI-Wert beschreibt das Verhältnis zwischen Substratreaktion und Hemmreaktion des Serpins (Abschnitt 2.1.1). Je kleiner der SI-Wert, desto effektiver ist also die Hemmung.

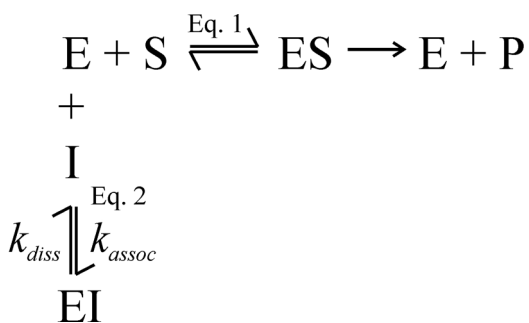
Zur Bestimmung der SI-Werte wurden die Proteasen unter den bereits für dec-RVKR-cmk bzw. E-64 beschriebenen Bedingungen mit den Spn4-Varianten titriert. Auch hier wurde eine Anpassung einer Geraden an die linear abfallenden Funktionswerte durchgeführt. Die SI-Werte ergeben sich dann aus dem Quotienten der so ermittelten Proteasekonzentration  $[E_I]$  und der durch Titration bestimmten *active site*-Konzentration  $[E_0]$ . Damit sich der jeweilige SI-Wert direkt als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse ablesen lässt, wurden die Restaktivitäten hier gegen  $[I]/[E_0]$  aufgetragen (siehe Ergebnisteil, Abschnitt 0, Abbildung 19 und 20).

Furin (3,3 nM) wurde mit 0-15 nM Spn4A unter den oben beschriebenen Bedingungen titriert, und CatL (22 nM) oder CatS (134 nM) wurden mit unterschiedlichen Spn4B und Spn4C Konzentrationen von 0–200 nM inkubiert.

#### 4.6.2 *Progress curve*-Methode

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von Proteasen durch die Spn4-Varianten wurden mit der *progress curve*-Methode bestimmt (Bieth, 1995). Diese Methode wurde bereits häufig für die Charakterisierung von Serpinen eingesetzt, die Furin, Elastase oder Cysteinproteasen inhibieren (Al-Khunaizi *et al.*, 2002, Dufour *et al.*, 1998, Cloutier *et al.*, 2002).

Die Reaktion eines Proteaseinhibitors (I) mit einer Protease (E) unter Ausbildung eines Komplexes (EI) als Konkurrenzreaktion zu der Umsetzung eines Substrates (S) lässt sich vereinfacht durch folgendes Schema (Abbildung 7) beschreiben:



**Abbildung 7 Schema *progress curve*-Methode**

Eq. 1 und Eq. 2 sind jeweils die Gleichgewichte für die Bildung des ES- und EI-Komplexes

mit der in Gleichung 1 definierten Gleichgewichtskonstanten:

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

Bei der *progress curve*-Methode wird die Reaktion durch Zugabe der Protease zu einem Gemisch aus Proteaseinhibitor und Proteasesubstrat gestartet und kontinuierlich durch die Freisetzung eines Produktes (P) aus dem Substrat detektiert.

Wenn sich das Gleichgewicht für die Bildung des Enzym/Substratkomplexes (Abbildung 7, Eq. 1) schneller einstellt als das für die des Enzym/Inhibitor Komplexes (Eq. 2), tritt zunächst eine exponentielle Bildung von P auf. Wenn P nur noch linear steigt, ist das *steady state*-Gleichgewicht erreicht. Für  $[I_0] \geq 10 [E_0]$  und bei konstanter Substratkonzentration ( $\delta[S]/\delta t \approx 0$ ) wird die biphasische Produktfreisetzung mit der Zeit ( $t$ ) durch Gleichung 2 beschrieben.

$$\text{Gleichung 2} \quad F = [P] = v_s t + \frac{v_0 - v_s}{k'} (1 - e^{-k' t}) + b$$

$v_0$  und  $v_s$  stehen jeweils für die Anfangsgeschwindigkeit bzw. die *steady state*-Geschwindigkeit der Reaktion und  $b$  ist die Fluoreszenz  $F$  bei  $t = 0$ . Die apparente Relaxationskonstante pseudo-erster Ordnung ist mit  $k'$  bezeichnet. Für irreversible Reaktionen ist  $v_s = 0$  und  $F$  erreicht den Grenzwert  $v_0/k' + b$  nach Gleichung 3.

$$\text{Gleichung 3} \quad F = [P] = \frac{v_0}{k'} (1 - e^{-k' t}) + b$$

Die gemessene Fluoreszenz ( $F$ ) ist proportional zur Produktfreisetzung und wird mit dieser gleichgesetzt. Die Konstante  $k'$  ist über Gleichung 4 mit den oben beschriebenen Konstanten  $k_{assoc}$  und  $k_{diss}$  verknüpft, und beide können durch Auftragung von  $k'$  gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt ermittelt werden. Da die Michaelis-Menten Konstante  $K_m$  für die Berechnung von  $k_{assoc}$  herangezogen wird, ist es wichtig, die Konstante selbst zu bestimmen und nicht aus der Literatur zu entnehmen.

$$\text{Gleichung 4} \quad k' = \frac{k_{assoc}}{(1 + [S]/K_m)} \cdot [I] + k_{diss}$$

Für eine irreversible Reaktion ist  $k_{diss} = 0$  und es folgt

$$\text{Gleichung 5} \quad k' = \frac{k_{assoc}}{(1 + [S]/K_m)} \cdot [I]$$

### Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten $K_m$

Zur Bestimmung von  $K_m$  wurde Pufferlösung mit verschiedenen Substratkonzentrationen vorgelegt, die Reaktion durch Zugabe einer konstanten Enzymkonzentration gestartet und die lineare Fluoreszenzzunahme über 20-30 min verfolgt. Genaueres zu den Reaktionsbedingungen ist Tabelle 16 und 17 zu entnehmen.

**Tabelle 16** Bei der  $K_m$ -Bestimmung verwendete Enzym- und Substratkonzentrationen

Protease	Enzymkonzentrationen	Substratkonzentrationen
Furin	0,2 nM	0-300 $\mu$ M
HNE	2 nM*	0-400 $\mu$ M
CatS	6,25 nM	0-40 $\mu$ M
CatL	2,25 nM	0-45 $\mu$ M

(\*)Herstellerangabe (bestimmt durch Absorptionsmessung bei 280 nM).

Zu Beginn der Reaktion bleibt die Substratkonzentration aufgrund des Überschusses nahezu konstant, und die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ( $v$ ) ist proportional zur Steigung der entstehenden Geraden. Durch Auftragung der Steigung  $m$  gegen  $[S]$  und Anpassung der Michaelis-Menten-Formel (Gleichung 5) mittels EnzFitter wurde  $K_m$  bestimmt ( $V_{\max}$  = Maximalgeschwindigkeit).

$$\text{Gleichung 5} \quad v = m = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

Bei der Reaktion von CatS mit (z-FR)<sub>2</sub>-R110 trat bei hohen Substratkonzentrationen eine Abnahme der Geschwindigkeit aufgrund einer Substrathemmung auf. Die Daten wurden zur Bestimmung von  $K_m$  an Gleichung 6 angepasst, die die Gleichgewichtskonstante der Substrathemmung  $K_{si}$  berücksichtigt (Vasiljeva *et al.*, 2003).

$$\text{Gleichung 6} \quad v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}}$$

### Bestimmung von $k_{assoc}$

Zur Messung von  $k_{assoc}$  für die Interaktion von Spn4A mit Furin, Spn4B, C, D mit humaner neutrophiler Elastase und Spn4B, C mit Cathepsin S und L wurden *progress curves* bei verschiedenen Serpinkonzentrationen (angegeben in den jeweiligen Abbildungen in Kapitel 5.4) aufgenommen. Ein  $\geq 10$ -facher Inhibitorüberschuss ermöglicht die Einhaltung der Bedingungen pseudo-erster Ordnung. Tabelle 17 bietet einen Überblick über die verwendeten Reaktionsbedingungen. Die Abstände der Messpunkte und die Messdauer wurden jeweils so gewählt, dass eine optimale Darstellung des biphasischen Reaktionsverlaufs möglich war.

**Tabelle 17** Reaktionsbedingungen für die *progress curve*-Methode

Protease	[E <sub>0</sub> ]	Puffer (Endkonzentration)	Substrat	[S]	Dauer
Furin	0,1 nM	100 mM HEPES; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,5 % Triton X-100; pH 7,5	pyr-RTKR-AMC	200 μM	2 h
HNE	1,0 nM*	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,05 % Triton X-100; 2 % DMSO; pH 7,5	MeOSuc-AAP-AMC,	91 μM	2 h
CatS	2,5 nM	50 mM NaAc; 1 mM EDTA; 4 mM DTT; 0,05 % Brij-35; pH 5,5	(z-FR) <sub>2</sub> -R110	10 μM	45 min
CatL	0,5 nM	50 mM NaAc; 1 mM EDTA; 4 mM DTT; 0,05 % Brij-35; pH 5,5	z-FR-AMC	18 μM	10 min** 45 min***

Wie in Tabelle 14 und 15 für die *active site*-Titration ausgeführt, wurden auch hier 50 μl 2x Puffer, Substrat und Serpin mit Wasser aufgefüllt, so dass nach Proteasezugabe ein Volumen von 100 μl resultierte. (\*) Herstellerangabe (Absorptionsmessung bei 280 nm). Ein geeigneter Titrant stand nicht zur Verfügung. Bei der Reaktion von Cathepsin L mit Spn4B (\*\*) und Spn4C (\*\*\*) wurde der *steady state* so schnell erreicht, dass die Messabstände minimiert wurden und sich somit die Messdauer verkürzte.

Die Daten ließen sich in allen Fällen mit EnzFitter an die Gleichungen 2 oder 3 anpassen. Aus der Auftragung der so ermittelten jeweiligen  $k'$ -Werte gegen die eingesetzten Serpinkonzentrationen ließen sich, wie oben beschrieben unter Berücksichtigung von  $K_m$ , die apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{assoc}$  berechnen.

## 5 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Charakterisierung der Serpin-Varianten Spn4A/E, Spn4B/F, Spn4C/G und Spn4D/H beschrieben. Zunächst wird die Herstellung der Plasmide skizziert, die die Expression der Serpine in verschiedenen Systemen ermöglichen (Kapitel 5.1). Die Ergebnisse der Expression und Reinigung aller vier RCL-Varianten sind in Kapitel 5.2 dargestellt, und die folgenden Kapitel 5.3 und 5.4 zeigen die biologische Aktivität und Selektivität der rekombinanten Serpine. Die ausführliche Charakterisierung der Variante Spn4A/E als Hemmstoff der Protease Furin ist in Kapitel 5.5 beschrieben.

### 5.1 Konstruktion von Spn4-Expressionsvektoren

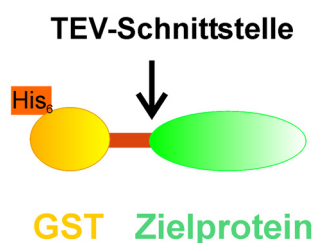
Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Expressionsplasmide für die *Drosophila* Spn4-Varianten entwickelt. Alle für Klonierungen oder nachfolgende Experimente relevanten Plasmide sind im Methodenteil (Abschnitt 4.2.8) in Tabelle 5 aufgeführt. Für alle hergestellten Plasmide wurde durch Sequenzierung (4.2.9) gezeigt, dass die für die Serpine codierenden Bereiche keine Mutationen aufweisen. Vektorkarten befinden sich im Anhang, Abschnitt 8.2.

#### 5.1.1 Herstellung der pKM-Varianten für die prokaryotische Expression

Serpine wurden bereits häufig in aktiver Form in Prokaryoten produziert (Bird *et al.*, 2004). Zur rekombinanten Herstellung und Reinigung wurden die Spn4-Varianten in dieser Arbeit in Form von Fusionsproteinen im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert. Der Gruppe von Carl Hashimoto war es zuvor nicht gelungen, Spn4A mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag aus Bakterien aufzureinigen (Han *et al.*, 2000). Die Verwendung von Fusionskonstrukten der Glutathion-S-Transferase (GST) hat sich als positiv für die Löslichkeit rekombinanter Proteine erwiesen (Smith and Johnson, 1988), und es gibt seit Jahren gut etablierte kommerzielle Systeme zu deren Expression und Reinigung (z. B. das pGEX-System von Amersham Biosciences). Um die Serpine möglichst unbeeinflusst vom GST-Anteil untersuchen zu können, ist allerdings eine spezifische proteolytische Abspaltung der 26 kDa großen GST nötig. Der Vektor pKM-263 codiert für GST aus *Schistosoma japonicum* mit einer N-terminalen Hexa-Histidinsequenz (His<sub>6</sub>-Tag) (Melcher, 2000). C-terminal zur GST-Sequenz befindet sich außerdem ein kurzer Sequenzabschnitt mit der Schnittstelle für die spezifische Protease des Tabak-Ätz-Virus (*Tobacco etch virus*), TEV (Dougherty *et al.*, 1989). Die Klonierung eines Zielgens in die *multiple cloning site* (MCS) ermöglicht die

Expression von Fusionskonstrukten, aus welchen die Tag-freien Zielproteine durch Abspaltung freigesetzt und aufgereinigt werden können.

Wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist, bestehen die im Rahmen dieser Arbeit exprimierten pKM-263-basierten Fusionsproteine aus einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, GST, einem kurzen Verbindungsstück mit der TEV-Schnittstelle und dem jeweiligen Serpin. Nach Abspaltung des Serpinanteils mit der ebenfalls His<sub>6</sub>-markierten TEV-Protease (Parks *et al.*, 1994) folgt eine Ni<sup>2+</sup>-tris-Carboxymethylethyldiamin (Ni-TED) vermittelte Abreicherung aller His<sub>6</sub>-markierten Proteine: GST, restliches GST-Fusionsprotein und TEV-Protease.



**Abbildung 8 Schematische Darstellung pKM-263 basierter Fusionskonstrukte**

Ausgehend von pKM-263 werden GST-Fusionsproteine exprimiert, die zusätzlich eine N-terminale Hexa-Histidinsequenz (His<sub>6</sub>-Tag) aufweisen (orange). In gelb ist der Affinitätsligand Glutathion-S-Transferase (GST), in grün das Zielprotein und in rot das Verbindungsstück mit der Schnittstelle der TEV-Protease gezeigt.

Die cDNA Sequenzen der Spn4-Varianten wurden im Rahmen der Dissertation von Olaf Krüger bestimmt. Die unterschiedlichen RCL-Varianten werden mit A/E, B/F, C/G und D/H bezeichnet, wobei die cDNAs der Isoformen A-D für ein Signalpeptid codieren (Codons 1-28, siehe Abbildung 9 und Anhang, Abschnitt 8.3.1). Die cDNAs der Isoformen E-H beginnen bedingt durch alternatives Spleißen mit dem nächsten ATG-Triplett (Codon 33 von Varianten A-D) (siehe Anhang, 8.3.2). Zur Charakterisierung der cDNAs wurden per PCR überlappende Teilfragmente amplifiziert und sequenziert (Krüger *et al.*, 2002).

Um die vollständigen Serpine exprimieren zu können, mussten die kompletten Sequenzen von Start- bis Stoppcodon per PCR amplifiziert werden. Für die Expression in Bakterien wurden die Spn4-Varianten E-H wie oben beschrieben - *in frame* mit GST - in pKM-263 kloniert und die Plasmide pKM-V1, pKM-V2, pKM-V3, pKM-V4 genannt. Tabelle 18 zeigt die hergestellten Plasmide (Spalte 1) und die Ausgangsmaterialien, die zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung standen.

Zunächst wurde der Expressionsvektor pKM-V1ΔHDEL hergestellt. Dieses Plasmid codiert für die RCL-Variante E, verkürzt um die Sequenz für die letzten vier Aminosäuren (HDEL).

Tabelle 18 Darstellung der auf pKM-263 basierenden hergestellten Expressionsvektoren

Name des Plasmids	Isoform	RCL	Ausgangsmaterial für die Klonierung	verwendete Endonukleasen
pKM-V1	E	A/E	cDNA, PCR (Primer 5,6)	<i>NotI/EcoRI</i>
pKM-V1 $\Delta$ HDEL	E $\Delta$ HDEL	A/E $\Delta$ HDEL	pTOPO-Sp4-V1 $\Delta$ HDEL (Primer 5,7)	<i>NcoI/EcoRI</i>
pKM-V2	F	B/F	pSBR22/pGEX-V2 (Primer 5,8)	<i>NotI/EcoRI</i>
pKM-V3	G	C/G	pTopo-V3 mutiert (Primer 5,9)	<i>NotI/EcoRI</i>
pKM-V4	H	D/H	cDNA, PCR (Primer 5,10)	<i>NotI/EcoRI</i>
pKM-V1 <sub>RRKA</sub>	RCL-Mutante von E	Mutante von A/E	pKM-V1 (Mutageneseprimer 1,2)	

Für die Klonierung der in Spalte 1 aufgeführten Plasmide standen verschiedene Ausgangsfragmente zur Verfügung (Spalte 4), die unter Verwendung der angegebenen Primer (siehe Anhang, Tabelle 24 und 25) amplifiziert worden waren. Die RT-PCR zur Amplifikation von E und H wurde von Caterina Bentele im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Bentele, 2004), Variante G wurde in einem Projekt von Joseph Schulze-Horsel amplifiziert und wies ungewollte Mutationen im 5'-Bereich auf. Auch für die Plasmide pTopoSp4-V1 $\Delta$ HDEL und pSBR22 von Julia Ladewig und Stefan Brinkmeyer sind die Primer angegeben, mit denen die Varianten ursprünglich vervielfältigt worden waren. Alle Sequenzen enthielten eine *EcoRI*-Schnittstelle unmittelbar hinter dem jeweiligen Stoppcodon. Bei pKM-V1<sub>RRKA</sub> ist das Codon 342 CGC (Arg) von RCL-Variante E (Codon 374 von A) durch das von Alanin (GCC) ersetzt.

Nachdem durch synonyme Mutation von Codon 217 eine interne *NcoI* Schnittstelle zerstört worden war (siehe Abschnitt 4.2.4 Tabelle 1 Nr. 3, 4), folgte eine Umklonierung des gesamten codierenden Bereiches aus pTOPO-Sp4-V1 $\Delta$ HDEL unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *EcoRI*. Die cDNAs aller Spn4-Varianten enthalten eine singuläre *NotI* Schnittstelle in der für die *hinge*-Region codierenden Sequenz. Die Sequenzen wurden mit Primern amplifiziert, die stromabwärts vom Stoppcodon eine *EcoRI* Schnittstelle anfügen. Die vier RCLs aus den in Tabelle 18, Spalte 4 angegebenen Sequenzen konnten daher nach Spaltung mit *NotI* und *EcoRI* in das Rückgrat des ebenfalls *NotI/EcoRI*-gespaltenen Vektors pKM-V1 $\Delta$ HDEL umkloniert werden. Die Mutationen in pTopo-V3 befinden sich 5' von der *NotI* Schnittstelle im konstanten Bereich der Spn4-Varianten, so dass auch pKM-V3 durch den RCL-Austausch mit der korrekten Sequenz erhalten werden konnte. Weiterhin wurde ausgehend von pKM-V1 zur Charakterisierung des reaktiven Zentrums der Variante A/E eine *loss of function*-Mutante erzeugt (pKM-V1<sub>RRKA</sub>), bei welcher das Codon 342 für das potenzielle P1 Arginin (CGC) von RCL-Variante E durch das von Alanin (GCC) ersetzt ist.



### 5.1.2 Herstellung von Expressionsplasmiden für die Untersuchung der Lokalisation von Spn4A in COS7-Zellen

Für die Untersuchung der Lokalisation von Spn4A in eukaryotischen Zellen wurde das vollständige Leseraster von Spn4A mit Signalpeptid in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) ligiert, welches eine transiente Überexpression von rekombinanten Proteinen in COS7-Zellen ermöglicht. Die Klonierung wurde von Martina Lummer im Rahmen ihrer Projektarbeit durchgeführt. Durch die Amplifikation der Spn4A-cDNA mit entsprechenden Primern wurde das Fragment mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *EcoRI* versehen und konnte direkt in die MCS von pcDNA3.1(+) eingefügt werden (Anhang, Tabelle 25, Nr. 6, 12). Das Plasmid wurde pcSpn4A\_SP genannt. Ein weiteres Konstrukt wurde erzeugt, um die Funktion des HDEL-Motivs in COS7-Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde unter Verwendung von *EcoRI* und *BsgI* ein Teil des codierenden Bereiches aus pKM-V1ΔHDEL gegen die entsprechende Sequenz in pcSpn4A\_SP ausgetauscht (pcSpn4AΔHDEL).

### 5.1.3 Konstruktion eines Vektors zur Spn4A-Expression in Insektenzellen

Zur Untersuchung der Hemmung von Proteasen durch Spn4A in Insektenzellen wurde das *Drosophila* Serpin in *Spodoptera frugiperda* Sf9-Zellen exprimiert. Für die Klonierung wurde von Yunjie Wang in seiner Projektarbeit ein Wildtyp Spn4A PCR-Fragment amplifiziert, welches von *KpnI*- und *SacII*-Schnittstellen flankiert war (Anhang, Tabelle 25, Nr. 11, 12). Der Vektor pIZ-ApoLpII/I-38 wurde uns freundlicherweise von Dr. Kees Rodenburg (Utrecht) zur Verfügung gestellt. Die MCS des Vektors, welcher auf pIZ/V5-His (Invitrogen) basiert, enthält die codierende Sequenz für eine verkürzte Form des Vorläuferproteins Apolipoprotein II/I aus *Locusta migratoria* (Smolenaars et al., 2005). Genaueres dazu ist Abschnitt 5.5.5 zu entnehmen. Durch Restriktionsspaltung mit *KpnI* und *SacII* wurde die Apolipoprotein II/I-Sequenz komplett entfernt, und Substitution durch das ebenfalls geschnittene oben beschriebene Spn4A-Fragment führte zum gewünschten Expressionsplasmid pIZ-Spn4A.

## 5.2 Prokaryotische Expression und Reinigung der Spn4-Varianten

Für Untersuchungen der Aktivität und Proteaseselektivität wurden alle vier Spn4-RCL-Varianten rekombinant als GST-Fusionsprotein produziert und über Glutathionsepharose aufgereinigt. Der Affinitätsligand GST wurde abgespalten und abgereichert (Kapitel 4.3). Bis auf die beiden Aminosäuren Glycin und Alanin N-terminal vom Start-Methionin, die nach TEV-Spaltung zurückbleiben, entsprechen die rekombinanten Serpine den Wildtyp-Varianten ohne Signalpeptid E, F, G und H (Abbildung 9). Daher wurden sie Spn4E, Spn4F, Spn4G und Spn4H genannt. Auch die Varianten A, B, C, D tragen nach Proteolyse an der potenziellen Signalpeptidasespaltstelle zwischen den Aminosäuren 28 und 29 (Krüger *et al.*, 2002) im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten ohne Signalpeptid nur vier weitere Aminosäuren am N-Terminus (Abbildung 9). Ursprünglich wurde das rekombinante Spn4E mit Spn4-A1 bezeichnet (Oley *et al.*, 2004). Die Namen der Fusionsproteine und Spn4-Varianten sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

```

Spn4A, B, C, D          MDYRLVPCGCWLLPLLGLLALFFPPVHTADVTMADA AHQEFARRLALFSINVGKLSGQK...
Spn4A ,B, C, D oSP    -----ADVTMADA AHQEFARRLALFSINVGKLSGQK...
Spn4E, F, G, H       -----MADA AHQEFARRLALFSINVGKLSGQK...
rec Spn4E, F, G, H    -----GAMADA AHQEFARRLALFSINVGKLSGQK...

```

### Abbildung 9 N-Termini der natürlichen und rekombinanten Spn4-Varianten

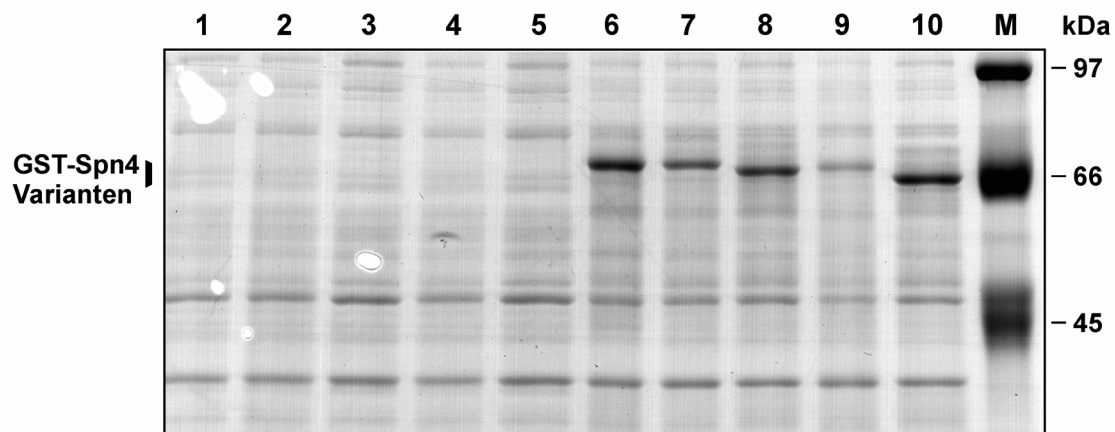
Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen am N-Terminus der links angegebenen Proteine im Einbuchstabencode. Die potenzielle Signalpeptidasespaltstelle der Varianten A-D befindet sich zwischen Position 28 und 29 (unterstrichen). Die prozessierten Proteine ohne Signalpeptid (oSP) haben somit im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten E-H vier zusätzliche Aminosäuren. Die rekombinanten Serpine E-H (hier mit rec Spn4E, F, G, H bezeichnet) basieren auf den Varianten E-H, weisen aber nach der TEV-Spaltung die beiden zusätzlichen Aminosäuren G und A auf.

**Tabelle 19** Namen der hergestellten rekombinanten Spn4-Varianten

Expressionsvektor	RCL-Variante	Fusionsprotein	TEV-gespaltenesSerp
pKM-V1	A/E	GST-Spn4E	Spn4E = Spn4-A1
pKM-V2	B/F	GST-Spn4F	Spn4F
pKM-V3	C/G	GST-Spn4G	Spn4G
pKM-V4	D/H	GST-Spn4H	Spn4H
pKM-V1 <sub>RRKA</sub>	RCL-Mutante A/E	GST-Spn4E <sub>RRKA</sub>	Spn4E <sub>RRKA</sub>

Die rekombinanten RCL-Varianten wurden Spn4E-H genannt, da sie auf den Varianten ohne Signalpeptid basieren. Die ursprüngliche Bezeichnung von Spn4E war Spn4-A1 (Oley *et al.*, 2004).

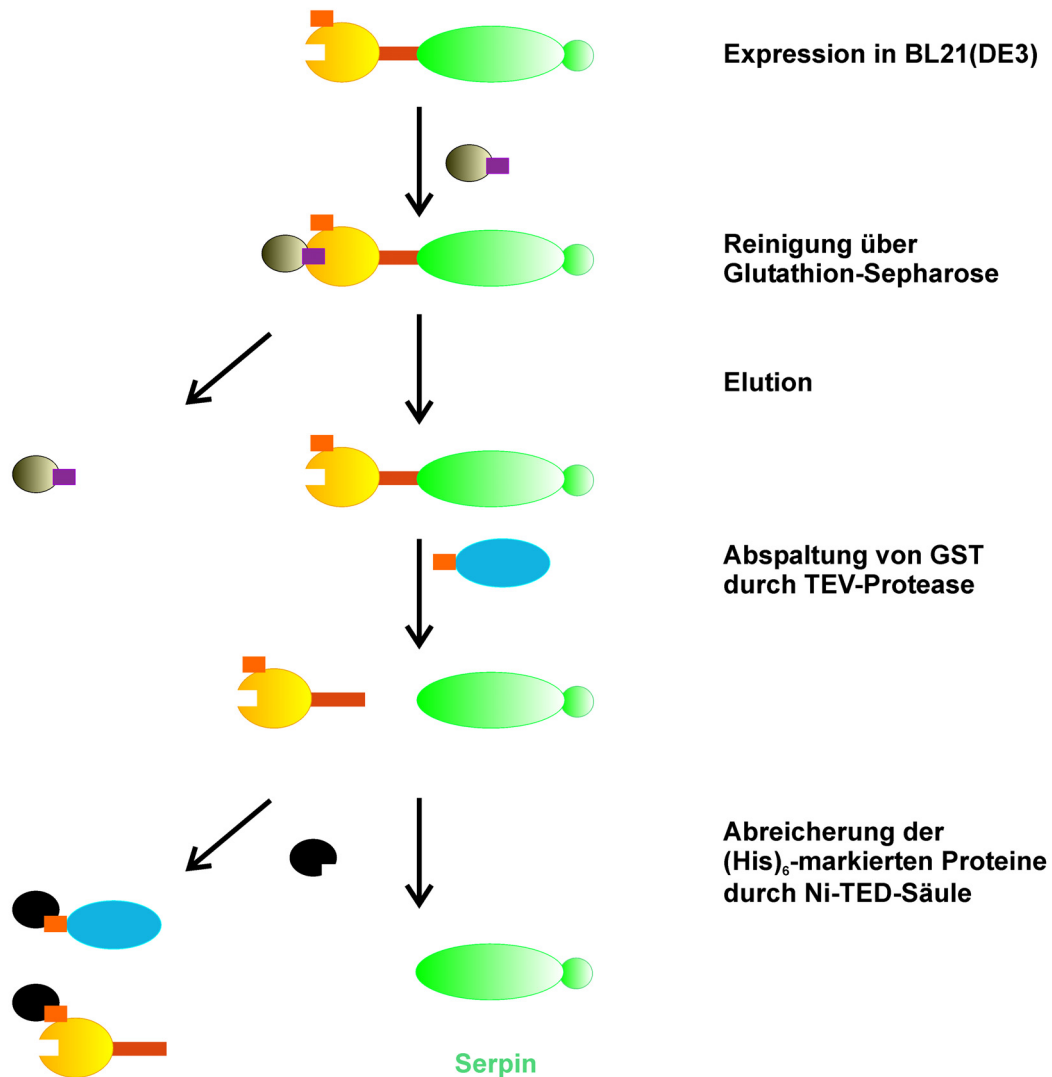
Zum Nachweis der Expression der Serpine wurden jeweils vor IPTG-Induktion und nach 3-4 stündiger Inkubation Proben aus den BL21(DE3)-Kulturen für 10 Minuten mit Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Abbildung 10 zeigt, dass alle fünf Fusionsproteine produziert wurden. Vor Induktion sind keine Proteinbanden auf entsprechender Höhe zu sehen. Aufgrund ihrer unterschiedlich langen RCL-Sequenzen (siehe Anhang, 8.3.3) zeigen die Fusionsproteine ein voneinander abweichendes Laufverhalten. GST-Spn4E (Spur 6) ist mit einem berechneten Molekulargewicht von 71,6 kDa das größte und GST-Spn4H (69,5 kDa) das kleinste Protein (Spur 10).



**Abbildung 10 Expression der Fusionsproteine**

Vor Induktion (Spuren 1-5) und 3,5 h nach Induktion (Spuren 6-10) wurden Bakterien mit den verschiedenen Expressionskonstrukten durch Kochen in Probenpuffer lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Spuren 1 und 6, GST-Spn4E; Spuren 2 und 7, GST-Spn4<sup>ERRKA</sup>; Spuren 3 und 8, GST-Spn4F; Spuren 4 und 9, GST-Spn4G; Spuren 5 und 10, GST-Spn4H; M, LMW-Marker, die Größen der Markerproteine sind am rechten Bildrand angegeben.

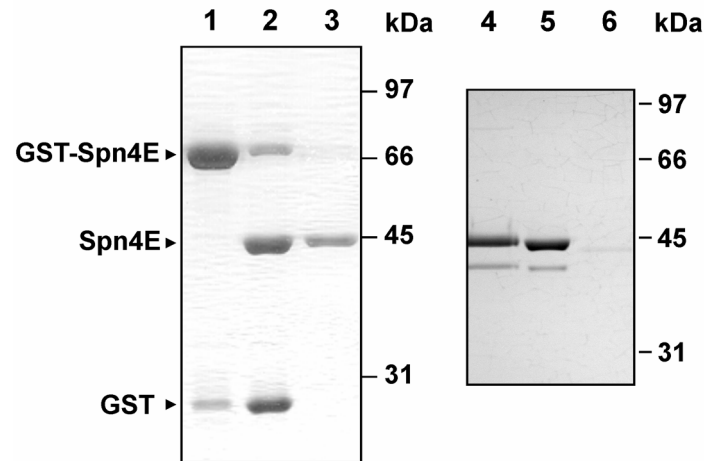
Die Reinigungsprozedur nach Standardprotokollen (Smith, 2000, Mercado-Pimentel *et al.*, 2002) wurde für Spn4E optimiert und auch für die anderen Serpine angewandt. Der Zusatz der Proteaseinhibitoren PMSF, EDTA und Sigma 8849 zum Lysepuffer sollte eine Spaltung der RCLs oder den Abbau durch Serinproteasen, Metalloproteasen oder Cysteinproteasen verhindern. Um die metastabilen Serpine nicht zu schädigen, erfolgten alle Reinigungsschritte und Inkubationen bei 4°C. TEV-Protease ist auch bei dieser niedrigen Temperatur aktiv (Polayes *et al.*, 1994), so dass sie zur Abspaltung der GST-Anteile verwendet wurde. In Abbildung 11 ist die Vorgehensweise zur Reinigung der Serpine veranschaulicht.



**Abbildung 11 Reinigungsstrategie für die Spn4-Varianten**

Das exprimierte Fusionsprotein besteht aus dem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (orange), GST (gelb), Linker mit TEV-Schnittstelle (rot) und Serpinanteil (grün). Der RCL (dargestellt als kleine grüne Kugel) liegt am C-Terminus des Proteins. Nach der einstufigen Affinitätsreinigung an Glutathionsepharose (lila/grau) wird GST durch TEV-Protease abgespalten. Da auch TEV N-terminal mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen ist, können alle Kontaminanten durch Ni-TED (schwarz) abgereichert werden, so dass die reinen Serpine zurückbleiben.

Zur Dokumentation des Reinigungserfolges wurden Fraktionen ausgewählter Zwischenschritte auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit Coomassie gefärbt (Abbildung 12). Spur 1 zeigt das von Glutathionsepharose eluierte Fusionsprotein GST-Spn4E als singuläre Bande bei etwa 66 kDa (berechnete Größe 71,6 kDa). Weiterhin ist GST (26 kDa) im unteren Bereich des Gels zu sehen. Durch TEV-Protease wurde ein Großteil des Fusionsproteins unter Freisetzung des Serpins und der GST gespalten (Spur 2). Durch Bindung an Ni-TED wurden die His<sub>6</sub>-markierten Kontaminanten (GST, Fusionsprotein und TEV-Protease) quantitativ abgereichert, so dass Spn4E in reiner Form gewonnen werden konnte (Spur 3).



### Abbildung 12 Abspaltung und Abreicherung des GST-Tags zur Gewinnung der rekombinanten Serpine

Die durch Affinitätsreinigung an Glutathionsepharose isolierten GST-Fusionsproteine wurden mit TEV-Protease unter Freisetzung der Serpinanteile gespalten. Durch Ni-Affinitätschromatographie wurden GST, restliches Fusionsprotein und TEV abgereichert. Die Reinigung ist in den Spuren 1-3 exemplarisch für Spn4E dargestellt. Spur 1, GST-Spn4E; Spur 2, GST-Spn4E nach Spaltung durch TEV-Protease; Spur 3, gereinigtes Spn4E nach Abreicherung ungewollter Kontaminanten; Spuren 4, 5 und 6, Präparationen der gereinigten rekombinanten Spn4-Varianten F, G und H. Die Abbildung zeigt ein mit Coomassie gefärbtes 10 %iges Acrylamidgel. Die Größen von Markerproteinen (LMW-Marker) sind jeweils am rechten Bildrand angegeben.

Die Serpine Spn4F und Spn4G ließen sich auf die gleiche Art und Weise aufreinigen. In den Präparationen lagen allerdings jedes Mal etwa 20 % der Serpinmoleküle in der inaktiven, vermutlich RCL-gespaltenen Form vor (Abbildung 12, Spuren 4, 5). Auch durch Kühlung aller Puffer, Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren während der Reinigung oder Minimierung mechanischer Scherkräfte war es nicht möglich, den Anteil gespaltenen Materials zu reduzieren. Dass die vier Proteine, die nur durch ihre 40-58 AS langen RCL-Sequenzen voneinander abweichen, unterschiedliche Eigenschaften haben, zeigte sich auch bei der Gewinnung von Spn4H (Spur 6, schwache Bande). Die Reinigung dieser Variante erwies sich als schwierig, und die Ausbeute lag nur bei 5-10 % der anderen drei Spn4-Isoformen. Die in Abbildung 10 durch Coomassiefärbung sichtbar gemachten Fusionsproteine wurden durch das Aufkochen der Bakterien in SDS-Puffer freigesetzt, und die Proben beinhalteten auch in *Inclusion bodies* vorliegende unlösliche Anteile, die bei der Extraktvorbereitung unter nativen Bedingungen unlöslich bleiben und abzentrifugiert werden. Versuche zur Verbesserung der Löslichkeit durch Erniedrigung der Temperatur und IPTG-Konzentration bei der Expression, durch Erhöhung der Detergenzkonzentration oder durch weitere *French-Press*-Passagen bei der Herstellung des Extrakts führten nicht zu einer höheren Ausbeute. Wie Spn4E wurde Spn4H aber in großer Reinheit ohne das Auftreten der RCL-gespaltenen Form erhalten (siehe Abbildung 15, Spuren 1, 10). Obwohl die Ausbeute niedrig war, reichte eine Präparation für alle in den Abschnitten 5.3 und 5.4.5 beschriebenen Experimente aus.

---

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einem Bradford-Test der Firma Pierce bestimmt und sind in Tabelle 20 gegenübergestellt.

**Tabelle 20**      **Konzentrationen der TEV-gespaltenen gereinigten rekombinanten Spn4-Varianten**

<b>Serpin</b>	<b>Konzentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Ausbeute aus 400 ml-Kultur</b>
<b>Spn4E</b>	125	250 $\mu\text{g}$
<b>Spn4F</b>	60	120 $\mu\text{g}$
<b>Spn4G</b>	120	240 $\mu\text{g}$
<b>Spn4H</b>	6	12 $\mu\text{g}$

### 5.3 Nachweis der inhibitorischen Aktivität und Protease-Screening

Die für inhibitorische Serpine typische Abfolge von Alaninresten in der *hinge*-Region wird durch das konstante Exon 4 codiert (Krüger *et al.*, 2002) und ist somit Merkmal aller hier untersuchten Varianten. Zur Unterscheidung und Charakterisierung der Spn4-Varianten sollten Proteasen identifiziert werden, die spezifisch durch einzelne Varianten gehemmt werden. Da nicht auszuschließen war, dass die in Bakterien produzierten Spn4-Varianten eine inkorrekte Faltung aufwiesen, musste zuerst ihre Aktivität nachgewiesen werden. Auch das Fehlen essenzieller posttranslationaler Modifikationen hätte zu Aktivitätsverlusten führen können. Der Aktivitätsnachweis konnte aber nur durch die Hemmung und somit das Finden einer möglichen Zielprotease erbracht werden.

Ausgangspunkt für die Bestimmung der Zielspezifität der erstmals in dieser Arbeit untersuchten Serpine Spn4E, F, G und H war die Aminosäuresequenz der RCLs (Abbildung 13) und der Hinweis, dass alle Spn4-Varianten offenbar mit und ohne Signalpeptid exprimiert werden können (Krüger *et al.*, 2002).

	P15	P9	P1	P1'	
$\alpha_1$ -AT	DEK	GTEAAGAM	MFLEAIP	MS	IPPE-----VKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
Spn4A/E	NEEGTEAAA	ATGMAVRRKRAIM	SPPEEPI	EFFADHP	PFTYVLVHQKD-LPLFWGSSVVRLEENTFASSEHDEL
Spn4B/F	NEEGTEAAA	ATGMVMCYASML	TFEPQPVQFHVQH	PFNYIINKDS	-TILFAGRINKF
Spn4C/G	NEEGTEAAA	ATGMFMSLTS	LPMPKDP	PIRFNVDHP	PFTFYILNKDS-TALFAGSIKKL
Spn4D/H	NEEGTEAAA	ATVWRVMVAFA	FSRKH----	FIANHP	FAFYVKTHYD-LPIFTGRYLG

**Abbildung 13 Aminosäurealignment der vier RCL der vier Spn4-Serpine und  $\alpha_1$ -Antitrypsin**

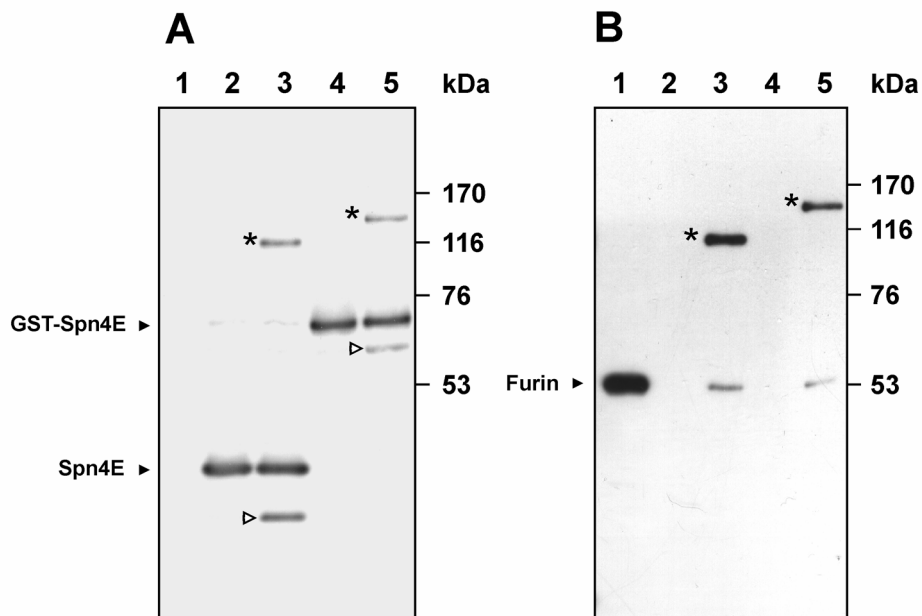
Weiß auf schwarz: Aminosäuren, die in allen fünf Sequenzen konserviert sind; fett: Aminosäurepositionen P1 und P1' für die Interaktion von  $\alpha_1$ -AT mit Trypsin. Die meisten Serpine haben einen RCL von 17 Aminosäuren, und die Position der Spaltstelle stimmt mit der von  $\alpha_1$ -AT überein. Daher wurde die Zuordnung der Aminosäurepositionen von der Sequenz von  $\alpha_1$ -AT abgeleitet. Auch Serpine mit Schleifen von 16 oder 18 Aminosäuren Länge können Proteasen irreversibel hemmen (Gettins, 2002). Kleine Aminosäuren in der *hinge*-Region (P15-P9) sind charakteristisch für inhibitorische Serpine.

Die Aminosäuresequenzen der RCLs der Spn4-Varianten weisen markante Unterschiede auf. Während bei Variante A/E basische Aminosäuren dominieren, ist die potenzielle P1-Position der anderen Varianten mit Alanin, Threonin oder Valin besetzt (Abschnitt 2.3). Varianten B/F und C/G weisen insbesondere im C-terminalen Teil Übereinstimmungen auf.

### 5.3.1 Bildung SDS-stabiler Komplexe von Spn4E mit der S8-Protease Furin

Die Aminosäuresequenz von Spn4A/E fiel durch zwei Merkmale besonders auf: 1. die Aminosäureabfolge RRKR im RCL, die der Erkennungs- und Spaltsequenz der Proproteinkonvertase Furin RXK/RR entspricht (Steiner, 1998) und 2. durch die Sequenz HDEL am C-Terminus des Proteins, welche dem Bindemotiv (KDEL) des ERD2-Rezeptors ähnelt (Scott *et al.*, 2004). Dieser Rezeptor transportiert mit einem solchen Signal ausgestattete Proteine ins ER zurück (Semenza *et al.*, 1990, Cabrera *et al.*, 2003). Beide Eigenschaften wiesen darauf hin, dass Furin, welches im sekretorischen Pfad lokalisiert ist (Anderson *et al.*, 2002), eine Zielprotease von Spn4A darstellt.

Eine verkürzte und somit lösliche Form von humanem Furin (Bravo *et al.*, 1994) wurde, wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben ist, mit rekombinantem GST-Spn4E und Spn4E unter Zusatz von 1 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert. Abbildung 14 zeigt die Bildung SDS-stabiler Komplexe mit Furin für beide getesteten Serpinformen (Spuren 3 und 5). Die Komplexe von ~115 und ~135 kDa wurden sowohl von Anti-Spn4- als auch von Anti-Furin-Antikörpern detektiert. Die anderen Serpine, die keine basischen Aminosäuren an einer typischen Spaltposition im RCL enthalten (siehe Abbildung 13), bildeten wie erwartet keine Komplexe aus (nicht dargestellt).



**Abbildung 14 Bildung SDS-stabiler Furinkomplexe mit Spn4E und GST-Spn4E**

Furin wurde mit Spn4E oder GST-Spn4E inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels Western-Blot (10 % NuPAGE-Gele) analysiert. Zur Detektion wurden das Anti-Spn4-Antiserum (A) oder ein monoklonaler Anti-Furin-Antikörper (B) eingesetzt. Spuren 1, Furin; Spuren 2, Spn4E; Spuren 3, Spn4E und Furin; Spuren 4, GST-Spn4E; Spuren 5, GST-Spn4E mit Furin. Komplexe sind mit einem Stern und die RCL-gespaltenen Serpinformen mit einem offenen Pfeilkopf markiert. Die Größen der Markerproteine (HMW-Marker) sind jeweils am rechten Bildrand angegeben.



Zusätzlich zu den jeweiligen Komplexen trat die RCL gespaltene Form von Spn4E und GST-Spn4E bei Furinzusatz auf (A, Spuren 3 und 5). Dies ist der Anteil, der entsprechend des *branched pathway*-Mechanismus der Serpine (Abschnitt 2.1.1, Abbildung 2) als Substrat fungiert.

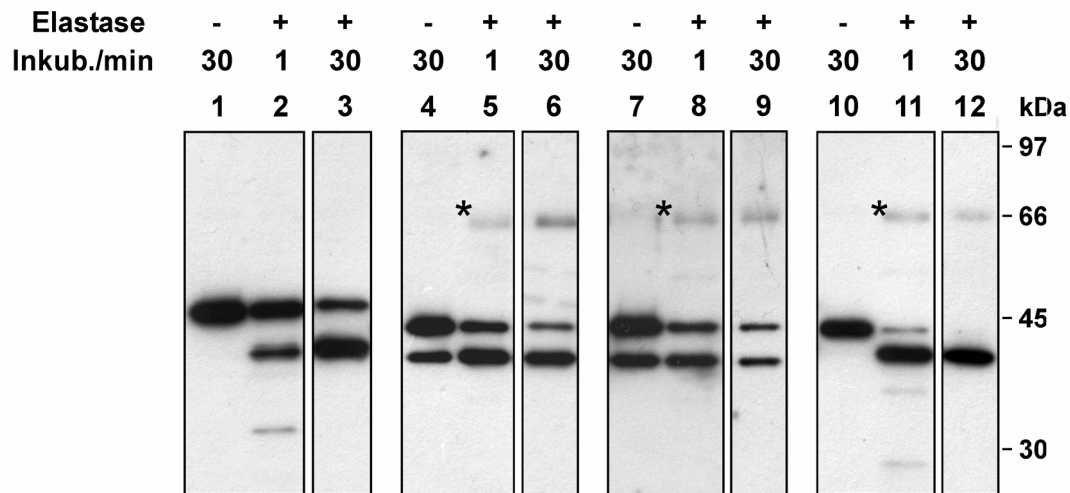
Die etwa gleich starken Signale der Komplexe in Abbildung 14, Spuren 3 und 5 deuten darauf hin, dass der GST-Anteil von GST-Spn4E die Komplexbildung nicht beeinträchtigt. Um möglichst native Serpine zu untersuchen, wurden in nachfolgenden Experimenten jeweils die TEV-gespaltenen Varianten eingesetzt, wenn nicht anders angegeben. Abbildung 14B zeigt, dass trotz eines großen Spn4E-Überschusses in den Spuren 3 und 5 bei etwa 53 kDa freies Furin detektiert wurde. Bei einem Kontrollexperiment zeigte sich, dass diese Bande nicht auftritt, wenn die Proben bei nur 72°C (anstatt bei 95°C) denaturiert werden (nicht gezeigt). Furin wird also komplett umgesetzt, aber ein Teil der Komplexe zerfällt nachträglich bei stringenteren Bedingungen.

### 5.3.2 Komplexbildung mit Zielproteasen der S1-Serinproteasefamilie

Nachdem gezeigt worden war, dass nur Spn4E die subtilisinähnliche Serinprotease Furin hemmt, wurden als nächstes Serinproteasen der Chymotrypsinfamilie S1 auf ihre Hemmung durch die Spn4-Varianten untersucht. Viele Vertreter dieser größten Proteasefamilie werden *in vivo* durch Serpine wie  $\alpha_1$ -AT, Antichymotrypsin oder Antithrombin III reguliert (Abschnitt 2.2.1).

Chymotrypsin besteht aus drei disulfidverbrückten Peptidketten und spaltet bevorzugt C-terminal von aromatischen oder großen aliphatischen Aminosäuren. Sowohl Spn4B/F als auch Spn4C/G tragen solche Aminosäuren (Tyr bzw. Leu) in ihrem RCL (Abbildung 13). Neutrophile Elastase gehört ebenfalls zur S1-Familie, spaltet spezifisch C-terminal von kleinen aliphatischen Aminosäuren und wird *in vivo* durch  $\alpha_1$ -AT reguliert. Da der RCL von Spn4D/H aus einer Abfolge von Alanin und Valin besteht, und auch Spn4B/F ein Alanin an der typischen P1-Position enthält, wurde auch HNE als mögliche Zielprotease für die Spn4-Varianten getestet. HNE (Abbildung 15) und Chymotrypsin (Abbildung 16) wurden unter den in Abschnitt 4.5.4 beschriebenen Bedingungen mit den vier Serpinen Spn4E-H umgesetzt.

Abbildung 15 zeigt jeweils die Proben der Komplexbildungsreaktionen, die nach 1 min (Spuren 2, 5, 8, 11) oder 30 min (3, 6, 9, 12) gestoppt wurden. In den Spuren 1, 4, 7, 10 sind Proben der jeweiligen Spn4-Varianten aufgetragen, die für 30 min nur in Puffer inkubiert wurden.



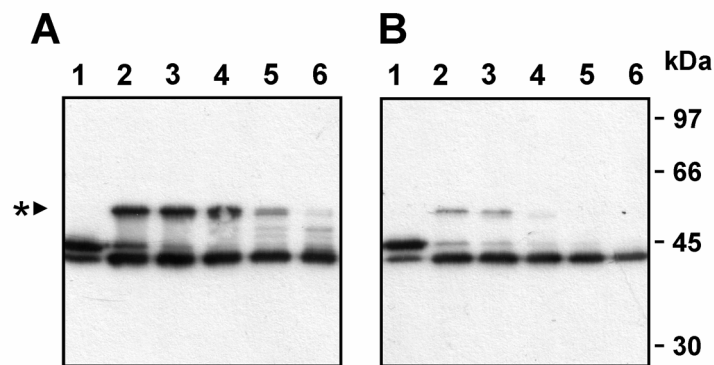
**Abbildung 15 Komplexbildung von Spn4F, G und H mit humaner neutrophiler Elastase**

Die vier Serpine Spn4E (Spuren 1-3), Spn4F (Spuren 4-6), Spn4G (Spuren 7-9) und Spn4H (Spuren 10-12) wurden mit oder ohne HNE für die angegebenen Zeiträume inkubiert und die Proben mittels Western-Blot analysiert. Hierfür wurden 10 %ige NuPAGE Gele verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GST-Spn4-Antiserum. Die Serpine wurden in den Spuren 1, 4, 7, und 10 als stärkste Banden von etwa 45 kDa detektiert. Die jeweilige RCL-gespaltene Form von etwa 38 kDa, die bei Spn4E und H erst nach Inkubation mit HNE auftritt, liegt bei Spn4F und G bereits in der Serpinpräparation vor (Spuren 4 und 7). Enzym/Inhibitorkomplexe sind mit einem Stern markiert. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

SDS-stabile Elastasekomplexe der erwarteten Größe von ~70 kDa wurden mit Spn4F, G und H erhalten. Der Furininhibitor Spn4E wurde hingegen nicht komplexiert. Die Komplexe waren in allen Fällen bereits nach einer Inkubationszeit von 1 min vorhanden. Wie für die irreversible Hemmung durch Serpine erwartet, waren sie über einen Zeitraum von 30 min stabil. Obwohl ein 4-facher Überschuss an Spn4H eingesetzt wurde und ein Anteil der Proteasemoleküle offensichtlich gehemmt wurde, lag nach 30 min nur noch die RCL-gespaltene Form dieses Serpins vor (Spur 12). Die RCLs einer gleichen Menge von Spn4E, welches keine Komplexe mit HNE bildete (Spur 3), und auch die von Spn4F und G (Spuren 6 und 9) wurden unter diesen Bedingungen nicht vollständig hydrolysiert. Nach 1 min treten bei den in den Spuren 2 und 11 aufgetragenen Proben weitere Degradationsprodukte von etwa 30 kDa auf, die durch HNE anschließend weiter proteolysiert werden und später nicht mehr nachweisbar sind. Ein Teil der Serpine Spn4F und G lag schon vor der Zugabe des Enzyms in einer truncierten, wahrscheinlich RCL-gespaltenen Form vor (Vergleich der Spuren 1 und 10 mit den Spuren 4 und 7). Das Coomassiegel dieser Proteine (Abbildung 12) hatte bereits gezeigt, dass etwa 20 % dieser Varianten gespalten waren.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die rekombinanten Serpine Spn4F, G, und H aktiv sind und im Gegensatz zu Spn4E SDS-stabile Komplexe mit HNE bilden.

Vergleichbare Experimente mit Chymotrypsin zeigten, dass die Serpine Spn4F und G auch mit dieser Protease Komplexe bildeten, wohingegen Varianten E und H nur degradiert wurden. In Abbildung 16 sind Zeitreihen der Umsetzung von Chymotrypsin mit Spn4F (A) und Spn4G (B) dargestellt. In Spur 1 sind jeweils die für 30 min nur in Puffer inkubierten Serpine gezeigt. Die Spuren 2-6 zeigen Proben mit Serpin und Chymotrypsin, die jeweils für 1, 2, 5, 10 und 30 min inkubiert worden waren. Bei Spn4F und G wurden bereits nach 1 min Komplexe von etwa 55 kDa detektiert. Diese Größe entspricht der von Komplexen aus dem jeweiligen Serpin und der 10 kDa großen C-Kette des Chymotrypsins, welche das katalytische Serin (Ser-195) enthält. Hier wurde im Gegensatz zum Experiment mit HNE ein selbst gegossenes Gel verwendet, so dass die Proteine anders aufgetrennt wurden als in Abbildung 15 dargestellt ist.



**Abbildung 16** Zeitreihen für die Bildung von Komplexen zwischen Chymotrypsin und Spn4F bzw. G

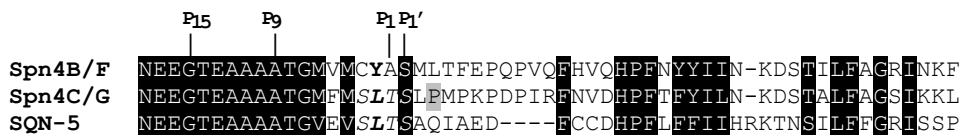
Spn4F (A) bzw. Spn4G (B) wurden für 1, 2, 5, 10 oder 30 min mit Chymotrypsin umgesetzt (Spuren 2-6). Die Spuren 1 zeigen jeweils eine Probe des Serpins, die für 30 min in Puffer inkubiert wurde. Die Proben wurden mittels eines selbst gegossenen 10 %igen Polyacrylamidgels aufgetrennt und der nachfolgende Western-Blot mit Anti-Spn4-Antikörpern entwickelt. Enzym/Inhibitor Komplexe von 55 kDa sind mit einem Stern markiert. Die Größen der Markerproteine sind am rechten Bildrand angegeben.

Die Zeitreihen der Umsetzungen zeigten, dass die Komplexe im Gegensatz zur Reaktion mit Elastase nach ihrer schnellen Bildung nach 5 bzw. 10 min zum Großteil wieder zerfallen bzw. abgebaut waren. Schon nach 2 min war kaum intaktes Spn4F oder G (Spuren 3) mehr vorhanden. Das Auftreten mehrerer zusätzlicher Banden von etwa 50 kDa (Abbildung 16A Spuren 5, 6) weist darauf, dass die Komplexe an verschiedenen Stellen gespalten wurden, und dass der Serpinüberschuss (3-fach) nicht ausgereicht hat, um Chymotrypsin vollständig zu hemmen.

Durch die Reaktionen mit Furin und Proteasen der S1-Familie konnte gezeigt werden, dass alle rekombinant hergestellten Spn4-Varianten in aktiver Form gewonnen werden konnten. Weiterhin lieferten die Komplexbildungen verschiedener Proteasen erste experimentelle Belege für die postulierte unterschiedliche Spezifität der Serpine.

### 5.3.3 Komplexbildung mit Cysteinproteasen der Familie C1

Im Gegensatz zu Metalloproteasen und Aspartatproteasen, bei denen ein aktiviertes Wassermolekül bei der Proteolyse als Nukleophil dient, zeigt der Reaktionsmechanismus von Cysteinproteasen große Parallelen zu dem von Serinproteasen (Abschnitt 2.2.2). Durch die Beteiligung des katalytischen Cysteins tritt auch bei diesen Proteasen eine zwischenzeitliche kovalente Bindung an das zu spaltende Protein auf. Cysteinproteasen spalten bevorzugt Substrate, die an der P2-Position große hydrophobe Aminosäuren aufweisen. Es sind bereits einige Cysteinprotease-inhibierende Serpine mit solchen P2-Aminosäuren beschrieben (Welss *et al.*, 2003). Ein Beispiel für einen *cross-class*-Inhibitor, der sowohl chymotrypsinähnliche Serinproteasen als auch Cysteinproteasen hemmen kann, ist das murine Serpin SQN-5, welches die Cathepsine K, L, S und V inhibiert (Al-Khunaizi *et al.*, 2002). Ein Vergleich der RCL-Sequenzen von SQN-5 und Spn4C/G zeigte auffällige Übereinstimmungen (Abbildung 17).

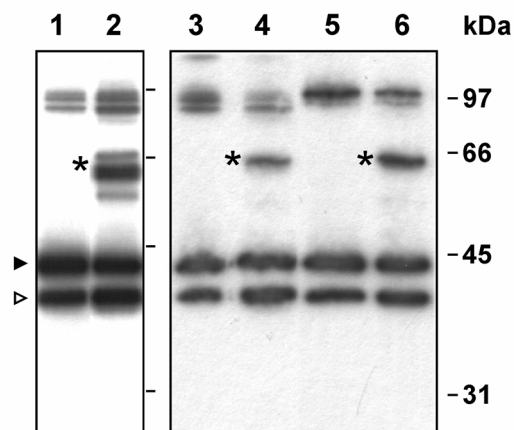


**Abbildung 17** Alignment der RCL-Aminosäuresequenzen von Spn4B/F und Spn4C/G mit der von SQN-5. Weiß auf schwarz: in allen drei Sequenzen identisch oder konservativ ersetzt; fett: hydrophobe Aminosäuren an der potenziellen P2-Position, kursiv: identisches Tetrapeptid im RCL von Spn4C/G und SQN-5, grau unterlegt: Prolin an P3' von Spn4C/G. Die Zuordnung der Aminosäurepositionen wurde von der Sequenz von  $\alpha_1$ -AT abgeleitet, vgl. Abbildung 13.

An der für die Hemmung von Cysteinproteasen wichtigen P2-Position tragen beide Serpine ein Leucin und auch die Positionen P3, P1 und P1' stimmen bei beiden überein. Das Prolin an P3' von Spn4C/G deutete ebenfalls darauf hin, dass diese Spn4-Variante ein Inhibitor von Cysteinproteasen ist (Luke *et al.*, 2000, Al-Khunaizi *et al.*, 2002). Spn4B/F hat an Position P2 ein Tyrosin. Diese große aromatische Aminosäure ist weniger hydrophob als Leucin, Valin oder Phenylalanin, aber auch sie könnte in die S2-Tasche von Cysteinproteasen passen.

Zur Überprüfung, ob die von Spn4-Serpine nicht nur mit Proteasen der Familien S1 und S8 Komplexe bilden, sondern auch mit Cysteinproteasen der Familie C1, wurden Spn4E, F, G und H unter nicht reduzierenden Bedingungen bei pH 5,5 mit Cathepsin B (CatB), Cathepsin L (CatL) oder Cathepsin S (CatS) inkubiert (Abschnitt 4.5.4). Vorversuche hatten ergeben, dass ein Aufkochen mit Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol für 4 min bei 95°C die Cathepsine nicht deaktiviert, sondern die Reaktion weiterläuft. Um die Komplexierungsreaktion definiert nach 1-5 min zu stoppen, wurde daher der

niedermolekulare Cysteinproteaseinhibitor E-64 zugesetzt. Der Nachweis von SDS-stabilen Komplexen aus Cysteinproteasen und Serpinen wurde bisher vielfach nur unter besonderen Bedingungen erreicht (Hwang *et al.*, 2005). Deshalb wurde das NuPAGE-System, mit Gelen mit einem pH-Wert von 6,4 für die Western-Blot-Analyse gewählt und auf Reduktionsmittel im Probenpuffer verzichtet. Zum Nachweis wurde das Anti-Spn4-Antiserum verwendet. Keins der Serpine bildete Komplexe mit CatB (nicht dargestellt). Die Experimente mit CatS zeigten Komplexbanden bei der Reaktion mit Spn4F und G (Abbildung 18, Spuren 4 und 6), nicht aber bei der Inkubation mit Spn4E oder H (nicht dargestellt).



**Abbildung 18 SDS-stabile Spn4-Komplexe mit Cysteinproteasen**

Spn4F oder SpnG wurden mit CatL oder CatS inkubiert und die Produkte mittels Western-Blot mit Anti-Spn4-Antikörpern detektiert. Zum Vergleich wurden die Serpine ohne Protease nur in Puffer inkubiert. Spuren 1 und 3: Spn4F, Spur 2: Spn4F mit CatL, Spur 4: Spn4F mit CatS, Spur 5: Spn4G, Spur 6: Spn4G mit CatS. Komplexe sind jeweils mit einem Stern markiert. Die intakten Serpine haben eine Größe von 45 kDa (geschlossener Pfeilkopf) und die RCL-gespaltenen Formen von etwa 38 kDa (schwarzer Pfeilkopf). Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

Deutliche Signale für CatL-Komplexe wurden unter vergleichbaren Bedingungen nur mit Spn4F erhalten (Abbildung 18, Spur 2), aber bei langer Belichtungszeit der Röntgenfilme konnten auch Spn4G/CatL-Komplexe nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Bei einer Größe von etwa 100 kDa wurden weitere Signale detektiert, die nach Aufkochen mit dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol jedoch nicht mehr nachweisbar waren. Es könnte sich hierbei um Heterodimere aus RCL-gespaltenen und intakten Serpinmoleküle handeln. Auch die Komplexe mit den Cysteinproteasen wurden durch die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol hydrolysiert, wie für die unter reduzierenden Bedingungen labile Thioesterbindung erwartet (Xu *et al.*, 2001). Spn4B/F und SpnC/G sind also in der Lage, SDS-stabile Komplexe sowohl mit Serinproteasen als auch mit Cysteinproteasen auszubilden. Sie sind die ersten beschriebenen Serpine aus *Drosophila*, die Cysteinproteasen hemmen und die ersten *cross-class* Serpine der Fruchtfliege.

---

## 5.4 Kinetische Charakterisierung der Hemmung von Zielproteasen

Die in Abschnitt 5.3 beschriebenen Komplexierungsexperimente lieferten erste Belege dafür, dass die Spn4-Varianten eine unterschiedliche Enzymspezifität haben und Proteasen aus den drei verschiedenen Klassen S1, S8 und C1 hemmen können. Die kinetische Charakterisierung der Inhibition mindestens einer Protease aus jeder Klasse durch die Spn4-Varianten wird in diesem Abschnitt beschrieben. Durch die Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung ( $k_{assoc}$ ) und der SI-Werte sollte überprüft werden, ob die Inhibitionsreaktionen die Charakteristika physiologischer Serpin/Protease-Interaktionen –  $k_{assoc}$ -Werte von  $>10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und SI-Werte von etwa 1 – zeigen (Gettins, 2002, Al-Khunaizi *et al.*, 2002).

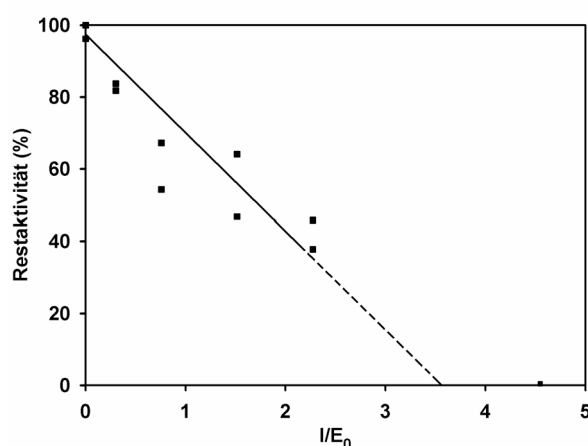
### 5.4.1 SI-Bestimmung für die Hemmung von Furin durch Spn4E

Aufgrund der Rolle von Furin bei der Prozessierung vieler Pathogene ist die Identifikation und Anwendung effizienter Inhibitoren von großem Interesse. Zunächst wurden daher die kinetische Parameter für die Hemmung von Furin durch Spn4E bestimmt (5.4.1 und 5.4.2).

Serpine sind Suizid-Inhibitoren, die für die Protease als Pseudosubstrat wirken, und der initiale Schritt der Proteolysereaktion ist Teil des Hemmmechanismus. Neben der irreversiblen Komplexierung und Desaktivierung der Protease kann auch eine Konkurrenzreaktion ablaufen, bei welcher das Serpin als Substrat gespalten wird (vgl. Abschnitt 2.1.1, Abbildung 2). Die irreversible Hemmung kann nur dann quantitativ ablaufen, wenn die Insertion des RCL in das  $\beta$ -Faltblatt des Serpins unter Deformation der Protease wesentlich schneller abläuft, als die Deacylierung im Fall der Proteolyse. Die Stöchiometrie der Hemmung wird über den SI-Wert beschrieben und ist abhängig von den Geschwindigkeiten der beiden konkurrierenden Reaktionen (Gettins, 2002).

Zur Bestimmung des SI-Wertes wurden verschiedene Spn4E-Konzentrationen mit einer durch Titration bestimmten, gleichbleibenden Furinkonzentration inkubiert (4.6.1). Nach 1 h wurde die Restaktivität der Protease gemessen. Hierfür wurde der Reaktionsansatz mit einer Lösung verdünnt, die einen großen Überschuss des Furinsubstrates Pyroglutamyl-RTKR-7-amido-4-methylcoumarin (pyr-RTKR-AMC) enthielt. Die Fluoreszenzzunahme durch AMC-Freisetzung mit der Zeit wurde kontinuierlich gemessen. Die Steigungen der Geraden entsprechen den Raten der AMC-Bildung und korrelieren mit der jeweiligen Restaktivität des Furins. Je höher die eingesetzte Spn4E-Konzentration, desto geringer war die Restaktivität. Die Rate der ungehemmten Reaktion wurde 100 % gesetzt.

Die Auftragung in Abbildung 19 zeigt eine nahezu lineare Abnahme der relativen Restaktivitäten in Abhängigkeit der zugesetzten Serpinkonzentration. Da bestimmt werden sollte, wieviel mol Serpin benötigt werden, um ein mol Protease zu hemmen, wurden die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen  $[I]$  durch die zuvor durch eine analoge Titration bestimmte Furinkonzentration  $[E_0]$  geteilt (4.6.1). Nach Anpassung einer Geraden an die ersten linear abfallenden Funktionswerte lässt sich der SI-Wert direkt als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesen und wurde mit 3,5 bestimmt. Bei einem 4-fachen Überschuss von Spn4E wurde unter den verwendeten Reaktionsbedingungen bereits keine Furinaktivität mehr festgestellt.



**Abbildung 19 Bestimmung des SI-Wertes für die Hemmung von Furin durch Spn4E**

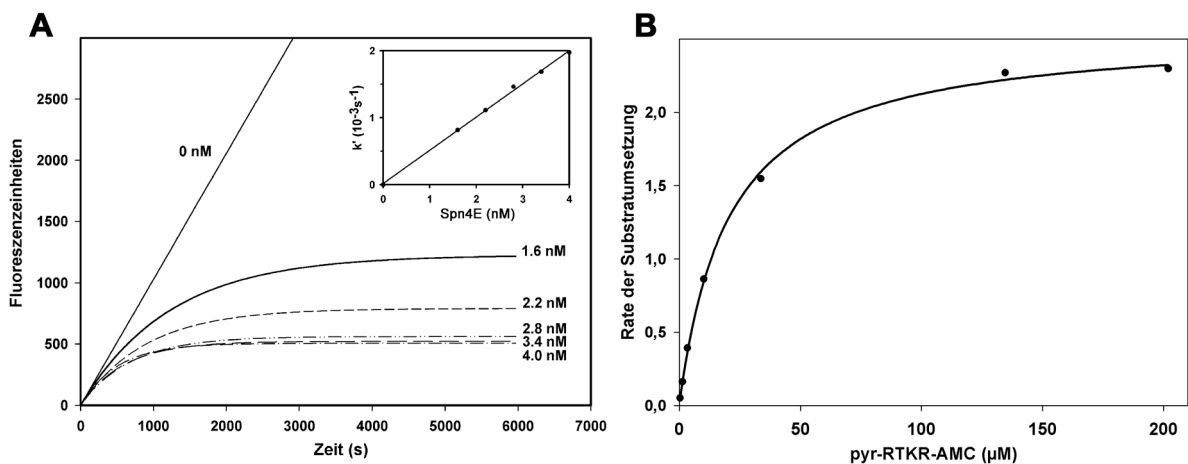
Furin wurde mit einem bis zu 5-fachen Spn4E-Überschuss inkubiert und die Restaktivität des Enzyms gemessen. Die Auftragung zeigt die relative Restaktivität in Abhängigkeit des Serpinüberschusses ( $I/E_0$ ). Eine Aktivität von 100 % ist die relative Rate der 7-Amino-4-methylcoumarin-Bildung bei der ungehemmten Reaktion. Nach Anpassung einer Geraden an die ersten linear abfallenden Funktionswerte lässt sich der SI-Wert als Schnittpunkt mit der x-Achse ablesen.

In hier nicht dargestellten Kontrollexperimenten zeigte sich in Übereinstimmung mit Abbildung 14, dass auch das Fusionsprotein GST-Spn4E unter diesen Bedingungen Furin effizient hemmt. Der Zusatz eines bis zu 50-fachen Überschusses von GST-Spn4F, G oder H hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Protease. Dies bestätigte, dass Furin selektiv nur von RCL-Variante A/E gehemmt wird. Eine via Mutagenese erzeugte Form, GST-Spn4E<sub>RRKA</sub>, bei welcher die vermutete P1-Aminosäure Arg 342 durch Ala ersetzt ist, zeigte ebenfalls keine Hemmung von Furin. Die basische Aminosäure Arginin an dieser Position ist demnach für die Erkennung und Acylierung des Serpins essenziell.

### 5.4.2 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{assoc}$ für die Hemmung von Furin durch Spn4E

Spn4A/E wurde im Rahmen dieser Arbeit als Inhibitor der Protease Furin identifiziert. Um die Geschwindigkeit der Hemmung mit der von bereits bekannten Furininhibitoren vergleichen zu können, wurde die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  $k_{assoc}$  bestimmt. Hierfür wurde die *progress curve*-Methode angewendet (vgl. Abschnitt 4.6.2). Mit dieser Methode wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von Furin durch die Serpine PI8 und  $\alpha_1$ -PDX mit Werten von  $k_{assoc} = 6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt (Dahlen *et al.*, 1998, Dufour *et al.*, 1998). PI8 ist ein Ovalbumin-ähnliches Serpin ohne Signalpeptid und  $\alpha_1$ -PDX ist eine gentechnisch modifizierte Form von  $\alpha_1$ -AT (Einleitung, Abschnitt 2.4.2).

Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von humanem Furin zu einem Gemisch aus Spn4E und Peptidsubstrat pyr-RTKR-AMC gestartet. Durch die Hemmung der Protease wurde im Verlaufe der Reaktion die Konzentration des freien Enzyms gesenkt und weniger Substrat wurde umgesetzt. In Abbildung 20A sind die *progress curves* für verschiedene Spn4E-Konzentrationen gezeigt. Je höher die Serpinkonzentration, um so schneller wird humanes Furin gehemmt. Das Erreichen eines Grenzwertes zeigt, dass Furin im Reaktionsverlauf vollständig und irreversibel gehemmt wurde.



**Abbildung 20** Kinetik der Hemmung von Furin durch Spn4E

In A sind die *progress curves* für die Hemmung von 0,1 nM Furin (A) durch Spn4E gezeigt. Die Serpinkonzentrationen (mindestens 10-facher Überschuss) sind rechts neben den jeweiligen Kurven angegeben. Die rechts oben eingefügte Abbildung zeigt die lineare Abhängigkeit der apparenten Hemmkonstanten pseudo erster Ordnung  $k'$  von der Serpinkonzentration. Aus den Geradensteigungen wurden unter Berücksichtigung der Michaeliskonstanten  $K_m$  von 20  $\mu\text{M}$  die Hemmkonstante zweiter Ordnung  $k_{assoc}$  berechnet. Die  $K_m$ -Bestimmung ist in B dargestellt. Als Peptidsubstrat für Furin diente Pyroglutamyl-RTKR-7-Amido-4-methylcoumarin (pyr-RTKR-AMC, Aminosäuren im Einbuchstabencode)



---

Durch nicht lineare Regression mittels EnzFitter Software wurde für jede Serpinkonzentration die Hemmkonstante pseudo erster Ordnung  $k'$  bestimmt (4.6.2, Gleichung 3). Die für jede Reaktion ermittelten  $k'$ -Werte wurden gegen die jeweilige Serpinkonzentration aufgetragen und nach 3.5.2, Gleichung 5 eine Gerade durch den Ursprung an die Daten angepasst (Abbildung 20, eingefügter Graph). Aus der Geradensteigung wurde unter Einbeziehung des mit 20  $\mu\text{M}$  bestimmten  $K_m$ -Wertes (Abbildung 20B) eine apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung  $k_{assoc}$  von  $5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Somit ist Spn4E der schnellste bislang beschriebene irreversible Furininhibitor.

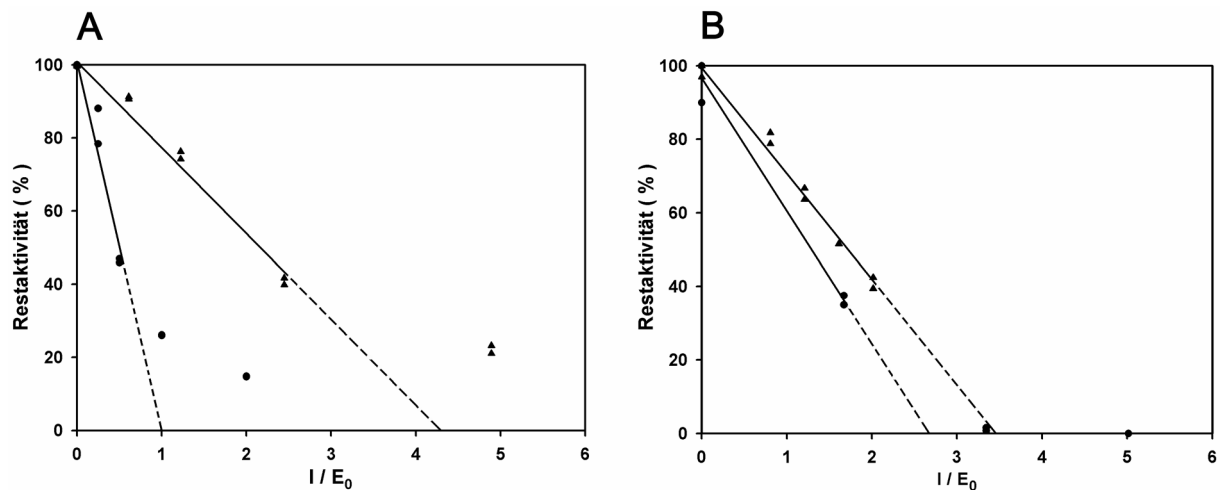
Durch Multiplikation mit dem SI-Wert wird eine Geschwindigkeitskonstante erhalten, bei der berücksichtigt wird, dass nur eins von 3,5 mol Spn4E tatsächlich in die Hemmreaktion involviert ist (Gettins, 2002). Die so korrigierte Konstante  $k_{overall}$  von  $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  weist darauf, dass Spn4E ein sehr aktiver Furininhibitor ist. Die Geschwindigkeit der Hemmung ist vergleichbar mit der für die Hemmung von HNE durch das Serpin Leukocyten-Elastase-Inhibitor (LEI) oder für die Hemmung des urokinaseähnlichen Plasminogenaktivators (uPA) durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I (PAI-1) mit Hemmkonstanten von  $3,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Gettins, 2002).

### 5.4.3 Stöchiometrie der Hemmung von CatS bzw. L durch Spn4F und G

In Abschnitt 5.3.3 wurde gezeigt, dass Spn4F und G SDS-stabile Komplexe mit Cathepsin L und S bilden können. Auch diese Reaktionen wurden kinetisch untersucht.

Nach der *active site*-Titration von CatS und CatL mit E-64 wurden die Cysteinproteasen mit den Serpinen Spn4F und G titriert. Experimentelle Details sind dem Methodenteil (Abschnitt 4.6.1) zu entnehmen.

Die Restaktivität der Proteasen nahm wie erwartet linear mit höheren Serpinkonzentrationen ab (Abbildung 21). Durch die Auftragung der jeweiligen Restaktivitäten gegen den Serpinüberschuss ( $I/E_0$ ) wurde der SI-Wert als Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse erhalten. Für die Hemmung von CatS wurden ähnliche SI-Werte (2,7 bzw. 3,6) für Spn4F bzw. Spn4G bestimmt. Bei CatL hingegen zeigte Spn4F die effektivere Hemmung mit  $SI = 1$ . Für Spn4G wurde ein SI-Wert von 4,3 bestimmt.



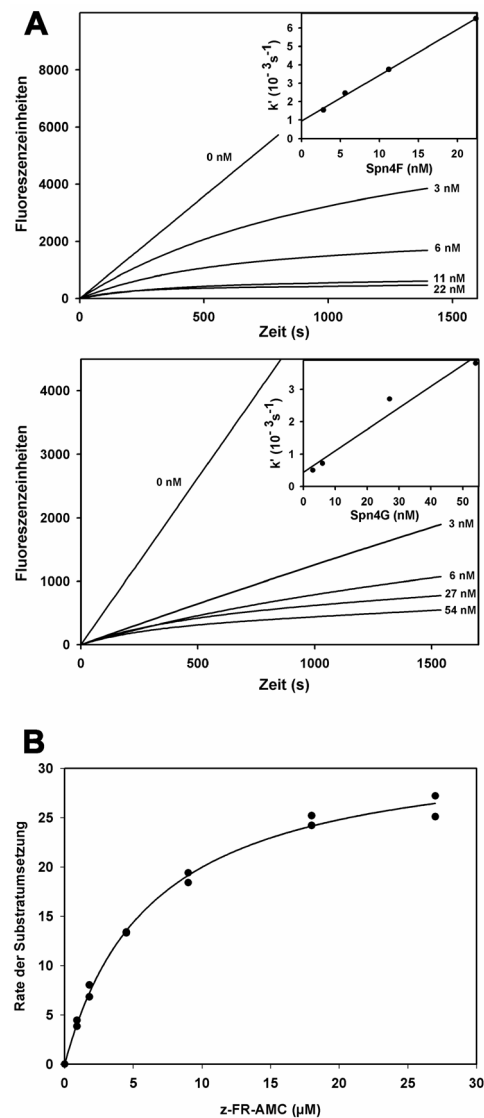
**Abbildung 21 SI-Bestimmung für die Hemmung von CatL bzw. S durch Spn4F und G**

CatL (A) oder S (B) wurden mit einem bis zu 5-fachen Überschuss von Spn4F (●) oder Spn4G (▲) inkubiert und die Restaktivität der Enzyme gemessen. Die Auftragung zeigt die relativen Restaktivitäten in Abhängigkeit des Serpinüberschusses ( $I/E_0$ ). Die SI-Werte wurden als Schnittpunkt mit der x-Achse abgelesen (siehe auch Abbildung 19).

#### 5.4.4 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{assoc}$ für die Hemmung von CatS bzw. CatL durch Spn4F und G

Unter Anwendung der *progress curve*-Methode ist es wie bei Furin möglich, die apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  $k_{assoc}$  für die Hemmung von Cysteinproteasen durch Serpine zu bestimmen (Al-Khunaizi *et al.*, 2002, Welss *et al.*, 2003).

Ein Gemisch aus Serpin und Peptidsubstrat wurde wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben in Mikrotiterplatten vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von CatS oder CatL gestartet. Die Substratumsetzung durch CatL in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ist in Abbildung 22A dargestellt. In allen Fällen zeigte sich die erwartete Abnahme der Enzymaktivität mit höheren Serpinkonzentrationen. Nach der anfänglichen exponentiellen Substratfreisetzung stellte sich bereits nach etwa 10 min ein neues Gleichgewicht mit der *steady state*-Geschwindigkeit  $v_s$  ein. Die Kurven erreichten also keinen Grenzwert, und die Daten ließen sich durch Gleichung 2 (Methodenteil, Abschnitt 4.6.2) beschreiben. Unter den verwendeten Messbedingungen wurde also keine vollständige Hemmung von CatL erreicht. Die eingefügten Abbildungen zeigen jeweils die Auftragung von  $k'$  gegen die Serpinkonzentration, aus welcher nach Anpassung von Gleichung 4 (Methodenteil 4.6.2)  $k_{assoc}$  aus der Steigung bestimmt wurde. Der zuvor bestimmte  $K_m$ -Wert für die Reaktion von CatL mit dem Substrat z-FR-AMC von 6,4  $\mu\text{M}$  wurde hierbei berücksichtigt (Abbildung 22B). Der Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der y-Achse ist in Fall einer reversiblen Reaktion nicht Null, sondern entspricht der Dissoziationskonstanten  $k_{diss}$ . Durch Bildung des Quotienten nach Gleichung 1 (4.6.2) wurden für CatL auch die Gleichgewichtskonstanten der Hemmung  $K_i$  berechnet.



**Abbildung 22 Kinetik der Hemmung von CatL durch Spn4F und G**

In A sind jeweils die *progress curves* für die Hemmung von 0,5 nM CatL durch Spn4F (oben) oder Spn4G (unten) gezeigt. Es wurde jeweils ein mindestens 8-facher Serpinüberschuss eingesetzt. Die Serpinkonzentrationen sind jeweils rechts neben den Kurven angegeben. Die rechts oben eingefügten Abbildungen zeigen jeweils die lineare Abhängigkeit der apparenten Hemmkonstante pseudo erster Ordnung  $k'$  von der Serpinkonzentration. Aus den Geradensteigungen wurden unter Berücksichtigung der Michaeliskonstanten  $K_m$  von 6,4  $\mu M$  die Hemmkonstante zweiter Ordnung  $k_{assoc}$  berechnet. Die  $K_m$ -Bestimmung ist in B dargestellt. Die Abkürzung z-FR-AMC steht für das fluorogene Substrat Benzylloxycarbonyl-FR-7-Amido-4-methylcoumarin.

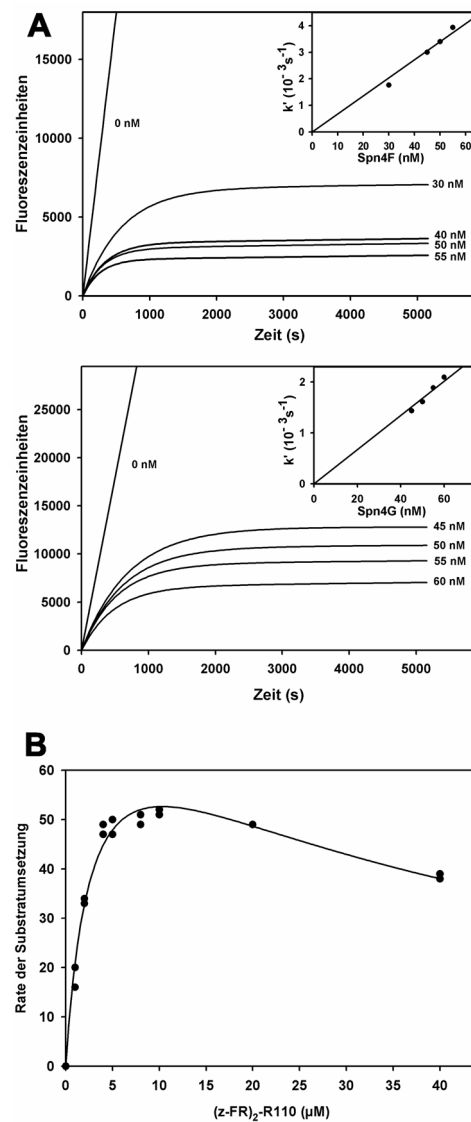
Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 gezeigt. Die Konstanten  $k_{assoc}$  für die Hemmung von CatL durch Spn4F oder G betragen  $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Durch Berücksichtigung der Stöchiometrie der Hemmung resultieren Werte von  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Spn4F und G hemmen CatL also ungefähr gleich schnell. Die Hemmkonstanten liegen im für physiologische Interaktionen beschriebenen Größenbereich und gehören zu den höchsten Werten, die für Cysteinprotease-inhibierende Serpine beschrieben wurden. Die  $K_i$  -Werte liegen jeweils in nanomolaren Bereich. Da die Gleichgewichtskonzentration des Protease/Inhibitor-Komplexes um neun Zehnerpotenzen größer als das Produkt der Konzentrationen der freien Reaktanden ist, kann die Reaktion – wie für Serpine und ihre Zielproteasen erwartet – als irreversibel betrachtet werden (4.6.2, Gleichung 1).

Die Hemmkurven für die Reaktion von CatS mit Spn4F oder G sind in Abbildung 23A dargestellt. Nach der initialen exponentiellen Produktbildung, gemessen als Fluoreszenzzunahme, wird nach etwa 30 min kein Substratumsatz mehr detektiert, und die Fluoreszenz erreicht einen Grenzwert. In diesem Fall wurden die Messdaten wie bei der Reaktion von Furin mit Spn4E durch Gleichung 3 (Methodenteil, Abschnitt 4.6.2) für  $v_s = 0$  beschrieben.

Die eingefügten Graphen zeigen die lineare Abhängigkeit der apparenten Hemmkonstanten pseudo erster Ordnung  $k'$  von der eingesetzten Inhibitor-Konzentration. Wie für eine irreversible Reaktion mit  $k_{diss} = 0$  zu erwarten ist, lassen sich die Messpunkte mittels einer Geraden durch den Ursprung beschreiben. Aus den Geradensteigungen wurden für Spn4F und Spn4G unter Einbeziehung der mit  $2,9 \mu\text{M}$  bestimmten Michaeliskonstanten  $k_{assoc}$ -Werte von  $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Auch nach Berücksichtigung der SI-Werte sind diese Hemmkonstanten niedriger als die für die Reaktion mit CatL (Tabelle 21).

**Tabelle 21** Kinetische Parameter der Inhibition von Cathepsinen durch die Spn4-Varianten F und G

Serpin	Spn4F	Spn4G
Cathepsin L, SI	1	4,3
Cathepsin L, $k_{assoc}$	$1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Cathepsin L, $k_{diss}$	$8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Cathepsin L, $K_i$	$8,5 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1,7 \times 10^{-9} \text{ M}$
Cathepsin L, $k_{assoc} \times \text{SI}$	$1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Cathepsin S, SI	2,7	3,6
Cathepsin S, $k_{assoc}$	$1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$9,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Cathepsin S, $k_{assoc} \times \text{SI}$	$4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



**Abbildung 23 Kinetik der Hemmung von CatS durch Spn4F und G**

A zeigt die Kurven für die Hemmung von 2,5 nM CatS (B) durch Spn4F (oben) bzw. Spn4G (unten). Die Serpinkonzentrationen sind neben den jeweiligen Kurven angegeben (mindestens 10-facher Serpinüberschuss). Der eingefügte Graph zeigt die lineare Abhängigkeit der apparenten Hemmkonstanten pseudo erster Ordnung  $k'$  von der Serpinkonzentration. In Abbildung B ist die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes (2,9  $\mu M$ ) dargestellt. Die Abkürzung  $(z-FR)_2-R110$  steht für das fluorogene Substrat Bis-Benzylloxycarbonyl-FR-Rhodamin 110.

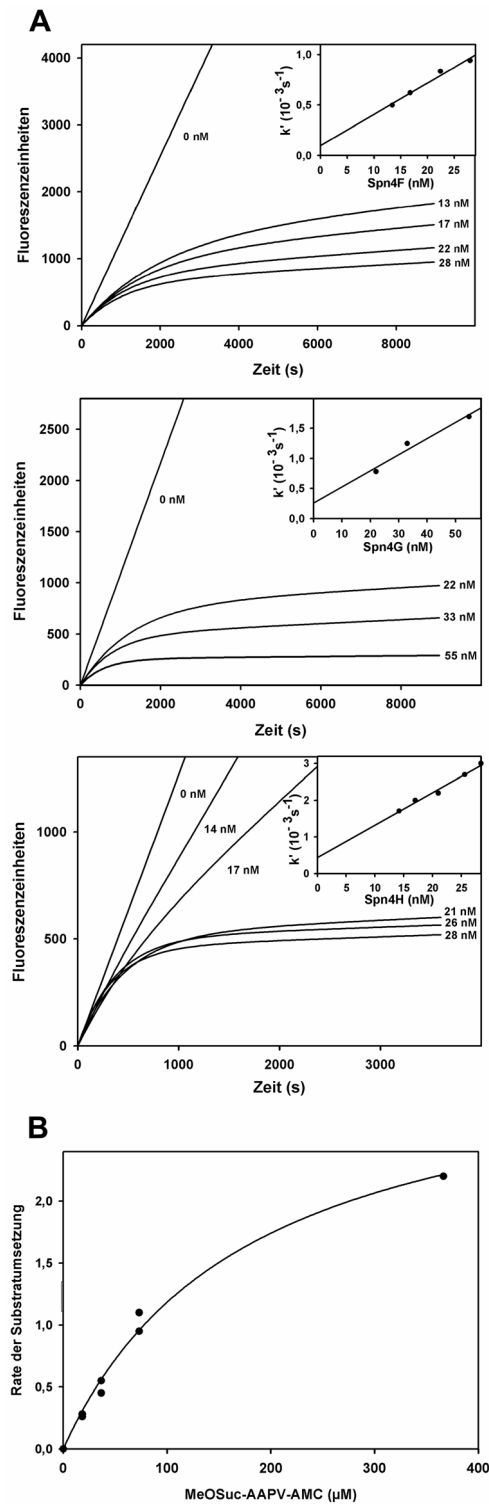
### 5.4.5 Hemmung von Elastase durch Spn4F, G und H

Bei dem in Abschnitt 5.3 beschriebenen *Screening* wurden HNE und Chymotrypsin als mögliche Zielproteasen aus der Familie S1 getestet. Komplexe mit Chymotrypsin wurden mit Spn4F und G erhalten, die auch als Inhibitoren von Cysteinproteasen wirken. HNE war die einzige der getesteten Proteasen, die durch Spn4H komplexiert werden konnte. Auch Spn4F und G bildeten Komplexe mit Elastase. Nachfolgend wurde die Hemmung von HNE durch die drei Serpine mit der *progress curve*-Methode analysiert (Abbildung 24). Da kein geeigneter *active site*-Titrant für Elastase zur Verfügung stand, wurde die vom Hersteller angegebene - durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelte – Gesamtproteasekonzentration als  $[E_0]$  angenommen. Die Konzentration an aktiver Protease ist sehr wahrscheinlich niedriger. Für die Bestimmung von  $k_{assoc}$  ist es nicht nötig, die genaue Proteasekonzentration zu kennen, solange durch einen mindestens 10-fachen Serpinüberschuss Bedingungen pseudo-erster Ordnung gewahrt bleiben. Für die Messungen wurde  $[E_0] = 1$  nM und Serpinkonzentrationen  $[I]$  von 13-55 nM eingesetzt (Abbildung 24). Die Kurvenverläufe waren in allen drei Fällen sehr ähnlich. Wie bei der Hemmung von CatL durch Spn4F und G beschrieben (Abschnitt 5.4.4), erreichte die Fluoreszenz keinen Grenzwert und Gleichungen 1, 2 und 4 aus Abschnitt 4.6.2 wurden zur Bestimmung der Konstanten  $k_{assoc}$ ,  $k_{diss}$  und  $K_i$  herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 22 Kinetische Parameter der Inhibition von HNE**

Serpin	Spn4F	Spn4G	Spn4H
$k_{assoc}$	$4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$k_{diss}$	$9,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
$K_i$	$2,1 \times 10^{-9} \text{ M}$	$6,7 \times 10^{-9} \text{ M}$	$3,4 \times 10^{-9} \text{ M}$

Für die Hemmung von HNE durch Spn4F und G wurden  $k_{assoc}$ -Werte von  $4\text{-}5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  erhalten. Spn4H hemmte Elastase etwa 3-mal so schnell ( $k_{assoc} = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) wie die anderen beiden Varianten. Der nahezu irreversible Charakter der Reaktionen zeigt sich auch hier wieder durch  $K_i$ -Werte im nanomolaren Bereich.



**Abbildung 24 Hemmkurven der Interaktion von HNE mit Spn4F,G und H**

In A sind jeweils die *progress curves* für die Hemmung von 1 nM HNE durch Spn4F (oben), G (Mitte) oder H (unten) gezeigt. Die Serpinkonzentrationen (mindestens 10-facher Überschuss) sind neben den jeweiligen Kurven angegeben. Aus den Geradensteigungen in den eingefügten Abbildungen wurden unter Berücksichtigung der Michaeliskonstanten  $K_m$  von 178  $\mu M$  die Hemmkonstante zweiter Ordnung  $k_{assoc}$  berechnet. Die  $K_m$ -Bestimmung ist in B dargestellt. Die Abkürzung MeOSuc-AAPV-AMC steht für das fluorogene Substrat 3-Methoxysuccinyl-AAPV-7-Amido-4-methylcoumarin.



Für alle vier zu charakterisierenden Spn4-Varianten wurden Zielproteasen identifiziert, mit denen sich die für inhibitorische Serpine typischen SDS-stabilen Komplexe bildeten. Die kinetische Analyse durch die Aufnahme von kontinuierlichen Hemmkurven zeigte das erwartete Verhalten einer *slow tight binding*-Inhibition für alle gemessenen Reaktionen.

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der Suche nach Zielproteasen für die Spn4-Varianten zusammengefasst. Spn4E und H hemmen jeweils nur eine der getesteten Proteasen. Spn4F und G sind *cross-class* Serpine, die sowohl Serinproteasen der Familie S1 als auch Cysteinproteasen der Familie C1 hemmen. Sie wiesen in den durchgeführten Experimenten die gleiche Proteasespezifität auf. Die geringe Selektivität bzw. hohe Instabilität der RCL dieser Varianten zeigte sich schon bei ihrer rekombinanten Produktion, da die Präparationen in beiden Fällen im Gegensatz zu Spn4E und H auch RCL-gespaltene Anteile aufwiesen (vgl. Abbildung 12).

**Tabelle 23** Vergleich der Spezifität der Spn4-Varianten

	<b>Spn4E</b>	<b>Spn4F</b>	<b>Spn4G</b>	<b>Spn4H</b>
<b>Furin (S8)</b>	+	-	-	-
<b>HNE (S1)</b>	-	+	+	+
<b>Chymotrypsin (S1)</b>	-	+	+	-
<b>Cathepsin L (C1)</b>	-	+	+	-
<b>Cathepsin S (C1)</b>	-	+	+	-
<b>Cathepsin B (C1)</b>	-	-	-	-

Bei den mit + markierten Paaren wurde eine Hemmung der Protease durch das jeweilige Serpin detektiert. Die Interaktionen wurden durch SDS-stabile Komplexe nachgewiesen und außer im Fall von Chymotrypsin durch Messungen zur Hemmkinetik bestätigt. Bei den mit – markierten Paaren zeigte sich keine Hemmung.

Spn4 ist das erste Gen, für welches gezeigt wurde, dass es die Expression von Serpinen ermöglicht, die Proteasen dreier verschiedener Klassen hemmen können.

## 5.5 Untersuchungen zur Funktion des Furininhibitors Spn4A/E

Die Suche nach Zielproteasen führte zur Identifikation von Spn4A/E als schnellsten irreversiblen Inhibitor der pharmakologisch interessanten Proproteinkonvertase Furin.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Spaltung des rekombinanten Serpins bei Beschreitung des Substratpfades tatsächlich C-terminal zum tetrabasischen Motiv RRKR erfolgt (5.5.1). Um die Funktion des Signalpeptids und des HDEL-Motivs zu prüfen, wurde weiterhin die Lokalisation des Serpins in transfizierten COS7-Zellen untersucht (5.5.2). Die drei letzten Abschnitte dieses Kapitels (5.5.3 bis 5.5.5) befassen sich mit der Analyse der Funktion von Spn4A in Insektenzellen.

### 5.5.1 Identifikation der Furinspaltstelle

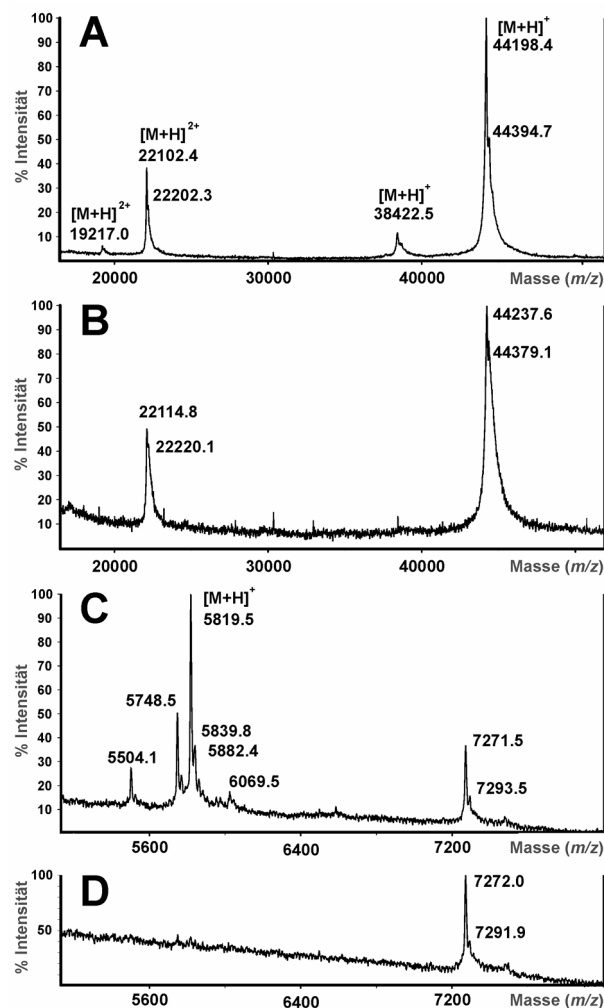
Das Präsenz der Furin-Konsensussequenz RXR/KR an den Aminosäurepositionen 371–374 im RCL von Spn4A (bzw. 339-342 bei Spn4E) hatte den Hinweis auf die Hemmung der Proproteinkonvertase gegeben. Wie Abbildung 14 zeigt, wirkt Spn4E nicht nur als Inhibitor, sondern auch als Substrat für Furin, so dass bei der Reaktion auch die RCL-gespaltene Form gebildet wird.

Zur Bestimmung der Spaltstelle wurde Spn4E ohne Zusatz von Detergenzien mit humanem Furin inkubiert und die Fragmente nach Entsalzung mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Bei dieser schonenden Ionisierungsmethode werden die Proteine nicht fragmentiert, und 1-fach protonierte Proteinionen erscheinen im Spektrum bei  $(m/z) = \text{Molmasse} + 1$ . Bei der erwarteten Furin-vermittelten Proteolyse des rekombinanten Spn4E (RRKR↓A) sollten ein großes N-terminales Fragment von  $(m/z) = 38454,1$  und ein kleines C-terminales Fragment von  $(m/z) = 5819,5$  entstehen.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Massenspektrometrie. Gezeigt sind Ausschnitte des Spektrums im Bereiche  $(m/z) = 20000-50000$  (A, B) und  $(m/z) = 5200-8000$  (C, D). Die Ausschnitte A und C zeigen das Spektrum von Spn4E nach Inkubation mit Furin. Das Spektrum einer Kontrollprobe des Serpins ohne Furinzusatz ist in den Ausschnitten B und D dargestellt. Ausschnitt B zeigt das ungespaltene Serpin als einfach und doppelt geladenes Ion bei jeweils  $(m/z) = 44237,6$  und  $(m/z) = 22114,8$ . Es gibt keine weiteren Peaks durch Verunreinigungen oder unspezifische Degradation. Die Spaltung durch Furin führte zu zwei zusätzlichen Peaks von  $(m/z) = 38422,5$  und  $(m/z) = 19217,0$ . Solche Werte waren für einfach und doppelt geladene Ionen des RCL-gespaltene Serpins erwartet worden. Mehrere Fragmente traten nach Furin-Spaltung bei  $(m/z) \sim 6000$  auf (C), die in der Kontrolle (D) nicht vorkommen. Der am stärksten ausgeprägte Peak liegt bei  $(m/z) = 5819,5$ , in Übereinstimmung

mit einer Furin-vermittelten Proteolyse des Serpins C-terminal zur Konsensussequenz. Es wurden keine Fragmente erhalten, die auf eine Spaltung C-terminal der anderen drei basischen Aminosäuren (P4, P3 bzw. P2) weisen. Der N-terminale Bereich des RCL von Spn4E hat also eine Länge von 18 Aminosäuren und ist somit um eine AS länger als der von  $\alpha_1$ -Antitrypsin.

Die Aminosäurepositionen 342 (Arg) und 343 (Ala) von Spn4E wurden durch dieses Experiment als die Positionen P1-P1' des RCL identifiziert. Die *loss of function*-Mutante des Serpins, welche an Position 342 ein Alanin an Stelle des Arginins aufweist, hemmt Furin in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis nicht (siehe Abschnitt 5.4.1).



**Abbildung 25 Identifikation des reaktiven Zentrums von Spn4E bei der Reaktion mit Furin**

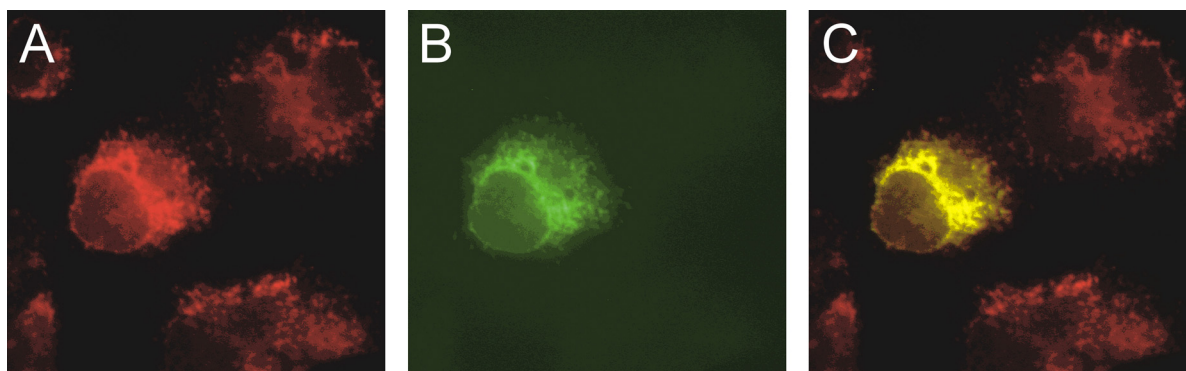
Rekombinantes Spn4E (berechnete Masse: 44255.6 Da) wurde mit humanem Furin inkubiert und die Proteine mittels MALDI-TOF-MS analysiert. In Übereinstimmung mit einer Spaltung C-terminal zur Furin-Konsensussequenz RRKR wurden Signale bei  $m/z = 38422.5$  (A) und  $5819.5$  (C) erhalten, die in der ohne Furin inkubierten Kontrolle nicht auftraten (B, D). Das Signal des am stärksten ausgeprägten Peaks wurde als 100 %ige Intensität definiert. ( $m/z$ ) = Masse/Ladung.

### 5.5.2 Signalpeptid und HDEL-Motiv bewirken die Lokalisation von Spn4A im endoplasmatischen Retikulum

Furin ist ein Transmembranprotein des sekretorischen Pfades und wandert zwischen trans-Golgi- und Cytoplasmamembran (Molloy *et al.*, 1999). In verschiedenen Systemen wurde auch das *Shedding* der Protease nachgewiesen, so dass Furin auch im extrazellulären Raum vorliegen kann (Denault *et al.*, 2002). Neue Ergebnisse zeigen biologisch aktives Furin auch im ER (Salvas *et al.*, 2005).

Die bisher beschriebenen *in vitro* Experimente zur Hemmung von Furin wurden mit dem rekombinant in Bakterien produzierten Spn4E durchgeführt. Spn4A verfügt über ein potenzielles Signalpeptid und ein HDEL-Signal. Es sollte nun getestet werden, ob dieses Serpin im sekretorischen Pfad vorliegt. Die folgenden Experimente zeigen, dass das Signalpeptid und das ER-Rückführungssignal (HDEL) den Transport ins ER und die dortige Lokalisation von Spn4A bedingen. Spn4A ist somit das erste beschriebene natürliche Serpin, das Furin am Wirkort inhibieren kann.

Zum Nachweis der ER-Lokalisation wurde Wildtyp-Spn4A transient in COS7-Zellen exprimiert und das Protein mittels Immunfluoreszenz (Abschnitt 4.5.6) detektiert. Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) ist im ER lokalisiert, und die antikörpervermittelte Detektion dieses Enzyms diente als Positivkontrolle. Abbildung 26A zeigt die Cy3-Fluoreszenz (rot) beim Nachweis von PDI in COS7-Zellen. Alle Zellen zeigen das den Kern umgebende, für das ER typische Färbungsmuster (Smirnova *et al.*, 2001).

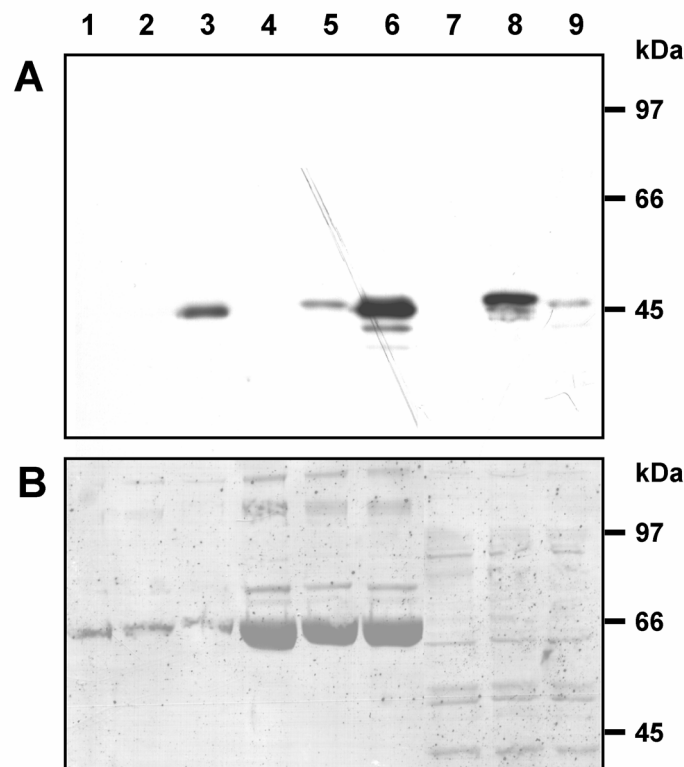


**Abbildung 26 Die Immunfluoreszenz zeigt eine Kolokalisation von Spn4A mit dem ER-Marker PDI**

Spn4A wurde transient in COS7-Zellen exprimiert und die Lokalisation des Serpins mit der des ER-Marker Proteins Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) verglichen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch einen monoklonalen Maus-Anti-PDI-Antikörper kombiniert mit einem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörper und durch das gereinigte Kaninchen Anti-Spn4-Antiserum kombiniert mit FITC-Anti-Kaninchen-Antikörpern. In A ist die Anregung der Cy3-Fluoreszenz, in B, die der FITC-Fluoreszenz und in C eine Überlagerung beider Bilder dargestellt. Die Gelbfärbung zeigt die Kolokalisation der Proteine.

Spn4A wurde durch Kombination des partiell gereinigten Anti-Spn4-Antiserums (Abschnitt 4.5.3) mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert, und die Grünfluoreszenz in Abbildung 26B zeigt die Lokalisation des Serpins in transfizierten Zellen an. Die umgebenden untransfizierten Zellen wurden nicht angefärbt. Die Überlagerung der Bilder A und B (Abbildung 26C) zeigt die Bereiche der transfizierten Zelle gelb, die von beiden Antikörpern erkannt wurden. Die hier durch Epifluoreszenz-Mikroskopie gezeigte Kolokalisation von Spn4A und PDI wurde durch Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie im Rahmen der Diplomarbeit von Martina Lummer bestätigt (Lummer, 2005). Spn4A ist also im ER lokalisiert und könnte dort mit Furin interagieren.

Nachfolgend wurde gezeigt, dass die C-terminalen Aminosäuren HDEL von Spn4A die Retention des Serpins im ER bedingen. Hierfür wurden Spn4A und eine Deletionsmutante des Serpins (Spn4A $\Delta$ HDEL) ohne das HDEL-Motiv (siehe 5.1.2) rekombinant in COS7-Zellen exprimiert und Extrakte und Überstände der Zellen mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 27).



**Abbildung 27 Das HDEL-Motiv verhindert die Sekretion von Spn4A**

COS7-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA3.1(+) (Spuren 1, 4, 7), pcSpn4A\_SP (Spuren 2, 5, 8) oder pcSpn4A $\Delta$ HDEL (Spuren 3, 6, 9) transfiziert, und die Kulturüberstände (Spuren 1-3), 8-fach konzentrierte Überstände (Spuren 4-6) oder Extrakte (Spuren 7-9) mittels Western-Blot Analyse mit Anti-Spn4-Antikörpern untersucht (A). Die in B dargestellte mit Coomassie gefärbte PVDF-Membran zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels. Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben. Details zur Herstellung der beiden Vektoren pcSpn4A\_SP (Wildtyp) und pcSpn4A $\Delta$ HDEL (Wildtyp, verkürzt um das potenzielle ER-Rückführungssignal) sind Abschnitt 5.1.2 zu entnehmen.

Die Transfektion des leeren Vektors pcDNA3.1(+) diente als Negativkontrolle. Spn4A tritt in Extrakten transfizierter Zellen auf (Spur 8), wie für ein Protein des ER zu erwarten war. Die Deletion der HDEL-Sequenz führt dazu, dass das Protein in geringerer Menge in Extrakten detektiert wird (Spur 9). Der Nachweis von Spn4A $\Delta$ HDEL im Überstand transfizierter Zellen (Spur 3) zeigt, dass das verkürzte Serpin hauptsächlich sekretiert wird. Erst nach 8-facher Konzentration der Überstände (Spuren 4-7) wurden auch geringe Mengen des Wildtyp-Serpins detektiert (Spur 5), welches vermutlich aus lysierten Zellen stammt. Das postulierte ER-Rückführungssignal verhindert tatsächlich die Sekretion von Spn4A, so dass es im sekretorischen Pfad verbleibt. Alle Eigenschaften von Spn4A/E, die ausgehend von der Aminosäuresequenz postuliert wurden, konnten durch die hier dargestellten Experimente bestätigt werden.

Das rekombinant in Säugetierzellen exprimierte *Drosophila* Serpin Spn4A liegt im ER vor, wohingegen eine Deletionsmutante sekretiert wird. Beide Varianten könnten dazu genutzt werden, die *in vivo*-Funktion von humanem Furin weiter zu untersuchen, indem die Prozessierung von Furinsubstraten an verschiedenen Wirkorten verhindert wird. Die Inhibition einer Furin-vermittelten Prozessierung von Pathogenen durch Spn4A könnte von therapeutischem Nutzen sein (siehe Diskussion, Abschnitt 6.2.2).

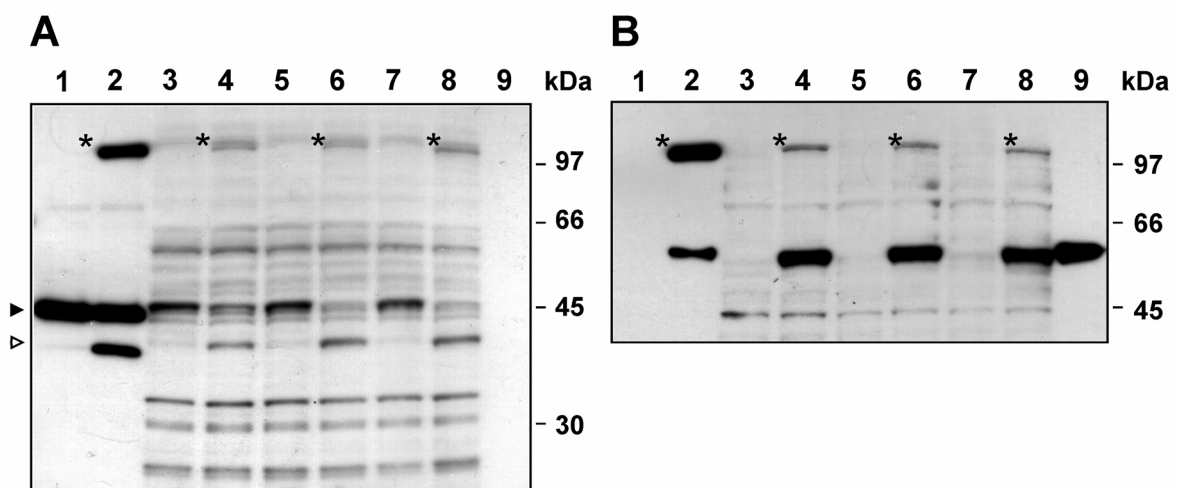
### **5.5.3 Nachweis von endogenem Spn4A/E in *Drosophila* Schneider 2-Zellen**

Nachdem die Hemmung des humanen Furins durch Spn4E gezeigt worden war, sollte die physiologische Funktion der RCL-Variante A/E in Insekten näher charakterisiert werden.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Caterina Bentele wurde RNA aus *Drosophila* Schneider 2-Zellen (S2-Zellen) isoliert und durch RT-PCR nachgewiesen, dass alle 8 Spn4-Varianten sowie die *Drosophila* Furine DFurin1 und 2 in diesen Zellen exprimiert werden (Bentele, 2004).

Um die Spn4-Proteine in S2-Zellen nachzuweisen, wurden Zellextrakte und Überstände mittels Western-Blot-Analyse auf Spn4-spezifische Banden untersucht, die auf die Serpinisoformen oder Spn4/Protease-Komplexe weisen. Der Extrakt von  $5 \times 10^5$  S2-Zellen wurde hierfür auf ein NuPAGE-Gel aufgetragen und der Western-Blot mit Anti-Spn4-Antikörpern entwickelt (Abbildung 28A, Spuren 3, 5, 7). Zur Identifikation von Spn4A/E wurden die Extrakte weiterhin unter verschiedenen Bedingungen mit rekombinantem humanem Furin inkubiert und der in A dargestellte Blot unter Verwendung von Anti-Furin-Antikörpern analysiert (B).

In Probe 5, welche unbehandelten S2-Extrakt enthielt, wurde mit Anti-Spn4-Antikörpern (Abbildung 28A) das stärkste Signal bei 45 kDa detektiert. Dies ist die erwartete Größe für die Spn4-Varianten. Direkt darunter wurden mindestens zwei weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von >40 kDa nachgewiesen. Hierbei könnte es sich ebenfalls um Spn4-Spleißvarianten handeln. Allerdings sind noch weitere Banden zu sehen, die stärkere Signale liefern, insbesondere bei ca. 35 und 55 kDa. Ein weiteres schwaches Signal tritt bei etwa 110 kDa auf. Hierbei könnte es sich um einen Spn4/Proteasekomplex handeln. Da der Zellextrakt eine hohe Proteinkonzentration aufweist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um unspezifische Signale handelt. Auch in Überständen wurde eine Bande starker Intensität bei 45 kDa detektiert (nicht dargestellt).



**Abbildung 28 Endogenes Spn4A/E in S2-Zellen**

Extrakte von  $5 \times 10^5$  S2-Zellen wurden bei 30°C mit rekombinantem humanem Furin (Spuren 4, 6, 8) oder mit dem entsprechenden Volumen dH<sub>2</sub>O inkubiert (Spuren 3, 5, 7). Als Positivkontrolle für die Komplexierung und den Blot wurde rekombinantes Spn4E ohne (Spur 1) oder mit Furin (Spur 2) inkubiert. Die Probe in Spur 9 enthielt nur Furin. Inkubationsbedingungen: Spuren 1, 2, 7, 8, 9 mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5h; Spuren 5, 6 ohne CaCl<sub>2</sub>, 5h; Spuren 3, 4 mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 min. Die Western-Blots wurden entweder mit Anti-Spn4- (A) oder mit Anti-Furin-Antikörpern (B) entwickelt. Komplexe sind mit (\*) markiert. Die Pfeilspitzen zeigen die intakte Form von Spn4A/E bei 45 kDa und die RCL-gespaltene Form bei 38 kDa (offene Spitze). Die Größen der Markerproteine (LMW-Marker) sind jeweils am rechten Bildrand angegeben.

Die Western-Blot Analyse der unbehandelten Extrakte ermöglichte keine Aussage darüber, welche der Varianten durch die 45 kDa Bande/n repräsentiert wird, da das Anti-Spn4-Antiserum alle acht Proteine detektiert. Die Behandlung der Extrakte mit rekombinantem humanem Furin deutete allerdings darauf, dass zumindest aktives Spn4A/E vorliegt, da sowohl mit Anti-Furin-Antikörpern als auch durch Anti-Spn4-Antikörper nach der Inkubation eine neu gebildete Bande bei etwa 115 kDa detektiert wurde (Abbildung 28, Spuren 4, 6, 8).

Diese hat die gleiche Größe, wie ein Komplex aus Furin und rekombinantem Spn4E (Abbildung 28, Spur 2, vgl. Abbildung 14, Spur 3). Bei Furinzusatz verschwindet die Spn4-Bande bei 45 kDa in A fast vollständig, aber es wird die RCL-gespaltene Form von 38 kDa detektiert. Die Komplexe wurden innerhalb von 2 Minuten gebildet (Spur 4) und waren über 5 Stunden stabil (Proben 6, 8). Durch Zusatz von 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Proben 3, 4, 7, 8) wurde die Reaktion nicht beeinflusst. Die aus den Zellen bei der Lyse freigesetzte CaCl<sub>2</sub>-Menge war also ausreichend für die Komplexierung. Abbildung 28B zeigt, dass ein Großteil des eingesetzten Furins nicht umgesetzt wurde, da dieses als 53 kDa-Bande detektiert wurde.

Durch das hier dargestellte Experiment wurde die Expression von endogenem Spn4A/E in S2-Zellen auf Proteinebene nachgewiesen. Es liegt in aktiver Form vor und bildet genau wie das rekombinant in Bakterien produzierte Spn4E Komplexe mit humanem Furin. Die Größe von 45 kDa entspricht der des rekombinanten Serpins. Dies deutet darauf hin, dass das Serpin im endogenen System nicht glykosyliert wird

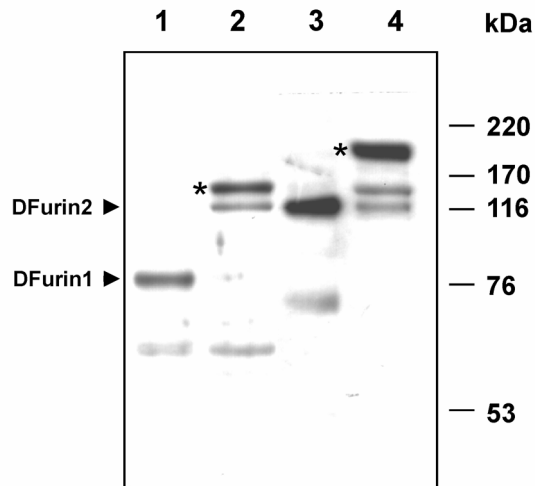
#### **5.5.4 *Drosophila* Furin1 und 2 als mögliche endogene targets von Spn4A**

Durch die Bereitstellung von Antiseren gegen *Drosophila* Furin1 und 2 von Dr. John Creemers (Leuven) wurde es möglich, auch die Präsenz dieser SPCs in S2-Zellen auf Proteinebene zu untersuchen. Diese Antiseren wurden bereits dazu verwendet, die Expression und Lokalisation rekombinanter Formen der *Drosophila*-Furine in Säugetierzellen zu analysieren (Roebroek *et al.*, 1993, De Bie *et al.*, 1995).

S2-Extrakte und Überstände wurden mittels Western-Blot-Analyse (vgl. 5.5.3) auf die *Drosophila*-Furine untersucht. Obwohl beide Enzyme Transmembrandomänen enthalten, zeigten sich im Western-Blot im Fall der Extrakte keine Banden der für die prozessierten Furine erwarteten Größen von 65 und 150 kDa, sondern nur unspezifische Hintergrundbanden (nicht gezeigt). Auch Banden von 100 oder 180 kDa, den Größenbereichen der Proformen, zeigten sich nicht. Im Gegensatz dazu wurden im Überstand kultivierter Zellen spezifische Banden von 90 bzw. 130 kDa (Abbildung 29, Spuren 1, 3) mit den jeweiligen Antiseren detektiert. Das extrazelluläre Vorliegen dieser Formen deutet darauf, dass ein *Shedding* der DFurine auch in S2-Zellen stattfindet (vgl. 2.4.3). Bei der Bande von 90 kDa ist nicht klar, um welche DFurin1-Isoform es sich handelt, da nicht bekannt ist, an welcher Aminosäureposition die Prozessierung der Proteine erfolgt. Der luminaire Bereich von DFurin2 hat im unglykosylierten Zustand eine berechnete Größe von 129 kDa.



Um eine Interaktion von DFurin1 und 2 mit Spn4E zu prüfen, wurden die Überstände mit dem rekombinanten Serpin inkubiert. Abbildung 29 zeigt in den Spuren 2 und 4 die Bildung SDS-stabiler Komplexe beider Enzyme mit Spn4E. Diese haben Größen von 145 bzw. 180 kDa. Die Komplexbildung unterstützt die Vermutung, dass DFurin1 und DFurin2 endogene *targets* von Spn4A sind.



**Abbildung 29 Komplexbildung von Spn4E mit *Drosophila* Furin1 und 2**

Serumfreie Kulturüberstände von S2-Zellen wurden ohne (Spuren 1, 3) oder mit 50 ng des rekombinanten Spn4E (Spuren 2, 4) inkubiert. Die Western-Blot-Analyse mit Anti-DFurin1- (Spuren 1,2) oder Anti-DFurin2-Antikörpern (Spuren 3, 4) zeigte die Bildung von Spn4E/DFurin-Komplexen (\*). Die Größen der Markerproteine (HMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden natürliche *Drosophila*-Furine aus S2-Zellen mit rekombinantem Spn4E komplexiert oder endogenes S2 Spn4A/E mit rekombinantem humanem Furin (5.5.3). Eine intrazelluläre Interaktion der Reaktionspartner wurde so nicht gezeigt.

### 5.5.5 Hemmung der Konvertaseaktivität durch Spn4A im Zellkulturmodell

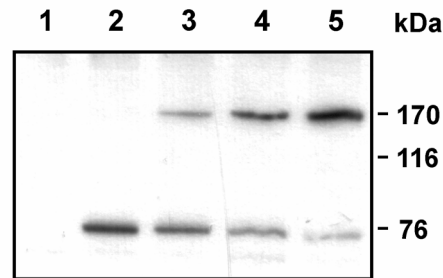
Zum Nachweis einer Spn4A vermittelten *in vivo*-Hemmung von Proproteinkonvertasen im sekretorischen Pfad von Insektenzellen musste ein geeignetes System gefunden werden.

Sf9-Zellen des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda* exprimieren eine SPC, die große Sequenzähnlichkeit zum *Drosophila* Furin2 aufweist (Cieplik *et al.*, 1998). Die adhärennten Zellen lassen sich serumfrei kultivieren, gut transfizieren und werden als Expressionssystem für rekombinante Proteine eingesetzt. Das in Sf9-Zellen exprimierte rekombinante Protein ApolipoproteinII/I-38 von *Locusta migratoria*, der Wanderheuschrecke, wird durch eine endogene Proteinkonvertase C-terminal der Konsensussequenz RQKR prozessiert (Smolenaars *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass diese Prozessierung durch die Expression von Spn4A verhindert wird. Dadurch kann der Nachweis erbracht werden, dass das Serpin in Insektenzellen die Aktivität von Furinen inhibiert.

Aus dem Vorläuferproteins ApolipoproteinII/I werden in Insekten nach Proteolyse die zwei Lipidtransportproteine Apolipoprotein II und I gebildet. Diese sind Bestandteile des Insektenlipoproteins *high density lipoprotein* (HDLp) (Weers *et al.*, 1993). Der pIZ/V5-His-basierte Expressionsvektor pIZ-ApoLpII/I-38 codiert für eine trunkierte Form von ApolipoproteinII/I von 150 kDa mit dem Namen ApoLpII/I-38. (Smolenaars *et al.*, 2005). Die Expression dieses Proteins in Sf9-Zellen und Konvertasespaltung resultiert in zwei Proteinen von etwa 75 kDa, Apolipoprotein II und ein verkürztes Apolipoprotein I, die ins Medium sezerniert werden. Durch Zusatz des niedermolekularen Furininhibitors dec-RVKR-cmk zum Medium transfizierter Zellen wird die Prozessierung verhindert und im Zellkulturüberstand befindet sich hauptsächlich die 150 kDa schwere Proform. Das Plasmid pIZ-ApoLpII/I-38 und ein Kaninchen-Antiserum gegen Apolipoprotein II wurden uns freundlicherweise von Dr. Kees Rodenburg (Utrecht) zur Verfügung gestellt.

Für die Expression des Wildtyp-Spn4A mit Signalpeptid und HDEL-Sequenz in Sf9-Zellen wurde die für ApoLpII/I-38 codierende Sequenz im pIZ/V5-His-*backbone* durch die Sequenz von Spn4A ersetzt (Abschnitt 5.1.3). Der so konstruierte Vektor wurde pIZ-Spn4A genannt.

Sf9-Zellen wurden nachfolgend mittels Polyethylenimin mit pIZ-Spn4A oder pIZ-ApoLpII/I-38 oder einer Kombination beider Plasmide transfiziert (Abschnitt 4.4.5). Bei der Kofektion wurden die beiden Plasmide pIZ-Spn4A und pIZ-ApoLpII/I-38 in den molaren Verhältnissen 4:1, 1:1 und 1:5 eingesetzt. Die Proteine der Zellkulturüberstände wurden wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben durch Trichloressigsäure gefällt und die Proben mittels Western-Blot untersucht.



**Abbildung 30 Spn4A inhibiert die Prozessierung von ApoLpII/I-38 in Sf9-Zellen**

ApoLpII/I38, Spn4A oder beide Proteine wurden transient in Sf9-Zellen exprimiert. Durch den Einsatz verschiedener Verhältnisse der beiden jeweiligen Plasmide kommt es zu einer Spn4A-Dosis-abhängigen Reduzierung der Prozessierung des Lipoproteinvorläufers. Spur 1, mittels Trichloressigsäure-Fällung konzentrierte Kulturüberstände von Sf9-Zellen nach Transfektion mit pIZ-Spn4A; Spur 2, mit pIZ-ApoLpII/I-38; Spuren 3-5, Kotransfektion der beiden Plasmide im Verhältnis pIZ-ApoLpII/I-38 zu pIZ-Spn4A von 4:1, 1:1 bzw. 1:5. Die Proben wurden mit NuPAGE-Gelen aufgetrennt, und zur Detektion diente ein polyklonales Kaninchen-Anti-ApoLpII-Antiserum. Die Größen der Markerproteine (HMW-Marker) sind am rechten Bildrand angegeben.

Abbildung 30 zeigt das sekretierte Apolipoprotein II in Spur 2 als singuläre Bande bei 75 kDa. In Spuren 3-5 sind die Proben der Kotransfektionen aufgetragen. Je höher der Anteil des Spn4A codierenden Plasmids, desto schwächer wird die 75 kDa Bande. Bei ~ 170 kDa tritt dafür das unprozessierte ApolipoproteinII/I-38 auf. Das Serpin Spn4A ist somit in der Lage, die Aktivität der endogenen Sf9-Konvertase in den Insektenzellen zu hemmen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Die Spn4-Varianten sind inhibitorische Serpine mit einem breiten Spektrum an Zielproteasen**

Durch differenzielles Spleißen können acht verschiedene Spn4-Serpine mit vier unterschiedlichen RCLs generiert werden, die entweder mit oder ohne Signalpeptid (SP) exprimiert werden (Krüger *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier RCL-Varianten durch Bestimmung ihrer Proteasespezifität charakterisiert.

#### **6.1.1 Die Reinigung der aktiven Serpine Spn4E, F, G und H**

Die vier Isoformen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Serpine nach proteolytischer Abspaltung des GST-Anteils gewonnen. Da sie auf den Signalpeptid-freien Varianten basieren, wurden sie Spn4E, Spn4F, Spn4G und Spn4H genannt. Die Aminosäuresequenzen der Varianten ähneln aber auch den Varianten mit SP nach Spaltung an der potentiellen Signalpeptidasespaltstelle (Kapitel 5.2, Abbildung 9).

Obwohl sich die vier rekombinanten Serpine nur durch die 40-58 Aminosäuren (AS) langen C-Termini voneinander unterscheiden (Abbildung 31), wurden sie reproduzierbar in unterschiedlichen Mengen und Qualitäten gewonnen (Kapitel 5.2). Die Ausbeute an Spn4H betrug bei allen Reinigungen jeweils nur etwa 10 % der Ausbeuten der anderen Varianten, und bei den Varianten Spn4F und G lag jeweils ein Teil der Serpine in einer schneller migrierenden, wahrscheinlich RCL-gespaltenen, inaktiven Form vor. Beide Phänomene ließen sich durch Änderungen der Expressions- und Reinigungsbedingungen nicht beheben. Alle vier Serpine wurden aber in aktiver Form und in ausreichender Menge für die nachfolgenden Experimente erhalten.

#### **6.1.2 Hemmung von Proteasen aus drei verschiedenen Peptidaseklassen aufgrund unterschiedlicher RCL-Sequenzen**

Spn4A/E weist im RCL die Konsensussequenz der Proproteinkonvertase Furin auf. Da die reaktiven Schleifen von Serpinen als Pseudosubstrat fungieren, und die Erkennung von Peptidmotiven dort die Inhibitionsreaktion einleitet, kam Furin als Zielprotease in Frage. Die Hemmung von Furin wurde durch den Nachweis SDS-stabiler Komplexe und durch Kinetikexperimente bestätigt (Abschnitte 5.3.1, 5.4.1, 5.4.2). Nahezu gleichzeitig wurde

Spn4A/E auch von zwei anderen Arbeitsgruppen als Furininhibitor identifiziert (Osterwalder *et al.*, 2004, Richer *et al.*, 2004).

Die Spaltung des RCL, welche den Suizid-Inhibitionsmechanismus einleitet, findet bei inhibitorischen Serpinen fast immer wie bei  $\alpha_1$ -AT C-terminal zur 17. AS des RCL statt (gezählt wird beginnend mit dem konservierten Glutamat an P17 in C-terminaler Richtung, vgl. Abbildung 31). Eine optimale Einlagerung des RCL in das  $\beta$ -Faltblatt A und der Übergang von der gespannten metastabilen Serpinform in die entspannte Konformation ist so möglich (Gettins, 2002). Die Furin-Konsensussequenz von Spn4A/E ist aber so positioniert, dass das essenzielle P1-Arginin an der 18. Stelle des RCL vorliegt (Abbildung 31). Die experimentelle Verifizierung der P1-Position war daher von Interesse. Ein Teil der Serpinmoleküle werden bei der Reaktion mit Furin als Substrat gespalten (siehe Abbildung 14, S. 54), und die Spaltstelle konnte über massenspektrometrische Messungen identifiziert werden (Abschnitt 5.5.1). Wie erwartet wird Spn4E C-terminal vom tetrabasischen Motiv RRKR hydrolysiert, und somit ist der N-terminale Bereich des RCL des Serpins eine AS länger als bei den meisten klassischen Serpinen. Es wurden keine Fragmente erhalten, die auf eine alternative Spaltung an den anderen basischen Aminosäuren deuten. Bei solchen Spaltungen wäre die P1'-Position mit einer basischen Aminosäure besetzt. Da die S1'-Tasche von Furin Arginin und Histidin enthält, akzeptiert die Konvertase keine basischen AS an P1' (Henrich *et al.*, 2003). Die Gruppe von Jean und Kollegen hat gezeigt, dass die Verkürzung der reaktiven Schleife eines Spn4A/E-Konstrukts auf 17 AS keinen Einfluss auf die Effizienz und Geschwindigkeit der Inhibition von humanem Furin hat (Richer *et al.*, 2004). Dies heißt jedoch nicht, dass diese Veränderung sich bei der Interaktion mit den *Drosophila* Furinen nicht auswirken könnte.

Die Serinproteasen der Familie S1 spalten entweder C-terminal von großen hydrophoben AS (wie Chymotrypsin), C-terminal von basischen AS (wie Thrombin) oder C-terminal von Alanin oder Valin (wie Elastase) (Abschnitt 2.2.1). Aus den RCL-Sequenzen von Spn4F, G und H wurde abgeleitet, dass Proteasen der S1-Familie mögliche Ziele dieser Serpine sind. Diese Vermutung wurde experimentell bestätigt. Spn4F und G waren in der Lage sowohl mit Chymotrypsin als auch mit neutrophiler Elastase Komplexe zu bilden (Abschnitt 5.3.2). Bei beiden Serpinen wurden die Komplexe mit Chymotrypsin nach ihrer schnellen Bildung bedingt durch nicht inaktivierte Anteile der Protease wieder abgebaut. Bereits nach 5-minütiger Inkubation waren nur noch gespaltene inaktive Serpinmoleküle zu beobachten. Der 3-fache Überschuss an Spn4G bzw. H hat offenbar nicht ausgereicht, um Chymotrypsin vollständig zu hemmen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die angenommene

Spaltung C-terminal von Leucin im Fall von Spn4G oder von Tyrosin im Fall von Spn4F bereits nach der 16. AS des RCL erfolgen würde. Die Inhibition von Proteasen durch Serpine mit einer verkürzten Schleife geht häufig mit einer drastischen Erhöhung des SI-Werts einher (Gettins, 2002), da die Insertion des RCL in das  $\beta$ -Faltblatt A gestört ist.

Bei der Reaktion von humaner neutrophiler Elastase (HNE) mit Spn4F, G und H wurden hingegen stabile Komplexe erhalten, und diese Reaktionen wurden daher nachfolgend kinetisch charakterisiert. Bei Spn4F und H liegen kleine aliphatische AS an den potentiellen P1-Positionen vor, so dass die Spaltung des RCL C-terminal der 17. AS durch HNE hier entsprechend den Erwartungen möglich ist. Spn4G weist an der vermuteten P1-Stelle ein Threonin auf. Es ist unklar, warum Elastase durch dieses Serpin gehemmt wird.

	P15	P9	P1	P1'	
<b><math>\alpha_1</math>-AT</b>	DEK	GTEAAG	AMFLEAIP	MS	SIPPE-----VKFNKPFVFLMIEQNTKSP
<b>Spn4A/E</b>	NEEGTEAAAA	TGM	AVRRKR	A	IMSPPEEPIEFFADHPFTYVLVHQKD-LPLFWG
<b>Spn4B/F</b>	NEEGTEAAAA	TGMVM	CYAS	MLTFEPQPVQFHVQHPFNYYI	INKDS-TILFAGRINKF
<b>Spn4C/G</b>	NEEGTEAAAA	TGMFMS	SLTSL	LMPKPDPIRFNVDHPFTFYILNKDS-TALFAGS	IKKL
<b>Spn4D/H</b>	NEEGTEAAAA	TVWRV	MAVAA	FSRKH----	FIANHPFAFYVKTHYD-LPLFTGRYLG

**Abbildung 31 Aminosäurealignment der vier Spn4-RCL-Varianten und  $\alpha_1$ -Antitrypsin**

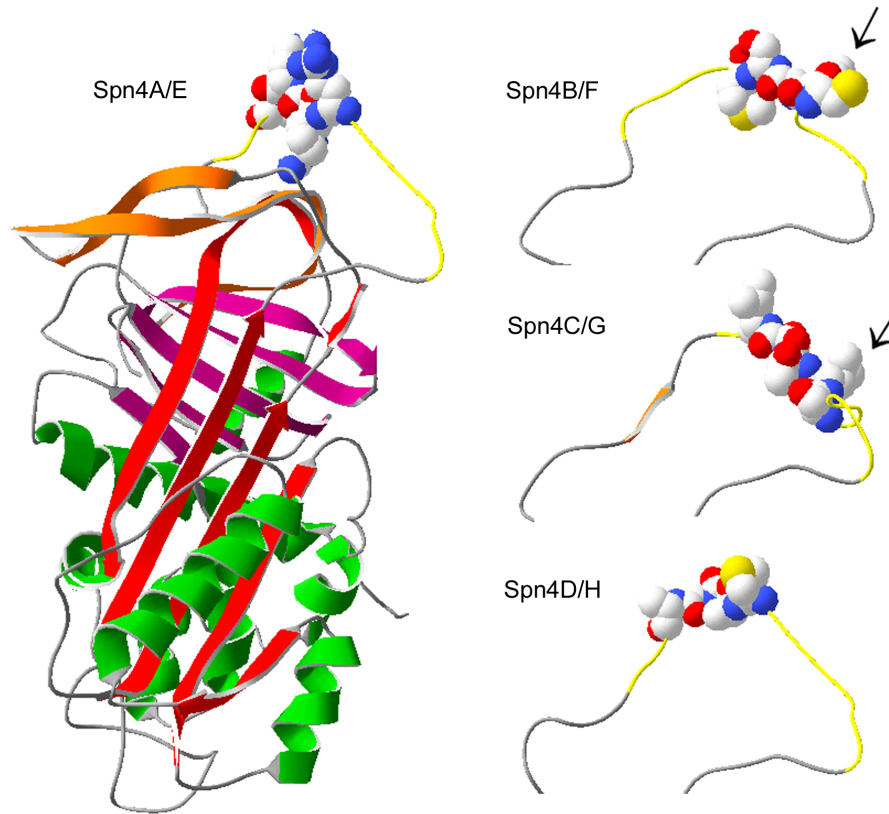
Weiß auf schwarz: Aminosäuren, die in allen fünf Sequenzen konserviert sind; fett: Aminosäurepositionen P1 und P1' für die Interaktion von  $\alpha_1$ -AT mit Trypsin. Die meisten Serpine haben einen RCL von 17 Aminosäuren, und die Position der Spaltstelle stimmt mit derjenigen von  $\alpha_1$ -AT überein. Daher wurde die Zuordnung der Spaltpositionen von der Sequenz von  $\alpha_1$ -AT abgeleitet. Auch Serpine mit Schleifen von 16 oder 18 Aminosäuren Länge können Proteasen irreversibel hemmen (Gettins, 2002). Kleine Aminosäuren in der *hinge*-Region (P15-P9) sind charakteristisch für inhibitorische Serpine. Die gelb unterlegten Aminosäurereste sind in Abbildung 32 in der Kalottendarstellung gezeigt.

Bei den papainähnlichen Cysteinproteasen der Familie C1 ist die Besetzung der S2-Tasche mit großen aromatischen oder hydrophoben AS für die Spaltung von Substraten erforderlich (Abschnitt 2.2.2). Die RCLs von Spn4F und G erfüllen diese Voraussetzung und erwiesen sich als Inhibitoren der Cathepsine L und S (Abschnitt 5.3.3). Diese Varianten sind die ersten Serpine aus *Drosophila*, die als Cysteinproteaseinhibitoren identifiziert wurden und außerdem die ersten *cross-class* Serpine aus diesem Organismus.

Die vier Spn4-RCL-Varianten unterscheiden sich also deutlich in ihrer Zielspezifität. Zur Veranschaulichung der voneinander abweichenden RCL-Sequenzen und Strukturen ist in Abbildung 32 ein schematisches Homologiemodell der vier Inhibitoren dargestellt. Bei Variante A/E fällt die Akkumulation der im Kalottenmodell blau dargestellten Stickstoffatome der RRKR-Sequenz auf. Dieses multibasische Motiv bedingt die Bindung der S8-Protease Furin (vgl. Abschnitt 6.2.1).

Die wahrscheinlich für die Bindung an Cathepsine wichtigen AS der potentiellen P2-Positionen von Spn4B/F bzw. C/G sind mit einem Pfeil markiert (Abbildung 32). Sie sind

einem möglichen Bindungspartner zugewandt. Für Variante C/G wird durch das Modell eine  $\beta$ -Strang-Struktur für den C-terminalen Teil des RCL vorhergesagt. Dieser Strang bildet einen Teil von  $\beta$ -Faltblatt C und ist daher orange gezeigt. Die angenommene Spaltstelle von Spn4D/H ist von kleinen AS umgeben, die wenig Raum einnehmen.



**Abbildung 32 Homologiemodellierung der Spn4-Varianten**

Auf der linken Seite ist das Serpin Spn4A/E dargestellt und auf der rechten Seite die drei abweichenden RCLs der Varianten Spn4B/F, Spn4C/G und Spn4D/H. Das Grundgerüst für alle vier RCL-Varianten ist identisch, da es von den konstanten Exons 3 und 4 codiert wird (Abschnitt 2.3). Die serpintypischen  $\beta$ -Faltblätter A, B und C sind in rot, pink und orange, die acht  $\alpha$ -Helices in grün und die RCLs in gelb dargestellt. Die Aminosäuren, die die potentielle Spaltstelle umgeben, sind jeweils in der Kalottendarstellung gezeigt (P4-P1' für Spn4A/E bzw. die potentiellen Positionen P3-P2' der anderen Varianten, (gelb in Abbildung 31)). Die Pfeile zeigen die nach außen gerichteten AS Tyr (Spn4B/F) und Leu (Spn4C/G). Die Homologiemodellierung wurde wie in (Frese, 2005) beschrieben durchgeführt. Als Grundlage dienten die Kristallstrukturen der Serpine  $\alpha_1$ -AT und Ovalbumin. Die Abbildung wurde mit PDB-viewer (SwissProt) erstellt.

### 6.1.3 Die Spn4-Varianten sind wirksame Inhibitoren, die Proteasen schnell inaktivieren

Die *progress curve*-Methode ermöglicht die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von Proteasen durch Inhibitoren und wurde schon häufig für Serpine angewandt (Dufour *et al.*, 1998, Cloutier *et al.*, 2002, Al-Khunaizi *et al.*, 2002). Wie im Methodenteil (Abschnitt 4.6.2) dargestellt, ist  $k_{assoc}$  die Geschwindigkeitskonstante der

---

Bildung der Enzym/Inhibitor-Komplexe (Assoziation) und  $k_{diss}$  die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion, der Dissoziation (Bieth, 1995). Bei den für Serpine erwarteten irreversiblen Reaktionen mit Proteasen sollte die Rückreaktion vernachlässigbar sein. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Reaktionen wurden die Proteasemoleküle wie erwartet entweder vollständig gehemmt ( $k_{diss} = 0$ ) oder  $K_i$  lag im nanomolaren Bereich. Damit ist die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktionen in der gleichen Größenordnung wie  $K_i$  für die irreversible Inhibition von Furin durch dec-RVKR-cmk ( $K_i = 2$  nM) (Jean *et al.*, 1998).

Für die Hemmung von Furin durch Spn4E wurde eine hohe apparente Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $k_{assoc} = 5,5 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) ermittelt, die das Serpin als schnellsten bislang beschriebenen irreversiblen Furininhibitor ausweist. Um zu berücksichtigen, dass nur eins von 3,5 Spn4E-Molekülen inhibitorisch wirkt (Abschnitt 5.4.1, SI = 3,5), wurde mit dem SI-Wert multipliziert (Gettins, 2002), so dass eine Hemmkonstante  $k_{overall}$  von  $1,9 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> resultiert. Die schnellste bekannte Reaktion eines Serpins, die von  $\alpha_1$ -AT mit der natürlichen Zielprotease Elastase, weist eine Hemmkonstante von  $6,5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> auf (Beatty *et al.*, 1980) und ist somit nur drei Mal schneller. Auch durch zwei weitere Arbeitsgruppen wurde die Assoziationskonstante für die Bildung von Komplexen aus humanem Furin und rekombinantem Spn4A/E untersucht. Obwohl aus einer dieser Arbeiten ebenfalls gefolgert werden konnte, dass es sich bei Spn4A/E um den schnellsten bekannten Inhibitor von humanem Furin handelt ( $k_{assoc} = 3,2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Richer *et al.*, 2004), lag der  $k_{assoc}$ -Wert im anderen Fall nur bei  $2,1 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Osterwalder *et al.*, 2004). Diese Differenzen sind möglicherweise auf Unterschiede in den verwendeten rekombinanten Proteinen zurückzuführen. Während das hier untersuchte Spn4E nur in zwei Aminosäuren vom Wildtyp abweicht, tragen die anderen Konstrukte eine N-terminale Hexa-Histidinsequenz gefolgt von einer Flag-Tag-Sequenz (Richer *et al.*, 2004) oder einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (Osterwalder *et al.*, 2004). Gerade am C-Terminus des Serpins in der Nähe des RRKR-Erkennungsmotivs im RCL könnte die basische Hexa-Histidinsequenz eine Interaktion mit Furin stören.

Bei der Berechnung von  $k_{assoc}$  wird die Michaeliskonstante  $K_m$  in die jeweilige Gleichung eingesetzt (Abschnitt 4.6.2, Gleichungen 4 und 5 S. 41). Um die individuellen Reaktionsbedingungen zu berücksichtigen, ist es wichtig,  $K_m$  selbst zu bestimmen und nicht aus der Literatur zu entnehmen (Bieth, 1995). Weiterhin beinhaltet die Bestimmung von  $k_{assoc}$  die Division durch die jeweilige Inhibitor-Konzentration. Die Serpinkonzentration wurde über einen Proteinfarbstest (Bradford-Test) bestimmt (Bradford, 1976). Dies ist eine Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Proteinen in Lösung und gibt keine



Auskunft über den Anteil aktiver Serpinmoleküle. Die Qualität der Serpinpräparation hat so ebenfalls einen Einfluss auf den Wert von  $k_{assoc}$ . Dies wird ebenfalls durch die von den verschiedenen Gruppen bestimmten SI-Werte deutlich (SI = 3,5 (Oley et al., 2004), SI = 1 (Richer et al., 2004), SI = 11,5 (Osterwalder et al., 2004)). Der Vergleich von  $k_{overall}$  ist daher sinnvoll. Diese Konstante gibt die Geschwindigkeit der Inhibition unabhängig vom Anteil des Substratpfades (z. B. beeinflusst durch Unterschiede zwischen den Konstrukten oder durch die Präsenz inaktiver, latenter Serpinformen) und der Qualität der Präparation an. Die in dieser Arbeit ermittelte Konstante  $k_{overall}$  von  $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  stimmt gut mit dem von Richer ermittelten Wert überein ( $3,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), wohingegen das Spn4A/E-Konstrukt mit dem C-terminalen Tag eine 10-mal langsamere Hemmggeschwindigkeit zeigt ( $k_{overall} = 2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Osterwalder et al., 2004).

Die Assoziationskonstanten der Hemmung HNE durch Spn4F, G bzw. H lagen mit  $3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  im Bereich physiologisch relevanter Serpin/Protease-Interaktionen. Allerdings sind diese  $k_{assoc}$ -Werte um bis zu Faktor 400 kleiner als die in der Literatur beschriebenen Werte für die Inhibition von HNE durch die humanen Serpine  $\alpha_1$ -AT und LEI (Beatty et al., 1980, Remold-O'Donnell et al., 1992). Da es keinen niedermolekularen *active site*-Titranten für HNE gibt, der im nanomolaren Konzentrationsbereich einsetzbar ist, wurden für die Reaktionen mit HNE keine SI-Werte bestimmt. Eine Titration von Elastase durch kommerziell erhältliches  $\alpha_1$ -AT (SI = 1) wäre möglich. Das Serpin müsste aber vorher mit Trypsin titriert werden, dessen *active site*-Konzentration durch *burst*-Titration mit *p*-Nitrophenyl-*p*-guanidinbenzoat (*p*-NPGb) bestimmt werden könnte (Dahlen et al., 1999). Bei dieser Konzentrationsbestimmung über drei Stufen ist mit großen Ungenauigkeiten zu rechnen. Um Bedingungen pseudo-erster Ordnung bei den *progress curve*-Messungen zu gewährleisten, wurde die vom Hersteller angegebene (durch UV-Messungen bestimmte) HNE-Konzentration angenommen und die Serpine in mindestens 10-fachem Überschuss eingesetzt.

Spn4H hemmte von den getesteten Proteasen nur HNE. Die Suche nach weiteren Zielenzymen dieses Serpins ist daher von Interesse.

Die Serpinvarianten Spn4F und G erwiesen sich als wirksame Inhibitoren der Cysteinproteasen Cathepsin L und S. Die Inhibitionskonstanten für die Interaktion der beiden Varianten mit CatL von  $k_{overall} = 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gehören zu den höchsten für *cross-class* Serpine beschriebenen Werten. Spn4F hemmt humanes CatL mit einem SI-Wert von 1. Eine Untersuchung der Hemmung des CatL von der Fruchtfliege bietet sich an, um zu testen, ob sich die Ergebnisse auf das natürliche System übertragen lassen.

#### 6.1.4 Breite zelluläre Lokalisation der Spn4-Varianten

Die Entdeckung eines breiten Spektrums von Zielproteasen für die Spn4-Spleißvarianten lässt vermuten, dass das Gen eine Art „Allzweckwaffe“ darstellt. In dem Zusammenhang war es wichtig, die postulierten unterschiedlichen Lokalisationen der Serpin-Isoformen zu testen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Spn4A nach Überexpression in COS7-Zellen mit PDI kolokalisiert und dass die Sekretion des Serpins, wie vermutet, durch das HDEL-Signal verhindert wird (Abschnitt 5.5.2). Martina Lummer zeigte in ihrer Diplomarbeit, dass alle anderen Varianten mit Signalpeptid (Spn4B, C und D) in diesem System sekretiert werden (Lummer, 2005). Die Varianten ohne Signalpeptid Spn4E-H zeigten in COS7-Zellen eine nukleocytoplasmatische Verteilung. Weiterhin wurden die natürlichen Spn4-Proteine in *Drosophila* S2-Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte Spn4-spezifische FITC-Fluoreszenz im Cytoplasma und Kern der *Drosophila*-Zellen, aber auch in Strukturen mit typischem ER-Muster. Das in diesen Experimenten eingesetzte und auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Anti-Spn4-Antiserum ermöglicht den Nachweis aller Varianten, wie die Western-Blots in Kapitel 5.3 (Abbildung 15, S.56) zeigen. Eine individuelle Erfassung der einzelnen Isoformen ist mit diesem Antiserum nicht möglich. Die Fluoreszenzsignale können also von verschiedenen Varianten stammen.

Die mRNAs aller acht Isoformen waren in S2-Zellen bereits in einem vorherigen Projekt nachgewiesen worden (Bentele, 2004). Allerdings zeigten die cDNAs der Varianten ohne Signalpeptid den Einschub eines transponierbaren Elements, welches bei der Nutzung eines potenziellen alternativen Start-Methionins die Expression eines Signalpeptids ermöglichen würde. Der Nachweis einer cytoplasmatischen Lokalisation von Spn4-Proteinen in S2-Zellen deutet aber darauf, dass (auch) das natürliche Startcodon verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wurden S2-Zell-Überstände und Extrakte mittels Western-Blotting auf Spn4-Proteine untersucht. Die Analyse der Extrakte zeigte neben Spn4A mehrere immunreaktive Proteinbanden von etwa 45 kDa, was auf die Präsenz von verschiedenen endogenen intrazellulären Varianten deutet (Abschnitt 5.5.3).

Die Experimente bestätigen also die vermutete breite Lokalisation der Spn4-Varianten im Cytoplasma, im sekretorischen Pfad und im extrazellulären Milieu.

### 6.1.5 Mögliche Rolle von Spn4 in der angeborenen Immunität

Das *Drosophila* Spn4-Gen ermöglicht die Expression verschiedener Serpinisoformen, die gegen Proteasen der Familien S1, S8 und C1 gerichtet sind und die ihre Zielenzyme im Cytoplasma, im sekretorischen Pfad und im extrazellulären Raum attackieren können.

Alle acht Varianten wurden in aus Embryonen oder adulten Tieren stammenden mRNA-Pools, sowie in S2-Zellen nachgewiesen (Krüger *et al.*, 2002, Bentele, 2004). Diese Beobachtungen deuten darauf, dass die Varianten am selben physiologischen Prozess beteiligt sind, wie zur Abwehr von Parasiten-Proteasen oder als Schutz vor eigenen Enzymen (Krüger, 2003, Silverman *et al.*, 2004). Es gibt eine Vielzahl von endogenen *Drosophila* Proteasen (Ross *et al.*), so dass der Bedarf an regulierenden Inhibitoren groß ist.

Viele Proteaseinhibitoren von Tieren und Pflanzen dienen der Abwehr von eindringenden Mikroorganismen oder Viren und sind dort im Organismus zu finden, wo diese eintreten, sich verteilen oder vermehren (Samen, Blut). Ein „Wettrüsten“ mit diesen Pathogenen führt dazu, dass immer neue Inhibitoren nötig werden, um deren Proteasen zu inaktivieren (Christeller, 2005). Der beim Spn4-Gen mögliche Mechanismus der alternativen Verwendung von RCL-Exon-Kassetten (*mutually exclusive exon use* (Jiang *et al.*, 1994)) ist eine effiziente Art, auf Evolutionsdruck zu reagieren, und unter Beibehaltung des Serpingrundgerüsts Inhibitoren mit diversen Spezifitäten und Lokalisationen zu generieren (Krüger, 2003, Christeller, 2005). Vergleiche von unterschiedlichen Serpin-Genen mit multiplen RCL-Isoformen deuten darauf, dass ein Intron in unmittelbarer Nähe der RCL-codierenden Sequenz notwendig ist (Krüger, 2003). Beim Menschen konnten bisher keine derart differenziell gespleißten Serpin-Gene identifiziert werden, obwohl z. B. Antithrombin III eine geeignete Intronposition (339c) aufweist. Die Weiterentwicklung von klassischen Serpinen zu Cysteinproteaseinhibitoren ermöglicht ebenfalls eine schnelle Anpassung und Verbreiterung des Proteaseinhibitorspektrums eines Organismus.

Ein Hinweis auf eine mögliche immunologische Funktion des Spn4-Gens lieferte eine Studie mit *Drosophila* Genchips, die eine leichte Expressionsinduktion (Faktor 2,4) von Spn4 nach mikrobieller Infektion zeigte (Irving *et al.*, 2001). Die Fliegen wurden hierbei mit einer sporulierenden Kultur des Pilzes *Beauveria bassina* inkubiert. Über die Nahrung aufgenommene Bakterienzellen der neu charakterisierten Spezies *Pseudomonas entomophila* bewirken eine systemische Expression antibakterieller Peptide (Vodovar *et al.*, 2005). Neben vielen weiteren Genen wurde auch die Expression von Spn4 induziert. Leider wurden die einzelnen Spn4-Spleißisoformen bei den beschriebenen Studien nicht individuell analysiert. Spn4A könnte nicht nur Proteasen von Eindringlingen blockieren, sondern auch die Bildung

von antimikrobiellen Peptide regulieren, die durch Prozessierung an Furinspaltstellen aktiviert werden. Zu diesen gehören Diptericine und Attacine (Hedengren *et al.*, 2000).

Die Hemmung der *Drosophila* Furine durch Spn4A könnte außerdem eine Virusinfektion verhindern. Bei Baculoviren ist die Prozessierung ihrer Glykoproteine an einem RXXR-Motiv – ähnlich wie bei HIV - für die Fusion mit der Wirtsmembran essenziell (Westenberg *et al.*, 2002).

## 6.2 Spn4A als Inhibitor des humanen Furins

Bei Vertebraten hat Furin wichtige Funktionen in Embryogenese und Homöostase und aktiviert beispielsweise Peptidhormone, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und Blutgerinnungsfaktoren. Die Protease ist aber gleichzeitig in verschiedenste pathologische Phänomene involviert, wie Tumormetastasierung, Neurodegeneration, bakterielle und virale Erkrankungen, hervorgerufen durch Proteine von *Bacillus anthracis* oder vom Ebola Virus. Trotz der möglichen Nebenwirkungen, die die Hemmung dieses essenziellen Enzyms mit sich bringen könnte, ist ein kurzzeitiger Einsatz von potenten Furininhibitoren zur Bekämpfung von ernsten Infektionskrankheiten denkbar (Henrich *et al.*, 2003). Im Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz des Furininhibitors Hexa-D-Arginin die tödliche Wirkung des Toxins von *Pseudomonas aeruginosa* verhindern kann (Sarac *et al.*, 2002).

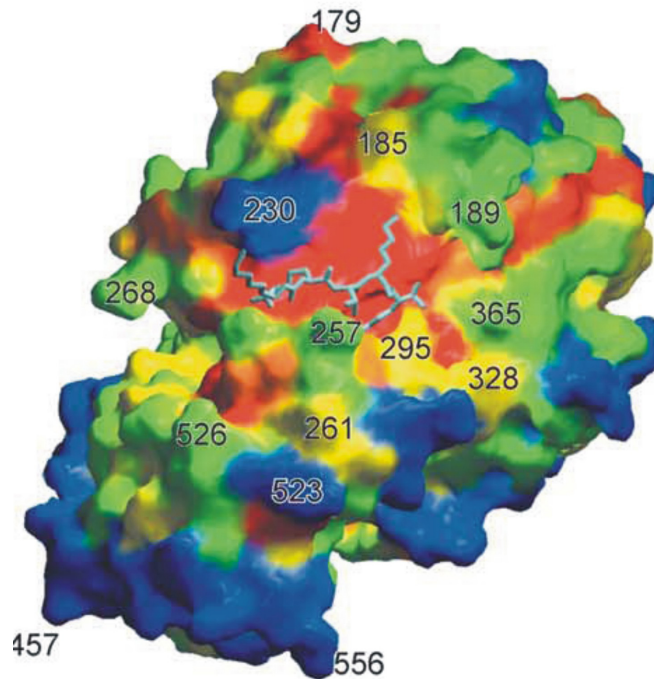
Die Spn4-Variante A/E wurde als sehr wirksamer Inhibitor des humanen Furins identifiziert. Die gezielte Hemmung von Furin im sekretorischen Pfad, oder der Einsatz des Serpins in verschiedenen Krankheitsmodellen könnten wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung von gegen Furin gerichteten pharmakologischen Substanzen liefern.

### 6.2.1 Die Struktur von Furin erklärt die Bindung des Motivs RRKR

Der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Furininhibitor Spn4A/E trägt das Motiv RRKR mit der Konsensuserkennungs-/Spaltsequenz der Protease in der reaktiven Schleife. Die Kristallstruktur des Furins der Maus im Komplex mit dem Peptidylinhibitor dec-RVKR-cmk erklärt die schon seit langem beschriebene Präferenz des Enzyms für multibasische Motive (Henrich *et al.*, 2003) und könnte somit die Bindung des RCL von Spn4A/E erläutern. Die Kristallstruktur wurde bereits ausführlich in zwei Review-Artikeln diskutiert (Rockwell and Thorner, 2004, Henrich *et al.*, 2005).

Die katalytische Domäne von Furin besteht wie bei Subtilisin aus einem verdrehten  $\beta$ -Faltblatt, das aus sieben parallelen  $\beta$ -Strängen und einem antiparallelen  $\beta$ -Strang aufgebaut ist und aus sieben  $\alpha$ -Helices. Zwei gebundene Calciumionen wurden in der Studie beschrieben, wobei eins davon an der Basis der S1-Tasche des Enzyms liegt und durch drei saure Aminosäuren koordiniert wird, die auch an der Substratbindung beteiligt sind. Die bei Subtilisin nicht vorhandene P-Domäne besteht aus einem acht-strängigen  $\beta$ -Sandwich und steht mit der katalytischen Domäne über mehrere Oberflächenschleifen in Kontakt.

Die katalytische Triade liegt im Zentrum einer tiefen Furche, die von sauren Aminosäuren ausgekleidet wird (Abbildung 33). Durch Bindung von Peptiden mit basischen Aminosäuren können die negativen Ladungen kompensiert werden.



**Abbildung 33** Oberflächendarstellung von Furin im Komplex mit dec-RVKR-cmk (Henrich *et al.*, 2005)

Die Farbgebung der Oberfläche wurde anhand der vorhergesagten Konservierung der Bereiche innerhalb der SPC-Familie vorgenommen. In rot sind die Bereiche dargestellt, bei denen die Sequenz und die Struktur konserviert sind. Die tiefe Furche in der Mitte des Moleküls ist bei allen SPCs mit negativ geladenen Aminosäuren ausgekleidet und enthält die Substratbindetaschen. Die basischen Aminosäuren des Chlormethylketons kompensieren die negativen Ladungen und werden optimal gebunden. Die Abbildung wurde der Arbeit von Henrich *et al.*, 2005 entnommen.

Wie der Komplex mit dec-RVKR-cmk gezeigt hat, ist die Anordnung der Aminosäuren in den S1 und S4-Taschen so, dass nur Guanidiniumgruppen optimal eingelagert werden können. Dies erklärt die Präsenz von Argininresten an diesen Positionen bei typischen Furinsubstraten. Die Geometrie der S2-Tasche ist hingegen für die Besetzung mit Lysin förderlich. Die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette ist von drei Sauerstoffatomen umgeben, zu denen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können. Dass die P3-Aminosäure Valin des gebundenen Peptidylchlormethylketons (Abbildung 33) der Oberfläche zugewandt ist, und es keine S3-Tasche gibt, erklärt möglicher Weise die Toleranz von Furin gegenüber Aminosäureaustauschen an dieser Position (Jean *et al.*, 1995, Krysan *et al.*, 1999). Viele natürliche Furinsubstrate und auch Spn4A/E weisen aber dennoch eine basische Aminosäure an P3 auf, die günstige Kontakte zu der an der Oberfläche lokalisierten Carboxylgruppe von Glu257 ausbilden könnte (Henrich *et al.*, 2003).

Durch Homologiemodellierungen wurden aus der Kristallstruktur des murinen Furins die Strukturen der sieben humanen furinähnlichen SPCs abgeleitet (Henrich *et al.*, 2005). Die meisten SPCs unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Substratspezifität, und die Modellierung hat für alle Enzyme den selben Aufbau des reaktiven Zentrums vorhergesagt (Abbildung 33). Auch die Domänenstrukturen und Inter-Domänenkontakte sind im Wesentlichen gleich. Die Entdeckung subtiler Unterschiede könnte die Basis zur Entwicklung selektiver Hemmstoffe sein. Alle SPCs weisen an ihrer Substratbindestelle viele negativ geladene Seitenketten auf, die sich jedoch in der Anzahl und Verteilung unterscheiden. Es wurde daher postuliert, dass eine spezifische Erkennung bestimmter Substrate (und somit auch Inhibitoren) durch die SPCs über einen unterschiedlichen Grad der Kompensierung negativer Ladungen ermöglicht wird. Furin ist die SPC, die die meisten positiven Ladungen für eine optimale Interaktion benötigt.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu untersuchen, ob und welche der weiteren SPCs durch Spn4A/E inhibiert werden. Kinetische Untersuchungen könnten Auskunft über die Selektivität des Serpins geben. Diese Frage soll in Zukunft durch Mutagenesestudien und in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen beantwortet werden.

Es wird vermutet, dass Unterschiede der katalytischen Zentren der SPCs - wahrscheinlich unterstützt durch verschiedene Exositekontakte - ausreichen, um eine Selektivität für bestimmte Inhibitoren zu ermöglichen (Henrich *et al.*, 2005). Dies wird durch Experimente mit  $\alpha_1$ -PDX unterstützt, die gezeigt haben, dass das Serpin ein wirksamer Inhibitor von Furin und PC6 ist, aber die anderen SPCs nur sehr langsam oder gar nicht hemmt (Jean *et al.*, 1998).

Aus der Furinstruktur wurde abgeleitet, dass die Ladung der Carboxylgruppe von Glutamat 257 des Furins durch Bindung einer basischen P3-Aminosäure - wie in Spn4A/E - kompensiert werden könnte (siehe oben). Interessanterweise liegen bei PC1/3 und PC2 Asparagin bzw. Threonin an Position 257 vor, was auf eine erhöhte Spezifität von Spn4A/E für Furin hinweisen könnte.

Für manche therapeutische Anwendungen kann jedoch auch der Einsatz von Inhibitoren günstig sein, die unselektiv sind. Zum Beispiel, die für die Membranfusion des HIV essenzielle Prozessierung des gp160 kann in CD4+ T-Lymphocyten und lymphatischen Geweben durch Furin, PC6 und PC7 erfolgen (Miranda *et al.*, 1996, Decroly *et al.*, 1997). Um eine Virusinfektion der Zellen zu verhindern, müssten hier alle SPCs ausgeschaltet werden, und eine gewebs- bzw. zellspezifische Hemmung der SPCs wäre in diesem Fall wünschenswert.

---

### 6.2.2 Spn4A und Spn4A $\Delta$ HDEL als Furininhibitoren im sekretorischen Pfad oder im extrazellulären Raum

SPCs haben redundante Spezifitäten, jedoch wird *in vivo* die Selektivität für bestimmte Substrate durch eine unterschiedliche Gewebsverteilung sowie durch verschiedene subzelluläre Lokalisationen ermöglicht (Henrich *et al.*, 2005).

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass Spn4A in transient exprimierenden COS7-Zellen mit dem ER-Marker-Protein PDI kolokalisiert und den sekretorischen Pfad nicht verlässt, wohingegen die Deletionsmutante Spn4A $\Delta$ HDEL effizient sekretiert wird (Abschnitt 5.5.2).

Die unterschiedlich lokalisierten Serpine Spn4A und Spn4A $\Delta$ HDEL könnten sich in Zellkulturmodellen als wertvolle Werkzeuge erweisen, um Furin selektiv im sekretorischen Pfad zu hemmen bzw. lösliche Formen des Enzyms im extrazellulären Milieu zu inaktivieren.

Die Aufklärung der Funktionen von Furin an verschiedenen Wirkorten könnte der Entwicklung von pharmakologischen Furininhibitoren dienen. Im Folgenden wird dargestellt, wie eine Hemmung der im TGN wirkenden SPC Furin durch das vornehmlich im ER-lokalisierte Spn4A möglich ist.

#### Lokalisation von Proteinen mit KDEL/HDEL-Signal

Der sekretorische Pfad von eukaryotischen Zellen besteht aus unterschiedlichen membranumschlossenen Kompartimenten. Dieses komplexe System ermöglicht die Faltung und Reifung von Proteinen in abgeschlossenen Räumen. Der Transport zwischen den Kompartimenten des sekretorischen Pfads erfolgt durch Knospung und Verschmelzung von Vesikeln, und sekretorische Proteine gelangen so aus dem ER über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (Herrmann *et al.*, 1999, Stephens and Pepperkok, 2001). Um die charakteristische Ausstattung von Enzymen und Lipiden in den Kompartimenten aufrechtzuerhalten sind regulierte Sortiermechanismen notwendig.

Viele Proteine des ER sind für die korrekte Faltung von Proteinen nötig (z. B. das Chaperonprotein BiP) oder wie Protein-Disulfid-Isomerasen für die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken. Solche Proteine besitzen an ihrem C-Terminus häufig das Tetrapeptid KDEL, das ihren Rücktransport ins ER ermöglicht und sie dadurch von sekretorischen Proteinen unterscheidet, die schnell zum Golgi-Apparat transportiert werden. Experimente von Pelham und Kollegen haben gezeigt, dass das Tetrapeptid KDEL am C-Terminus löslicher Proteine notwendig und hinreichend für die Lokalisation eines Proteins im ER ist (Munro and Pelham, 1987). BiP besitzt ein KDEL-Signal, und die Deletion dieser Sequenz oder die C-terminale Addition von zwei weiteren Aminosäuren führt zur Sekretion des ER-



Proteins. Die Studie hat auch gezeigt, dass die Verlängerung von lysosomalen Proteinen um die vier Aminosäuren des Signals zur Akkumulation dieser Proteine im ER führt. Es wurde daher gefolgert, dass die Gegenwart einer C-terminalen KDEL- oder einer verwandten Sequenz bei einem Protein mit Signalpeptid ein guter Indikator dafür ist, dass dieses normalerweise im Lumen des ER vorliegt (Pelham, 1990). Ein weiterer Mechanismus zu ER-Lokalisation kann Assoziation von Proteinen an KDEL-Proteine sein. So ist die im ER wirkende Prolyl-4-Hydroxylase ein Heterodimer aus PDI und einer Proteinkette ohne KDEL (Helaakoski *et al.*, 1989). Auch Abwandlungen des KDEL-Signals sind möglich, so weisen Pflanzen und Hefen vornehmlich das Signal HDEL auf (Pelham *et al.*, 1988). Generell sind die letzten beiden Aminosäuren stärker konserviert als die beiden ersten (Scott *et al.*, 2004).

Der Rezeptor ERD2 (*ER-retention defective 2*) wurde in Hefe-Mutanten entdeckt, die HDEL-Proteine sekretieren. Das Expressionsniveau dieses 7-Transmembrandomänen-Proteins bestimmt die Kapazität des Rückhaltungssystems (Semenza *et al.*, 1990). ERD2 wird im ER und in post-ER-Kompartimenten wie ERGIC (*ER-golgi-intermediate compartment*) und dem cis-Golgi gefunden. Die subzelluläre Verteilung des Rezeptors hat Konsequenzen für die Lokalisation von KDEL-Proteinen. Diese werden entsprechend - außer im ER - im ERGIC und cis-Golgi gefunden, aber weniger häufig in späteren Golgi-Kompartimenten (Pelham, 1996). Bisher ist nicht klar, warum der ERD2-Rezeptor selbst nicht sekretiert wird.

Auch Pathogene nutzen das ER-Rückführungssystem in eukaryotischen Zellen. Sowohl das Shiga- als auch das *Pseudomonas*-Toxin weisen ein KDEL-Signal auf. Das Shiga-Toxin kann nach extrazellulärer Zugabe im ER nachgewiesen werden (Sandvig *et al.*, 1992), und das KDEL-Signal des *Pseudomonas*-Toxins ist notwendig für seine Toxizität (Pastan *et al.*, 1992). Es wurde daher postuliert, dass endocytisierte Proteine Kompartimente erreichen können, von denen aus der retrograde Transport ins ER möglich ist.

Abgeleitet von der bekannten Lokalisation von KDEL-Proteinen und des ERD2-Rezeptors in Säugerzellen war damit zu rechnen, dass auch Spn4A hauptsächlich im ER vorliegt. Die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch Proproteinkonvertasen findet aber vornehmlich im trans-Golgi oder post-Golgi Kompartimenten statt. Die Frage ist daher, wie die *in vitro* demonstrierte Spn4A-vermittelte Hemmung der Prozessierung von Substraten stattfinden kann.

Unsere Immunfluoreszenzexperimente haben gezeigt, dass Spn4A in COS7-Zellen mit PDI kolokalisiert. Da PDI im ER wirkt, wurde daher gefolgert, dass Spn4A auch im ER vorliegt. PDI kann aber unter bestimmten Bedingungen sogar bis an die Oberfläche gelangen (Turano *et al.*, 2002). Es wurde nicht gezeigt, dass die Lokalisation von PDI unter unseren

experimentellen Bedingungen nur auf das ER beschränkt ist. Zur Identifikation der Wirkorte der Serpine Spn4A und Spn4A $\Delta$ HDEL sollte ihre Lokalisation in stabil exprimierenden Zelllinien überprüft werden. Hierbei wäre es von Interesse, sowohl Zellen, die Proteine über den konstitutiven sekretorischen Pfad exportieren als auch regulierbare endokrine Zellen zu untersuchen.

Die Rückführungssignale der Proteine von verschiedenen Organismen sind auf den jeweiligen ERD2-Rezeptor abgestimmt, und die effiziente Bindung ist teilweise nur durch den homologen Rezeptor möglich. Das bei Hefen verbreitete Motiv HDEL kommt auch bei fünf humanen ER-Proteinen vor (Scott *et al.*, 2004). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass das Insektenserpin Spn4A in Säugerzellen weiter im sekretorischen Pfad vordringen kann als homologe Proteine. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann ERD2 auch im TGN nachgewiesen werden (Griffiths *et al.*, 1994), was eine weitere Möglichkeit zur Translokation von ER-Proteinen ins TGN nahe legt.

### **Lokalisation des humanen Furins**

Die Lokalisation und Aktivierung von Furin wurde ausführlich untersucht (Anderson *et al.*, 2002) und in verschiedenen Reviews beleuchtet (Molloy *et al.*, 1999, Thomas, 2002). Nach dem aktuellen Modell wird davon ausgegangen, dass die pH-abhängige Prozessierung des Propeptids die schrittweise Translokation des Furins leitet und somit die Aktivierung reguliert. Das Propeptid fungiert zunächst als Chaperon für die Faltung der katalytischen Domäne. Nach einer autokatalytischen Abspaltung im ER an einer klassischen Furinkonsensussequenz (RXKR) verbleibt es anschließend als Inhibitor nicht-kovalent an das Enzym gebunden. Demnach ist Furin im ER inaktiv. Das Propeptid kann erst nach einer weiteren proteolytischen Spaltung abdissoziieren, so dass Furin vollständig aktiviert wird. Es wird angenommen, dass diese Spaltung C-terminal von einer Sequenz mit basischen Resten an P6, P2 und P1 (nicht aber an P4) nur unter den sauren Bedingungen der TGN/endosomalen Kompartimente ablaufen kann. Belege dafür sind, dass ein lösliches Furinkonstrukt mit KDEL-Signal, das im ER bleibt, keine Abspaltung des Propeptids zeigte (Anderson *et al.*, 2002). Eine Absenkung des pH-Werts (pH 6,0) führte zur Freisetzung des Propeptids von Furin aus ER-Membranfraktionen. Weiterhin wurde die zweite Spaltung und Dissoziation durch Behandlung mit Brefeldin A inhibiert, welches den Transport zwischen ER und Golgi verhindert.

Auch wenn Furinkonstrukte mit KDEL-Motiv inaktiv sind (Rehemtulla *et al.*, 1992, Anderson *et al.*, 2002) und viele Furinsubstrate in trans-Golgi- oder post-Golgi-Kompartimenten

prozessiert werden, gibt es mehrere Hinweise darauf, dass das Enzym auch im ER aktiv sein kann. Die Spaltung eines chimären Proteinkonstrukts aus der Prodomäne und dem C-Terminus von PC1 an einem dibasischen Motiv findet bereits sehr früh nach einer metabolischen Markierung und ungehemmt von Brefeldin A statt (Salvas *et al.*, 2005). Die Prozessierung des Konstrukts läuft auch ab, wenn ein KDEL-Signal angehängt wird. Schon früher wurde die partielle Proteolyse von einer natürlichen Mutante des Insulin-Rezeptors im ER durch Furin beschrieben (Bass *et al.*, 2000). Außerdem gibt es mutierte Formen des Profurins, die im ER zurückgehalten werden und dennoch den Pro-von Willebrand-Faktor prozessieren können (Bissonnette *et al.*, 2004).

Der Inhibitionsmechanismus der Serpine ist mit einer gravierenden Konformationsänderung des Serpins verbunden. Die Protease wird dabei an den anderen Pol des Inhibitors transportiert (Abschnitt 2.1.1, Abbildung 2) (Huntington *et al.*, 2000, Dementiev *et al.*, 2006). Es stellt sich die Frage, wie dies bei einem Transmembranprotein wie Furin ablaufen kann. Aus der Kristallstruktur des murinen Furins wurde abgeleitet, dass der Bereich C-terminal der P-Domäne *in vivo* als flexibles Verbindungsstück zwischen katalytischer und TM-Domäne dienen könnte (Rockwell and Thorner, 2004). Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese konformelle Flexibilität zulässt, dass eine membranständige Form des Enzyms durch Spn4A inhibiert wird. In verschiedenen Zellkultursystemen werden aber auch lösliche Formen des Enzyms gebildet, die wahrscheinlichere Ziele von Spn4A sind. Das natürliche verkürzte Furin wird durch Spaltung an Arg<sup>683</sup> 32 AS N-terminal der Transmembrandomäne erzeugt (Plaimauer *et al.*, 2001). An diesem Prozess beteiligte Proteasen sind bisher nicht bekannt. Interessanterweise wurde gezeigt, dass das *Shedding* von Furin in stabil exprimierenden HEK293-Zellen bereits intrazellulär im TGN erfolgen kann (Denault *et al.*, 2002). Hier wäre eine Interaktion von Spn4A mit löslichem Furin möglich.

Spn4A wurde in dieser Arbeit als erster natürlicher Furininhibitor beschrieben, der ein Signalpeptid aufweist und im sekretorischen Pfad lokalisiert ist. Kürzlich wurde ein Serpin aus *Branchiostoma lanceolatum* identifiziert, das über ein klassisches KDEL-Signal verfügt und ebenfalls Furin inhibiert (Bentele *et al.*, 2006).

Das humane Serpin PI8 weist die Sequenz RXXRXXR im RCL auf, und es ist schon lange bekannt, dass es Furin *in vitro* hemmen kann (Dahlen *et al.*, 1998). Eine Interaktion *in vivo* schien aber unwahrscheinlich, da das PI8 nicht über ein Signalpeptid verfügt. In einer aktuellen Arbeit wurden endogene Komplexe aus Furin und PI8 in Überständen von aktivierten humanen Blutplättchen nachgewiesen (Leblond *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass PI8 genau wie Furin stimulationsabhängig von Blutplättchen freigesetzt wird. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das PI8 ein natürlicher Inhibitor des humanen Furins ist, und dass lösliche Formen des Enzyms als Ziel für Serpine in Frage kommen.

### 6.3 Hemmung von Insektenfurinen durch Spn4A

Der Nachweis der acht Spn4-Spleißisoformen in RNA-Pools aus embryonalen und adulten Fruchtfliegen sowie aus S2-Zellen legt nahe, dass alle RCL-Formen gleichzeitig exprimiert werden und gemeinsam einen biologischen Prozess regulieren (siehe Abschnitt 6.1.5). Allerdings könnten die Varianten außerdem weitere, voneinander unabhängige Funktionen erfüllen. Diese Arbeit weist darauf hin, dass Spn4A ein natürlicher Regulator von Insekten-SPCs darstellen könnte, denn die beiden *Drosophila* Furine 1 und 2 bilden kovalente Komplexe mit einer rekombinanten Form des Inhibitors (Abschnitt 5.5.4), und die Überexpression des Serpins in Sf9-Zellen limitiert die endogene Konvertaseaktivität der Zellen (Abschnitt 5.5.5).

#### 6.3.1 S2-Zellen als Modellsystem für die Hemmung von *Drosophila* SPCs durch Spn4A

Um zu testen, ob sich die Ergebnisse zur *in vitro*-Hemmung des humanen Furins durch Spn4A/E aus *Drosophila melanogaster* auf das homologe System übertragen lassen, wurde untersucht, ob das Serpin auch die *Drosophila* Furine inhibiert. Da diese Enzyme kommerziell nicht erhältlich sind, wurde getestet, ob sie in S2-Zellen exprimiert werden. Um zu beurteilen, ob S2-Zellen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Spn4-Funktion sind, wurde die Präsenz der Serpine in diesen Zellen ebenfalls überprüft.

*Drosophila* Furin 1 und 2 wurden als Proteine von 90 bzw. 130 kDa in unkonzentrierten Zellkulturüberständen der S2-Zellen nachgewiesen (Abschnitt 5.5.4, Abbildung 29) nicht aber in Zellextrakten. Weder durch Zugabe von Natriumdesoxycholat zum Lysepuffer noch nach Aufkochen der bei der Extraktpräparation anfallenden unlöslichen Zelltrümmer mit SDS-haltigem Probenpuffer wurden im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern Banden erhalten, die auf die Furine deuteten (nicht gezeigt). Die starke Freisetzung löslicher Formen von DFurin1 und 2 von S2-Zellen deutet auf eine extrazelluläre Funktion der Enzyme.

Es gibt drei Isoformen von *Drosophila* Furin 1: DFurin1, DFurin-X und DFurin-CRR (Abschnitt 2.4.3) (Roebroek *et al.*, 1993). Alle drei Enzyme lassen sich in COS-1 Zellen exprimieren und wurden als Proteine von etwa 110, 165 bzw. 155 kDa von dem auch in der vorliegenden Arbeit für Western-Blots verwendeten Anti-DFurin-1-Antiserum aus COS-1-Lysaten immunpräzipitiert (Roebroek *et al.*, 1993). Bisher wurden die DFurine nicht im Insektenystem untersucht.

In Proben des Überstandes von S2-Zellen wurde mit Hilfe des Anti-DFurin1-Antiserums eine intensive Bande bei etwa 90 kDa detektiert (5.5.4 Abbildung 29). Aus der Größe des Proteins

konnte nicht abgeleitet werden, um welche DFurin1-Isoform es sich handelt, da nicht bekannt ist, an welcher Aminosäureposition das *Shedding* der Proteine erfolgt. Für humanes Furin wurde gezeigt, dass die Cysteinreste an Position 614 und 641 in der CRR-Domäne für die Bildung der löslichen Form essenziell sind (Denault *et al.*, 2002). Da nur DFurin1-CRR über Cystein-reiche Regionen verfügt, könnte vermutet werden, dass es sich in den S2-Überständen um eine lösliche Variante dieser DFurin1-Isoform handelt. DFurin2, das eine sehr ausgedehnte CRR-Domäne hat, wurde ebenfalls im Überstand nachgewiesen. Bei der Expression in LoVo- und BSC40-Zellen werden verschiedene Prozessierungsstufen der *Drosophila*-Furine gebildet (De Bie *et al.*, 1995). Auch diverse verkürzte lösliche Formen wurden in den transfizierten Säugerzellen identifiziert, die bereits intrazellulär im ER entstanden. Diese wiesen aber andere Größen auf als die hier untersuchten von den S2-Zellen freigesetzten Wildtyp-Proteine. Lösliches DFurin2 wurde beispielsweise im Rahmen dieser Arbeit als 130 kDa-Form detektiert. Die kleinste Form, die von De Bie und Kollegen beschrieben wurde, war 162 kDa groß. Es ist daher anzunehmen, dass die Prozessierung im natürlichen System anders erfolgt als in den Säugerzellen und dass es sich nicht nur um Unterschiede in der Glykosylierung handelt. Die Behandlung des S2-Überstandes mit Glykosidasen könnte dennoch einen ersten Anhaltspunkt liefern.

Beide *Drosophila* Furine bildeten SDS-stabile Komplexe mit zum Überstand zugesetztem rekombinantem Spn4E (Abschnitt 5.5.4). Dies zeigte, dass es sich bei den 90 und 130 kDa Proteinen um aktive Formen der Proteasen handelt und dass beide als *in vivo-target* für Spn4A in Frage kommen.

Durch das Anti-Spn4-Antiserum wurde in S2-Extrakten ein 45 kDa-Protein detektiert, welches mit humanem Furin unter Bildung eines Komplexes reagierte (Abschnitt 5.5.3, Abbildung 28). Sowohl aktives Spn4A/E als auch die DFurine werden demnach von S2-Zellen gebildet, so dass diese Zelllinie ein geeignetes Modellsystem für die natürliche Serpin/Protease-Interaktion darstellen könnte. Experimente zur Anreicherung endogener Komplexe sind in Arbeit (Diplomarbeit Stefanie Gürtler). Auch in Überständen zeigte sich eine Anti-Spn4-immunreaktive Bande von 45 kDa, aber Furin-inhibierendes, aktives Spn4A konnte bisher dort nicht nachgewiesen werden.

Überexpressionsexperimente weisen darauf, dass das Serpin trotz des HDEL-Signals von Insektenzellen sekretiert werden kann. Nach Expression von Spn4A in Sf9-Zellen (Abschnitt 5.5.5) wurde das Protein mittels Western-Blotting im Gegensatz zu dem vergleichbaren Experiment mit COS7-Zellen (5.5.2) nicht nur in Extrakten, sondern auch in Überständen nachgewiesen (nicht gezeigt). Ein in S2-Zellen transient exprimiertes Konstrukt, bestehend

aus dem  $\alpha_1$ -AT-Signalpeptid und Spn4E (SP-Spn4E), wurde ebenfalls im Überstand detektiert (Richer et al., 2004). Diese Studie zeigte außerdem, dass *Drosophila* PC2 (*amontillado*) ebenfalls von Spn4A/E inhibiert wird und dass nach Koexpression des SP-Spn4E-Konstruktes mit *amontillado* Komplexe aus beiden Proteinen in S2-Überständen auftreten können. Es konnte hier allerdings nicht gefolgert werden, ob die Komplexe sekretiert oder erst extrazellulär gebildet wurden (Richer et al., 2004).

### 6.3.2 Spn4A als *in vivo*-Regulator von Insekten SPCs

In *Drosophila* gibt es nur drei Gene, welche SPCs codieren: DFur-1, D-Fur-2 (Roebroek et al., 1991) und *amontillado*, das *Drosophila* Homolog zu PC2 (Siekhaus and Fuller, 1999).

Diese Arbeit und die Ergebnisse von (Richer et al., 2004) haben gezeigt, dass Spn4A Komplexe mit allen drei SPCs bildet und somit ein möglicher natürlicher Regulator dieser Enzyme ist.

Um zu zeigen, dass Spn4A die endogene Konvertaseaktivität in Insektenzellen hemmen kann, wurde das Serpin in Sf9-Zellen des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda* überexprimiert, welche ein aktives, DFurin2-ähnliches Enzym bilden (Cieplik et al., 1998). Es war bereits bekannt, dass das in diesen Zellen rekombinant produzierte Lipidtransportprotein Apolipoprotein von *Locusta migratoria* an einer RXXR-Sequenz prozessiert wird (Smolenaars et al., 2005). Die Reifung des Apolipoproteins konnte durch Koexpression von Spn4A gehemmt werden (5.5.5), so dass sich die *in vitro* Experimente zur Inhibition der DFurine auf Insekten-Zellkultursysteme übertragen ließen.

Sf9-Zellen bieten den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu S2-Zellen vollständig adhärent wachsen und sich effizient mittels Polyethylenimin transfizieren lassen (Marcel Smolenaars, persönliche Mitteilung). S2-Zellen wurden außerdem nicht verwendet, da Reaktionen des endogen exprimierten Spn4A/E die Interpretation der Ergebnisse erschwert hätten.

Die erste Identifikation von Spn4-Transkripten in Ammenzellen und Oocyten von *Drosophila melanogaster* wies auf eine Funktion der Serpine in der Embryonalentwicklung (Han et al., 2000). Auch die DFurine werden im Oviduct exprimiert, was auf eine Interaktion der Proteine *in vivo* deuten könnte. Erste genetische Studien mit transgenen Fliegen, die Spn4A (Osterwalder et al., 2004) überexprimieren, machen plausibel, dass *amontillado* eine Zielprotease des Serpins ist. Das Schlüpfen der transgenen Larven war beeinträchtigt, und die Blockierung der Häutung hatte bei einigen Individuen letale Folgen. Die transgenen Fliegen zeigten den selben Phänotyp wie Mutanten mit einem defekten *amontillado*-Gen (Siekhaus and Fuller, 1999).

## 6.4 Fazit

Diese Arbeit zeigt, dass die ausgehend vom Spn4-Gen von *Drosophila melanogaster* exprimierten RCL-Varianten *in vitro* Zielproteasen von den drei evolutionär unabhängigen Peptidasefamilien S1, S8 und C1 inhibieren. Dies deutet darauf, dass auch die physiologische Funktion des Gens die Hemmung diverser Proteasen darstellt.

Variante A/E wurde als sehr wirksamer Inhibitor des humanen Furins identifiziert. Die gezielte Hemmung von Furin im sekretorischen Pfad durch das Serpin in verschiedenen Krankheitsmodellen könnte wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung von gegen Furin gerichteten Pharmazeutika liefern.

Eine spezielle physiologische Funktion von Spn4A könnte die Hemmung der *Drosophila* SPCs sein, denn das Serpin bildet kovalente Komplexe mit den *Drosophila* Furinen 1 und 2 und ist in der Lage die endogene Konvertaseaktivität von Sf9-Zellen zu limitieren.

Die zukünftige Identifizierung aller endogenen Spn4-Ziele ist nötig, um die Funktion des Gens und des komplexen Spleißmusters zu definieren. Sowohl zelluläre Proteasen als auch die von *Drosophila*-Pathogenen sind mögliche Kandidaten. Der letzte Teil der Arbeit lieferte ein Beispiel dafür, dass es möglich ist, die mit den Säugerproteasen erzielten *in vitro*-Ergebnisse auf das physiologische System zu übertragen.



## 7 Literaturverzeichnis

Al-Khunaizi, M., Luke, C.J., Askew, Y.S., Pak, S.C., Askew, D.J., Cataltepe, S., Miller, D., Mills, D.R., Tsu, C., Bromme, D., Irving, J.A., Whisstock, J.C. & Silverman, G.A. (2002) The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry*, **41**, 3189-3199.

Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. & Thomas, G. (2002) The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem*, **277**, 12879-12890.

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.

Annand, R.R., Dahlen, J.R., Sprecher, C.A., De Dreu, P., Foster, D.C., Mankovich, J.A., Talanian, R.V., Kiesel, W. & Giegel, D.A. (1999) Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 655-665.

Barnes, W.M. (1992) The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene*, **112**, 29-35.

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.

Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982) L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J*, **201**, 189-198.

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., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G. & Klein-Szanto, A.J. (2001) Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10326-10331.

Beatty, K., Bieth, J. & Travis, J. (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem*, **255**, 3931-3934.

Bentele, C. (2004) Isoforms of the *Drosophila melanogaster* serpin Spn4 in Schneider-2 cells and experiments aimed at identification of target enzymes, Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.

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

- 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.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bissonnette, L., Charest, G., Longpre, J.M., Lavigne, P. & Leduc, R. (2004) Identification of furin pro-region determinants involved in folding and activation. *Biochem J*, **379**, 757-763.
- Bode, W., Papamokos, E. & Musil, D. (1987) The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *Eur J Biochem*, **166**, 673-692.
- 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.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A. & Fuller, R.S. (1994) Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem*, **269**, 25830-25837.
- Brinkmeyer, S., Eckert, R. & Ragg, H. (2004) Reformable intramolecular cross-linking of the N-terminal domain of heparin cofactor II: effects on enzyme inhibition. *Eur J Biochem*, **271**, 4275-4283.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Cabrera, M., Muniz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martin, M.E. & Velasco, A. (2003) The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell*, **14**, 4114-4125.
- Carugati, A., Pappalardo, E., Zingale, L.C. & Cicardi, M. (2001) C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol*, **38**, 161-173.
- Christeller, J.T. (2005) Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *Febs J*, **272**, 5710-5722.
- 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.

- Cloutier, S.M., Chagas, J.R., Mach, J.P., Gygi, C.M., Leisinger, H.J. & Deperthes, D. (2002) Substrate specificity of human kallikrein 2 (hK2) as determined by phage display technology. *Eur J Biochem*, **269**, 2747-2754.
- Dahlen, J.R., Foster, D.C. & Kisiel, W. (1999) Inhibition of neutrophil elastase by recombinant human proteinase inhibitor 9. *Biochim Biophys Acta*, **1451**, 233-241.
- 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.
- De Bie, I., Savaria, D., Roebroek, A.J., Day, R., Lazure, C., Van de Ven, W.J. & Seidah, N.G. (1995) Processing specificity and biosynthesis of the *Drosophila melanogaster* convertases dfurin1, dfurin1-CRR, dfurin1-X, and dfurin2. *J Biol Chem*, **270**, 1020-1028.
- Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D. & Seidah, N.G. (1997) Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett*, **405**, 68-72.
- 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.
- Denault, J.B. & Leduc, R. (1996) Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett*, **379**, 113-116.
- Dougherty, W.G., Parks, T.D., Cary, S.M., Bazan, J.F. & Fletterick, R.J. (1989) Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology*, **172**, 302-310.
- Dufour, E.K., Denault, J.B., Hopkins, P.C. & Leduc, R. (1998) Serpin-like properties of alpha1-antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett*, **426**, 41-46.
- Edwards, C.P. & Aruffo, A. (1993) Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr Opin Biotechnol*, **4**, 558-563.
- Frade, R., Rodrigues-Lima, F., Huang, S., Xie, K., Guillaume, N. & Bar-Eli, M. (1998) Procathepsin-L, a proteinase that cleaves human C3 (the third component of complement), confers high tumorigenic and metastatic properties to human melanoma cells. *Cancer Res*, **58**, 2733-2736.
- Frese, M. (2005) Genetic and biochemical characterization of serpins from *Branchiostoma lanceolatum*, Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Fugere, M. & Day, R. (2002) Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs). *Curr Pharm Des*, **8**, 549-562.
- Fugere, M. & Day, R. (2005) Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 294-301.

- Fuller, R.S., Brake, A.J. & Thorner, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, **246**, 482-486.
- Genilloud, O., Garrido, M.C. & Moreno, F. (1984) The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene*, **32**, 225-233.
- Gettins, P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, **102**, 4751-4804.
- Godbey, W.T., Wu, K.K. & Mikos, A.G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5177-5181.
- Graf, L., Szilagy, L. & Venekei, I. (2004) Chymotrypsin In *Handbook of proteolytic enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. ed.), pp. 1495-1501. Elsevier, London.
- 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.
- 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.
- Han, J., Zhang, H., Min, G., Kemler, D. & Hashimoto, C. (2000) A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases. *FEBS Lett*, **468**, 194-198.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, **293**, 1840-1842.
- Hayflick, J.S., Wolfgang, W.J., Forte, M.A. & Thomas, G. (1992) A unique Kex2-like endoprotease from *Drosophila melanogaster* is expressed in the central nervous system during early embryogenesis. *J Neurosci*, **12**, 705-717.
- Hedengren, M., Borge, K. & Hultmark, D. (2000) Expression and evolution of the *Drosophila* attacin/diptericin gene family. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 574-581.
- Helaakoski, T., Vuori, K., Myllyla, R., Kivirikko, K.I. & Pihlajaniemi, T. (1989) Molecular cloning of the alpha-subunit of human prolyl 4-hydroxylase: the complete cDNA-derived amino acid sequence and evidence for alternative splicing of RNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 4392-4396.
- 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.
- Herrmann, J.M., Malkus, P. & Schekman, R. (1999) Out of the ER-outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol*, **9**, 5-7.

- Hook, V., Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Troutner, K., Toneff, T., Bunday, R., Logrinova, A., Reinheckel, T., Peters, C. & Bogyo, M. (2004) Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol Chem*, **385**, 473-480.
- Hultmark, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet*, **9**, 178-183.
- Hunkapiller, M.W., Forgac, M.D. & Richards, J.H. (1976) Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry*, **15**, 5581-5588.
- Hunkapiller, M.W., Smallcombe, S.H., Witaker, D.R. & Richards, J.H. (1973) Ionization behavior of the histidine residue in the catalytic triad of serine proteases. Mechanistic implications. *J Biol Chem*, **248**, 8306-8308.
- Hunt, L.T. & Dayhoff, M.O. (1980) A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, **95**, 864-871.
- Huntington, J.A., Read, R.J. & Carrell, R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **407**, 923-926.
- Hwang, S.R., Stoka, V., Turk, V. & Hook, V.Y. (2005) The novel bovine serpin endopin 2C demonstrates selective inhibition of the cysteine protease cathepsin L compared to the serine protease elastase, in cross-class inhibition. *Biochemistry*, **44**, 7757-7767.
- Irving, J.A., Pike, R.N., Dai, W., Bromme, D., Worrall, D.M., Silverman, G.A., Coetzer, T.H., Dennison, C., Bottomley, S.P. & Whisstock, J.C. (2002a) Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. *Biochemistry*, **41**, 4998-5004.
- Irving, J.A., Shushanov, S.S., Pike, R.N., Popova, E.Y., Bromme, D., Coetzer, T.H., Bottomley, S.P., Boulyenko, I.A., Grigoryev, S.A. & Whisstock, J.C. (2002b) Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation. *J Biol Chem*, **277**, 13192-13201.
- Irving, J.A., Steenbakkens, P.J., Lesk, A.M., Op den Camp, H.J., Pike, R.N. & Whisstock, J.C. (2002c) Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol*, **19**, 1881-1890.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. & Hetru, C. (2001) A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15119-15124.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G. & Lazure, C. (1995) Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem*, **270**, 19225-19231.
- 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.

- Jiang, H., Wang, Y. & Kanost, M.R. (1994) Mutually exclusive exon use and reactive center diversity in insect serpins. *J Biol Chem*, **269**, 55-58.
- Kirschke, H., Schmidt, I. & Wiederanders, B. (1986) Cathepsin S. The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L (EC 3.4.22.15). *Biochem J*, **240**, 455-459.
- Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G. & Leppla, S.H. (1992) Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10277-10281.
- Knight, C.G. (1995) Active-site titration of peptidases. *Methods Enzymol*, **248**, 85-101.
- Komiyama, T., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P. & Salvesen, G. (1994) Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem*, **269**, 19331-19337.
- Krüger, O. (2003) Eine phylogenetische Analyse von Serpin-Genen aus eukaryotischen Genomprojekten, Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Krüger, O., Ladewig, J., Köster, K. & Ragg, H. (2002) Widespread occurrence of serpin genes with multiple reactive centre-containing exon cassettes in insects and nematodes. *Gene*, **293**, 97-105.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C. & Fuller, R.S. (1999) Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem*, **274**, 23229-23234.
- 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.
- Liu, N., Raja, S.M., Zazzeroni, F., Metkar, S.S., Shah, R., Zhang, M., Wang, Y., Bromme, D., Russin, W.A., Lee, J.C., Peter, M.E., Froelich, C.J., Franzoso, G. & Ashton-Rickardt, P.G. (2003) NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *Embo J*, **22**, 5313-5322.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik, 1. Aufl.*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Luke, C., Schick, C., Tsu, C., Whisstock, J.C., Irving, J.A., Bromme, D., Juliano, L., Shi, G.P., Chapman, H.A. & Silverman, G.A. (2000) Simple modifications of the serpin reactive site loop convert SCCA2 into a cysteine proteinase inhibitor: a critical role for the P3' proline in facilitating RSL cleavage. *Biochemistry*, **39**, 7081-7091.
- Lummer, M. (2005) Nachweis der zellulären Lokalisation der Spn4-Isoformen aus *Drosophila melanogaster*, Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- 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.
- Macherey Nagel Purification of polyhistidine-tagged proteins, Protino Ni-TED, User manual.

- Melcher, K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Anal Biochem*, **277**, 109-120.
- Mercado-Pimentel, M.E., Jordan, N.C. & Aisemberg, G.O. (2002) Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein Expr Purif*, **26**, 260-265.
- Miranda, L., Wolf, J., Pichuantes, S., Duke, R. & Franzusoff, A. (1996) Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7695-7700.
- Mitchell, L., Piovella, F., Ofosu, F. & Andrew, M. (1991) Alpha-2-macroglobulin may provide protection from thromboembolic events in antithrombin III-deficient children. *Blood*, **78**, 2299-2304.
- 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., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. & Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem*, **267**, 16396-16402.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899-907.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N. & et al. (1991) The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *Embo J*, **10**, 2321-2330.
- Navia, M.A., McKeever, B.M., Springer, J.P., Lin, T.Y., Williams, H.R., Fluder, E.M., Dorn, C.P. & Hoogsteen, K. (1989) Structure of human neutrophil elastase in complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7-11.
- Nüsslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801.
- Oley, M., Letzel, M.C. & Ragg, H. (2004) Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, **577**, 165-169.
- 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.
- Otto, H.H. & Schirmeister, T. (1997) Cysteine Proteases and their Inhibitors. *Chem Rev*, **97**, 133-172.
- Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A. & Dougherty, W.G. (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem*, **216**, 413-417.
- Pastan, I., Chaudhary, V. & FitzGerald, D.J. (1992) Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem*, **61**, 331-354.

- Pelham, H.R. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, **15**, 483-486.
- Pelham, H.R. (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct*, **21**, 413-419.
- Pelham, H.R., Hardwick, K.G. & Lewis, M.J. (1988) Sorting of soluble ER proteins in yeast. *Embo J*, **7**, 1757-1762.
- Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelspach, M., Dorner, F. & Schlokot, U. (2001) 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem J*, **354**, 689-695.
- Polayes, D., Goldstein, A., Ward, G. & Hughes, A. (1994) TEV protease, recombinant: A site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins In *Focus (Invitrogen Firmenjournal)*, Vol. 16, pp. 2-5.
- Rawlings, N. & Barrett, A.J. (2004a) The clans and families of cysteine peptidases In *Handbook of proteolytic enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. ed.), pp. 1051-1069. Elsevier, London.
- Rawlings, N. & Barrett, A.J. (2004b) Serine peptidases and their clans In *Handbook of proteolytic enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. ed.), pp. 1417-1439. Elsevier, London.
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*, **290** (Pt 1), 205-218.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. & Barrett, A.J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*, **378**, 705-716.
- Reddy, V.Y., Zhang, Q.Y. & Weiss, S.J. (1995) Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3849-3853.
- Rehemtulla, A., Dorner, A.J. & Kaufman, R.J. (1992) Regulation of PACE propeptide-processing activity: requirement for a post-endoplasmic reticulum compartment and autoproteolytic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8235-8239.
- Remold-O'Donnell, E., Chin, J. & Alberts, M. (1992) Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5635-5639.
- 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.
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L. & Chapman, H.A. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*, **4**, 357-366.



- Roberts, T.H., Hejgaard, J., Saunders, N.F., Cavicchioli, R. & Curmi, P.M. (2004) Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *J Mol Evol*, **59**, 437-447.
- Rockwell, N.C. & Thorner, J.W. (2004) The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci*, **29**, 80-87.
- Roebroek, A.J., Ayoubi, T.A., Creemers, J.W., Pauli, I.G. & Van de Ven, W.J. (1995) The Dfur2 gene of *Drosophila melanogaster*: genetic organization, expression during embryogenesis, and pro-protein processing activity of its translational product Dfurin2. *DNA Cell Biol*, **14**, 223-234.
- Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Pauli, I.G., Bogaert, T. & Van de Ven, W.J. (1993) Generation of structural and functional diversity in furin-like proteins in *Drosophila melanogaster* by alternative splicing of the Dfur1 gene. *Embo J*, **12**, 1853-1870.
- Roebroek, A.J., Pauli, I.G., Zhang, Y. & van de Ven, W.J. (1991) cDNA sequence of a *Drosophila melanogaster* gene, Dfur1, encoding a protein structurally related to the subtilisin-like proprotein processing enzyme furin. *FEBS Lett*, **289**, 133-137.
- Ross, J., Jiang, H., Kanost, M.R. & Wang, Y. (2003) Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene*, **304**, 117-131.
- Rubin, G.M. (1988) *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science*, **240**, 1453-1459.
- Ruhlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K. & Huber, R. (1973) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *J Mol Biol*, **77**, 417-436.
- 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., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Verlag Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview, New York.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H. & van Deurs, B. (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*, **358**, 510-512.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sarac, M.S., Cameron, A. & Lindberg, I. (2002) The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in vivo. *Infect Immun*, **70**, 7136-7139.

- Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-162.
- Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Bromme, D., Chapman, H.A. & Silverman, G.A. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, **37**, 5258-5266.
- Scott, M., Lu, G., Hallett, M. & Thomas, D.Y. (2004) The Hera database and its use in the characterization of endoplasmic reticulum proteins. *Bioinformatics*, **20**, 937-944.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A. & Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 928-933.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. & Pelham, H.R. (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*, **61**, 1349-1357.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-820.
- Sichler, K., Hopfner, K.P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W. & Brandstetter, H. (2002) The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett*, **530**, 220-224.
- Siekhaus, D.E. & Fuller, R.S. (1999) A role for amontillado, the *Drosophila* homolog of the neuropeptide precursor processing protease PC2, in triggering hatching behavior. *J Neurosci*, **19**, 6942-6954.
- 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.
- Silverman, G.A., Whisstock, J.C., Askew, D.J., Pak, S.C., Luke, C.J., Cataltepe, S., Irving, J.A. & Bird, P.I. (2004) Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 301-325.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. & van der Blik, A.M. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **12**, 2245-2256.
- Smith, D.B. (2000) Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods Enzymol*, **326**, 254-270.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.

- Smolenaars, M.M., Kasperaitis, M.A., Richardson, P.E., Rodenburg, K.W. & Van der Horst, D.J. (2005) Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipoprotein-II/I. *J Lipid Res*, **46**, 412-421.
- Steiner, D.F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 31-39.
- Stephens, D.J. & Pepperkok, R. (2001) Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles? *J Cell Sci*, **114**, 1053-1059.
- Storer, A.C. & Menard, R. (1994) Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*, **244**, 486-500.
- Stratagene QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, User manual.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- 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.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-766.
- Tödtmann, U. (2004) Klonierung, rekombinante Expression und Charakterisierung von Serpin1 aus *Branchiostoma lanceolatum*, Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F. & Ferraro, A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, **193**, 154-163.
- Turk, B., Turk, D. & Salvesen, G.S. (2002) Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des*, **8**, 1623-1637.
- van Duijnhoven, H.L., Creemers, J.W., Kranenborg, M.G., Timmer, E.D., Groeneveld, A., van den Ouweland, A.M., Roebroek, A.J. & van de Ven, W.J. (1992) Development and characterization of a panel of monoclonal antibodies against the novel subtilisin-like proprotein processing enzyme furin. *Hybridoma*, **11**, 71-86.
- Vasiljeva, O., Dolinar, M., Turk, V. & Turk, B. (2003) Recombinant human cathepsin H lacking the mini chain is an endopeptidase. *Biochemistry*, **42**, 13522-13528.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. & Lemaitre, B. (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11414-11419.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-619.
- Weers, P.M., Van Marrewijk, W.J., Beenackers, A.M. & Van der Horst, D.J. (1993) Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipoproteins I and II originate from a common precursor. *J Biol Chem*, **268**, 4300-4303.

Weiss, B., Thompson, A. & Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem*, **243**, 4556-4563.

Wells, T., Sun, J., Irving, J.A., Blum, R., Smith, A.I., Whisstock, J.C., Pike, R.N., von Mikecz, A., Ruzicka, T., Bird, P.I. & Abts, H.F. (2003) Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry*, **42**, 7381-7389.

Westenberg, M., Wang, H., WF, I.J., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. & Zuidema, D. (2002) Furin is involved in baculovirus envelope fusion protein activation. *J Virol*, **76**, 178-184.

Wright, W.W., Smith, L., Kerr, C. & Charron, M. (2003) Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biol Reprod*, **68**, 680-687.

Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G. & Wu, H. (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature*, **410**, 494-497.

Zambon, M.C. (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*, **11**, 227-241.

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.

## 8 Anhang

### 8.1 Materiallisten

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte, Materialien, Größenstandards, Enzyme und Substrate sowie die Software aufgelistet.

<b>Chemikalien und andere Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
40 % Acrylamid / Bis <i>solution</i> , 29:1	BIO RAD
Agarose	Life Technologies
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Sigma
Brij-35	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA
DMP (Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid)	Fluka
dNTPs (2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate)	Genecraft
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
Ethidiumbromidlösung	Roth
Filmentwickler D19	Kodak
Filmfixierer Unifix	Kodak
Glutathion red.	Sigma
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid)	Sigma
Lennox L Agar	Life Technologies
Lennox L Broth Base	Life Technologies
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
Mowiol 4-88	Hoechst
NP40	Fluka
PEI (Polyethylenimin), 25 kDa	Polysciences Europe
PhastGel Blue R, Coomassie R350	Amersham Biosciences
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail, P8849	Sigma
Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure)	Aldrich
TCA (Trichloressigsäure)	Serva
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Serva
TFA (Trifluoressigsäure)	Aldrich
Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Triton X-100	Serva
Tween 20	Omnilab Lifescience
Zeocin	Invitrogen

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
96 well Platten, schwarz transparenter Boden	Nunc
Biofuge 28 RS	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Blot Modul Xcell II	Novex
Blotpapier	Schleicher & Schüll
CCD-Videokamera	Biometra
Deckgläser 24 × 50 mm	Omnilab
Digitalkamera C8484-05G	Hamamatsu
DNA-Sequenzer LI-COR 4200	MWG-Biotech AG
Entwicklungsbox	G. Kisker
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop IX81*	Olympus
Frensh Press**	SLM Aminco
Gelelektrophoresesystem Miniprotean	BIO-RAD
Geltrockner 583	BIO-RAD
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Heizblock, TB1 Thermoblock	Biometra
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Inkubationsschüttler	B. Braun Biotech
NuPAGE-Gele	Invitrogen
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Protino® Ni 2000 Säulen	Macherey Nagel
PVDF-Membran <i>Hybond-P</i>	Amersham Biosciences
Schüttelkolben, 1000 ml	B. Braun Biotech
Schüttler DuoMax 1030	Heidolph
Spektrometer FLUOstar/POLARstar galaxi***	bmg labtechnologies
Spektrometer UV-1602	Shimadzu
Sponge Pads (Western Blot)	Invitrogen
Thermocycler Progene	Thermo-Dux
Thermocycler T-Gradient	Biometra
Tisch-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Transilluminator (312 nm)	Biometra
Vortex Genie 2, G-560 E	Scientific Industries
Voyager DE Massenspektrometer****	PE Biosystems GmbH
Waage A120S, analytisch	Sartorius
Waage U4800 P	Sartorius
Zentrifuge RC5C, Rotoren: SS-34, GS-3	Sorvall Instruments,
Zip Tips® C18	Millipore

Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von

\* AG Prof. Niehaus, Fakultät für Biologie

\*\* AG Prof. Pistorius / Staiger, Fakultät für Biologie

\*\*\* AG Zellkulturtechnik, Technische Fakultät

\*\*\*\* Abteilung Massenspektrometrie, Fakultät für Chemie

<b>Geräte und Materialien für die Zellkultur</b>	<b>Hersteller</b>
Begasungsbrutschrank Modell 3336	Forma Scientific. Inc.
Lab-Tek Chamberslides	Nunc
Megafuge 1.0	Heraeus
Reinraumwerkbank Lamine Air HB2448	Heraeus
Schalen Nunclon Δ Surface	Nunc
Technoflow Cleanbench 2F120-II GS	Integra Biosciences
T-Flaschen Nunclon Δ Surface T25, T75, T175	Nunc
Zellschaber	Greiner, Sarstedt

<b>Kits</b>	<b>Hersteller / Bestellnummer</b>
<i>Coomassie Protein Assay Reagent</i>	Pierce, 23200
<i>ECL Western Blotting Detection</i>	Amersham Biosciences, RPN 2109
<i>ThermoSequenase labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP</i>	Amersham Biosciences, US79585
<i>Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid</i>	Macherey Nagel, 740588
<i>Nucleobond<sup>®</sup> PC 100</i>	Macherey Nagel, 740573
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, 28704
<i>Quick Ligation Kit</i>	New England Biolabs, M2200
<i>pGEM<sup>®</sup>-T Vector System</i>	Promega, A3610
<i>TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing</i>	Invitrogen, K4575J10

<b>Größenstandards</b>	<b>Hersteller / Bestellnummer</b>
1 kb O'GeneRuler DNA Leiter	Fermentas, SM 1163
100 bp DNA Leiter	Genecraft, GC-015-004
HMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, 17-0615-01
LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, 17-0446-01
PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas, SM0671

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller / Bestellnummer</b>
AcTEV-Protease	Invitrogen, 12575-015
Cathepsin B	Calbiochem, 219364
Cathepsin L	Calbiochem, 219402
Cathepsin S	Calbiochem, 219343
Chymotrypsin	Princeton Separations, EN-160
humane neutrophile Elastase	Calbiochem, 324681
Furin	New England Biolabs, P8077
KlenTherm DNA-Polymerase	Genecraft, GC-001-0100
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega, M7741
Restriktionsendonuklease <i>DpnI</i>	New England Biolabs, R0176
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	New England Biolabs, R0101
Restriktionsendonuklease <i>KpnI</i>	New England Biolabs, R0142
Restriktionsendonuklease <i>NcoI</i>	New England Biolabs, R0193
Restriktionsendonuklease <i>NotI</i>	New England Biolabs, R0189

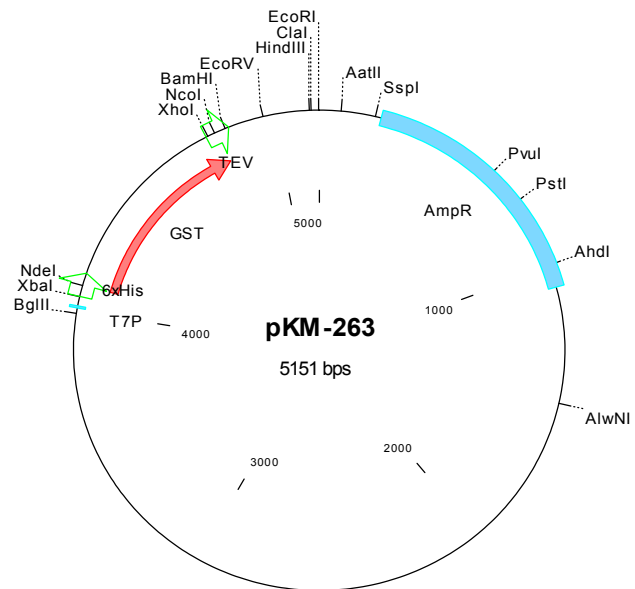
<b>Substrate und Inhibitoren</b>	<b>Bezugsquelle, Produktnummer</b>
Pyr-RTKR-AMC	Bachem, I-1650
z-FR-AMC*HCl	Alexis, ALX-260-131
(z-FR) <sub>2</sub> -R110	Molecular Probes, R6502
MeOSuc-AAPV-AMC	Calbiochem, 324740
dec-RVKR-cmk	Bachem, N-1505
E-64	Sigma, E3132

<b>Software</b>	<b>Bezugsquelle</b>
EnzFitter	Biosoft
Photoshop 7.0	Adobe
FLUOstar	bmg laboratories
Base ImagIR Data Collection	LI-COR Biotechnology Division
Base ImagIR Data Analysis	LI-COR Biotechnology Division
Sigmaplot	SPSS Inc.
Photo Finish ZSoft 3.0	WordStar Atlanta Technology Center
PDB viewer	SwissProt

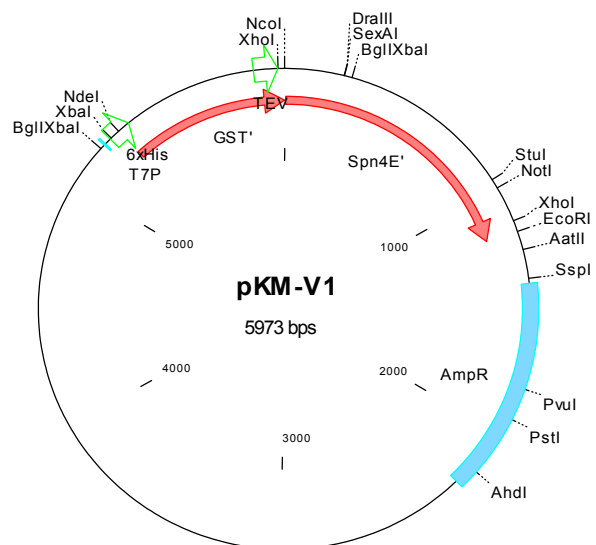
## 8.2 Vektorkarten

### 8.2.1 pKM-263 und Derivate

Der Vektor pKM-263 (Euroscarf, Frankfurt) codiert für GST aus *Schistosoma japonicum* mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und der Spaltsequenz der TEV-Protease am C-Terminus unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Melcher, 2000).



Ausgehend von pKM-263 wurden die Vektoren pKM-V1-V4 kloniert. Sie enthalten die jeweiligen cDNA Sequenzen von Spn4E-H (flankiert von NcoI und EcoRI-Schnittstellen) im Leseraster mit dem His<sub>6</sub>-Tag, der GST und der TEV-Schnittstelle, hier gezeigt am Beispiel von pKM-V1. Die zur Herstellung der Fragmente verwendeten Primer sind in 8.3.4, Tabelle 25 angegeben (Nr. 5-10).

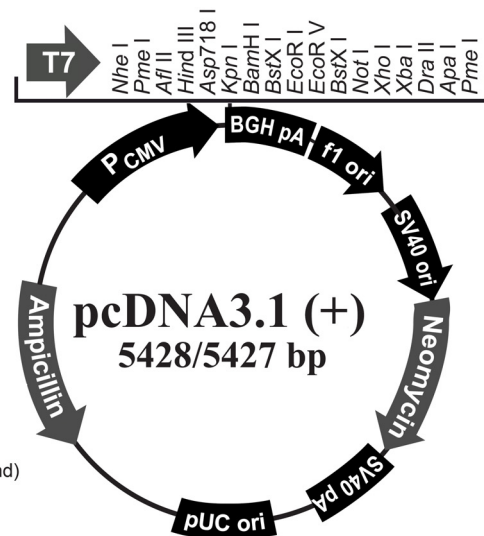




## 8.2.2 pcDNA3.1(+) und Derivate

### Comments for pcDNA3.1 (+) 5428 nucleotides

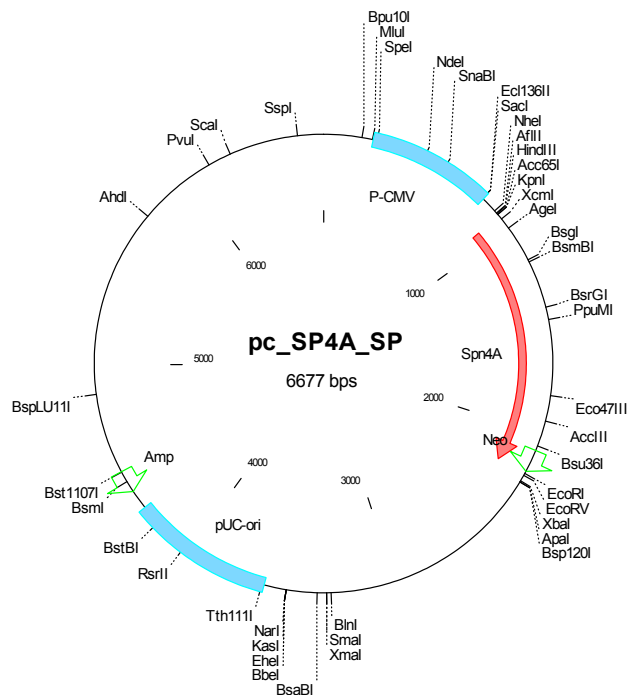
CMV promoter: bases 232-819  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 Multiple cloning site: bases 895-1010  
 pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039  
 BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252  
 f1 origin: bases 1298-1726  
 SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074  
 Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930  
 SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234  
 pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)  
 Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428  
 ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)  
 Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)  
*bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)



entnommen aus

Invitrogen, pcDNA3.1(+) pcDNA3.1(-), User manual, Version I.

Die Sequenz von Spn4A wurde, flankiert von jeweils einer KpnI- und einer EcoRI-Schnittstelle, in den gespaltenen Vektor pcDNA3.1(+) ligiert und der Vektor pc\_Sp4A\_SP genannt (Lummer, 2005). pcSpn4ΔHDEL ist identisch bis auf die Deletion der letzten 12 Basenpaare (vier Codons). Zur Herstellung der PCR-Fragmente wurde jeweils Primer 12 mit 6 oder 7 kombiniert (8.3.4, Tabelle 25).



### 8.2.3 pIZ/V5-His und Derivate

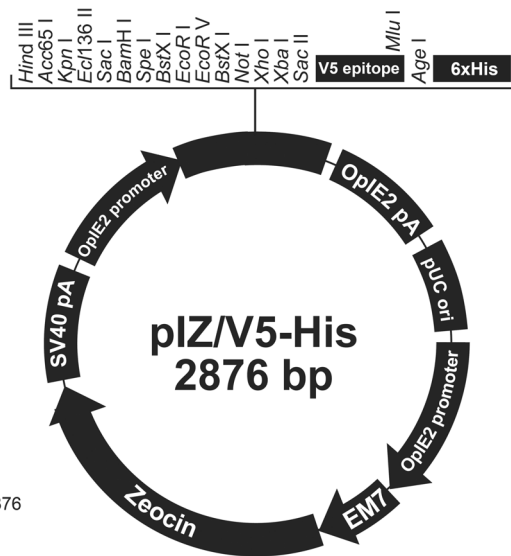
#### Comments for pIZ/V5-His 2876 nucleotides

OpIE2 promoter: bases 4-552  
 Multiple cloning site: bases 561-656  
 V5 epitope: bases 663-704  
 6xHis tag: bases 714-731  
 OpIE2 Reverse priming site: bases 741-766  
 OpIE2 polyadenylation sequence: bases 749-878  
 pUC origin: bases 947-1620  
 OpIE2 promoter: bases 1665-2213  
 EM7 promoter: bases 2231-2308  
 Zeocin™ resistance marker (ORF): bases 2309-2683  
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 2747-2876

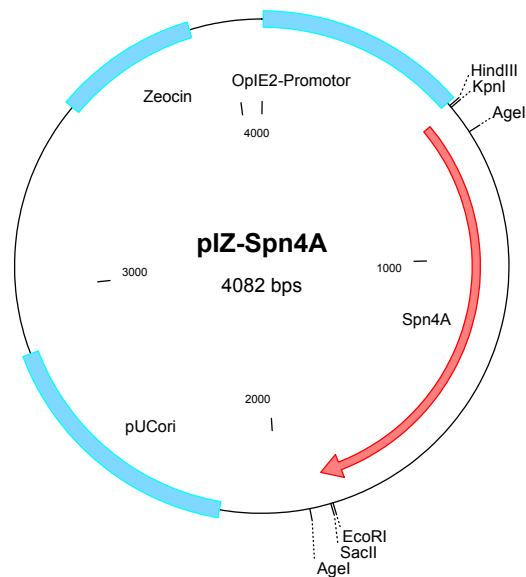
entnommen aus

Invitrogen, InsectSelect System with pIZ/V5-His,

User manual, Version F.



pIZ-Spn4A enthält die Spn4A-cDNA flankiert von Schnittstellen für KpnI und SacII. Durch die Termination der Transkription am endogenen Stoppcodon des Gens werden Sequenzen der V5- und His<sub>6</sub>-Tags nicht abgelesen. Zur Herstellung des PCR-Fragments wurden Primer 11 und 12 eingesetzt (8.3.4, Tabelle 25).



### 8.3 Codierende Sequenzen der Spn4-Isoformen

Alle Isoformen verfügen über das selbe Serpingrundgerüst, das von den Exons 3 und 4 codiert wird und über eine individuelle reaktive Schleife, codiert von jeweils einem alternativen 3' Exon (vgl. Abbildung 3, S. 8, (Krüger *et al.*, 2002)). Die Spleißvarianten A-D beginnen mit Exon 1 und codieren für ein N-terminales Signalpeptid (unterstrichen) mit der potentiellen Signalpeptidasespaltstelle zwischen Thr 28 und Ala 29 (siehe 8.3.1, gezeigt am Beispiel von Spn4A). Codon 1 der Varianten E-H entspricht Codon 33 der anderen Varianten (siehe 8.3.2, gezeigt am Beispiel von Spn4E). Spn4E-D werden ohne Signalpeptid exprimiert.

8.3.3 zeigt einen Teil der von Exon 4 codierten *hinge*-Region und die individuellen RCL-Sequenzen. Die letzte allen Varianten gemeinsame Base von Exon 4 ist grün unterlegt. Start- und Stoppcodons sind jeweils rot markiert. Für die Herstellung der in Kapitel 5.1 beschriebenen Expressionsvektoren relevante Restriktionsschnittstellen sind farbig unterlegt: *NcoI* (blau), *NotI* (gelb), *BsgI* (pink).

#### 8.3.1 Codierende Sequenz von Spn4A

```

1  M D Y R L V P C G C W L L P L L V L A L
1  ATGGATTATCGTTTGGTGCCATGTGGTTGCTGGTTGCTCCCCCTGCTCGTCTAGCCCTC

21  F P F P P V H T A D V T M A D A A H Q E
61  TTCCCGTTTCCACCGGTCCACACGGCTGACGTCACCATGGCTGACGCCGCCACCAGGAG

41  F A R R L A L F S I N V Y G K L S G Q K
121  TTCCCGGCCGGCTGGCCCTTTTCTCTATCAACGTGTACGGCAAGCTGTCCGGGCGAGAAG

61  P G E N I V F S P F S I Q T C A A M A R
181  CCCGGCGAGAACATCGTCTTCTCGCCCTTTTCCATCCAGACTTGTGCGGCGATGGCCAGG

81  L G A E N E T A T Q L D Q G L G L A S S
241  CTGGGTGCAGAAAACGAGACGGCTACCCAGCTGGACCAGGGACTGGGCTTGGCCTCTAGT

101  D P E Q I A H S F H Q V L A A Y Q D S Q
301  GACCCAGAGCAAATCGCACACAGTTTTTACCAGGTGCTGGCCGCTACCAGGACAGTCAG

121  I L R I A N K I F V M D G Y Q L R Q E F
361  ATCTTGCGCATCGCCAACAAGATTTTTCGTTCATGGATGGCTACCAGCTGCGCCAGGAGTTT

141  D Q L L S K Q F L S A A Q S V D F S K N
421  GATCAGCTGTTATCCAAGCAGTTCTCTCGGCGGCTCAGAGCGTGGACTTTTCCAAAAAT

```

161 V Q A A A T I N N W V E Q R T N H L I K  
481 GTACAAGCAGCGGCCACCATCAACAATTGGGTTGAGCAGCGCACCAACCATCTGATCAAG

181 D L V P A D V L N S E S R L V L V N A I  
541 GACCTTGTGCCGGCTGATGTATTGAACTCCGAATCGCGACTCGTCCTTGTGAACGCCATT

201 H F K G T W Q H Q F A K H L T R P D T F  
601 CACTTCAAGGGCACCTGGCAGCACCAGTTCGCCAAACACTTAACCCGCCAGACACCTTT

221 H L D G E R T V Q V P M M S L K E R F R  
661 CACCTGGATGGGGAGCGAACAGTTCAGGTTCCGATGATGAGTTTAAAGGAGCGGTTCCGC

241 Y A D L P A L D A M A L E L P Y K D S D  
721 TACGCCGATCTGCCGGCGCTAGATGCCATGGCTCTGGAAGTGCCTACAAGGACTCAGAC

261 L S M L I V L P N T K T G L P A L E E K  
781 CTCTCTATGCTGATCGTACTGCCAACACCAAGACGGGTCTGCCCGCTCTGGAGGAGAAG

281 L R L T T L S Q I T Q S L Y E T K V A L  
841 TTGCGCCTCACGACCCTCTCGCAGATCACGCAGTCGTTGTACGAAACAAAGGTAGCGCTC

301 K L P R F K A E F Q V E L S E V F Q K L  
901 AAATTGCCAGGTTCAAGGCAGAGTTCCAAGTGAATTGTCTGAGGTTTTCCAGAAGCTG

321 G M S R M F S D Q A E F G K M L Q S P E  
961 GGCATGTCAAGGATGTTCTCCGATCAGGCTGAATTTGGAAAAATGCTACAAAGTCCGGAG

341 P L K V S A I I H K A F I E V N E E G T  
1021 CCATTGAAAGTGTGAGCCATCATAACAAGGCCTTCATTGAAGTCAACGAGGAGGGAACG

361 E A A A A T G M A V R R K R A I M S P E  
1081 GAGGCTGCGGCCGCACCGGCATGGCGGTGCGTAGGAAGCGCGCTATTATGTCGCCTGAG

381 E P I E F F A D H P F T Y V L V H Q K D  
1141 GAACCAATTGAGTTCTTTGCCGACCATCCTTTCACCTATGTCTTGTGCATCAGAAGGAT

401 L P L F W G S V V R L E E N T F A S S E  
1201 CTGCCATTGTTTTGGGGCTCAGTTGTGCGGCTCGAGGAAAATACCTTCGCCTCCAGCGAG

421 H D E L -  
1261 CATGATGAGCTGTGA

### 8.3.2 Codierende Sequenz von Spn4E

1 M A D A A H Q E F A R R L A L F S I N V  
1 ATGGCTGACGCCGCCACCAGGAGTTGCCCGCCGGCTGGCCCTTTTCTCTATCAACGTG

21 Y G K L S G Q K P G E N I V F S P F S I  
61 TACGGCAAGCTGTCGGGGCAGAAGCCCGGCGAGAACATCGTCTTCTCGCCCTTTTCCATC

41 Q T C A A M A R L G A E N E T A T Q L D  
121 CAGACTTGTGCGGCATGGCCAGGCTGGGTGCAGAAAACGAGACGGCTACCCAGCTGGAC

61 Q G L G L A S S D P E Q I A H S F H Q V  
181 CAGGGACTGGGCTTGGCCTCTAGTGACCCAGAGCAAATCGCACACAGTTTTCCACCAGGTG

81 L A A Y Q D S Q I L R I A N K I F V M D  
241 CTGGCCGCCTACCAGGACAGTCAGATCTTGCGCATCGCCAACAAGATTTTCGTCATGGAT

101 G Y Q L R Q E F D Q L L S K Q F L S A A  
301 GGCTACCAGCTGCGCCAGGAGTTTGATCAGCTGTTATCCAAGCAGTTCTCTCGGCGGCT

121 Q S V D F S K N V Q A A A T I N N W V E  
361 CAGAGCGTGGACTTTTCCAAAAATGTACAAGCAGCGGCCACCATCAACAATGGGTTGAG

141 Q R T N H L I K D L V P A D V L N S E S  
421 CAGCGCACCAACCATCTGATCAAGGACCTTGTGCCGGCTGATGTATTGAACTCCGAATCG

161 R L V L V N A I H F K G T W Q H Q F A K  
481 CGACTCGTCCTTGTGAACGCCATTCAC TTC AAGGGCACCTGGCAGCACCAGTTCGCCAAA

181 H L T R P D T F H L D G E R T V Q V P M  
541 CACTTAACCCGCCAGACACCTTTCACCTGGATGGGGAGCGAACAGTTCAGGTTCCGATG

201 M S L K E R F R Y A D L P A L D A M A L  
601 ATGAGTTTAAAGGAGCGGTTCCGCTACGCCGATCTGCCGGCGCTAGATG **CCATGG** CTCTG

221 E L P Y K D S D L S M L I V L P N T K T  
661 GAACTGCCCTACAAGGACTCAGACCTCTCTATGCTGATCGTACTGCCCAACACCAAGACG

241 G L P A L E E K L R L T T L S Q I T Q S  
721 GGTCTGCCCGCTCTGGAGGAGAAGTTGCGCCTCACGACCCTCTCGCAGATCACGCAGTCG

261 L Y E T K V A L K L P R F K A E F Q V E  
781 TTGTACGAAACAAAGGTAGCGCTCAAATGCCAGGTTCAAGGCAGAGTTCCAAGTGAA

---

281 L S E V F Q K L G M S R M F S D Q A E F  
841 TTGTCTGAGGTTTTCCAGAAGCTGGGCATGTCAAGGATGTTCTCCGATCAGGCTGAATTT

301 G K M L Q S P E P L K V S A I I H K A F  
901 GGAAAAATGCTACAAAGTCCGGAGCCATTGAAAGTGTGAGCCATCATAACAAGGCCTTC

321 I E V N E E G T E A A A A T G M A V R R  
961 ATTGAAGTCAACGAGGAGGGAACGGAGGCTCCGGCCCGCCACGGGCATGGCGGTGCGTAGG

341 K R A I M S P E E P I E F F A D H P F T  
1021 AAGCGCGCTATTATGTGCGCTGAGGAACCAATTGAGTTCCTTTGCCGACCATCCTTTCACC

361 Y V L V H Q K D L P L F W G S V V R L E  
1081 TATGTCCTTGTGCATCAGAAGGATCTGCCATTGTTTTGGGGCTCAGTTGTGCGGCTCGAG

381 E N T F A S S E H D E L -  
1141 GAAAATACCTTCGCCTCCAGCGAGCATGATGAGCTGTGA

### 8.3.3 Individuelle RCL-Sequenzen der Spn4-Varianten B/F, C/G, D/H

#### Spn4B (Spn4F)

361 (329) E A A A A T G M V M C Y A S M L T F E P  
 1081 (985) GAGGCTGCGGCCGCACGGGAATGGTCATGTGCTACGCCTCCATGCTCACGTTGGAACCG  
 381 (409) Q P V Q F H V Q H P F N Y Y I I N K D S  
 1141 (1045) CAGCCCGTCCAATTCCATGTCCAGCATCCATTTAACTATTACATTATCAATAAGGATTCT  
 401 (429) T I L F A G R I N K F -  
 1201 (1105) ACTATTTGTTTGGCGGAAGAATCAATAAGTTTGA

#### Spn4C (Spn4G)

361 (329) E A A A A T G M F M S L T S L P M P K P  
 1081 (985) GAGGCTGCGGCCGCACGGGTATGTTTATGAGCCTTACTTCGCTGCCCATGCCGAAGCCG  
 381 (409) D P I R F N V D H P F T F Y I L N K D S  
 1141 (1045) GATCCGATACGTTTCAATGTGACCATCCATTTACATTTTACATCCTTAACAAGGACTCA  
 401 (429) T A L F A G S I K K L -  
 1201 (1105) ACCGCTCTTTCGCTGGCAGCATAAAGAAACTTAA

#### Spn4D (Spn4H)

361 (329) E A A A A T V W R V M A V A A F S R K H  
 1081 (985) GAGGCTGCGGCCGCACGGTATGGCGGGTATGGCCGTAGCTGCCTTCAGTCGCAAACAC  
 381 (409) F I A N H P F A F Y V K T H Y D L P I F  
 1141 (1045) TTCATTGCCAACCATCCTTTTGCTTCTACGTGAAGACCCATTACGATCTGCCGATATTC  
 401 (429) T G R Y L G -  
 1201 (1105) ACTGGGCGCTACTTGGGTAA

### 8.3.4 Primer

**Tabelle 24** verwendete Mutageneseprimer

	Primer	Sequenz (5'→3')
1	MutSp4V1-RRKA+	CGGTGCGTAGGAAG <u>GCCG</u> CTATTATGTCGCCTGAGG
2	MutSp4V1-RRKA-	CCTCAGGCGACATAATAGCG <u>GCC</u> TTCTTCTACGCACCG
3	MutaSp4V1cg+	GCCGCGCTAGATGCGATGGCTCTGGA <u>ACTG</u> CCC
4	MutaSp4V1cg-	GGGCAGTTCAGAGCCAT <u>CG</u> CATCTAGCGCCGGC

Das Primerpaar 1/2 diene zur Herstellung einer Spn4A *loss of function*-Mutante. Das für Arginin an P1 codierende Triplet (CGC) wurde gegen (GCC) ausgetauscht, das für Alanin codiert. Das Primerpaar 3/4 wurde zur Entfernung einer internen *NcoI*-Schnittstelle verwendet (Abschnitt 5.1.1). Ausgetauschte Basen sind jeweils fett und unterstrichen dargestellt.

**Tabelle 25** Zur Amplifikation der vollständigen cDNA-Varianten eingesetzte Primer

	Primer	Sequenz (5'→3')
5	BamHI-DMSp4-5'	GGTTCGCGTGGATCCATGGCTGACGCCGCCACCA
6	EcoRI sp4 V1-	CCCGGGAATTCTCACAGCTCATCATGCTCGCTGGAG
7	EcoRI Sp4 VIoER	CCCGGGAATTCTACTCGCTGGAGGCGAAGGTATTT
8	EcoRI-DMSp4(2)-3'	GTCGACCCGGGAATTCTCAAACTTATTGATTCTTCCC
9	SP4 III 3er EcoRI -	GTCGACCCGGGAATTCTTAGAGTTTCTTTATGCTGCCAG
10	EcoRI sp4 V4-	CCCGGGAATTCTTAACCCAAGTAGCGCCAGTGAAT
11	SacII EcoRI Sp4(-)	ACCTATCCGCGGGAATTCTCACAGCTCATCATGC
12	KpnI sp4 SP	CGTTTAGGTACCAGTATGGATTATCGTTTGGTGCCATGTGG

Primer 6-11 wurden jeweils in Kombination mit Primer 5 eingesetzt, so dass die codierenden Bereiche der Spn4-Varianten E-D mit flankierenden *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen (unterstrichen) amplifiziert wurden. Die *Bam*HI-Schnittstelle von Primer 5 überlappt mit einer *Nco*I-Schnittstelle (CCATGG), die für die Herstellung der pKM-Varianten benötigt wurde. Primer 12 in Kombination mit 6,7 oder 11 diene der Herstellung von Spn4A-Fragmenten mit Signalpeptid (SP). Die *Sac*II-Schnittstelle in Primer 11 ist kursiv dargestellt. Die Startcodons in 5 und 12 und die Stoppcodons (5'→3') in 6-11 sind jeweils fett gedruckt.



## 8.4 Abkürzungen

2, 10, 100x	2, 10, 100-fach konzentriert
$\alpha_1$ -AT	$\alpha_1$ -Antitrypsin
$\alpha_1$ -PDX	$\alpha_1$ -Antitrypsin Portland
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
ApoLpII/I	Apolipoprotein II/I
AS	Aminosäure(n)
BSA	bovines Serumalbumin
C1-I	C1-Inhibitor
CatB	Cathepsin B
CatL	Cathepsin L
CatS	Cathepsin S
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	<i>complementary desoxy ribonucleic acid</i>
cmk	Chormethylketon
CRR	<i>cystein rich region</i>
Cy3	Carbocyanin 3
dec	decanoyl
DFurin1/2	<i>Drosophila</i> Furin1/2
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes und filtriertes Wasser
dKLIP-1	<i>drosophila kexin-like protein-1</i>
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERD2	<i>ER-retention defective 2</i>
ERGIC	<i>ER-golgi-intermediate compartment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HDLp	<i>high density lipophorin</i>
His <sub>6</sub> -Tag	Hexa-Histidinsequenz
HIV	human immunodeficiency virus
HMW-Marker	<i>high molecular weight</i> -Marker
HNE	humane neutrophile Elastase
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
kDa	Kilodalton
LB	Lennox L Broth Base
LMW-Marker	<i>low molecular weight</i> -Marker
<i>m/z</i>	Molekülmasse/Ladung
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> Massenspektrometrie
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOSuc	3-Methoxysuccinyl
min	Minuten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT1-MMP	Membran-Typ I-Matrixmetalloproteinase
Ni-TED	Ni <sup>2+</sup> -tris-Carboxymethylethylendiamin
OD <sub>x</sub>	Absorption bei x nM
oSP	ohne Signalpeptid
<i>p</i>	para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEI	Polyethylenimin
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase von <i>pyrococcus furiosus</i>
<i>p</i> -NPGB	<i>p</i> -Nitrophenyl- <i>p</i> -guanidinobenzoat
pot.	potenziell
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
pyr	L-Pyroglutamyl
R110	Rhodamin 110
RCL	<i>reactive centre loop</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Stöchiometrie der Hemmung
SP	Signalpeptid
SPC	subtilisinähnliche Proproteinkonvertase
SV40	<i>simian virus 40</i>
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase von <i>thermus aquaticus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TM	transmembran
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume / volume</i>
w/v	<i>weight / volume</i>
z-	Benzyloxycarbonyl