

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin am Klinikum rechts der Isar
Frauenklinik und Poliklinik
(Direktorin und ärztliche Leitung: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Rekombinante Expression, Rückfaltung
und biochemische Charakterisierung
verschiedener Formen der Kallikrein-ähnlichen Protease 15 (KLK15)**

Michaela Amélie Schwarz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Univ.-Prof. Dr. Manfred Schmitt

Die Dissertation wurde am 23.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

Meiner Familie, Wolfgang, Helena und Christopher gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft.....	5
1.1 Rolle der Kallikrein-ähnlichen Proteasen in der Karzinogenese und als potentielle Tumormarker	5
1.2 Regulation der Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	8
1.2.1 Zymogenaktivierung.....	8
1.2.2 Regulation durch Steroidhormone.....	9
1.3 Nomenklatur.....	10
1.4 Genlokus und Genstruktur.....	10
1.5 Spleißvarianten	12
1.6 Die humane Kallikrein-ähnliche Protease 15 und ihre Spleißvariante 15ntfl	13
1.7 Klinische Bedeutung der Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	19
1.7.2 Gynäkologie.....	20
1.7.3 Urologie.....	22
1.7.4 Dermatologie.....	24
1.7.5 Innere Medizin.....	25
1.7.6 Neurologie.....	26
1.7.7 Zahnmedizin.....	27
2. Zielsetzung der Arbeit.....	28
3. Material und Methoden.....	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Oligonukleotide.....	29
3.1.2 Vektoren.....	29
3.1.3 Bakterienstämme.....	32
3.1.4 Medien.....	32
3.1.5 Chemikalien und Enzyme.....	32
3.1.6 Geräte.....	33
3.1.6.1 PCR-Geräte.....	33
3.1.6.2 Zentrifugen.....	33
3.1.6.3 Sonstige Geräte.....	33
3.2 Methoden.....	35
3.2.1 DNA-Analysen.....	35
3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese.....	37
3.2.1.3 Reinigung der amplifizierten DNA.....	38
3.2.1.4 Restriktion der DNA.....	40
3.2.2 Ligation.....	41
3.2.3 Transformation.....	42
3.2.3.1 Extraktion und Aufreinigung von DNA.....	43
3.2.3.2 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
3.2.3.3 Sequenzierung von DNA.....	45
3.2.4 Produktion von rekombinanter KLK15 und KLK15ntfl sowie pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl.....	45
3.2.4.1 Expressionsanalyse.....	45
3.2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.2.4.3 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	49
3.2.4.4 Silberfärbung.....	49
3.2.4.5 Trocknung von Polyacrylamid-Gelen.....	50
3.2.4.6 Expression von pro-KLK15/ntfl und KLK15/ntfl.....	50
3.2.5. Reinigung der rekombinanten Proteine	51
3.2.5.1. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakten.....	51
3.2.5.2 Denaturierende Proteinreinigung über Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Säulen.....	52
3.2.6 Rückfaltung der rekombinanten reifen Proteine und Vorläuferproteine.....	55
3.2.7 Aufkonzentrieren der rückgefalteten Proteine.....	59
3.2.8 Aktivierung der rekombinanten Proteine	59
3.2.8.1 Enterokinase.....	59

3.2.8.2 Trypsin.....	60
3.2.9 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten reifen Proteine und Vorläuferproteine.....	61
3.2.9.1 Westernblot-Analyse.....	61
3.2.9.2 Substrattests.....	62
3.2.9.3 Inkubation von pro-KLK15 mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	66
4. Ergebnisse	67
4.1 Herstellung eines Expressionsplasmids für mature <i>KLK15</i> und <i>KLK15ntfl</i> in <i>E. coli</i>	67
4.1.1 Klonierungsstrategie für das mature Enzym <i>KLK15</i> und <i>KLK15ntfl</i>	67
4.1.2 Ligation der DNA-Fragmente mit dem pQE30-Plasmid.....	69
4.1.3 Restriktionsanalyse von isolierten Klonen von maturem <i>KLK15</i> und <i>KLK15ntfl</i>	69
4.1.4 Sequenzierungsergebnisse.....	72
4.2 Herstellung eines Expressionsplasmids für <i>pro-KLK15</i> und <i>pro-KLK15ntfl</i>	73
4.2.1 Klonierungsstrategie für die pro-Formen von <i>KLK15</i> und <i>KLK15ntfl</i>	73
4.2.2 Ligation der DNA-Fragmente mit dem pQE100-Plasmid.....	74
4.2.3 Restriktionsanalyse von isolierten Klonen von <i>pro-KLK15</i> und <i>pro-KLK15ntfl</i>	75
4.2.4 Sequenzierungsergebnisse.....	77
4.3 Transformation der neu gebildeten Plasmide in <i>E. coli</i> M15[pREP4].....	77
4.4 Expression und Reinigung von <i>KLK15</i> , <i>KLK15ntfl</i> , <i>pro-KLK15</i> und <i>pro-KLK15ntfl</i>	78
4.5 Rückfaltung der (pro-)KLKs.....	80
4.6 Aktivierungsversuche mit Enterokinase und Trypsin.....	84
4.6.1 Enterokinaseaktivierung von <i>KLK15/KLK15ntfl</i> mit Enterokinasespaltstelle.....	84
4.6.2 Trypsinaktivierung von <i>pro-KLK15</i> und <i>pro-KLK15ntfl</i>	85
4.7 Substrattests mit chromogenen und fluorogenen Substraten.....	85
4.7.1 Substrattests mit chromogenen Substraten.....	85
4.7.2 Substrattests mit fluorogenen Substraten.....	87
4.8 Inkubation von <i>pro-KLK15</i> mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	89
4.8.1 Inkubation von <i>pro-KLK15</i> mit <i>KLK6</i>	91
4.8.2 Inkubation von <i>pro-KLK15</i> mit <i>KLK4</i>	91
4.8.3 Auswirkungen von 7 KLKs auf <i>pro-KLK15</i>	92
5. Diskussion und Schlussfolgerung.....	94
5.1 Klonierung der muren Formen und der pro-Formen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	94
5.2 Transformation der Epressions-Plasmide in <i>E. coli</i> , Expression und Reinigung von <i>KLK15</i> , <i>KLK15ntfl</i> , <i>pro-KLK15</i> und <i>pro-KLK15ntfl</i>	96
5.3 Die Rückfaltungen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen <i>KLK15</i> , <i>KLK15ntfl</i> und deren pro-Form.....	96
5.4 Substrattests mit chromogenen und fluogenen Substraten	97
5.5 Inkubation von <i>pro-KLK15</i> mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen.....	98
5.6 Die Spleißvariante <i>KLK15ntfl</i>	101
5.7 <i>KLK15</i> (ACO; HSRNASPH; Prostinogen) in der Literatur.....	102
6. Zusammenfassung	106
7. Literaturverzeichnis	107
8. Abkürzungsverzeichnis.....	122
Erklärung.....	126
Danksagung.....	132

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

1.1 Rolle der Kallikrein-ähnlichen Proteasen in der Karzinogenese und als potentielle Tumormarker

Die Krebsentstehung ist ein komplexer Prozess, der durch Mutationen auf DNA-, mRNA-, und Proteinebene geschieht. Aufgabe der Krebsforschung ist es, diese Mutationen zu identifizieren und deren Effekte auf den Phänotyp des Tumors herauszufinden. Dies schafft die Grundlage für die Entwicklung neuer Ansätze einer effizienten Krebs-Früherkennung sowie spezieller Therapieverfahren. Auch für das Verständnis des unterschiedlichen Wachstums- und Metastasierungsverhaltens und damit der Malignität verschiedener solider Tumoren sind diese Erkenntnisse von Bedeutung.

Bei der Ausbreitung und Metastasierung solider Tumore spielt der Abbau des umgebenden Gewebes wie auch der Basalmembran zur Überschreitung der Gewebegrenzen eine wichtige Rolle. Extrazelluläre proteolytische Vorgänge bewirken die Auflösung der das Tumorgewebe umgebenden extrazellulären Matrix, genannt „Tumorstroma“. Das Tumorstroma setzt sich aus einem Netzwerk von Proteinen (Fibrin, Elastin, Kollagen, Fibronectin, etc.), Glycosaminoglykanen (z.B. Hyaluronsäure), Proteoglykanen (z.B. Heparin) und Stromazellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Histiozyten und Zellen des Immunsystems) zusammen (Dvorak *et al.*, 1986). Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus dem Protein Kollagen Typ IV und dem Glykoprotein Laminin.

Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten können, werden Proteasen genannt. Sie degradieren nicht nur andere Proteine, sondern regulieren auch direkt oder indirekt, die Aktivität einiger bioaktiver Moleküle und sind daher an einer beeindruckenden Anzahl (patho-)physiologischer Prozesse beteiligt (Lopez-Otin *et al.*, 2008). Proteasen werden nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums in verschiedene Gruppen eingeteilt. So befindet sich z.B. bei Serinproteasen dort die katalytische Triade mit der Aminosäure Serin und zwei weiteren Aminosäuren (Histidin und Aspartat). Am Abbau des Tumorstromas und der Basalmembran scheinen vor allem folgende Proteasenfamilien beteiligt zu sein:

- Metalloproteasen: z.B. Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysine
- Cysteinproteasen: z.B. Kathepsin B, H und L
- Serinproteasen: z.B. Plasmin, Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA)

Die Kallikrein-ähnlichen Proteasen (KLKs) bilden eine Untergruppe in der Serinproteasefamilie, zu der auch die Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin zählen. Kallikreine und Kallikrein-ähnliche Proteasen werden in großem Umfang von verschiedenen Geweben exprimiert und sie kontrollieren eine Vielzahl von Entwicklungs- und Selbstregulationsmechanismen. So bewirken sie z.B. die Verflüssigung der Samenflüssigkeit (KLK3), die Hautabschuppung, Blutdruckregulierung und sie sind an der neuronalen Entwicklung und der Zahnschmelzbildung beteiligt (Swedberg *et al.*, 2010, Lundwall *et al.*, 2008). Sie sind außerdem in die Komplementaktivierung, Aktivierung von pro-Hormonen und bei der Gewebeneubildung involviert (Yousef und Diamandis *et al.*, 2002, 2003).

Im Hinblick auf ihre Mitwirkung an der Pathogenese von Krebs scheinen KLKs eine doppelte Rolle zu spielen: sie können die Karzinogenese sowohl begünstigen, als auch inhibieren. So weisen immer mehr Studien darauf hin, dass die KLKs in die Krebsentstehung verwickelt sind. Viele KLKs sind direkt und/oder indirekt im Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM-Proteine) involviert, was die Tumorerkrankung und Metastasierung erleichtert. KLK2, 3, 5, 6, 13, und 14 katalysieren direkt die Hydrolyse einiger ECM-Proteine (Webber *et al.*, 1995, Bernett *et al.*, 2002, Magklara *et al.*, 2003). KLK2 und KLK4 aktivieren die pro-Form der Plasminogen-aktivierenden Serin-Protease uPA und sind damit indirekt am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Lilja *et al.*, 1985, Webber *et al.*, 1995, Deperthes *et al.*, 1996, Frenette *et al.*, 1997, Takayama *et al.*, 2001, Blaber *et al.*, 2002, Magklara *et al.*, 2003). Über uPA werden zudem Mitglieder der Matrix-Metalloproteasenfamilie aktiviert (Choong *et al.*, 2003). Matrix-Metalloprotease MMP-2 und MMP-9 werden beispielsweise beim Ovarialkarzinom abweichend exprimiert und scheinen an der Progression einer benignen zur fortgeschrittenen Tumorerkrankung beteiligt zu sein (Schmalfeldt *et al.*, 2001). Die KLKs könnten auch direkt an der Aktivierung von pro-Matrix-Metalloproteasen beteiligt sein, denn diese benötigen die proteolytische Aktivität von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen für die Spaltung ihrer pro-Peptide (Sternlicht *et al.*, 2001, Egeblad *et al.*, 2002).

Einige KLKs hemmen jedoch möglicherweise die Tumorausbreitung. Bei KLK10 wird angenommen, dass es sich um ein Tumorsuppressorgen handelt. Dies basiert einerseits auf seiner reduzierten Expression in zahlreichen Krebsarten (Liu *et al.*, 1996, Dhar *et al.*, 2001, Roman-Gomez *et al.*, 2004, Goyal *et al.*, 1998) und andererseits auf einer inhibierenden Wirkung auf die Tumorbildung *in vivo*. So konnten Holzschleiter *et al.* (2006) nachweisen, dass eine höhere Expression von KLK7-mRNA in Geweben von Brustkrebspatientinnen mit einer insgesamt besseren Prognose verbunden waren. KLK3, KLK6 und KLK13 sind über die Freisetzung von

Angiostatin-ähnlichen Fragmenten von Plasminogen an der Hemmung der Angiogenese beteiligt (Sotiropoulou *et al.*, 2003, Heidtmann *et al.*, 1999, Fortier *et al.*, 1999).

Bestimmte KLKs werden mittlerweile als prognostische Marker für Krebspatienten im klinischen Alltag eingesetzt, wie z.B. das Prostata-spezifische Antigen bei Prostatakrebspatienten. Solche Biomarker stellen wichtige Hilfsmittel dar, die nicht nur bei der Diagnosestellung, der klinischen Einordnung (*Staging*), der Einschätzung des Tumorumfanges und der Bewertung der Prognose helfen, sondern auch im weiteren Verlauf bei der Überwachung der Behandlung, der Evaluation des Behandlungserfolges und der Früherkennung eines Rezidives. Zudem ermöglichen sie zum Teil eine Evaluation des Krebsrisikos und ein effizientes *Screening*, sowie eine Vorhersage über das wahrscheinliche Ansprechen des Tumors auf die Therapie (Duffy *et al.*, 2001). Die größte Bedeutung unter allen Biomarkern hat bis heute KLK3/PSA im klinischen Einsatz für das *Screening*, die Diagnose, das *Staging*, und die Überwachung von Prostatakrebs. Da der PSA-Wert aber auch bei der benignen Prostatahyperplasie und bei Prostataentzündungen erhöht sein kann, ist er jedoch nicht sehr spezifisch. In diesen Fällen könnte die Erhöhung der KLK3-Proteine im Serum durch Angiogenese oder die Zerstörung der Architektur in der Drüsenstruktur verantwortlich sein, wodurch der Austritt von KLKs in den Kreislauf erleichtert wird. Auch den meisten anderen Biomarkern fehlt oft die erhoffte Sensitivität und Spezifität und folglich dauert die Suche nach aufschlussreicheren Markern an. Es gibt dazu Untersuchungen, die auf einen Einfluss der Expression von KLK4 und KLK7 auf das Gesamtüberleben von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen hinweisen. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass beide Kallikrein-ähnliche Proteasen besonders hoch bei mäßig und schlecht differenzierten Tumoren exprimiert waren und Patienten mit besonders intensiven Färbungen hatten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p < 0.05$). Somit scheint die Immunhistochemie von KLK4 und KLK7 sowohl diagnostisches als auch prognostisches Potential bei oralen Plattenepithelkarzinomen zu haben (Zhao *et al.*, 2010).

Die Kallikreinfamilie scheint also zahlreiche Tumor-Biomarker zu beinhalten (Diamandis *et al.*, 2001, Diamandis *et al.*, 2002, Yousef *et al.*, 2002). Zusätzlich zu KLK3 weisen viele andere Kallikreine veränderte mRNA- oder Proteinexpressions-Niveaus innerhalb der Gewebe oder dem Serum von Krebspatienten auf, und repräsentieren potentielle Biomarker für Früherkennung, Prognose oder Überwachung gewisser Hormon-abhängiger Krankheiten wie Ovarial-, Mamma- oder Prostatakarzinom.

1.2 Regulation der Kallikrein-ähnlichen Proteasen

1.2.1 Zymogenaktivierung

Eines der Hauptcharakteristika von Proteasen ist deren Fähigkeit, Reaktionen irreversibel zu katalysieren. Als Folge haben sich zahlreiche Mechanismen entwickelt, die Aktivität von Serinproteinasen räumlich und zeitlich zu regulieren, um unerwünschte Proteindegradation zu verhindern, einschließlich Zymogenaktivierung, interne Spaltung und endogene Inhibitoren.

Viele bekannte Proteasen werden zunächst als Zymogene oder inaktive Vorläufer synthetisiert, die ein inhibierendes pro-Peptid besitzen, welches das aktive Zentrum blockiert, und dadurch die Substratbindung verhindert. So konnten bereits 1976 Bode und Huber nachweisen, dass die Zymogenumwandlung zum aktiven Enzym durch diverse Mechanismen beeinflusst werden kann. Dazu zählen enzymatische sowie nicht-enzymatische Kofaktoren, die die Aktivierung auslösen. Ein Beispiel ist die Wechselwirkung von Streptokinase und Plasminogen, was als „*molecular sexuality*“ bezeichnet wird (Bode und Huber, 1976). Weiterhin kann bereits ein einfacher pH-Wechsel zur Autoaktivierung von manchen Zymogenen führen.

In der Aminosäuresequenz wird die Aminosäure, hinter der ein Substrat vom N-*Terminus* aus gesehen gespalten wird, als P1 bezeichnet. Nach Schechter und Berger (1967) werden die Reste des Substrats auf der Amino-Seite einer Spaltstelle mit P1, P2, P3 etc. und auf der Carboxyseite mit P1', P2', P3' etc. bezeichnet, wobei die Zählung jeweils an der Spaltstelle beginnt. Dementsprechend werden die Taschen im spaltenden Enzym, welche die Seitenkette einzelner Aminosäure-Reste aufnehmen, verwendet, um die Spezifität einer Protease zu beschreiben. Diese werden mit S1, S2 ... Sn von der katalytischen Triade zum N-*Terminus* und S'1, S'2... S'n zum C-*Terminus* nummeriert (Light *et al.*, 1989). Die Spezifität der Spaltstelle einer Serinprotease wird durch den Aminosäurerest eingeschränkt, der am Boden der sogenannten "S1-site" liegt. Diese S1-Tasche befindet sich sechs Aminosäuren vor dem Serinrest der katalytischen Triade. Anhand der dort gelegenen Aminosäure werden diese in Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche Serinproteasen eingeteilt. Trypsin-ähnliche Serinproteasen enthalten das negativ geladene Aspartat an dieser Position, was ihnen ermöglicht, spezifisch nach dem positiv geladenen Arginin oder Lysin zu spalten. Chymotrypsin-ähnliche Proteasen mit einem hydrophoben Aminosäurerest an dieser Stelle hydrolysieren Peptidbindungen C-terminal von hydrophoben Aminosäuren wie Tryptophan (Stryer *et al.*, 2003). Die pro-Peptid-Spaltstellen aller KLKs enthalten einen P1 Arg oder Lys-Rest (mit Ausnahme von KLK4 und KLK13). Dies weist darauf hin, dass diese die Aktivität einer Trypsin-ähnlichen Serinprotease für ihre Aktivierung benötigen. So wurde gezeigt, dass Trypsin pro-KLK5,

pro-KLK6, pro-KLK7, und pro-KLK15 in deren aktive Form konvertieren kann, während Enterokinase pro-KLK11 aktivieren kann (Hansson *et al.*, 1994, Brattsand *et al.*, 1999, Mitsui *et al.*, 2000, Gomis-Ruth *et al.*, 2002). Da aber auch die meisten KLKs eine Trypsin-ähnliche Spezifität besitzen, spielen Autoaktivierung und ebenso Aktivierung anderer pro-KLKs durch KLKs eine Rolle. So sind z.B. KLK2 (Lovgren *et al.*, 1999, Denmeade *et al.*, 2001), KLK6 (Little *et al.*, 1997, Magklara *et al.*, 2003) und KLK13 (Sotiropoulou *et al.*, 2003) in der Lage, sich selbst zu aktivieren und könnten damit an der Initiation und der Aufrechterhaltung einer Kaskade oder eines Netzwerks beteiligt sein, vergleichbar mit der Funktion des Faktor XI in der intrinsischen Gerinnungskaskade (Naito *et al.*, 1991). Ebenso haben experimentelle Hinweise gezeigt, das rekombinante KLK2, KLK4 und KLK15 effizient pro-KLK3 *in vitro* aktivieren können (Lovgren *et al.*, 1997, Kumar *et al.*, 1997, Takayama *et al.*, 1997, Takayama *et al.*, 2001).

1.2.2 Regulation durch Steroidhormone

Im Hinblick auf die Regulation der Expression von KLKs vermuteten Yousef *et al.*, (2003) die Existenz einer Steroidhormon-gesteuerten Kaskade. Steroidhormone sind an der normalen Entwicklung und Funktion vieler Organe genauso maßgeblich beteiligt, wie an der Entstehung endokrin-bedingter Krebserkrankungen. Strukturell leiten sie sich vom Cholesterin ab, und sind somit gut fettlöslich aber schwer wasserlöslich. Aus Cholesterin entstehen die Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Geschlechtshormone, was in der Nebennierenrinde und in den männlichen und weiblichen Gonaden, den Hoden und den Ovarien, geschieht. Im Ovar wird zunächst Testosteron produziert, das dann mit Hilfe einer Aromatase zu Östradiol umgebaut wird. Steroidhormone können direkt in die Zelle gelangen und brauchen dafür keinen *Second Messenger*. Dort binden sie an ihre entsprechenden Rezeptoren und können so die Genexpression aller menschlichen KLK-Gene in endokrinegebundenen Zelllinien regulieren. Dies bekräftigten zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*- Studien, die beispielsweise das parallele unterschiedliche KLK-Expressionsmuster bei Malignität aufzeigten. Das Muster der Hormonregulation gewisser Gene kann dabei interessanterweise unterschiedlich sein, so wird beispielsweise *KLK4* durch Androgene in Prostata- und Brustkrebs- Zelllinien hochreguliert (Nelson *et al.*, 1999, Yousef *et al.*, 1999), sowie durch Östrogen in Endometriumkarzinom-Zelllinien (Myers *et al.*, 2001). *KLK2*- und *KLK3*-Transkription wird durch Androgene und Progesteron bei Prostata- und Brustkrebs- Zelllinien hochreguliert (Riegmann *et al.*, 1991, Young *et al.*, 1995, Cleutjens *et al.*, 1997). *KLK12* wird durch Östrogen und Gestagen in Brustkrebs- Zelllinien ebenfalls hochreguliert (Yousef *et al.*, 2000). *KLK1*, *KLK6*, und *KLK10* reagieren dagegen mehr auf Östrogene (Yousef *et al.*, 1991, Lou *et al.*,

2000, Clements *et al.*, 1994). Beim Ovarialkarzinom konnte für fast alle Kallikrein-ähnlichen Proteasen eine zum Normalgewebe oder Serum veränderte Expression festgestellt werden, *KLK1*, *KLK5-KLK8*, *KLK10*, und *KLK14* werden dort sogar konkurrierend hochreguliert (Yousef *et al.*, 2003). Dabei scheint eine Überexpression von *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK10* und *KLK15* mit einer eher ungünstigeren Patientenprognose zu korrelieren, während *KLK8*, *KLK9*, *KLK11*, *KLK13* und *KLK14* für einen eher günstigeren Krankheitsverlauf stehen (Yousef und Diamandis *et al.*, 2003). In LNCaP-Prostatakarzinomzelllinien wird das Gen für humane *KLK15* durch Steroidhormone hochreguliert (Yousef *et al.*, 2001) und ist assoziiert mit aggressiveren Formen des Prostatakarzinoms.

1.3 Nomenklatur

Die anerkannte Nomenklatur für die Kallikrein-ähnlichen Proteasen unterschied bis vor kurzem noch deutlich zwischen Gen (*KLK1*, *KLK2*, etc.) und Enzym (*K1*, *K2*, etc.). Um den Ursprung zu kennzeichnen wurde eine Vorsilbe benutzt, z.B. h (*human*) für die menschliche Spezies und m (*mouse*) für die Spezies der Nagetiere.

Die neue Nomenklatur bezeichnet Proteine ohne erwiesene Kininogenase-Aktivität als Kallikrein-ähnliche Proteasen. Außer *KLK1*, das Kininogenase-Aktivität besitzt und deshalb immer noch Gewebekallikrein (oder Kallikrein 1) genannt wird, lauten die neuen Namen von *KLK2* - *KLK15* nun Kallikrein-ähnliche Proteasen, gefolgt von der Nummer des Gens (zum Beispiel Kallikrein-ähnliche Protease 15 für *KLK15*). Um zwischen Protein und Gen zu unterscheiden steht *KLK* in Standard-Großbuchstaben für das Protein, *KLK* in Kursivschrift steht für die Bezeichnung des Gens (Lundwall *et al.*, 2006).

1.4 Genlokus und Genstruktur

Der Genlokus der humanen *KLKs* erstreckt sich auf eine Größe von circa 300 kb und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 19, in der zytogenetischen Region 13.4 (Yousef *et al.*, 2000). Die *KLK*-Gene stehen eng gruppiert und werden nicht durch ein der Genfamilie fremdes Gen unterbrochen (*Abb. 1*).

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

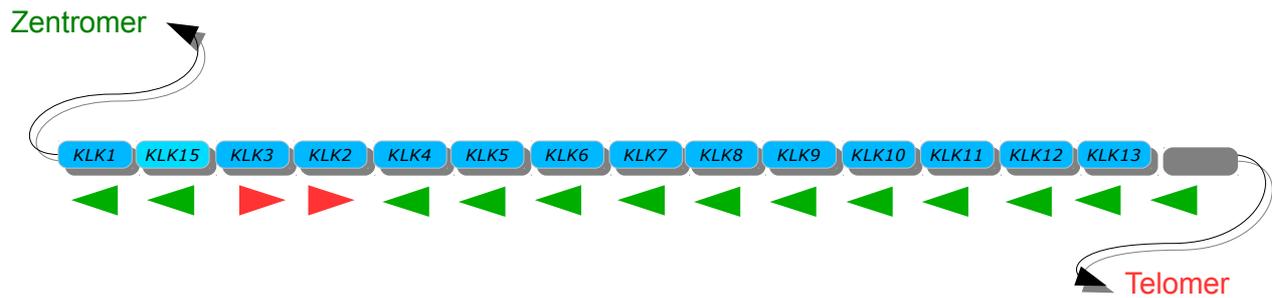


Abb. 1: Der Genlocus der humanen Kallikrein-ähnlichen Proteasen

Schematische Darstellung des Genlokus der humanen Kallikrein-ähnlichen Proteasen (*KLK*) auf Chromosom 19q13.4. Es sind nur die funktionalen Gene gemäß ihrer Position gezeigt, die roten und grünen Pfeile markieren die Richtung der Transkription. Mit Ausnahme von *KLK2* und *KLK3* werden alle Mitglieder der Genfamilie in Richtung Telomer nach Zentromer transkribiert.

Die drei klassischen Kallikrein-ähnlichen Proteasen (*KLK 1, 2* und *3*) sowie *KLK15* befinden sich in einer nur 60 kb großen Region, gefolgt von den übrigen 11 Kallikrein-ähnlichen Proteasen. Die genomische Struktur ist hochkonserviert, grundsätzlich sind die kodierenden Regionen jeder *KLK*-Protease auf fünf *Exons* mit ähnlicher oder sogar identischer Länge verteilt (**Abb. 2**).

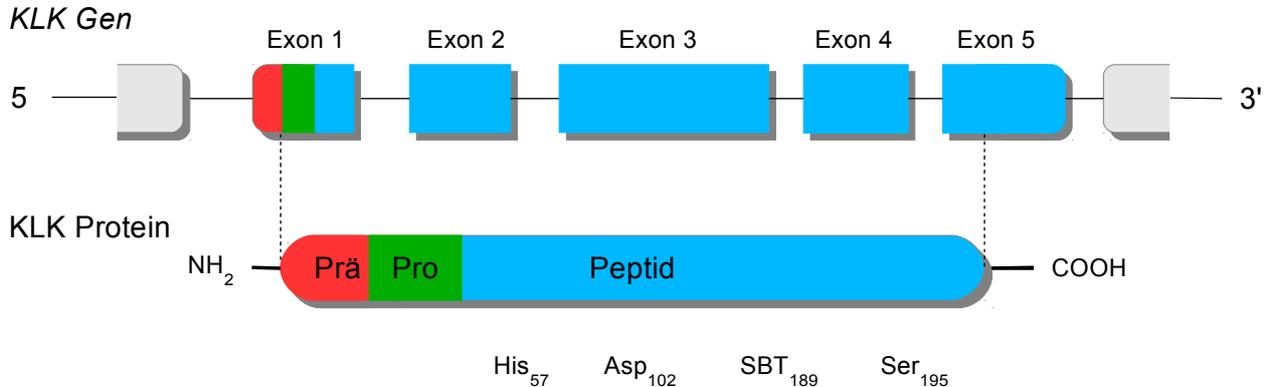


Abb. 2: Schematische Darstellung eines *KLK*-Gens bzw. -Proteins

Ein *KLK*-Gen besteht grundsätzlich aus 5 kodierenden *Exons* und dazwischen 4 *Introns*, die sich in einer 5-10 kb großen Region befinden. Einige Gene haben zusätzliche 5'-oder 3' nicht-kodierende *Exons* (offene Boxen). Jedes Protein wird als prä-pro-Enzym synthetisiert, die katalytische Triade, bestehend aus His₅₇, Asp₁₀₂ und Ser₁₉₅ ist gekennzeichnet (Chymotrypsin-Nummerierung). SBT kennzeichnet die Stelle der Aminosäure in der substratbindenden Tasche, die festlegt, ob das spätere Protein Trypsin- oder Chymotrypsin-artig spaltende Fähigkeiten besitzt. Das relativ kurze Signalpeptid (prä-Sequenz) besteht aus 16-33 Aminosäuren, das pro-Peptid aus 4-9 Aminosäuren (außer bei *KLK5* mit 37 Aminosäuren). Das mature, enzymatisch aktive Enzym besteht aus 227-252 Aminosäuren. 10-12 konservierte Cystein-Reste bilden 5 (*KLK1-3, KLK13*) oder 6 (restliche *KLK*) Disulfidbrücken, die das Protein stabilisieren.

Alle Gene kodieren für wahrscheinlich sezernierte Serinproteasen mit einer typischen katalytischen Triade bestehend aus Histidin-Aspartat-Serin in den *Exons* 2, 3 und 5 (Yousef und Diamandis *et al.*, 2001, Yousef *et al.*, 2005).

1.5 Spleißvarianten

Von allen Kallikrein-ähnlichen Proteasen existiert zumindest ein alternatives Transkript (auch *Splice*-Variante genannt) zusätzlich zu den *full-length* mRNAs. Spleißvarianten entstehen in erster Linie in den kodierenden Bereichen durch Überspringen eines *Exons* bzw. einen *Exon*abbruch. Die meisten dieser alternativen *KLK*-Transkripte kodieren wohl für verstümmelte Proteine, deren biologische und physiologische Bedeutung noch unklar ist. Nach derzeitigem Stand der Forschung sind rund 80 alternative Spleißvarianten der Kallikrein-ähnlichen Proteasen bekannt, die in ihrer Form einzigartig sind. PSA als bekanntestes Beispiel verfügt mit 15 Spleißvarianten über die größte Zahl an alternativen Transkripten, gefolgt von *KLK13* und *KLK4* mit 9 Varianten, während bis heute von *KLK14* nur ein alternatives Transkript gefunden wurde (Yousef *et al.*, 2005, Kurlender *et al.*, 2005). Mehrere vorangegangene Studien weisen darauf hin, dass abweichende Kallikreintranskripte unterschiedlich exprimiert werden oder spezifisch bei Krebs exprimiert werden, wodurch sie eine neue Generation von Biomarkern für Krebs innerhalb der Kallikreinfamilie darstellen. So zeigt eine Studie, dass *KLK3* sogar mindestens 15 Transkripte erzeugt, welche für acht potentielle Protein-Isoformen kodieren können (Heuze-Vourch *et al.*, 2003). RT-PCR Analyse weist nach, dass mindestens fünf gespleißte Isoformen in normalen, gutartigen, hyperplastischen und kanzerösen Geweben exprimiert werden. Zusammen könnten diese *KLK3*-Varianten die Diagnostik mit *KLK3/PSA* ergänzen. Zahlreiche Daten deuten darauf hin, dass außerdem Spleißvarianten von *KLK11* als Biomarker für die Diagnose und Prognose von Prostatakrebs klinischen Wert haben könnten (s. Kap. 1.7.3 Urologie). Die genaue biologische und klinische Bedeutung von Kallikreintranskript-/Proteinvarianten muss allerdings noch geklärt werden.

Darüber hinaus wurde es möglich, den diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Wert zahlreicher Biomarker in Modellen zu kombinieren und damit ein besseres Unterscheidungsvermögen als für einzelne Biomarker allein zu erreichen (Woolas *et al.*, 1995, Burke *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1999, De Laurentiis *et al.*, 1999, Jerez-Aragones *et al.*, 2003). Folglich könnte die Kombination von klassischen und abweichenden Kallikrein-ähnlichen Proteasen im Hinblick auf Diagnostik und Prognose bessere Informationen bereitstellen als einzelne Analyte alleine.

1.6 Die humane Kallikrein-ähnliche Protease 15 und ihre Spleißvariante 15ntfl

Das menschliche Gen *KLK15* ist eines der Serinproteasegene, die zur Familie der humanen Kallikrein-ähnlichen Proteasen gehören. Im Vergleich zu allen anderen KLKs (und auch zu anderen Serinproteasen) besitzt KLK15 eine einzigartige *Insertion* von ca. 10 Aminosäuren (Goetting *et al.*, 2010). Modellierungsstudien deuten darauf hin, dass diese *Insertion* einen an der Oberfläche des Proteins gelegenen flexiblen *loop* bildet, der zum einen möglicherweise für die Interaktion mit einem natürlichen Substrat notwendig ist und zum anderen aber auch die Substratspezifität der Protease selbst beeinflusst (*Abb. 3* und *Abb. 6*).



Abb. 3: Modell der Struktur von KLK15. Die einzigartige *Insertion* von KLK15 (und seiner Spleißvariante) ist in gelb, der Bereich, der in KLK15ntfl im Vergleich zum Wildtypprotein fehlt, ist in rot wiedergegeben. Freundlicherweise von S.Sperl zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren besitzt KLK15 im aktiven Zentrum eine ungewöhnliche Aminosäure in der Position, die in Serinproteasen mit der Interaktion des (basischen) P1-Restes verantwortlich ist. Während in anderen trypsinähnlichen Proteasen stets ein Asp₁₈₉ vorliegt, ist es bei KLK15 ein Glu₁₈₉ (*Abb. 4*). Diese Aminosäure könnte die Substrattasche in KLK15 deutlich verkleinern und dadurch die Bindung eines Substrates beschränken.

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

KLK1	W V L T A A H C	KLK1	D L M L L	KLK1	D G D S G G P L		
KLK2	W V L T A A H C	KLK2	D L M L L	KLK2	D G D S G G P L		
KLK3	W V L T A A H C	KLK3	D L M L L	KLK3	S G D S G G P L		
KLK4	W V L S A A H C	KLK4	D L M L I	KLK4	D G D S G G P L		
KLK5	W L L T A A H C	KLK5	D L M L I	KLK5	D G D S G G P V		
KLK6	W V L T A A H C	KLK6	D I M L L	KLK6	D G D S G G P L		
KLK7	W V L T A A H C	KLK7	D L M L V	KLK7	N G D S G G P L		
KLK8	W V L T A A H C	KLK8	D L M L L	KLK8	D G D S G G P L		
KLK9	W L L T A A H C	KLK9	D I M L I	KLK9	G G D S G G P L		
KLK10	W V L T A A H C	KLK10	D L M L L	KLK10	D S D S S G P L		
KLK11	W L L T A A H C	KLK11	D I M L V	KLK11	D G D S G G P L		
KLK12	W V L T A A H C	KLK12	D L R L L	KLK12	D G D S G G P L		
KLK13	W V L T A A H C	KLK13	D I M L L	KLK13	D G D S G G P L		
KLK14	W V I T A A H C	KLK14	D L M L L	KLK14	D G D S G G P L		
KLK15	W V L S A A H C	KLK15	D I M L L	KLK15	E G D S G G P L		



His



Asp



Ser

Abb. 4: Die Sequenzen in der Umgebung der katalytischen Triade sind in den humanen KLKs hoch konserviert. Die mit dem grünen Pfeil markierte Aminosäure ist in Trypsin-ähnlichen Serinproteasen typischerweise ein Aspartat (Asp₁₈₉) und ist charakteristisch für die Enzymspezifität. 12 der 15 KLKs besitzen eine Trypsin-ähnliche Aktivität (Asp₁₈₉ im aktiven Zentrum, bzw. im Fall von KLK15 Glu₁₈₉). KLK3 (Ser₁₈₉), KLK7 (Asn₁₈₉) und KLK9 (Gly₁₈₉) werden den Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen zugeordnet.

Die cDNA für KLK15 wurde erstmals aus einer humanen Prostata-cDNA-Bibliothek durch degenerierte PCR-Amplifikation isoliert (Takayama *et al.*, 2001). Die so neu identifizierte Protease wurde zunächst Prostin genannt. Sie setzt sich aus 240 Aminosäuren zusammen, mit einem aminoterminalen, aus 15 Aminosäuren bestehenden Signalpeptid, einem Propeptid von 6 Aminosäuren, sowie einem maturen Enzym aus 235 Aminosäuren (**Abb. 5**).



Abb. 5: Aufbau der KLK-Protease pro-KLK15. Schematische Abbildung der prä-pro-Proteasen-Domäne der pro-Form der Kallikrein-ähnlichen Protease KLK15. Von besonderer Wichtigkeit ist die pro-Sequenz, nach deren Abspaltung die Aktivierung des Proteins erfolgt.

Das mature Enzym ist in seiner Sequenz zu 41% identisch mit KLK3/PSA. Das Zymogen, das eine Molekularmasse von 28 kDa besitzt, wurde bereits von Takayama *et al.* (2001) mit Agarose-immobilisiertem Trypsin aktiviert. Diese Serinprotease wurde daraufhin Prostin genannt, und sie

war in der Lage, das chromogene Substrat S-2222 (N-Benzoyl-L-Ile-L-Glu-L-Gly-L-Arg-pNA·HCl) zu spalten. Rekombinantes Prostin aktiviert pro-PSA, indem es die Peptidbindung zwischen dem aminoterminalen Arginin₇ und Isoleucin₈ spaltet. Diese Erkenntnis weist darauf hin, dass Prostin ein physiologischer Aktivator von pro-PSA sein könnte. Darauf schließt sich seine eigene proteolytische Aktivierung an, was Teil eines Kaskadensystems in der Prostata sein könnte (Takayama *et al.*, 2001). Die Expression von KLK15 ist außerdem in malignen Neoplasien im Vergleich zu benignen Tumoren signifikant erhöht. In uni- und multivariaten Analysen konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von KLK15 mit einem signifikant verkürzten Gesamt- und progressfreien Überleben korreliert (Yousef und Diamandis *et al.*, 2003).

Die Klonierung des Gens *KLK15* ermöglichte die Analyse seiner *Exon-Intron*-Struktur (Yousef *et al.*, 2001). Es besteht aus fünf kodierenden *Exons*. Insgesamt sind bis heute sechs verschiedene Spleißvarianten bekannt (**Abb. 5**). Die Struktur von KLK15-splv_1, 2, 3, 4 und 5 ist in dem Übersichtsartikel von Kurlender *et al.* (2005) näher beschrieben. Eine weitere Variante, KLK15ntfl, wurde in unserem Labor aus Ovarialkarzinomgewebe identifiziert (P. Victorov und V. Magdolen, pers. Mitteilung).

Diese Variante enthält eine *in frame* Deletion, die 14 Aminosäuren (aa) betrifft, aufgrund der Verwendung einer alternativen *splice site* nahe des aktiven Zentrums der Serinprotease. Das von dieser mRNA abgeleitete Protein wurde KLK15ntfl (*near-to-full-length*) genannt. Die Deletion liegt unmittelbar in der Nähe des Serin-Restes des aktiven Zentrums (Ser₁₉₅) und umfasst interessanterweise den Glu₁₈₉-Rest (**Abb. 6**).

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

```

TRY1      IVGGYNCEENSVPYQVSLN--SGYHFCGGSLINEQWVVSAGHCYKSRIQVRLG-EHNIEVLEGN
CTR8      IVNGEDAVPGSWPWQVSLQDKTGFHFCCGGLISEDWVVTAAHCGVRTSDVAVAGEFDQGSDEEN
KLK1      IVGGWECEQHSQPWQAALYH-FSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFD-ENT
KLK3      IVGGWECEKHSQPWQVLVAS-RGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHP-EDT
KLK4      IINGEDCSPHSQPWQAALVM-ENELFCSGVLVHPQWVLSAAHCQNSYTIIGLGLHSLFHP-EDT
KLK6      LVHGGPCDKTSHPHYQAALYT-SGHLLCGGVLHPLWVLTAAHCKKPNLQVFLGKHNLRQR-ESS
KLK15-WT  LLEGDECAPHSQPWQVALYE-RGRFNCGASLISPHWVLSAAHCQSRFMRVRLGEHNLRKR-DGP
KLK15-ntfL LLEGDECAPHSQPWQVALYE-RGRFNCGASLISPHWVLSAAHCQSRFMRVRLGEHNLRKR-DGP

TRY1      EQFINAAKIRHPQYDRKTLNN-----DIMLIKLSRAVIN-ARVSTISLPTAPP--A
CTR8      IQVLKIAKVFKNPKFSILTVNN-----DITLLKLATPARFS-QTVSAVCLPSADDDFP
KLK1      AQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLRTEPADTITDAVKVVELPTEEP--E
KLK3      GQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDSSHDLMMLLRLRSEPAELT-DAVKVMDLPTQEP--A
KLK4      SQMVEASLSVRHPEYNRPLLAN-----DLMLIKLDESSES-DTIRSIASIASQCP--T
KLK6      QEQSSVVRAVIHPDYDAASHDQ-----DIMLLRLRARPAKLS-ELIQPLPLERDCS--A
KLK15-WT  EQLRTTSRVIHPRYEARSHRN-----DIMLLRLVQPARLN-PQVRPAVLPTRCP--H
KLK15-ntfL EQLRTTSRVIHPRYEARSHRN-----DIMLLRLVQPARLN-PQVRPAVLPTRCP--H

TRY1      TGTKCLISGWGN-----TASSGADYPDELQCLDAPVLSQAKCEASYPGKITSNMFCVGF
CTR8      AGTLCATTGWGK-----TKYNANKTPDKLQQAALPLLSNAECKKSWGRRITDVMICAGA
KLK1      VGSTCLASGWGS-----IEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGH
KLK3      LGTTCYASGWGS-----IEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGR
KLK4      AGNSCLVSGWGL-----LANGRMPTVLQCVNVSVVSEEVCSKLYDPLYHPSMFCAGG
KLK6      NNTSCHILGWGK-----TADGDFPDTIQCAYIHLVSREECEHAYPGQITQNMLCAGD
KLK15-WT  PGEACVVSQWGLVSHNEPGTAGSPRSQVSLPDTLHCANISII SDTSCDKSYPGRLTNTMVCAGA
KLK15-ntfL PGEACVVSQWGLVSHNEPGTAGSPRSQVSLPDTLHCANISII SDTSCDKSYPGRLTNTMVCAGA

TRY1      LEGGKDS CQGDSGGPVVCNG---QLQGVSWSG-DGCAQKNKPGVYTKVYNYVKWIKNITIAANS
CTR8      S--GVSSCMGDSGGPLVCQKDGAWTLVGIVSWG-SDT CSTSSPGVYARVTKLIPWVQKILAAAN-
KLK1      LEGGKDCVGDSSGGPLMCDG---VLQGVTSWGVYPCGTPNKPSVAVRVLVSYVKWIEDTIAENS
KLK3      WTGGKSTCSGDSGGPLVCNG---VLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP
KLK4      GHDQKDCSNGDSGGPLICNG---YLQGLVSFGKAPCGQVGVPGVYTNLCKFTEWIEKTVQAS-
KLK6      EKYGKDCS CQGDSGGPLVCGD---HLRGLVSWGNI PCGSKEKPGVYTNVCRYTNWIQKTIQAK-
KLK15-WT  EGRGAESC GDSGGPLVCGG---ILQGIVSWGVDVPCDNTTKPGVYTKVCHYLEWIRETMKRN-
KLK15-ntfL -----GDSGGPLVCGG---ILQGIVSWGVDVPCDNTTKPGVYTKVCHYLEWIRETMKRN-

```

Abb. 6: Homologievergleich verschiedener Serinproteasen mit KLK15 und KLK15ntfL. Die klassischen KLKs (*KLK1-3*) besitzen eine einzigartige *Insertion* (grau), *KLK15* und seine Spleißvariante an anderer Stelle ebenfalls (gelb). Der Bereich, der in KLK15ntfL im Vergleich zum Wildtypprotein fehlt, ist in rot angedeutet. Die katalytische Triade ist blau hinterlegt.

Bei KLK15ntfL handelt es sich um eine 3'-Verkürzung des kodierenden *Exons* 4 (E4), bei KLK15-splv_1 um eine 3'-Verkürzung von E3. Im Fall von KLK15-splv_2 ist neben der 3'-Verkürzung von E3 das gesamte *Exon* E4 deletiert, bei KLK15-splv_3 ist E3 vollständig vorhanden, aber E4 deletiert. Im Fall von KLK15-splv_4 ist das *Intron* zwischen E3 und E4 nicht herausgespleißt, bei KLK15-splv_5 ist das *Intron* nicht herausgespleißt, aber E4 fehlt (**Abb. 7**).

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

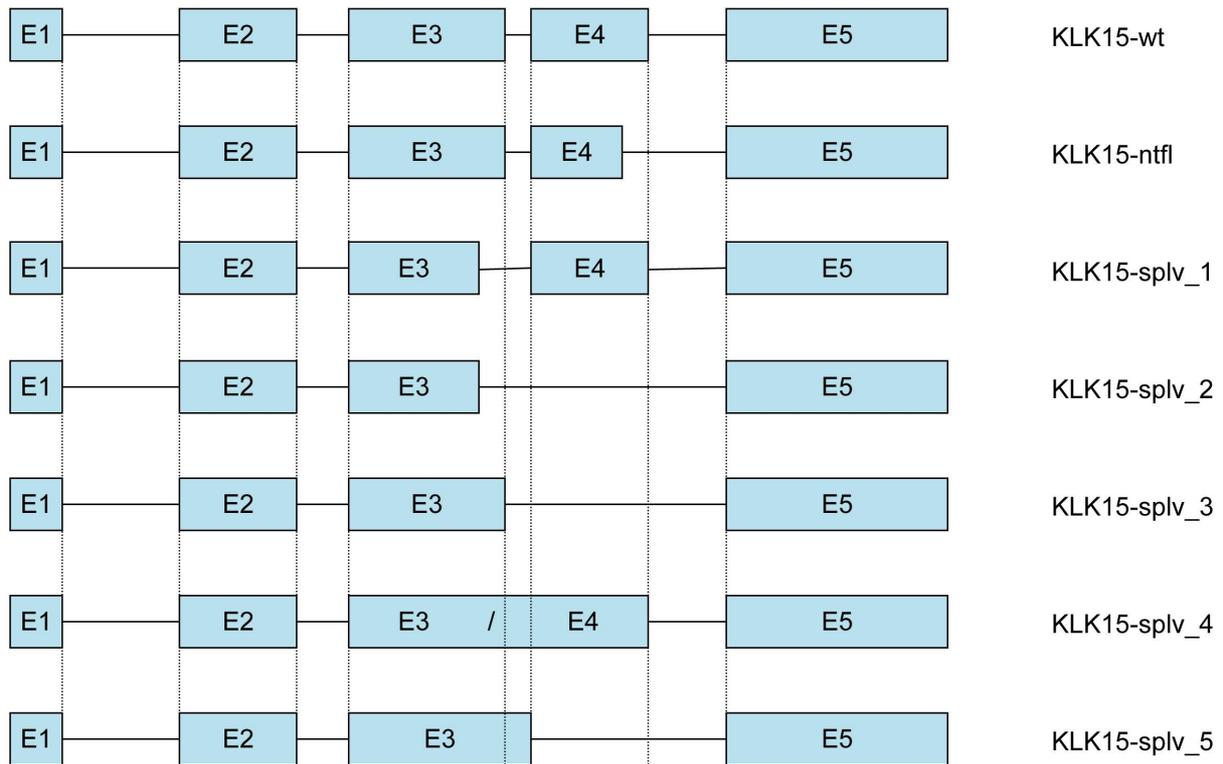


Abb. 7: Exon-Intron-Struktur der KLK15-wt mRNA und ihren Spleißvarianten

Die kodierenden *Exons* von KLK15-wt sind mit E1 bis E5 gekennzeichnet. Bei den Spleißvarianten handelt es sich um 3' Verkürzungen von *Exons*, um sogenanntes *Exon skipping* und/oder *Intron retention* Ereignisse.

Ob die Proteine *in vivo* tatsächlich in stabiler Form synthetisiert werden, ist noch nicht nachgewiesen. Eine Translation der jeweiligen alternativ gespleißten mRNAs würde zur Produktion von Proteinen zwischen 121 und 242 Aminosäuren (aa) im Vergleich zum Wildtyp (256 aa) führen (**Abb. 8**). Aufgrund der in den meisten Fällen großen Deletion C-terminaler oder interner Sequenzen ist eine Proteaseaktivität der Spleißvarianten wohl auszuschließen. Die Variante KLK15ntfl zeichnet sich allerdings durch eine interne Deletion von nur 14 aa aus.

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

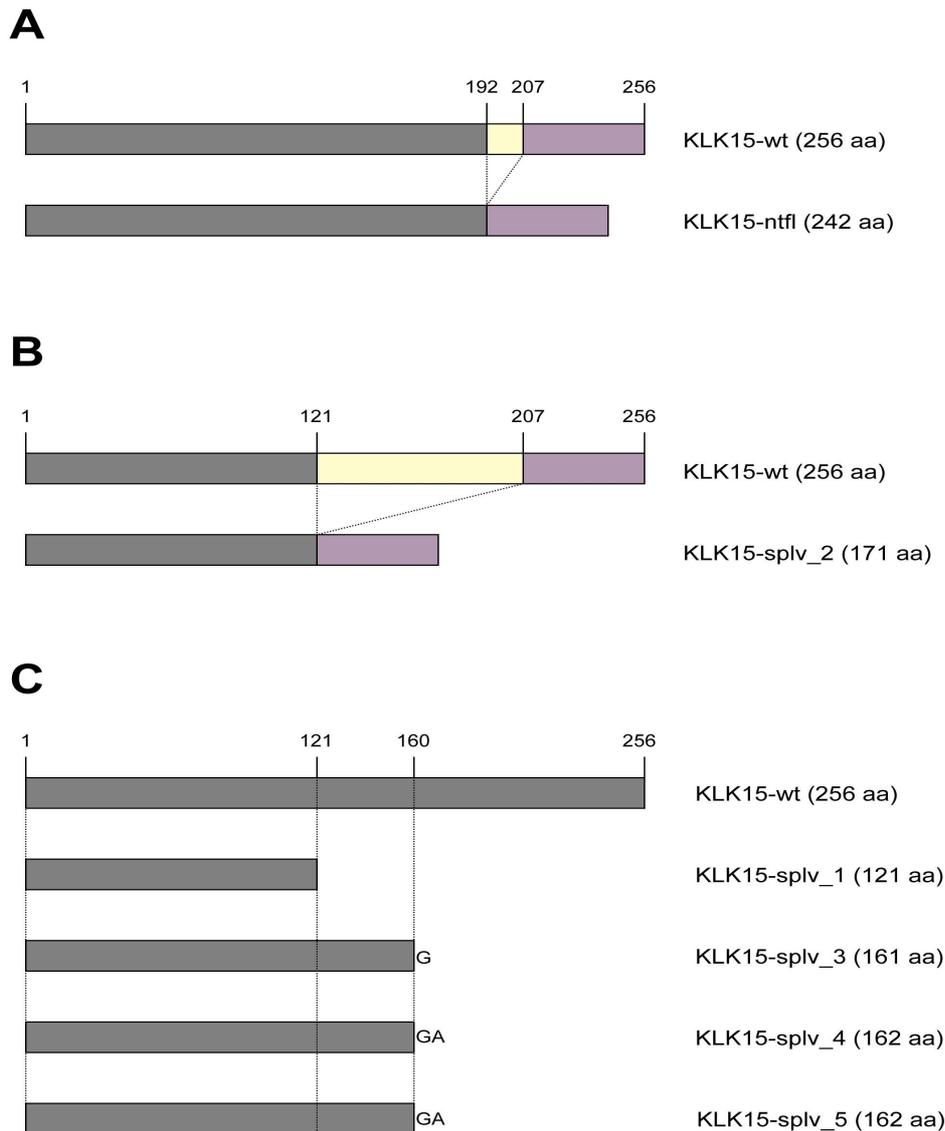


Abb. 8: Potentielle Proteinprimärstruktur der KLK15-Spleißvarianten

KLK15ntfl (A) unterscheidet sich von KLK15-wt durch eine Deletion von 14 aa, KLK15-splv_2 (B) durch eine Deletion von 85 aa. Die weiteren Spleißvarianten (C) würden zu C-terminal verkürzten Varianten führen.

Mavridis *et al.* konnten 2009 mit ihrer Studie nachweisen, dass in Prostatagewebeproben mRNA-Spleißvarianten unterschiedlich stark ausgeprägt waren. So zeigte sich im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu Gewebeproben aus benigner Prostatahyperplasie ein statistisch signifikanter ($P < 0.001$) Anstieg in der Häufigkeit einer Überexpression von KLK15-Transkripten, die sowohl die aktive Isoform als auch die Isoform 3 kodieren. Darüber hinaus waren KLK15-Transkripte bei

aggressiveren Tumoren ($P=0.017$) deutlich höher exprimiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die KLK15-Expressionsanalyse als wertvolles Hilfsmittel zur Unterscheidung von gutartigem Hyperplasiegewebe der Prostata und Prostatakrebsgewebe und als Hinweis für eine schlechtere Prognose eingesetzt werden könnte. Zur klinischen Bedeutung spezifischer Spleißvarianten von KLK2, KLK3 und KLK11 beim Prostatakarzinom siehe Kap.1.7.3 Urologie.

1.7 Klinische Bedeutung der Kallikrein-ähnlichen Proteasen

1.7.1 Kallikrein-ähnlichen Proteasen als Bestandteil extrazellulärer Proteolyse-Netzwerke

Ein wichtiges Forschungsziel ist daher die Analyse der Rolle von KLKs in Kaskadenreaktionen und Netzwerken und ihre Kommunikation mit Proteasen anderer katalytischer Klassen. Während die wohlbekannteste Koagulationskaskade aus aufeinanderfolgenden proteolytischen Aktivierungen besteht, scheinen KLKs ein proteolytisches Netzwerk zu bilden. An diesem ist eine beachtliche Reihe an (pro-)Proteasen ohne eindeutige Hierarchie beteiligt. Bis heute zeigten diese Proteasen, dass sie sowohl fibrinolytische Enzyme einschließen (z.B. Plasmin), Koagulationsproteasen (z.B. Thrombin) als auch Metalloproteasen Mepripin α und β (Borgono und Diamandis *et al.*, 2004; Becker-Pauly *et al.*, 2007; Pampalakis und Sotiropoulou *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007, 2008, 2009; Ohler *et al.*, 2010). Die Strategie, diese Wechselwirkungen mithilfe von *double-tagged* pro-KLKs zu analysieren, umging technische Limits und erlaubte bei hohem Durchsatz die *in vitro* Analyse von 77 pro-KLK/KLK-potentiellen Aktivatorpaaren (Beaufort *et al.*, 2010). Die N- und C-Termini von Trypsin-ähnlichen pro-Enzymformen weisen auf das Kernprotein der Protease hin (Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Folglich beeinflusst das Hinzufügen von *Tags* nicht die Rückfaltung rekombinanter pro-Enzymformen. Nun zeigt es sich, dass Trypsin-ähnliche KLKs auch starke Aktivatoren des Zymogens der Urokinase sind, während sie Plasminogen inaktiv lassen. Beaufort *et al.* zeigten 2010, dass Plasmin und einige MMPs in Gegenzug in der Lage sind, die Aktivierung einiger pro-KLKs auszulösen. Es wurden bereits einige KLKs wie beispielsweise KLK3/PSA identifiziert, die als vielversprechende diagnostische oder prognostische Biomarker für verschiedene Krebsarten dienen, einschließlich Ovarial-, Mamma- und Prostatakarzinom. Immer mehr Daten deuten auch darauf hin, dass KLKs in die Krebsentstehung verwickelt sind, insbesondere in die Tumormetastasierung. Dadurch stellen sie attraktive Ziele für Medikamente im Hinblick auf das therapeutische Eingreifen dar (Borgono *et al.*, 2004). Die Entdeckungen von Krebs-spezifischen mRNA-Transkriptionsvarianten, die exklusiv oder mit größerer Häufigkeit in Krebszellen auftreten, und die durch eine Biopsie oder in Körperflüssigkeiten auffindbar sind, könnten natürliche diagnostische Biomarker hervorbringen.

1.7.2 Gynäkologie

Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom hat nach wie vor die ungünstigsten Prognose aller Genitaltumoren. Da es im frühen Stadium keine oder wenig Symptome hervorruft, wird dieses Karzinom meist erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Über 70% aller Ovarialtumoren sind epithelialen Ursprungs, z.B. Zystadenokarzinome. Die klinische Einteilung erfolgt nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) oder UICC (Union internationale contre le cancer). Aus einer Patientinnengruppe (n=142), bei der zwischen 1985 und 1999 in der Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München des Klinikums rechts der Isar ein Ovarialkarzinom diagnostiziert und behandelt worden war, befanden sich 17,6% im FIGO-Stadium I, 7,0% im Stadium II, 54,9% im Stadium III, und 20,5% bereits im Stadium IV (Dorn *et al.*, 2007). Nur 9,9% der diagnostizierten Tumore waren gut differenziert und als G1 eingeteilt. Bei 60,5% aller Fälle wurden höhergradige Tumore (G3) mit einer schlechten Prognose für das Überleben diagnostiziert (Dorn *et al.*, 2007). Leider ist CA-125 auch heute noch der einzige Tumormarker bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms, der eine gut definierte und validierte Rolle spielt. Serum CA-125 wurde im Screening für Ovarialkarzinom evaluiert zur Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Ovarialgeweben und zur Prognosestellung (Zurawski, *et al.*, 1988 Vasilev *et al.*, 1988, Rubin *et al.*, 1989, Bridgewater *et al.*, 1999). Dennoch hat es noch keine klare Position bei Diagnose, Prognose oder Entscheidungen über die Behandlung (Meyer *et al.*, 2000, Chi *et al.*, 2000). Zwar wurden einige potentielle neue Serummarker statistisch ausgewertet, entweder allein oder in Kombination mit CA-125, einschließlich CA-15-3, CA-19-9, OVX1, lysophosphatidische Säure (LPA), und karzinoembryonales Antigen CEA (Meyer *et al.*, 2000, Berek *et al.*, 1995, Stenman *et al.*, 1995). Diese Marker leisten aber derzeit keinen gut definierten Beitrag, nur die Kombination von CA-125 und Ultraschalldiagnostik erzielt die höchste verfügbare Sensitivität und Spezifität (Chi *et al.*, 2000).

Die Tumorausbreitung des soliden Primärtumors des Ovars erfolgt sowohl „*per continuitatem*“, also über kontinuierliche Infiltration der Nachbarorgane, Implantation abgelöster Tumorzellen in das Peritoneum, als auch hämatogen und lymphogen, d.h. durch Einbruch in Lymph- und Blutgefäße. Die Tumoraussaat in das Peritoneum kann zur Peritonealkarzinose mit massiver Aszitesbildung führen. Über hämatogene Streuung können sich Lungen-, Leber- und Knochenmetastasen ausbilden. Die Überlebensprognose der Patientin hängt vom Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose, vom Lymphknotenstatus, der Histologie, dem Differenzierungsgrad und der Polymorphie ab

(Schmidt-Matthiesen und Bastert, 1995). Als Goldstandardtherapie gilt die radikale Tumor- sowie Metastasenentfernung mit nachfolgender kombinierter Chemotherapie (Dorn *et al.*, 2007), was sowohl die rezidivierenden Symptome lindert als auch die Überlebenschancen verbessert (Martin *et al.*, 2009). Dennoch ist die therapeutische Intervention mit einer erheblichen Morbidität verbunden. Bei Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung trägt die radikale Chirurgie ein Mortalitätsrisiko von 3%. Zur Verbesserung der Überlebensrate und zur Senkung dieses Mortalitätsrisikos sind verlässliche tumorassoziierte Biomarker erforderlich (Kiechle *et al.*, 2006; Dorn *et al.*, 2007). Ein wichtiges Ziel in der gynäkologischen Onkologie stellt daher die Suche nach geeigneten Tumormarkern zur Ergänzung der möglichst frühzeitigen Diagnostik dieser malignen Erkrankung dar.

Die Expressionsanalysen für KLK15 sowie die Ergebnisse zu anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen deuten auf ein großes Potential von Kallikrein-ähnlichen Proteasen als Tumormarker beim Ovarialkarzinom hin. Zahlreiche Studien haben beispielsweise gezeigt, dass die Kallikrein-ähnlichen Proteasen 4-8, 10, 11 und 13-15 in Ovarialkarzinomgewebe, Serum, oder Zelllinien auf mRNA- und/oder Proteinebene überexprimiert werden (Anisowicz *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 1997, Unterwood *et al.*, 1999, Tanimoto *et al.*, 1999, Gaberc-Porekar *et al.*, 2001, Dong *et al.*, 2001, Diamandis *et al.*, 2002, Kapadia *et al.*, 2003, Yousef *et al.*, 2003, Borgono *et al.*, 2003). Die Hochregulation von Kallikrein 5-8, 10, 11, und 14 beim Ovarialkarzinom wurde von Yousef *et al.*, 2003 verifiziert. Der Nachweis dieser Kallikreingenexpression erfolgte *in silico* durch digital-differentielle Darstellung und X-profiler Analysen in normalem und kanzerösem Ovarialgewebe und Zelllinien. Weitere Daten weisen darauf hin, dass viele alternative Kallikreintranskripte bei Krebs auch unterschiedlich exprimiert werden, und manche sogar Krebs-spezifisch sind. Dong *et al.* haben 2003 die Überexpression einer Variante von *KLK5* dokumentiert, die eine kurze 5'UTR aufwies, sowie eine Variante von *KLK7* mit einer längeren 3'UTR bei Ovarialzellkarzinom-Zelllinien, verglichen mit normalen Ovarial-Epithelzellen (zu Spleißvarianten siehe auch Kap.1.5). Eine weitere Spleißvariante von *KLK5*, bezeichnet als *KLK5*-Spleißvariante 1, wird in Ovarialkarzinomgeweben hochreguliert, aber bei Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert. Zwei neue mRNA-Spleißvarianten des Gens für *KLK8* werden in relativ hohem Maße bei kanzerösem Ovarialgewebe überexprimiert, bei denen entweder zwei oder drei kodierende *Exons* fehlen, im Vergleich zu normalen Ovarialgeweben, in denen sie nicht nachgewiesen wurden (Magklara *et al.*, 2001).

Mammakarzinom

In der Brust werden *KLK5*, *KLK6*, *KLK10* und *KLK13* exprimiert.

Im Gegensatz zu Ovarialkrebs werden bei Brustkrebsgeweben oder Zelllinien auf mRNA-Ebene die Kallikreingene *3*, *10*, *12*, *13*, und *14* herunterreguliert (Liu *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 1998, Yousef *et al.*, 2000, Yousef *et al.*, 2001, Dhar *et al.*, 2001), während das *KLK6*-Gen bei metastasierendem Brustkrebs herunterreguliert und in primären Brusttumoren hochreguliert wird (Anisowicz *et al.*, 1996). *In-silico*-Analysen von *KLK*-mRNA-Expressions-Ebenen in normalen und kanzerösen Brustgeweben und Zelllinien deuten darauf hin, dass mindestens vier Kallikreingene, nämlich *KLK5*, *6*, *8*, und *10* bei Brustkrebs hochreguliert werden (Yousef *et al.*, 2004), teilweise übereinstimmend mit den vorangegangenen Erkenntnissen. Obwohl der Pegel an menschlichem *KLK5* und *14* auf mRNA-Ebene reduziert war bei Brustkrebs, wurden erhöhte Serumwerte von *KLK5*- und *14*-Proteinen bei einer Untergruppe von Brustkrebspatienten beobachtet (Yousef *et al.*, 2003, Borgono *et al.*, 2003). Diese Diskrepanz zwischen *KLK5*- und *14*-mRNA und Serumprotein-Ebene bei Brustkrebs wurde ebenso beobachtet für *KLK3*/PSA bei Prostatakrebs. In diesen Fällen könnte die Erhöhung der *KLK*-Proteine im Serum durch Angiogenese oder die Zerstörung der Architektur in der Drüsenstruktur während der Karzinogenese verantwortlich sein, wodurch der Austritt von *KLKs* in den Kreislauf erleichtert wird.

Schwangerschaft

Für das *KLK1*-Kinin-System wurde eine Rolle vermutet bei der Bildung und Aufrechterhaltung des placentaren Blutflusses durch Vasodilation, Antiaggregation der Plättchen, Zellproliferation, und Trophoblastinvasion während verschiedener Schwangerschaftsstadien (Valdes *et al.*, 2001).

1.7.3 Urologie

In enzymatisch aktiver Form tragen *KLK2* und *KLK3* zur Verflüssigung der Samengerinnsel nach einer Ejakulation bei, was wesentlich ist für die Spermienmotilität, durch deren Hydrolyse von Samenvesikelproteinen, Seminogelin I und II, und Fibronectin (Lilja *et al.*, 1985, Deperthes *et al.*, 1996). *KLK3* jedoch spaltet diese Substrate mit höherer Effizienz und an anderen Stellen im Vergleich zu *KLK2*.

Das bemerkenswerteste Beispiel für Koexpression ist die gleichzeitige und weitgehend einzigartige Expression von *KLK2*, *KLK3*, *KLK4*, *KLK11* und *KLK15* in der Prostata auf mRNA-Ebene.

Prostatakarzinom

Im Hinblick auf Prostatakrebs werden *KLK2*, *KLK3*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK10*, und *KLK13* herunterreguliert, verglichen mit normalem angrenzendem Gewebe (Hakalahti *et al.*, 1993, Laskowski *et al.*, 2000, Petraki *et al.*, 2003, Magklara *et al.*, 2003, Sotiropoulou *et al.*, 2003), während *KLK11*, *KLK14*, und *KLK15* überexprimiert werden (Diamandis *et al.*, 2002, Yousef *et al.*, 2003, Stephan *et al.*, 2003). Zusätzlich wird die Expression von *KLK5*, *KLK10*, und *KLK14* merklich reduziert in kanzerösem versus normalem Hodengewebe auf mRNA-Ebene (Luo *et al.*, 2001, Yousef *et al.*, 2001, Yousef *et al.*, 2002). Es wurden auch gewebsspezifische Expressionsmuster für viele alternative mRNA-Transkripte von Kallikreingenen dokumentiert (siehe dazu Kap.1.4 Spleißvarianten). Beispielsweise haben Slawin *et al.* im Jahr 2000 eine präoperative Spleißvarianten-spezifische *Reverse-Transkriptions-PCR* für *KLK2* entwickelt, die dazu dient, Metastasierung von Prostatakrebs aufzuspüren und einen positiven pathologischen Lymphknotenstatus bei Männern mit klinisch lokalisiertem Prostatakrebs vorherzusagen. David *et al.* berichteten darüber hinaus über die Identifikation zweier Spleißvarianten von *KLK2* und *KLK3*, die aus dem Einschluss intronischer Sequenzen resultieren, die dem ersten *Exon* benachbart sind und die jeweils als K-LM und PSA-LM bezeichnet werden (David *et al.*, 2002). Mit Ausnahme des Signalpeptids kodieren K-LM und PSA-LM Transkripte für Protein-Isoformen, die vollkommen unterschiedlich sind zu den klassischen Proteinen von *KLK2* und *KLK3*. Daraufhin wurden polyklonale Antikörper gegen synthetische Peptide generiert, die von Aminosäuresequenzen abgeleitet sind, welche spezifisch für jedes Protein einer Variante sind. Immunhistochemie von Prostataabschnitten zeigten bei Verwendung dieser polyklonalen Antikörper, dass die Proteine von K-LM und PSA-LM nur in sekretierenden Zellen des Tubuluslumens nachweisbar waren. *Westernblot*-Analysen wiesen darauf hin, dass das Protein von K-LM im Samenplasma präsent ist, ähnlich wie die klassischen Formen von *KLK2* und *KLK3*. Das *KLK11*-Gen hat zwei gewebsspezifische mRNA- Isoformen, bekannt als Gehirntyp und Prostatatyp, wobei ersteres im Gehirn und in der Prostata und letzteres exklusiv in der Prostata exprimiert wird (Mitsui *et al.*, 2000). Nakamura *et al.* verglichen mit quantitativer *Reverse-Transkription-PCR* die Expression von Prostata- und *braintype* *KLK11*-Isoformen in vergleichbaren normalen und kanzerösen prostatistischen Geweben (Nakamura *et al.*, 2003). Beide Varianten wurden in kanzerösen verglichen mit normalen Prostatageweben überexprimiert. Eine niedrigere Expression vom Prostata-Typ *KLK11* war mit höherem Tumorstadium, -Grad und *Gleason score* assoziiert. Bei der *braintype*-Isoform wurde keine derartige Assoziation beobachtet.

KLK12 wird hochreguliert durch Androgene und Gestagene in Prostatakrebs- Zelllinien (Yousef *et*

al., 2000). Hooper *et al.* haben ein 1,5-kb-Transkript von *KLK14* entdeckt, das nur in der Prostata transkribiert wird. Darüber hinaus hat die Arbeit von Chang *et al.* enthüllt, dass das Gen für *KLK13* mindestens fünf Gewebe-spezifische Spleißvarianten besitzt, die exklusiv im Hoden exprimiert werden, im Gegensatz zu der klassischen *KLK13*-mRNA, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird, einschließlich Prostata, Hoden, und Speicheldrüse (Yousef *et al.*, 2000). Diese *KLK13*-Spleißvarianten werden in einer Fraktion von morphologisch normalen Hodengeweben exprimiert, sind aber in angrenzenden kanzerösen Geweben abwesend (Chang *et al.*, 2001).

Wenn ihr biologischer Signalweg entschlüsselt ist, könnten Kallikrein-ähnliche Proteasen auch als potentielle Ziele für Medikamente und therapeutische Mittel eingesetzt werden, und als Kandidaten für passive oder aktive Immuntherapie. Beispielsweise unterstützt die Identifikation von CD4 positiven T-Zellen, die spezifisch für natürlich prozessierte, *KLK4*-abgeleitete *Epitope* innerhalb des T-Zell-*Repertoires* von Männern die Anwendung von *KLK4* als Ziel für ganze Gen-, Protein-, oder Peptid-basierte Impfstrategien gegen Prostatakrebs (Hural *et al.*, 2002). Diese Kallikrein-ähnliche Protease könnte auch ein Ziel für Immuntherapie darstellen, denn anti-*KLK4*- Antikörper waren nur im Serum von Männern mit Prostatakrebs nachweisbar (Day *et al.*, 2002).

1.7.4 Dermatologie

In der Haut werden *KLK1*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK9*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* und *KLK14* koexprimiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression von *KLK5* und *KLK7* auf das *Stratum granulosum* der normalen Epidermis beschränkt ist (Sondell *et al.*, 1994, Sondell *et al.*, 1996, Eckholm, Brattsand *et al.*, 2000). Eine *In-Situ*-Hybridisierungs-Studie deutet darauf hin, dass einige andere *KLKs* genauso bedeutend vom *Stratum granulosum* exprimiert werden wie von der inneren Hülle des Haarfollikel-epithels und im Zytoplasma von Zellen innerhalb der ekkrinen Schweißdrüsen und Talgdrüsen (Komatsu *et al.*, 2003). Dieselbe Forschergruppe fand heraus, dass Spleißvarianten von *KLK4*, *KLK8*, und *KLK13*-Gentranskripten in der Haut die vorherrschende mRNA-Spezies darstellen.

Darüber hinaus hat man vermutet, dass inhibitorische Peptide, die aus Serinprotease-Inhibitor Kazal-Typ 5 (*SPINK5*) stammen, die Aktivität von *KLKs* regulieren könnten, aufgrund der Kolokalisation von *KLKs* und *SPINK5* in der Haut (Komatsu *et al.*, 2003). Zahlreiche Berichte zeigen, dass Kallikrein-ähnliche Proteasen bei der normalen Physiologie der Haut eine Rolle spielen, speziell bei der epidermalen Homeostase. Sowohl *KLK5* (Brattsand *et al.*, 1999) als auch *KLK7* (Hansson *et al.*, 1994) wurden aus dem *Stratum corneum*, der äußersten Hülle der Haut, isoliert und geklont.

Es wird vermutet, dass sie bei der Degradation von interzellulären Strukturen eine Rolle spielen (Ludstrom *et al.*, 1990, Eckholm *et al.*, 2000), wie beispielsweise Desmosomen, welche die Kerneozyten verbinden (Ludstrom *et al.*, 1990, 1991, Sondell *et al.*, 1995, Simon *et al.*, 2001). Dadurch wird der zelluläre Zusammenhalt herabgesetzt und die Zellabschuppung erleichtert, während der letzten Stadien des epidermalen Umsatzes. Da jedoch KLK5 und KLK7 bevorzugt nur einen Teil der desmosomalen Proteine spalten (Simon *et al.*, 2001), sind zusätzliche Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen an der Abschuppung des *Stratum corneum* beteiligt (Suzuki *et al.*, 1996). Viele andere Mitglieder der Kallikrein-ähnlichen Genfamilie spielen dabei eine Rolle (Komatsu *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Abschuppung könnte KLK7 auch eine Rolle bei der Pathophysiologie der Haut spielen, wie beispielsweise bei der pathologischen Keratinisierung (Sondell *et al.*, 1996), *Psoriasis* „Schuppenflechte“ (Ekholm *et al.*, 1999), und bei entzündlichen Reaktionen. Zurückgeführt wird das auf seine Fähigkeit, proinflammatorische *Zytokine* wie *Interleukin-1 β* zu aktivieren (Nylander-Lundqvist *et al.*, 1996, Nylander-Lundqvist *et al.*, 1997).

1.7.5 Innere Medizin

Hämatologie

Das Gen für *KLK10* wird bei akuter lymphoblastischer Leukämie herunterreguliert (Roman-Gomez *et al.*, 2004).

Pankreas

In der Bauchspeicheldrüse wird *KLK1*, *KLK6-KLK13* sowie eine Variante des *KLK8*-Gens vorwiegend exprimiert (Mitsui *et al.*, 1999). Sich verdichtende Daten weisen darauf hin, dass einige Kallikrein-ähnliche Proteasen an der Weiterverarbeitung von Peptidhormonen im endokrinen Pankreas beteiligt sind. Immunohistochemische Studien deuten an, dass *KLK1*, *6*, *10*, und *13* in den Langerhans'schen Inselzellen stark exprimiert werden innerhalb der spezialisierten α -, β -, δ - und pankreatisches- Polypeptid-Zellen, die jeweils Insulin, Glukagon, Somatostatin, und pankreatisches Polypeptid synthetisieren (Petraki *et al.*, 2001, Petraki *et al.*, 2002, Petraki *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2001, ole-MoiYoi *et al.*, 1979). Demnach könnten diese KLKs an der Aktivierung von pro-Hormonen teilhaben, möglicherweise in Kooperation mit anderen pro-Hormonkonvertasen, wie beispielsweise PC1 und PC2, welche ebenso wie Kallikrein-ähnliche Proteasen in ähnlichen Zelltypen des endokrinen Pankreas kolokalisiert sind (Petraki *et al.*, 2002). Tatsächlich wurde die Aktivierung von pro-Insulin zu reifem Insulin durch KLK1 bereits dokumentiert (Yoi *et al.*, 1979).

Anfang dieses Jahrtausends zeigte eine *Mikroarray*-Analyse, die das Profil des Genexpressionsmusters in menschlichen Lungen-Adenokarzinomen erstellte, dass *KLK11* bei einer Untergruppe von neuroendokrinen Karzinomen einzigartig überexprimiert wird (Bhattacharjee *et al.*, 2001). Eine andere *Mikroarray*- Studie hat verschiedene Transkriptionsprofile in pankreatischen duktalem Adenokarzinomen charakterisiert und gezeigt, dass *KLK10* eines der am höchsten und am spezifischsten überexprimierten Gene ist beim Pankreaskrebs, verglichen mit normalen und benignen Pankreasgeweben (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2003).

1.7.6 Neurologie

Im zentralen Nervensystem werden *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK9* und *KLK14* koexprimiert. Die Proteine *KLK1*, *KLK6*, *KLK10*, und *KLK13* wurden ebenso im Epithel des *Plexus Choroideus* und anderen Zelltypen im zentralen und peripheren Nervensystem lokalisiert (Petraki *et al.*, 2001, Petraki *et al.*, 2002, Petraki *et al.*, 2003, Raidoo *et al.*, 1996). Eine Variante des *KLK8*-Gens wird vorzugsweise im erwachsenen Gehirn und im *Hippocampus* exprimiert (Mitsui *et al.*, 1999).

Die Forschergruppe um Diamandis *et al.* hat 2003 ein Review veröffentlicht, in dem die potentielle Rolle von Kallikrein-ähnlichen Proteasen im Zentralnervensystem diskutiert wird (Yousef *et al.*, 2003). Vermeintliche Funktionen für *KLK6* und *KLK8* wurden von den experimentell verifizierten Aktionen ihrer Nagetierorthologen extrapoliert. In Anbetracht der hohen Identität der Aminosäuresequenz zwischen humanem *KLK6* und *KLK8* und deren Nagetierorthologen (~70%), ist es denkbar, dass die Proteine eine ähnliche Aktivität aufweisen. Das Rattenortholog von *KLK6* beispielsweise, genannt Myelenzephalon-spezifische Protease (MSP), könnte eine Rolle bei der Regulation der Zentralnervensystem - demyelinisierenden Krankheit spielen (Scarisbrick *et al.*, 1997, Scarisbrick *et al.*, 2000, Scarisbrick *et al.*, 2001, Scarisbrick *et al.*, 2002), einschließlich der Entwicklung von Multiple Sklerose - Läsionen, während das Maus-Ortholog bei der Myelinisierung und dem Myelinumsatz involviert ist (Yamanaka *et al.*, 1999). Ebenso ist die menschliche Kallikrein-ähnliche Protease 6 an der Entstehung der Alzheimerkrankheit beteiligt, aufgrund ihrer Fähigkeit, *in vitro* das *Amyloid*-Vorläuferprotein zu spalten, und möglicherweise β -*Amyloid*-Peptide zu generieren (Little *et al.*, 1997, Magklara *et al.*, 2003). Es gilt als erwiesen, dass diese aggregieren und eine der pathologischen Hauptläsionen bilden, die die Alzheimerkrankheit charakterisieren. Zahlreiche Berichte deuten darauf hin, dass Mäuse- *KLK 8*/Neuropsin an der Synaptogenese, Nervenentwicklung (Suzuki *et al.*, 1995), Regulation von Langzeitpotenzierung und Anfällen bei Gehirnentzündung beteiligt sein könnte (Komai *et al.*, 2000, Oka *et al.*, 2002, Okabe *et al.*, 1996).

1.7.7 Zahnmedizin

Darüber hinaus könnte das menschliche Protein von KLK4 bei der Zahnentwicklung beteiligt sein. Während der Zahnschmelzausbildung, so nimmt man an, degradiert es das Zahnschmelzmatrixprotein basierend auf dem Expressionsmuster und der vermuteten Rolle seines Mäuse-/und Schwein-Orthologs (Hu *et al.*, 2000, Ryu *et al.*, 2002).

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Expression, Reinigung, Rückfaltung und biochemische Charakterisierung verschiedener Formen der Kallikrein-ähnlichen Protease 15 (KLK15). Für die Produktion der rekombinanten Proteine sollten zunächst entsprechende prokaryotische Expressionsplasmide generiert werden. Das erste Klonierungsmodell sollte der Herstellung einer synthetischen pro-Form von KLK15 mit einer Erkennungssequenz für das Enzym Enterokinase dienen. Ziel dieses Teilprojekts war die Erzeugung der maturen (aktiven) Form von KLK15 und ihrer Spleißvariante KLK15ntfl. Zur biochemische Charakterisierung der maturen Proteine sollten potentielle chromogene und fluorogene Substrate getestet werden.

Im zweiten Teilprojekt sollte die Produktion von pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl, der „natürlichen“ Vorstufe von KLK15 und ihrer Spleißvariante, mit dem „natürlichen“ pro-Peptid von 6 Aminosäuren ausgearbeitet werden. Da man bereits seit längerer Zeit die Existenz einer komplexen Verflechtung, sowohl zwischen den 15 Kallikrein-ähnlichen Proteasen untereinander, als auch mit anderen Enzymklassen im menschlichen Enzymnetzwerk vermutet, sollten mithilfe dieser pro-Enzymformen von KLK15 ihre potentiellen proteolytischen Aktivatoren ermittelt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide, die als *primer* für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt wurden, synthetisierte die Firma Metabion.

3.1.2 Vektoren

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Plasmide und deren abgeleitete Plasmide verwendet:

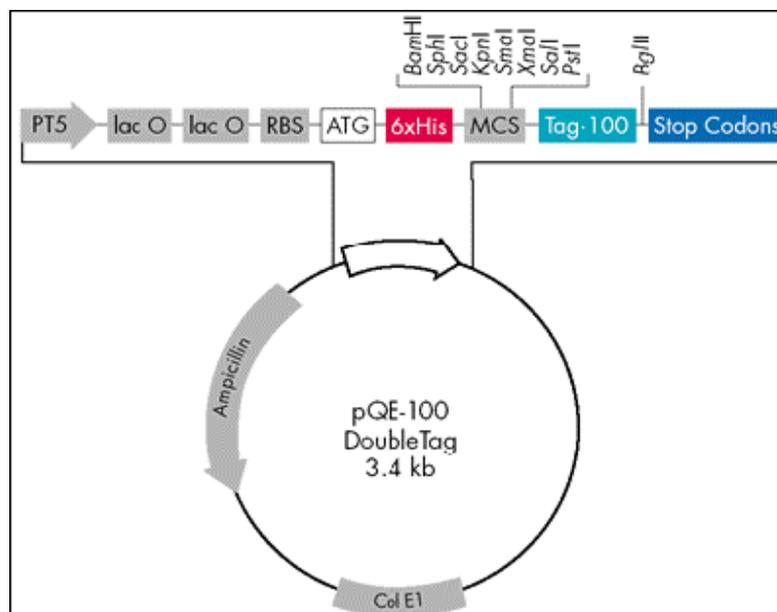


Abb. 9: Der Vektor pQE100 für die Klonierung der pro-Formen von KLK15 und KLK15ntfl. Schematische Darstellung der wichtigen Charakteristika des Vektors pQE100. Als Besonderheit enthält der Vektor ein Ampizillin-Resistenzgen, eine *multiple cloning site* zur Einfügung von DNA-Fragmenten sowie das *lac* Operator Gen in zweifacher Ausführung. Weiterhin sind zwei *Tags* vorhanden, der *Tag100* und der *6x His-Tag*. Die entsprechenden DNA-Sequenzen kodieren für Erkennungsstellen für Antikörper (*Tag100*), über die eine Identifikation bzw. Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgen kann. Der *6xHis-Tag* wird zur Reinigung des Proteins über Ni^{2+} -NTA-Agarose gebraucht. Die Abbildung wurde entnommen aus *QiaExpressionist handbook 2003*, S.24.

3. Material und Methoden

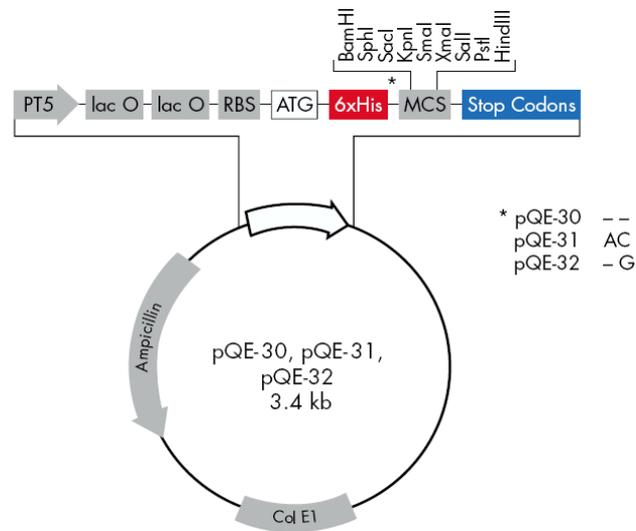


Abb. 10: Der Vektor pQE30 für die Klonierung der murenen Formen von KLK15 und KLK15ntfl. Schematische Darstellung der wichtigen Charakteristika des Vektors pQE30. Als Besonderheit enthält der Vektor ein Ampizillin-Resistenzgen und eine *multiple cloning site* zur Einfügung von DNA-Fragmenten. Weiterhin ist der 6x *His-Tag* vorhanden, der für die Bindungsstelle für Nickelionen kodiert, wodurch die Reinigung über eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule ermöglicht wird. Außerdem kann durch Antikörper gegen diesen 6x*His-Tag* das Protein beispielsweise in *Westernblot*-Analysen identifiziert werden. Die Abbildung wurde der Internetpräsenz der Firma Quiagen entnommen.

3. Material und Methoden

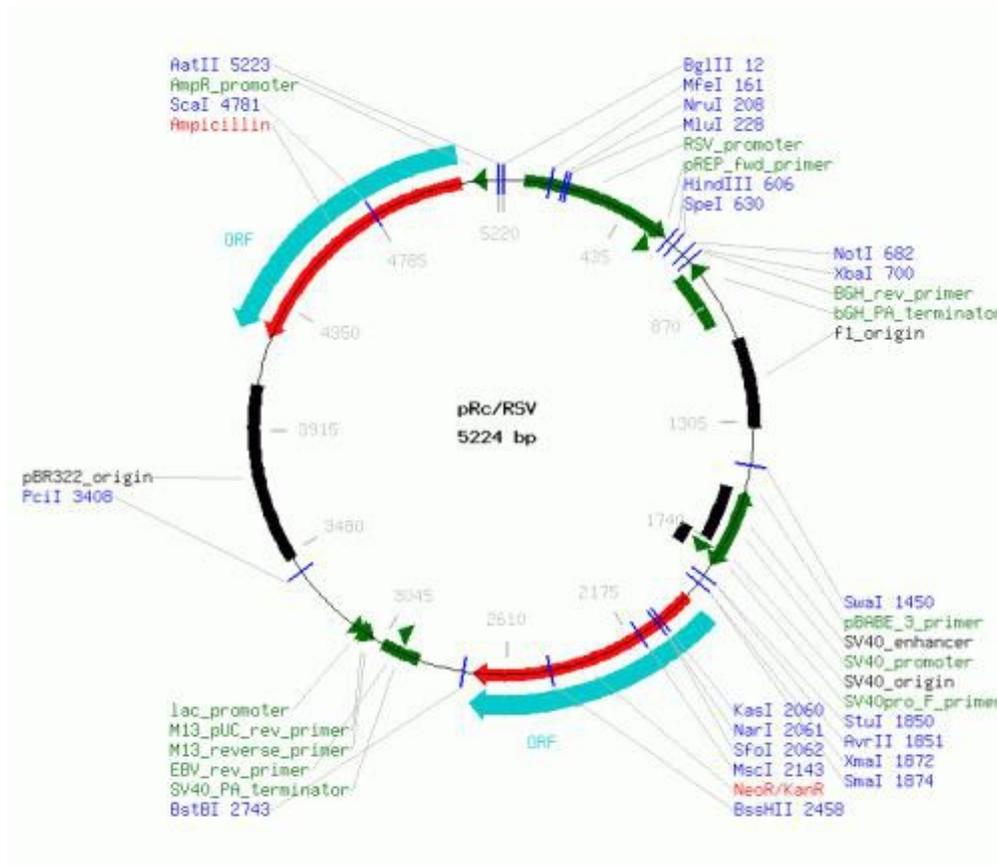


Abb. 11: Eukaryotischer Expressionsvektor pRc-RSV.

Das pRc-RSV Plasmid ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der eine *Enhancer*-Promotorsequenz vom Rousarcoma-Virus für eine starke Transkription enthält, ein Polyadenylierungssignal und Transkriptionsbeendigungssequenzen, um die Stabilität der RNA zu erhöhen, sowie ein Neomycin- oder Genetizinresistenzgen für die Selektion der Integration des Vektors ins Genom der transfizierten Zellen (Yamamoto *et al.*, 1980, Gorman *et al.*, 1982). Die Abbildung wurde der Internetpräsenz der Firma Lablife entnommen.

Die cDNA für die KLK-Proteasen wurde nach Präparation der mRNA aus Tumorgewebe von an Mamma- bzw. Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen und reverser Transkription in den pRcRSV Vektor ligiert (Dr. M. Debela, *Protein Research Group* des Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; P. Victorov und M. Valachova, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München). Daher waren zu Beginn dieser Arbeit die kodierenden Sequenzen der bearbeiteten KLK-Proteasen als cDNA in einem pRc-RSV-Vektor vorhanden.

3. Material und Methoden

3.1.3 Bakterienstämme

E. coli-Bakterien sind fakultativ anaerobe, gramnegative stäbchenförmige Bakterien, die auf Vollnährmedien oder in flüssigem LB-Medium angezüchtet werden. Es kamen folgende

E. coli-Bakterienstämme zur Verwendung (Firma Qiagen, Hilden):

- Stämme für allgemeine Klonierungsarbeiten: *E. coli* XL1 *blue* von Stratagene

(Bullock *et al.*, 1987)

- Expressionsstämme: *E. coli* M15 [pREP4] von Qiagen (Zamenhof und Villarejo, 1972)

Der *E. coli* Stamm M15[pRep4], der sich aus der K12 Familie herleitet, weist den Phänotyp Nal^{S} , Str^{S} , Rif^{S} , Thi^{-} , Lac^{-} , Ara^{+} , Gal^{+} , Mtl^{-} , F^{-} , RecA^{+} , Uvr^{+} und Lon^{+} auf. Er enthält das pREP4 Repressorplasmid, welches für Kanamycinresistenz kodiert und vor allem das *lac* Repressorprotein exprimiert. In Kombination mit dem pQE Expressionsvektor kann der *E. coli* Stamm M15[pRep4] für die Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden.

3.1.4 Medien

2x TY-Medium	1,6 % Trypton
	1 % Hefeextrakt
	0,5 % NaCl
	1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$; pH7 einstellen
	umgehend autoklavieren
LB-(Luria-Bertani) Medium	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
	1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$; pH7 einstellen
	umgehend autoklavieren

Damit auf eine Antibiotikaresistenz selektiert werden konnte, wurden den Medien nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotikallösungen zugesetzt. Je nach Resistenzgen der Plasmide wurden Ampizillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Kanamycin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet, beides von Sigma.

3.1.5 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden in der gewünschten Reinheit von den Firmen peqLAB, Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

3. Material und Methoden

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten (*Taq*-Polymerase, Ligase, Restriktionsendonukleasen) wurden von der Firma NEB und peqLAB bezogen.

DNA-Längenstandards

DNA-Leiter	1 kb peqLAB Biotechnologie GmbH
Proteinstandards	
<i>Protein molecular weight marker</i>	
1,4 mg/ml No.I und IV	peqLAB
<i>Nucleo-Spin Plasmid Purification-Kit</i>	Macherey-Nagel
Dialyseschläuche	SPECTRUM, <i>spectra/por</i> <i>molecularporous membranes</i>
Rekombinante Enterokinase	Novagen
Chromogene Serinproteasen-Substrate	Bachem, Americas Inc.,Torrance, USA
Fluorogene Serinproteasen-Substrate	Bachem, Americas Inc.,Torrance, USA

3.1.6 Geräte

3.1.6.1 PCR-Geräte

Mini Cyclor TM (MJ Research)
PERKIN ELMER gene amplification PCR system 2400

3.1.6.2 Zentrifugen

Varifuge RF (Heraeus sepatech)
Eppendorfzentrifuge 5415C
Beckman-Avanti™30 Zentrifuge
Speed-vac Zentrifuge *savant* SVC100

3.1.6.3 Sonstige Geräte

pH-Meter (Schott)
Eppendorf-Photometer
Waage *Sartorius* BP 1200
Heizblock: Eppendorf Thermomixer 5436
Electrophorese: BioRad - *model* 1000/500 *power supply Mini-Protean II*

3. Material und Methoden

- *Consort E 865*
- *BluePower 3000/500 Serva*

UV-Licht: Biometra TII

Blotting-apparatus: Biometra, biomedizinische Analytik, Göttingen, Deutschland

SLT SPECTRA ELISA Reader Spectra II

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Analysen

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) ist eine *in vitro*-Technik, mit der DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, nach dem Prinzip der DNA-Replikation gezielt millionenfach vervielfältigt werden können. Sie ermöglicht die Amplifizierung spezifischer Genabschnitte, auch bei sehr geringer Menge an Ausgangsmaterial.

Drei Grundkomponenten bilden das Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktion: die DNA, das Enzym *Taq*-Polymerase und die *primer*. Die einzelsträngige DNA stellt die Matrize („*Template*“) für die Neusynthese eines zu ihr komplementären Stranges dar. Das Enzym *Taq*-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Lawyer *et al.*, 1989) und ist eine DNA-abhängige Polymerase. Sie eignet sich wegen ihrer Hitzebeständigkeit hervorragend für den temperaturabhängigen Syntheszyklus (Mullis und Faloona, 1987).

Um DNA amplifizieren zu können, benötigt sie als Starthilfe einzelsträngige DNA-Moleküle (*primer*), die komplementär zu einem Stück DNA-Matrize sind. Für *KLK15* und *KLK15ntfl* wurden jeweils zwei Oligonukleotid-*primer* entworfen, deren Sequenzen den Anfang- bzw. Endsequenzen der jeweiligen pro-KLK Protease komplementär entsprachen. Diese *primer* hybridisieren an beiden Seiten des interessanten DNA-Abschnitts und limitieren so den zu vervielfältigenden Abschnitt beidseitig. Nach deren Anlagerung verlängert die DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) dATP, dGTP, dTTP und dCTP sowie Magnesiumionen die *primer* und synthetisiert so einen neuen Komplementärstrang entlang der ursprünglichen Einzelstrangsequenz. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 94 °C zu Einzelsträngen („*denaturation*“). Als Zweites wird die Temperatur auf ein *primerspezifisches* Niveau abgesenkt, bei dem sich die *primer* optimal an die jeweiligen Einzelstränge anlagern können („*annealing*“). Je besser die Basenpaarungen übereinstimmen, desto stärker ist die Bindung und somit auch die Spezifität, jedoch nur, bis die Schmelztemperatur von *primer* und Zielsequenz erreicht ist. Deshalb wählt man bei Standard-PCRs meist eine Temperatur, die circa 3 °C unter der errechneten Schmelztemperatur liegt, damit ein *annealing* der *primer* an die Zielsequenz sichergestellt ist. Die Temperatur, bei der 50% der *primer* in Lösung sind und 50% gebunden vorliegen, wird als T_m bezeichnet. Für den *primer* F1 betrug diese 37 °C, für F2 52 °C und für F3 54

3. Material und Methoden

°C. Diese *Annealing*- bzw. Hybridisierungstemperatur ist von großer Bedeutung, denn sie kann die Spezifität der Reaktion enorm beeinflussen. Ist die Temperatur zu hoch, hybridisieren die *primer* nicht an die DNA. Ist sie zu niedrig gewählt, entstehen unspezifische Hybride, in denen Basen fehlgepaart sind. Schließlich werden bei 72 °C die komplementären Stränge durch die hitzebeständige *Taq*-Polymerase amplifiziert ("*Elongation*"). Dieser dreistufige Zyklus verläuft repetitiv und ergibt eine exponentiell ansteigende Zahl von PCR-Produkten, deren Spezifität abhängig von der Matrix, dem Aufbau der *primer*, der *Annealing*-Temperatur und der Elongationszeit ist. Der Kreislauf von Denaturierung, Hybridisierung und Synthese wird in der Regel zwanzig- bis dreißigfach wiederholt.

Danach liegt das gewünschte DNA-Fragment in mehreren hundert Millionen Exemplaren vor.

Puffer und Lösungen:

Template: RSV Plasmid - DNA von *KLK15* und *KLK15ntfl*

primer:

-Oligoname *KLK15*-F1 (Metabion):

5'-ATG ACA AGT TGC TGG AAG GTG ACG A-3'

-Oligoname *KLK15*-F2 (Metabion) -> Enterokinase – Spaltestelle *DDDK*:

5'-GAT GAC GAT GAC AAG TTG CTG GAA G-3'

-Oligoname *KLK15*-F3-BEK (Metabion) -> *Bam HI* - Erkennungssequenz:

5'-ATC TGG ATC CGA TGA CGA TGA CAA GTT G-3'

-Oligoname *KLK15*-RH (Metabion) -> *Hind III* - Erkennungssequenz:

5'-ATT ACA AGC TTT CAG TTC CTC TTC ATG-3'

Durchführung

Um ein Endvolumen von 50 µl zu erreichen, wurden folgende Lösungen zusammengemischt:

H ₂ O	14 µl
<i>primer</i> <i>KLK15</i> -F1	3 µl
<i>primer</i> <i>KLK15</i> -RH	3 µl
dNTP	4 µl
Plasmid-DNA verdünnt	1 µl
<i>PCR-Mastermix</i> :	
H ₂ O	42 µl
10x Reaktionspuffer mit Mg ²⁺ (PeqLab)	12 µl
Pwo-DNA-Polymerase	6 µl

3. Material und Methoden

Von diesen 60 µl *PCR-Mastermix* wurden je 25 µl dem Reaktionsgemisch mit KLK15 und KLK15ntfl zupipettiert, um ein Endvolumen von 50 µl zu erreichen.

Bei dem verwendeten DNA-Material (*Template*) handelte es sich um KLK15 und KLK15ntfl, die zuvor in den pRc-RSV-Vektor ligiert worden waren. Die eingesetzte Menge betrug 470 ng/µl pRcRSV von KLK15 und 190 ng/µl pRcRSV von KLK15ntfl.

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl befanden sich folgende Reagenzien in den angegebenen Endkonzentrationen: 2,5 U Pwo-Polymerase, 1/10 Volumen 10x Reaktionspuffer komplett mit Mg²⁺, 0,25 µM 5'-*primer*, 0,25 µM 3'-*primer*, dNTP 2,5 mM und die verdünnte Plasmid-DNA der *Templates* (9,4 ng/µl KLK15 bzw. 3,8 ng/µl KLK15ntfl). Das Pipettieren des Reaktionsansatzes erfolgte an der Arbeitsbank auf Eis. Da die PCR-Maschine einen integrierten Heizdeckel besitzt, konnte auf die Abdeckung des PCR-Ansatzes mit Öltröpfchen als Verdunstungsschutz verzichtet werden. Die Amplifikation der DNA wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (**Tab. 1**):

Beginn	Denaturierung bei 94 °C	3 min
10 Zyklen	Denaturierung bei 94 °C	20 sek
	<i>Annealing</i> bei 37 °C	30 sek
	Elongation bei 72 °C	45 sek – 2 min
15 Zyklen	Denaturierung bei 94 °C	20 sek
	<i>Annealing</i> bei 52 °C	30 sek
	Elongation bei 72 °C	45 sek – 2 min
Ende	Verlängerte Elongation bei 72 °C	7 min

Tab. 1: Bedingungen, unter denen die Polymerasekettenreaktion durchgeführt wurde.

Das fertige PCR-Produkt wurde mittels 1% Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Die Agarose bildet nach dem Abkühlen ein dreidimensionales Maschenwerk.

In einem elektrischen Feld verlangsamt sie die Wanderung der negativ geladenen DNA zur Anode größenabhängig. Aufgrund dieses Maschenwerks bewegen sich die kürzeren DNA-Stränge schneller auf den Pluspol zu als die längeren DNA-Stränge.

Ethidiumbromid (EtBr) wird als interkalierende Substanz zur Anfärbung von Nukleinsäuren verwendet. Wird es ultraviolettem Licht ausgesetzt, fluoresziert es in orangeroter Farbe, die sich bis

3. Material und Methoden

zu zwanzigfach verstärkt, nachdem es sich an DNA gebunden hat. Da es an DNA bindet, ist Ethidiumbromid ein sehr starkes Mutagen, und kann karzinogene und teratogene Auswirkungen haben.

Puffer und Lösungen:

1x TBE-Puffer:	90 mM Tris
	90 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA pH 8,3
Ethidiumbromid	10 µg/ml in H ₂ O <small>bidest</small> (karzinogen)
5x DNA-Auftragspuffer	0,1% Bromphenolblau
	0,1 % Xylenzanol
	30% Glyzerin
	5% 20x TBE-Puffer

Durchführung

Der Agaroseanteil wurde nach Größe der aufzutrennenden DNA bemessen und betrug 1%.

So wurde zu 40 ml 1x TBE-Puffer 0,4 g Agarose gegeben, diese bei 100 °C gekocht und unter Rühren langsam auf 50 °C abgekühlt. Nach Hinzupipettieren von 10 µl Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung im lauwarmem Zustand in eine Gelkammer gegossen und die Taschenkämme eingesetzt.

Das erhärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit 1x TBE-Puffer befüllt, bis das Gel davon bedeckt war.

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit dem Auftragspuffer vermischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Um später die Größe der DNA-Fragmente richtig abschätzen zu können, wurde ein DNA-Marker aufgetragen, dessen Banden einer exakten Basenpaarlänge zugeordnet werden können. Die Elektrophorese lief bei 100 Volt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm konnte das Ergebnis mit einer *Polaroid*-Sofortbildkamera aufgenommen werden.

3.2.1.3 Reinigung der amplifizierten DNA

Das amplifizierte PCR-Produkt enthält neben der erwünschten DNA auch eine beträchtliche Menge an unerwünschter DNA, Proteinen, Enzymen und Salzen. Um eine möglichst reine und hoch konzentrierte DNA zu erhalten, müssen diese Verunreinigungen beseitigt werden.

3. Material und Methoden

Die Phenol-Chloroform-Isoamyl-Fällung stellt ein gängiges Verfahren dar, Proteine aus DNA-haltigen Lösungen abzutrennen. Phenol denaturiert Proteine, während es mit Nukleinsäuren nicht interagiert und löst sich in Chloroform sehr viel besser als in Wasser.

Durch den Zusatz von Chloroform wird größtenteils verhindert, dass Phenolreste in der wässrigen DNA-haltigen Phase zurückbleiben und nachfolgende Reaktionen stören könnten. Zunächst muss man PCI und DNA vortexen. Phenol-Chloroform-Isoamyl (PCI) bildet die untere organische Phase, nachdem es mit der wässrigen DNA-Lösung gemischt wurde. Nach Zentrifugation erscheint die DNA in der wässrigen Phase, während Proteine in der organischen Phase und zwischen beiden Phasen verbleiben. So können beispielsweise Bestandteile einer PCR oder eines Restriktionsansatzes entzogen werden.

Nach der PCI-Extraktion wird die obere, wässrige Phase abgenommen und in einem neuen Gefäß mit EtOH gemischt, um die DNA zu fällen. Dies ist nötig, um Phenolreste von der DNA zu trennen. Diese bleiben nach Zentrifugation im Überstand.

Durchführung

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 4M LiCl versetzt (EV:190 µl) und im Verhältnis 1:1 mit PCI (25:24:1) unter dem Abzug aufgefüllt, für 20 Sekunden gevortext und bei 13 000 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig unter dem Abzug in ein neues Gefäß abpipettiert, und 2 Volumina (=380 µl) 100% EtOH zugefügt. Nach 10 Minuten auf Eis wurde die DNA bei 4 °C abzentrifugiert (15 Min bei maximaler Geschwindigkeit). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und danach die DNA in der „Speed Vac“-Zentrifuge getrocknet.

Verdau mit Proteinase K

Eine einmalige PCI-Extraktion reicht nicht aus, um die DNA von allen Proteinen zu reinigen. Daher erfolgte anschließend der Verdau mit dem Enzym Proteinase K, einer Serinprotease, welche peptidische Bindungen spaltet und damit Polypeptide zu kleineren Oligopeptiden abbaut, die sich dann in einer zweiten PCI-Behandlung leichter entfernen lassen.

Durchführung

Für ein DNA-Volumen von 190 µl wurden je Ansatz folgende Substanzen benötigt:

10 x Proteinase K Puffer	20 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	4 µl

3. Material und Methoden

Hierzu wurden je 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) zu den 190 µl DNA-Lösung pipettiert und bei 37 °C eine halbe Stunde inkubiert. Im Anschluß wurde die DNA noch für 10 min im Heizblock bei 68 °C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren.

Nun erfolgte die zweite Phenol-Chlorophorm-Isoamyl-Behandlung, wie oben beschrieben, um Oligopeptide und Proteinase K wieder zu entfernen.

Ethanol-fällung

Eine DNA-Fällung mit Ethanol wird angewendet, um eine stark verdünnte DNA zu konzentrieren, zur Aufreinigung nach PCI-Extraktion oder um niedermolekulare Bestandteile zu entfernen.

Durchführung

Im Anschluß wurden daher 0,1 Volumina der wässrigen Phase 4 M Lithiumchlorid zugegeben sowie 2 Volumina 100% Ethanol, gemischt und für 10 min auf Eis stehen gelassen.

Der Niederschlag wurde bei 13 000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zweimal jeweils mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen, wobei vor dem Entfernen der Waschlösung wieder einige Minuten zentrifugiert wurde.

Das in der „Speed- Vac“-Zentrifuge getrocknete Pellet wurde schließlich in 100 µl H₂O_{bidest} pH8 gelöst.

3.2.1.4 Restriktion der DNA

Eine Restriktion ist ein Vorgang, bei dem doppelsträngige DNA von spezifischen Restriktionsendonukleasen an Stellen mit bestimmter Erkennungssequenz zerschnitten wird.

So können Plasmide auf ihre Größe oder das Vorhandensein eines inklonierten Fragments überprüft werden. Durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese werden die geschnittenen DNA-Stücke auf ihre Größe und ihr Schnittmuster überprüft.

Bei der Klonierung werden der Vektor und das 5'- und 3'- Ende des einzuklonierenden Fragments mit zwei unterschiedlichen Enzymen geschnitten. Wird das Fragment dann in den Vektor eingefügt, so ist durch die verschiedenen Schnittsequenzen seine Richtung bereits vorbestimmt.

Durchführung

Für den Restriktionsansatz wurden 172 µl mit H₂O_{bidest} verdünnte DNA mit je 3 µl Restriktionsendonuklease *Bam HI* und *Hind III*, 20 µl 10x Puffer sowie 2 µl bovinem

3. Material und Methoden

Serumalbumin (100x) für 3 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert (=200 µl Gesamtvolumen). Danach wurde die DNA mit 1/10 Volumen 4 M LiCl versetzt und mit 2 Volumina 100% EtOH gefällt.

Nach der Ethanolfällung wurde ein präparatives Agarosegel angefertigt.

Die benötigten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Aufreinigung in ein Reaktionsgefäß (*Costar Centrifuge Tube Filter, non-sterile* 8161) transferiert. Um die DNA von den Agarosemolekülen zu befreien und letztendlich zu eluieren, wurde das Gefäß je dreimal hintereinander für 20 min bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Schließlich wurde die DNA bei 10 000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und das Filtrat durch eine Phenol-Chlorophorm-Isoamyl-Extraktion gereinigt. Es folgte eine Behandlung mit 3 Volumina 100% Ethanol und 0,02 Volumen 1M Magnesiumchlorid in 10% Essigsäure für 20 min bei -20 °C sowie ein Waschschrift mit 70% Ethanol mit Zentrifugation über 5 min bei 4 °C und zuletzt wurde die DNA in der „*Speed-vac*“- Zentrifuge getrocknet.

3.2.2 Ligation

Das Enzym DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Einklonierung von Fragmenten in einen Vektor zunutze. Für diese Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von NewEnglandBiolabs (NEB) verwendet.

Lösungen und Puffer:

Für den Reaktionsansatz von 21 µl wurden folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

Vektor pQE30	1 µl (100ng)
Qiagen, Hilden	
<i>Insert KLK15FL/ntfl</i>	12 µl (300 ng)
10x Ligationspuffer	600 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ 10 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) pH 7,5; 2 µl
10 mM ATP	3 µl
T4-DNA-Ligase von NEB (5U/µl)	1 µl

Durchführung

Vor der Ligation wurden die DNA-Konzentrationen der verschiedenen pQE30-Plasmide und der *KLK15*- und *KLK15ntfl*-Fragmente mithilfe eines Agarosegels verglichen. Das molare Verhältnis von Vektor zu *Insert* sollte 1:3 bis 1:5 betragen (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Konzentrationsabschätzung von Vektor und *Insert* erfolgt durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten im Agarose-Gel. Da die Anwesenheit energiereicher Phosphate unabdingbar ist, wurde der Reaktion zusätzlich ATP zugefügt. Die in TE-Puffer gelöste DNA und der Vektor pQE30 wurden auf Eis mit Ligationspuffer, ATP und T4-DNA-Ligase gemischt und für 3,5 h bei 25 °C im Wasserbad inkubiert.

3.2.3 Transformation

Als Transformation wird die Übertragung einer DNA, z.B. eines Plasmids in eine Bakterienzelle bezeichnet. Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um *E. coli* wirksam zu transformieren, muß man die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit, DNA aufzunehmen, verstärkt. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, werden als *kompetent* bezeichnet.

Der Stamm „X11 *blue*“ enthält ein Plasmid mit einem Tetrazyklin-Resistenzgen, welches eine Selektion des Stammes auf dieses Antibiotikum erlaubt. Der für die spätere Expression verwendete Bakterienstamm *E. coli* „M15“ enthält bereits ein Plasmid, das ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin trägt. Der Vektor pQE30 trägt ein Ampizillinresistenzgen zur Selektion.

Lösungen und Puffer:

Kompetente Zellen	<i>E. coli</i> „X11 <i>blue</i> “ (Lagerung bei -80 °C)
TE	10 mM Tris-HCl pH8 1 mM EDTA
2x TY-Medium	
LB-(Luria-Bertani) Medium	
LB-Agarplatten	1,5 % Baktoagar (15g/l LB-Medium), autoklavieren
Ampizillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest} (-20 °C), im Medium 100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O _{bidest} (-20 °C), im Medium 25 µg/ml

Durchführung

50 µl von kompetenten *E. coli* „X11 blue“ Zellen wurden langsam (15 min) auf Eis aufgetaut.

Nach Zugabe von 8 µl Ligationsansatz und 17 µl TE wurden die Zellen für 25 min auf Eis inkubiert und danach bei 37 °C für genau 105 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt.

Es folgte eine Abkühlung der Zellen für 5 min auf Eis. Im nächsten Schritt wurden 1 ml 2x TY-Medium zugegeben und die Suspension nach sanftem Mischen bei 37 °C im Heizblock für die Regenerationsphase über eine Stunde inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 6000 rpm für 1 min wurde das meiste des Überstands verworfen und die verbliebenen 200 µl der Zellsuspension mit einem abgeflamten Spatel auf Ampizillin enthaltende LB-Agarplatten ausplattiert.

Am nächsten Tag wurden die im Brutschrank bei 37 °C gewachsenen Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium, das 100 µg/ml Ampizillin enthielt, über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.2.3.1 Extraktion und Aufreinigung von DNA

Zur Reinigung der Plasmid-DNA züchtet man eine Kultur der plasmidhaltigen Bakterien in Flüssigmedium. Die Zellen werden von Proteinen und RNA gereinigt und enthalten nach diesem Schritt Plasmid-DNA und chromosomale DNA, die in der Bakterienzelle unabhängig voneinander vermehrt werden. Diese zwei Arten von DNA gilt es zu trennen. Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen werden die Verfahren der Minipräparation und der Anionenaustausch-Plasmidaufreinigung benutzt. Ihnen allen liegt das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) mit NaOH zugrunde. Durch Zugabe einer 2,6 M Kaliumazetatlösung werden nachfolgend Zelltrümmer, Proteine und SDS ausgefällt und mittels Zentrifugation entfernt.

Im anschließenden Teil wird der Vorgang der Minipräparation exemplarisch abgehandelt.

Die zur DNA-Aufreinigung eingesetzten Fertigkits weisen modifizierte Formen der alkalischen Lyse auf und sind zusätzlich mit Schritten der Hochaufreinigung mit Anionenaustauschersäulen kombiniert. Die gewonnene DNA besitzt ein hohes Maß an Reinheit und kann sequenziert werden.

Durchführung

Da das Plasmid pQE100 ein sogenanntes *low copy plasmid* ist, wurden für die Plasmid-Präparation anstelle der üblichen 1,5 ml Übernachtskultur 3-4 ml eingesetzt. Die Plasmid-Isolation erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid Isolation Kit* der Firma Macherey-Nagel. 4 ml der *E. coli*-Kultur wurden 30 Sekunden bei 11 000 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde nach Angaben des Herstellers mit den verschiedenen Puffern versetzt, mehrfach inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine *NucleoSpin*-Plasmid-Säule

gefüllt, die zuvor in einem Sammeltube platziert worden war. Die *NucleoSpin*-Plasmid-Säule enthält eine *Silika*-Membran, an die die DNA bindet. Diese *Silika*-Membran wurde in mehreren Schritten gewaschen und getrocknet, bevor mittels eines speziellen Elutionspuffers die DNA von der Membran gelöst wurde. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse (*Bam HI* und *Hind III*) und Agarosegelelektrophorese auf Vorhandensein eines *Inserts* mit der richtigen Größe untersucht. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, bevor die Plasmid-DNA zur Sequenzierung geschickt wurde.

3.2.3.2 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Aromatische Ringsysteme der DNA-Moleküle können Lichtwellen im Bereich von 220-320 nm absorbieren. Diese Eigenschaft macht man sich bei der spektralphotometrischen Messung von DNA zunutze. Das Extinktionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm.

In eine Quarzküvette werden nach Leerwert Eichung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 5 μl der DNA-Lösung (mit 95 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt) gegeben, diese dem Strahlengang in einem Eppendorf-Photometer ausgesetzt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Auswertung der ermittelten Absorptionswerte werden folgende Zusammenhänge benutzt:

Für Doppelstrang-DNA gilt: $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA

$$c_{\text{DNA}} = \frac{\text{gemessene OD}_{260} \cdot 50 \mu\text{g}}{V_{\text{Probe}}}$$

Gerät: Eppendorf-BioPhotometer (Firma Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf)

Zur Kontrolle der Reinheit der DNA-Proben werden Absorptionsspektren bei Wellenlängen von 100-400 nm gemessen und Verhältnisse der Absorptionswerte bestimmter Wellenlängen gebildet: E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} . Diese Quotienten sind bei Verunreinigungen der Probe durch Protein oder RNA verändert.

Durchführung

Von den in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelösten DNA-Präparaten wurden 5 μl zur spektralphotometrischen Bestimmung in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 μl aufgefüllt. Diese DNA-Lösung wurde in Quarzküvetten überführt.

3.2.3.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen für dieses Projekt wurden von der Firma Medigenomix in Martinsried durchgeführt. Die Sequenzierung ermöglicht die genaue Feststellung der Basenfolge von Abschnitten doppel- und einzelsträngiger DNA. Hierfür stehen Methoden zur Verfügung, die entweder radioaktive oder fluoreszierende Marker zur Detektion benutzen. Die Sequenzierung mittels Fluoreszenzfarbstoff markierter *Didesoxyanaloga* beginnt mit dem *primer*initiierten DNA-Syntheseprozess, bei dem zu den normalen Basen dATP, dTTP, dCTP und dGTP zusätzlich die 2',3'-*Didesoxyanaloga* der vier Basen gegeben werden. Nach deren Einbau kommt es zu einem Abbruch der Strangsynthese, da am 3'-Ende die Hydroxylgruppe für die Phosphodiesterbindung mit einem energiereichen Phosphat und damit dem Einbau einer neuen Base fehlt. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe, die in einem Sequenziergel aufgetrennt werden. Da jede *Didesoxy*-Base mit einem Farbstoff markiert ist, der bei Anregung Licht einer anderen Wellenlänge aussendet, können die nach ihrer Größe im Gel aufgereihten Fragmente mit einem Laser abgetastet und die Maxima der Lichtemissionen mit einer Photoelektrode gemessen werden. Die Abfolge der Maxima der vier unterschiedlichen Wellenlängen gibt genauen Aufschluß über die Basensequenz.

Die gewonnene Sequenzinformation wird anschließend einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Die finale Sequenz kann anschließend mit den bereits aus Datenbanken bekannten DNA-Sequenzen verglichen und einer genauen Sequenzanalyse unterzogen werden.

3.2.4 Produktion von rekombinanter KLK15 und KLK15ntfl sowie pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl

3.2.4.1 Expressionsanalyse

Der verwendete Vektor pQE30 enthält neben dem Gen für Antibiotikaresistenz, der *multiple cloning site* (MCS) und dem Histidin-Tag u.a. auch den *lac*-Promoter. Dieser enthält zwei Operator-Stellen, die als Bindungsstellen für den *lac*-Repressor dienen. In Gegenwart des Repressors findet keine Transkription statt, da erst nach Zugabe von IPTG, welches an den Repressor bindet (wodurch dieser nicht mehr an den Operator gebunden ist), die Induktion der Transkription erfolgt. Auf diese Weise wird die Expression des gewünschten Proteins optimal reguliert und eine maximale Ausbeute gewährleistet.

Lösungen und Puffer:

Kompetente Zellen

E. coli "M 15"^{cc}[pREP4]

3. Material und Methoden

	(Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH8 einstellen
2x TY-Medium	
LB-(Luria-Bertani) Medium	
Ampizillin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
Kanamycin	25 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	1 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Durchführung

Die DNA zur Expression von KLK15/ntfl bzw. analog pro-KLK15/ntfl wurde in *E. coli* "M15" kompetente Zellen transformiert (siehe dazu Kapitel 3.2.3) und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 5 μl Ampizillin (100 mg/ml) und 5 μl Kanamycin (25 mg/ml) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Für die Expressionsanalyse von KLK15 wurden pro Klon je zwei Röhren angesetzt, die 3 ml 2xTY-Medium sowie Ampizillin und Kanamycin enthielten. Diesen Röhren wurde je 150 μl von der Übernachtskultur zugesetzt und sie wurden dann für 1-1,5 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,6$ wurde einem der beiden Röhren 6 μl 1 M IPTG zur Induktion der Expression zugesetzt und alle Röhren weitere 4 h geschüttelt. Danach wurden die Zellen geerntet, der Überstand nach Zentrifugation verworfen und die Pellets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Am folgenden Tag wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung aller Bakterienproteine durchgeführt.

3.2.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli *et al.*, 1970). So können komplexe Proteingemische analysiert werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat), S-S reduzierenden Mitteln und durch Erhitzen werden diese vollständig denaturiert.

SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass nur noch das Molekulargewicht die Laufgeschwindigkeit der Proteine beeinflusst.

3. Material und Methoden

Die Proteine wandern dabei im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, die von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid gebildet wird. Sind freie Radikale anwesend, so bildet Acrylamid lange Polymere, die mit Hilfe von Bisacrylamid vernetzt werden. Als Katalysator der Reaktion wird TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) eingesetzt, als Radikalbildner dient Ammoniumperoxodisulfat. SDS ist ein Detergens mit stark negativ geladenen Molekülen. Es lagert sich so an das Polypeptidgerüst der Proteine an, dass diese denaturieren, und es entstehen Komplexe, die durch die Sulfatgruppen gleichmäßig negativ geladen sind. Durch ein kurzzeitiges Erhitzen der Proben auf 95 °C werden die Wasserstoffbrücken der Proteine aufgespalten und so die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Moleküle gelöst. Weiterhin werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, hier 2-Mercaptoethanol, Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen gespalten, was einem Auflösen der Quartärstruktur entspricht. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist somit nicht mehr von ihrer elektrischen Ladung im nativen Zustand, sondern nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig. Je nach der erwarteten Größe der Proteine kann die Porengröße durch unterschiedliche Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentrationen variiert werden. Das Gel besteht aus zwei Anteilen, Sammelgel und Trenngel, die sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Proteine wandern zunächst schnell und ohne Auftrennung durch das großporige Sammelgel. Sobald die Grenzfläche zum Trenngel erreicht ist, verringert sich die Geschwindigkeit stark und die Proteine werden konzentriert, was in scharfe Banden bei der Gelelektrophorese resultiert. Nach Eindringen in das Trenngel verhält sich die Geschwindigkeit der Proteinwanderung nun der Molekularmasse entsprechend.

Lösungen und Puffer:

SDS-PAA-Trenngel 12 %ig

Acrylamid Stammlösung 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
(Lagerung bei 4 °C)

Trenngelpuffer 1,5 M Tris, pH 8,8 mit HCl (0,375 M Endkonzentration
im Gel)
10 % SDS (0,1 % Endkonzentration im Gel)

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris, pH 6,8 mit Hcl (0,129 M Endkonzentration im Gel)
10 % SDS, davon 1/100 Vol. = 0,1 % Endkonzentration

APS 10 % Ammoniumpersulfat
(Lagerung bei -20 °C)

TEMED (Lagerung bei Raumtemperatur)

3. Material und Methoden

Laufpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glyzin 0,1 % SDS (Lagerung bei Raumtemperatur)
3-fach-reduzierender Probenpuffer	30 % Glyzerin 6 % 2-Mercaptoethanol 6% SDS 4,8 ml Sammelgelpuffer pro 10 ml 0,05 % Bromphenolblau (Lagerung bei -20 °C)

Durchführung

Herstellung der Gele

In dieser Arbeit wurden Vertikalgele (8 cm x 10 cm x 1mm) eingesetzt, die aus einem 12%igen Trenngel, überschichtet von einem 5%igen Sammelgel, bestanden. Die Prozentangabe bezieht sich dabei auf den Polyacrylamid-Anteil. Die Gele werden zwischen zwei abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten der Firma BioRad (durch "*Spacer*" getrennt) gegossen. Ein 12 %iges Trenngel wurde so zwischen die Glasplatten gefüllt, dass die oberen 2 cm frei blieben, um es mit 0,5 %iger SDS-Lösung zu überschichten. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde die SDS-Lösung abgegossen und Reste vollständig entfernt. Ca. 3 ml der Sammelgel-Stammlösung wurden mit 50 µl APS und 10 µl TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen, und ein Probenkamm wurde eingesetzt, was dazu führte, dass sich nach dem Polymerisieren oben mehrere Taschen bildeten, worin die Proteinlösungen aufgetragen werden konnten. Nach Aushärten des Gels wurde es mitsamt den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Puffer befüllt. Der Probenkamm wurde entfernt und die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert.

Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden zuvor mit dreifach reduzierendem SDS-Probenpuffer versehen und für 5 Min bei 95 °C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der peqLAB Gold Protein-Marker mitgeführt. Die Elektrophorese unter Verwendung des SDS-Laufpuffers erfolgte bei 100-160 Volt pro Gel für 45 bis 70 min. Anschließend wurden die Gele mit PAGE-Fixierer (15 min), PAGE-Coomassie-Färber (2 h) und PAGE-Entfärber (24 h) behandelt, um die Banden der aufgetrennten Proteinmischung zu visualisieren. Zur Dokumentation wurden die Gele digitalisiert und

anschließend zur Dehydrierung zwischen zwei Zellophanfolien eingespannt.

3.2.4.3 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Nach der Auftrennung der Proteine können diese direkt im Gel gefärbt werden.

Der meistverwendete Farbstoff ist Coomassie *brilliant blue*. Mit diesem Farbstoff kann eine Nachweisempfindlichkeit von 1 µg bis 0,1 µg erreicht werden (nach Weber und Osborn, 1969).

Lösungen und Puffer:

Fixierlösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure mit H ₂ O _{bidest} auffüllen
Coomassie Färbung	0,1 % <i>brilliant blue</i> R (Coomassie) 10 % Essigsäure mit H ₂ O _{bidest} auffüllen 30 min bis 4 h rühren, filtrieren
Entfärbe-Lösung	10 % Essigsäure mit H ₂ O _{bidest} auffüllen
Dehydrierlösung	25 % Ethanol 5 % Glycerin mit H ₂ O _{bidest} auffüllen

3.2.4.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode zur Proteinfärbung, die Nachweisgrenze liegt bereits im Bereich von einigen Nanogramm. Proteine gehen mit dem „*Farmer's Reducer*“ eine Wechselwirkung ein. Bei Hinzufügen der Silbernitratlösung entstehen durch Reduktion der Silberionen an den Proteinbanden Silberkeime. Das Silbersalz an den Silberkeimen wird durch anschließendes Waschen mit der reduzierenden Entwicklerlösung zu elementarem Silber reduziert und die Proteinbanden werden sichtbar (Rabilloud *et al.*, 1988; Nesterenko *et al.*, 1994).

Lösungen und Puffer:

<i>Silber-Fixierlösung</i>		<i>Farmer's Reducer</i>	
Ethanol 100 %	5 ml	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	16 g
Aqua _{bidest}	5 ml	K ₃ Fe (CN) ₆	10 g
Essigsäure 96 %	1 ml		

3. Material und Methoden

<i>Entwicklerlösung</i>		<i>Silbernitratlösung</i>
Na ₂ CO ₃ 2,5 %	20 ml	0,1 % AgNO ₃
Formaldehydlösung 37 %	20 µl	

Durchführung

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 100 ml Fixierlösung [45 % Ethanol, 9,1 % Essigsäure] für mindestens 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 2 x 5 min in H₂O_{bidest} gewaschen und für 5 min in 100 ml H₂O_{bidest} mit einer Spatelspitze „*Farmer's reducer*“ inkubiert. Bevor das Gel für 30 min imprägniert wurde (0,1% Silbernitratlösung), wurde es dreimal 20 min in H₂O_{bidest} gewaschen. An einen erneuten kurzen Waschschrift über 10 Sekunden mit H₂O_{bidest} schloss sich die Entwicklung an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem 10 % Essigsäure hinzugegeben wurde. Anschließend konnte das Gel in H₂O_{bidest} aufbewahrt oder getrocknet werden.

3.2.4.5 Trocknung von Polyacrylamid-Gelen

Um die PAA-Gele haltbar zu machen, wurden sie mittels Warmlufttrocknung getrocknet.

Die Gele wurden zunächst mindestens 15 min in Dehydrierlösung inkubiert. Für die Trocknung wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Dehydrierlösung benetzte Zellophanfolien gelegt. Nach Anlegen der Klammern wurde der Geltrockner für 60 min auf 40 °C erhitzt. Die Gele verblieben danach noch bis zur vollständigen Abkühlung eingespannt.

3.2.4.6 Expression von pro-KLK15/ntfl und KLK15/ntfl

Die rekombinanten Proteine wurden über das *QIAexpressionist*-System exprimiert.

Die Expressionsvektoren enthalten außer dem interessanten Genabschnitt einige wichtige DNA-Sequenzen, die die Replikation des Plasmids in der Bakterienzelle steuern. Diese ermöglichen eine effiziente Transkription der mRNA des zu exprimierenden Proteins und somit dessen Translation. Der Vektor pQE30 enthält ein Promoter/Operator-Element mit einem starken T5 Promoter, der von der *E. coli*-RNA-Polymerase als die Stelle erkannt wird, an der die Transkription des Gens beginnen soll. Der T5-Promoter sorgt für eine hohe Transkriptionsgeschwindigkeit und ist eine der wichtigsten Stellen eines Expressionsvektors. In direkter Nachbarschaft liegt eine zweifache *lac*-Operator-Sequenz, die das *lac*-Repressor-Protein bindet und so eine effiziente Unterdrückung des starken T5-Promoters gewährleistet. Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) bindet an den *lac*-Repressor und inaktiviert ihn. Wird einem Kulturmedium IPTG zugegeben, so folgt die Expression jedes Proteins, das sich unterhalb des Promoters befindet.

Durch den pQE30-*Tag*-Vektor wird an einem Ende des exprimierten Proteins ein *Tag*, eine sog.

Erkennungssequenz platziert, der 6 x *His-Tag* am N-Terminus. Durch die 6 x *His-Tag*-Struktur wird eine auf die Expression folgende Reinigung ermöglicht, auch der Proteinnachweis mittels spezieller anti-Histidin-Antikörper ist möglich. Nach erfolgter Transformation und Vermehrung der Wirtszelle wird durch Induktion gezielt die Transkription des Gens ausgelöst. Das gewünschte Protein entsteht in großen Mengen durch Translation der gebildeten mRNA.

Durchführung

Die Expression von pro-KLK15FL/ntfl und KLK15FL/ntfl erfolgte zunächst wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Die Übernachtskultur in LB-Medium wurde einem Expressionsansatz von 250 ml 2xTY-Medium mit Ampizillin und Kanamycin zugegeben und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden 500 µl einer 1M Lösung IPTG zur Induktion der Expression zugegeben, und danach wurde die Bakteriensuspension weitere 5 h geschüttelt. Nach Ablauf dieser 5 h wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Pellets wurden nach dem Wiegen in Falcons bei -80 °C eingefroren.

3.2.5. Reinigung der rekombinanten Proteine

3.2.5.1. Zellaufschluss und Gewinnung von Rohextrakten

Die bei Expression von Fremdprotein häufig gebildeten Einschlusskörper ("*inclusion bodies*") haben in *E. coli* einen Durchmesser von 0.2 bis 1.5 µm und beulen in einigen Fällen die Bakterienzelle regelrecht aus. Das Protein in den Einschlusskörpern ist meist vollständig synthetisiert, liegt aber in einem nur partiell gefalteten Zustand vor. Daher ist in den meisten Fällen eine vollständige Denaturierung des Proteins notwendig, um es in Lösung zu bekommen, aus der es dann wieder renaturiert werden kann. Der erste Schritt der Isolierung dieses Proteins ist die Gewinnung der Einschlusskörper, gefolgt von einer Auflösung der Proteinaggregate. Das Protein in Einschlusskörpern ist meistens unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien, daher werden für die Solubilisierung zumeist ionische Detergenzien wie 1 % SDS und Denaturierungsmittel wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium/HCl verwendet.

Es scheint keine einfache Korrelation zwischen der Bildung von Einschlusskörpern und der Art des Proteins zu geben. Wilkinson und Harrison fanden eine schwache Korrelation mit Ladungs- bzw. Faltungseigenschaften, denn die Tendenz zur Bildung von Einschlusskörpern steigt bei Proteinen

3. Material und Methoden

mit hohem Anteil an Cys bzw. Pro oder bei stark hydrophoben Proteinen leicht an (Wilkinson und Harrison, 1991). Das homolog oder heterolog exprimierte Protein ist selten zu 100 % in Einschlusskörpern deponiert. Meistens ist ein nicht unerheblicher Teil des Proteins löslich im Zytoplasma der Wirtszelle. Da unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet wurde, spielt das jedoch eine untergeordnete Rolle. Sowohl *inclusion bodies* als auch zytosolisch gelöste Proteine werden in 6 M GuHCl denaturiert.

Lösungen und Puffer:

Lyse-Puffer A
6 M Guanidinium/HCl
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
0,53 µl/ml 2-Mercaptoethanol
pH 8.0 einstellen

Lyse-Puffer Z
8M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
0,53 µl/ml 2-Mercaptoethanol
pH 8

Durchführung

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Lyse-Puffer A. Dazu wurden die Bakterienpellets etwa 20 min auf Eis aufgetaut und mit 5 ml Puffer A pro Gramm nasse Zellen mindestens 1 h gerührt. Anschließend wurde der Rohextrakt für 30 min bei 10 000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und das Pellet verworfen.

3.2.5.2 Denaturierende Proteinreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen

Die in M15-Bakterien exprimierten pro-Formen von KLK15 und KLK15ntfl sowie deren mature Form tragen am N-Terminus sechs Histidin-Einheiten, die eine große Affinität zu Nickel-Ionen aufweisen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine säulenchromatographische Reinigung der überexprimierten Proteine an Ni²⁺-NTA mittels IMAC (*“immobilized metal ion affinity chromatography”*). NTA ist ein Chelatbildner, der vier der sechs freien Bindungsstellen des Nickel-Ions besetzt.

3. Material und Methoden

Zwei Bindungsstellen bleiben frei und können mit dem 6 x *His-Tag* interagieren (**Abb. 13**).

Die Proteine bleiben solange an die NTA-Agarose gebunden, bis durch Senkung des pH-Werts auf ca. pH 4,5 eine Ablösung der Proteine erfolgt (**Tab. 2**). Bei niedrigem pH-Wert werden die Histidin-Reste protoniert und können dadurch nicht mehr an die Nickelionen binden. Durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu jedem Puffer wird eine Bildung von Disulfid-Querverbindungen verhindert. Die Reinigung erfolgte nach den Herstellerangaben (*The QIAExpressionist™* der Fa. QIAGEN 2003). Dazu wurde der Rohextrakt auf die Säule appliziert und nach mehreren Waschschriften mit schrittweiser Erniedrigung des pH-Wertes das gereinigte Protein eluiert (**Abb. 12**). Die gereinigten Proteinfraktionen wurden aufgefangen und zur semi-quantitativen und qualitativen Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemacht.

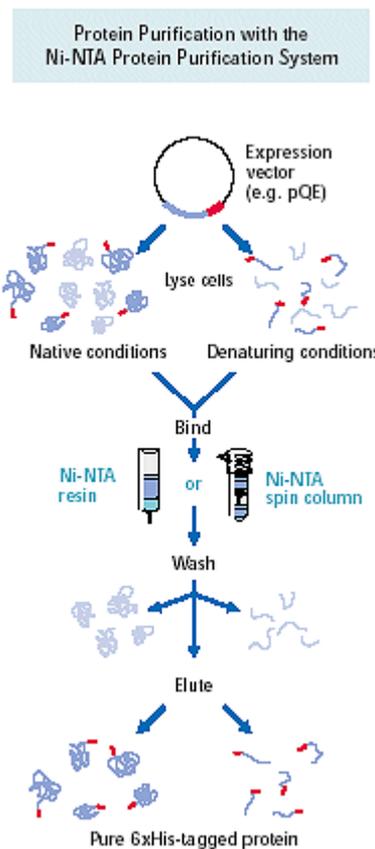


Abb. 12: Prinzip der Nickel-Affinitäts-Chromatographie

3. Material und Methoden

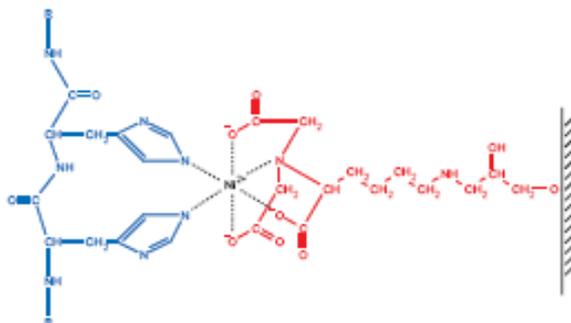


Abb. 13: Prinzip der Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Interaktion zwischen dem benachbarten 6 x *His-Tag* (blau dargestellt) und der Ni²⁺-NTA-Matrix (rot dargestellt). Entnommen aus *Qiaexpressionist*, Qiagen, 6/2003, S.19.

Lösungen und Puffer:

Waschpuffer

Puffer A	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 6 M GuHCl	pH 8
Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Urea	pH 8
Puffer C1	Wie Puffer B	pH 7
Puffer C2	Wie Puffer B	pH 6,6
Puffer C3	Wie Puffer B	pH 6,3

Elutionspuffer

Puffer D1	Wie Puffer B	pH 5,9
Puffer D2	Wie Puffer B	pH 5,5
Puffer E1	Wie Puffer B	pH 4,5
Puffer E2	Wie Puffer B	pH 4,0

Tab. 2: Denaturierende Proteinreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen, Lösungen und Puffer

Durchführung:

Vorbereitung der Chromatographiesäulen:

Die bei 4 °C gelagerte Ni²⁺-NTA-Agarose wurde durch Schütteln völlig resuspendiert, und die Chromatographiesäulen wurden mit jeweils 5 ml des Gemisches befüllt. Nach Absinken der Agarose (ca. 30 min) wurde die untere Kappe der Säulen geöffnet und der Überstand konnte abfließen. Die Säulen wurden mit 20 ml Puffer A äquilibriert.

Vorbereitung des Zell-Lysats:

Die Zellpellets wurden 30 min auf Eis aufgetaut und abgewogen. Pro Gramm nassen Zellpellets wurden 5 ml Puffer A zugegeben. Die Reaktionsgemische blieben mindestens eine Stunde oder alternativ über Nacht auf dem Rotator. Durch Zentrifugation bei RT und 10000 rpm wurde das klare, proteinhaltige Lysat von den Zellresten getrennt und die vorbereitete Säule damit befüllt. Es folgten 5 Waschschrte, zunächst mit 20 ml Puffer A, dann mit jeweils 12 ml Puffer B, C1 und C2 und 6 ml Puffer C3. Anschließend wurden die Proteine eluiert, beginnend mit 6 ml Puffer D1 und 3 ml D2, gefolgt von 5 Fraktionen à 2 ml Puffer E1 und 2 Fraktionen Puffer E2 à 1,5 ml.

3.2.6 Rückfaltung der rekombinanten reifen Proteine und Vorläuferproteine

Aufgrund der stark denaturierenden und schwach reduzierenden Bedingungen während der Aufreinigung wurden die Proteine entfaltet. Um die Proteine in die native Konformation zu überführen, wurde der denaturierende Puffer langsam mittels Dialyse gegen einen nicht denaturierenden Puffer ausgetauscht (**Tab. 4+5**). Der Einsatz von reduziertem und oxidiertem Glutathion (Redox-System) ermöglicht die ständige Neubildung aber auch das erneute Auflösen von Disulfidbrücken. Durch lange Inkubation in diesem Puffer konnte die energetisch günstigste Proteinfaltstruktur gebildet werden. **Tab. 3** erläutert die in den 3 Rückfaltungsprotokollen eingesetzten Faltungshelfer.

3. Material und Methoden

Reagenzien	Wirkung für die Rückfaltung
Harnstoff	Stabilisierung der Löslichkeit des Proteins, Denaturierung
MgCl ₂ , ZnCl ₂ , CaCl ₂	Zweiwertige Ionen, die als Faltungshelfer dienen
Tris/HCl	Erzeugen des benötigten pH-Werts
GSH/GSSH	Redoxsystem
Glyzin	hilft, das Protein in Lösung zu halten
Tween20	Detergenz
HEPES	organisches Pufferreagens zum Erhalt des physiologischen pH
L-Arginin	Unterdrückung der Proteinaggregation und damit Erhöhung der Ausbeute an nativem Protein
Saccharose	Stabilisierung des Proteins

Tab. 3: Die verschiedenen zur Rückfaltung der pro-Formen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen verwendeten Reagenzien sowie ihre Wirkung.

Lösungen und Puffer:

Erstes Rückfaltungsprotokoll in Dialyseschläuchen, das von M. Debela für die Rückfaltung von KLK3 bereits optimiert wurde (**Tab. 4**):

Rückfaltungspuffer			Aufbewahrungspuffer
(1)	(2)	(3)	
4 M Harnstoff	2 M Harnstoff		
300 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
50 mM Hepes	50 mM Hepes	50 mM Hepes	
	50 mM Glyzin	50 mM Glyzin	
	1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	
	2,2 mM CaCl ₂	2,2 mM CaCl ₂	
	250 mM L-Arginin	250 mM L-Arginin	
	5 mM Gluthation reduzierte Form	5 mM Gluthation reduzierte Form	
	0,25 mM Gluthation oxidierte Form	0,25 mM Gluthation oxidierte Form	
	0,005 % Tween 20	0,005% Tween 20	50 mM Tris
pH 7,5; 24 h	PH 7,2; 32 h	PH 7,2; 32 h	0,005% Tween
			pH8; 8 h, dann über Nacht in frischem Puffer

Tab. 4: Rückfaltungsprotokoll von KLK3, Lösungen und Puffer

3. Material und Methoden

Zweites Rückfaltungsprotokoll in Dialyseschläuchen, das von M. Debelá für die Rückfaltung von KLK14 bereits optimiert wurde (**Tab. 5**):

Rückfaltungspuffer			Aufbewahrungspuffer
(1)	(2)	(3)	
4 M Harnstoff	2 M Harnstoff	1 M Harnstoff	
50 mM Hepes			
	50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM Tris
	2,5 mM MgCl ₂	2,5 mM MgCl ₂	
	2 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₂	
300 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	50 mM Glyzin	50 mM Glyzin	
	5 mM Saccharose	5 mM Saccharose	
	2,5 mM Gluthation red. Form		
	0,25 mM Gluthation oxid. Form		
	0,005% Tween 20	0,005% Tween 20	0,005% Tween
	PH 8; 32 h	PH 8; 24 h	pH 8; 48 h

Tab. 5: Rückfaltungsprotokoll von KLK 14, Lösungen und Puffer

Durchführung

Die Konzentration der eluierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Blaufärbung bestimmt. Daraufhin wurden die Proteine mit Elutionspuffer auf 0,1 mg/ml verdünnt und über Nacht am Rad mit 10 mM DTT inkubiert, um alle eventuell bestehenden Disulfidbrücken zu lösen und das Protein somit komplett zu entfalten. Am nächsten Tag wurde die Dialyse in je 5 l Rückfaltungspuffer bei 4 °C und sanftem Rühren begonnen. Dazu wurden die Proteinlösungen in Dialyseschläuche umpipettiert.

Bei der Wahl des Dialyseschlauchs ist zu berücksichtigen, dass die Porengröße des Schlauches möglichst $\frac{1}{3}$ des Molekulargewichts nicht übersteigen soll. So wird ein Austritt der Proteine verhindert. Im Falle von KLK15 wurde eine Porengröße mit 6-8 kD Molekulargewicht gewählt. Nach Berechnung der benötigten Schlauchlänge wurden die Dialyseschläuche zurechtgeschnitten und für ca. 5 min in H₂O_{bidest} eingeweicht.

Nach Ablauf der oben angegebenen Inkubationszeiten wurden die Proteine aus ihren Dialyseschläuchen in *Falcon-Tubes* transferiert. Diese wurden im Anschluß daran zentrifugiert, der Überstand in neue Röhren gefüllt und bei -20 °C gelagert.

„drop-wise“- Methode

Zusätzlich zu dieser herkömmlichen Inkubation in Dialyseschläuchen wurde die „drop-wise“-Methode entwickelt, die sich als effektiver bei der Rückfaltung gewisser Proteasen herausgestellt hat. Nachdem die denaturierte, gereinigte KLK eluiert wurde, inkubierte man das Protein in einem Puffer mit 40 mM DTT während 8 h bei Raumtemperatur. Alle Rückfaltungsmethoden wurden bei 4°C auf einem magnetischen Rührer durchgeführt. Das Protein wurde dialysiert, indem man eine *Spectra/Por*-Membran (MWCO: 12 -14,000) benutzte, über Nacht gegen einen Dialysepuffer 4 M Harnstoff, HEPES und NaCl bei pH 7,5 und 4°C.

Danach wurde der die KLK enthaltende Dialyseschlauch über Nacht in Rückfaltungspuffer (1) gelegt. Im Anschluß daran wurde die Lösung mit dem Konstrukt vorsichtig aus einer Höhe von ca. 50 cm in ein Glasgefäß getropft, das 350 ml Rückfaltungspuffer (2) enthielt und ebenfalls auf einem Magnetrührer stand. Die KLK wurde dann in diesem Puffer für weitere 24 h inkubiert. Abschließend wurde die Proteinlösung auf das gewünschte Maß aufkonzentriert, indem man eine „*Stirred Ultrafiltration Cell* (Cat. No. 5124 von Millipore)“ mit einer „*Ultrafiltration Membrane* (MWCO: 10,000 von Millipore)“ verwandte. Zusätze und Salzlösung wurden bei 4°C während 4h gegen einen Aufbewahrungspuffer dialysiert, dann wurde der Aufbewahrungspuffer gegen einen frisch zubereiteten ausgetauscht (**Tab. 6**).

KLK	Dialysepuffer	Rückfaltungspuffer		Aufbewahrungspuffer
		(1)	(2)	
KLK15ntfl, KLK15	Harnstoff 4 M	Harnstoff 2 M		
	NaCl 300 mM	NaCl 150 mM	NaCl 150 mM	NaCl 150 mM
	HEPES 50 mM	HEPES 50 mM	HEPES 50 mM	Tris HCl 50 mM
		Glyzin 50 mM	Glyzin 50 mM	
		MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM	
		CaCl ₂ 2.2 mM	CaCl ₂ 2.2 mM	
		L-Arginin 250 mM	L-Arginin 250 mM	Bei 4°C über 4h
		Glutathion red. 5 mM	Glutathion red. 5 mM	
		Glutathion ox. 0.25 mM	Glutathion ox. 0.25 mM	
		Tween-20 0.005 %	Tween-20 0.005 %	Tween-20 0.005 %
		PEG3350 0.05%		
		Triton X-100 0.05%	pH 8,0	
	2 l	2 l	0,4 l	Austausch gegen
	pH 7.5	pH 7.2	pH 7.2	frischen Puffer,
	Bei 4°C über Nacht	Bei 4°C über Nacht	Bei 4°C über Nacht	Dialyse über Nacht

Tab. 6: Rückfaltungsprotokoll von KLK15 und KLK15 ntl, Lösungen und Puffer der „drop-wise“ Methode Diese Methode wurde entwickelt, da sie sich als effektiver bei der Rückfaltung gewisser Proteasen herausgestellt hat.

Zuletzt wurden die Proteinlösungen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Aufkonzentrieren der rückgefalteten Proteine

Da die Proteinkonzentration am Ende der Rückfaltung für die nachfolgende Reaktion mit Enterokinase zu gering ist, muß der Proteinlösung ein Teil des Aufbewahrungspuffers entzogen werden. Hierfür wurden die Proben in ein spezielles Behältnis überführt, das eine Membran mit einer bestimmten Porengröße enthält. Durch Zentrifugation konnten überschüssiges Wasser und Puffersubstanzen durch diese Poren abzentrifugiert werden, wohingegen die Proteine die Membran nicht passierten.

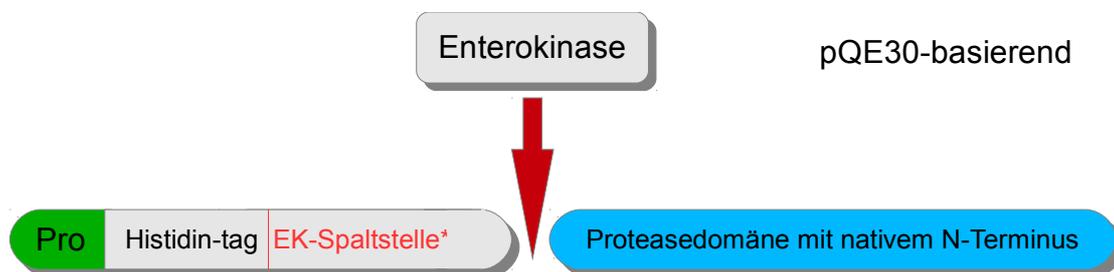
Durchführung:

Es wurden *Vivaspin Concentrators* der Firma Vivascience mit Membranstärke 5000 MWCO PES mit einem Probenvolumen von ca. 1 ml befüllt. Die Proben wurden ca. 2,5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um eine Reduktion des Probenvolumens auf etwa die Hälfte zu erreichen.

3.2.8 Aktivierung der rekombinanten Proteine

3.2.8.1 Enterokinase

Der Testansatz zur Aktivierung der rekombinanten Proteine KL15 bzw. KLK15ntfl erfolgte zunächst mit rekombinanter Enterokinase (Novagen) mit unterschiedlicher Konzentration (**Abb. 14**), dann mit Enterokinase aus dem Schwein, ebenfalls mit unterschiedlicher Konzentration (0,02 U/µg; 0,1 U/µg; 0,5 U/µg; 2 U/µg). Um den besten Zeitpunkt während der Inkubation für eine Aktivierung festzustellen, wurde mittels SDS-PAGE eine Zeitkinetik von 0, 4, 8, 24, 36 und 48 h dokumentiert.



*Asp-Asp-Asp-Asp-Lys

Abb. 14: Schematische Darstellung der Aktivierung rekombinanter Proteine mittels Enterokinase

3. Material und Methoden

Lösungen und Puffer:

Proteinlösung	4-5 µg/100µl
rekombinante Enterokinase	0,02 U/µg; 0,1 U/µg; 0,5 U/µg; 2 U/µg (Novagen)
Enterokinase aus dem Schwein	0,02 U/µg; 0,1 U/µg; 0,5 U/µg; 2 U/µg
10x Enterokinasepuffer	Sigma

Durchführung

Nach der Rückfaltung und dem Abzentrifugieren der präzipitierten und fehlgefalteten Proteine wurde die Konzentration der löslichen Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassieblaufärbung bzw. Silbergefärbung ermittelt. Danach wurden sie mit Enterokinase und 10x-Puffer bei 20 °C in einem Wasserbad inkubiert, zusammen mit einer Negativkontrolle, die keine Enterokinase enthielt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die Zeitkinetik mittels SDS-PAGE und Silbergefärbung dokumentiert.

3.2.8.2 Trypsin

Vorangegangene Studien von Takayama *et al.* (2001) haben gezeigt, dass pro-KLK15 von Trypsin gespalten und aktiviert werden kann. Die Aktivierungsversuche von pro-KLK15 und seiner Spleißvariante KLK15ntfl wurden daher entsprechend der Protokolle dieser Gruppe durchgeführt. Da das verfügbare Gesamtvolumen an löslichem Protein im Vergleich sehr viel geringer war, wurde die Menge von Trypsinagarose (Sigma) analog reduziert.

Lösungen und Puffer:

Trypsinagarose	Sigma
10x Puffer	1M NaCl 1M Tris-HCl pH 7,5
rückgefaltete pro-KLK15	100 µl (5 µg)
rückgefaltete pro-KLK15ntfl	100 µl (5 µg)

Durchführung

50 µl Trypsinagarose (Sigma) wurden viermal sanft gewaschen, indem sie mit 1 ml 1 mM HCl gemischt wurden und zwischen den Waschschritten bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 25 µl H₂O_{bidest} wieder suspendiert, welches dann für die

Aktivierung von pro-KLK15 benutzt wurde. Um die verbleibende Trypsinaktivität zu testen, wurde das Pellet in 100 µl Waschlösung (1 mM HCl) resuspendiert und bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert. 45 µl vom Überstand wurden für den Assay zurückbehalten. Die Probe wurde anschließend bei Raumtemperatur mit 5 µl 10x Puffer und 50 µl Substrat inkubiert. Danach wurde die Aktivität gemessen. 100 µl (5µg) rückgefalteter pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl wurden unter sanftem Schütteln im Eppendorf Thermomixer bei 37 °C inkubiert, um die Agarose in Lösung zu halten. Zu den Zeitpunkten 0, 15, 60 und 240 min wurden Proben von beiden Proteinlösungen (25 µl) entnommen. Die Reaktion wurde durch 20 sekündiges Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit beendet. 5 µl aus den Proben wurden auf die Taschen einer SDS-PAGE geladen, nachdem sie in 15 µl Aufbewahrungspuffer zusammen mit 10 µl 3x reduzierendem Puffer verdünnt worden waren. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung visualisiert.

3.2.9 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten reifen Proteine und Vorläuferproteine

Reinheit und Molekulargewicht der rekombinanten Proteine wurde durch SDS-PAGE mit 13%igen Gelen nachgewiesen. Das Produkt wurde mit Silber- oder Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

3.2.9.1 Westernblot-Analyse

Um die Reaktivität polyklonaler Antikörper gegen KLK15 (aus Toronto) in Sera immunisierter Kaninchen zu prüfen und die Abspaltung der den *His-Tag* enthaltenden Sequenz aufzuzeigen, wurden *Semi-dry-Westernblot*-Analysen durchgeführt. Ungefähr 1 µg Protein aus der Trypsin- und Enterokinaseaktivierung wurden mit SDS enthaltendem Probenpuffer gemischt und in die Taschen eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels geladen. Als Standard wurde *prestained protein marker* "IV" (PeqLab) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min lang in *Blotting*-Lösung inkubiert.

Lösungen und Puffer:

<i>Prestained protein marker</i> "IV"	4 µl (Peqlab)
20% Methanol	
50 mM Borsäure	
1x PBS	68 mM NaCl
	17 mM Na ₂ HPO ₄
	58 mM NaH ₂ PO ₄

3. Material und Methoden

5% Magermilchpulver in PBS, um die Membranen zu blockieren

1% Magermilchpulver in PBS für Antikörperinkubation und für die Waschschr
(Merck, Darmstadt)

Filterpapier (Biometra)

Polyvinylidenfluoridmembranen "PVDF" (Pall)

"ECL Western Blotting Detection Reagent" 1,5 ml pro Membran

(Amersham Pharmacia, Freiburg)

Durchführung

Die Proteine in den Gelen wurden mittels der sog. *semi-dry*-Technik auf Membranen übertragen. Von unten nach oben wurden die folgenden Schichten in den *blotting*-Apparat (Biometra, biomedizinische Analytik, Göttingen) gelegt: drei Lagen Filterpapier, das mit 20%igem Methanol in 50 mM Borsäure pH 8 vollgesaugt war, gefolgt von der Polyvinylidenfluoridmembran (Pall), dem Gel und drei Lagen Filterpapier, das mit 5%igem Methanol in 50 mM Borsäure pH 8 getränkt war. Besondere Sorgfalt wurde darauf verwendet, Luftblasen zwischen den Lagen zu entfernen. Geblottet wurde anschließend für 2,5 h bei ungefähr 80 mA pro Gel. Im Anschluß wurden die Membranen über Nacht in *blocking*-Puffer (1x PBS, 5% Magermilchpulver) bei 4 °C inkubiert.

Nach einem Waschschritt mit PBS und 1% Magermilchpulver wurde die Membran mit α -RGS-his-Antikörper (Maus, 1:500) oder mit α -KLK15-Antikörper (Kaninchen, 1:2000, freundlicherweise von J.Shaw aus Toronto zur Verfügung gestellt) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Membran erneut viermal mit PBS gewaschen, anschließend folgte die zweite Antikörperinkubation. Dazu wurde mit einem Peroxidase-markierten polyklonalen Ziegenantikörper gegen Maus (1:5000) und mit einem Peroxidase-markierten Ziegenantikörper gegen Kaninchen (1:5000) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden die Membranen dreimal hintereinander mit 1% Magermilchpulver in PBS gewaschen. Antikörper, die an die Membran gebunden waren, wurden durch "ECL Western Blotting Detection Reagent" (Amersham Pharmacia, Freiburg) sichtbar gemacht, den Herstellerangaben entsprechend.

3.2.9.2 Substrattests

Charakteristischerweise verfügen die Serinproteasen über einen Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms, der in Verbindung mit zwei weiteren Aminosäuren (Histidin und Aspartat) die sogenannte katalytische Triade der Serinproteasen bildet. In seiner aktiven Form kann dieser Serinrest Peptidbindungen katalytisch hydrolysieren. Nach der Aminosäuresequenz der katalytischen Reste werden die Serinproteasen weiter differenziert: Die Trypsin-ähnliche Gruppe der Serinproteasen

3. Material und Methoden

spaltet Peptidbindungen, die auf basische Aminosäuren folgen (wie zum Beispiel Arginin oder Lysin), denn sie verfügen über einen Aspartat- (oder Glutamat-) Rest in der substratbindenden Tasche, der mit den basischen Aminosäuren starke elektrostatische Bindungen eingehen kann.

Die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen haben eine unpolare substratbindende Tasche und bevorzugen eine aromatische oder unpolare Aminosäure wie Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin oder Leucin als Substrat. Zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen werden chromogene und fluorogene Substrate verwendet. Spaltet ein aktives Enzym diese Substrate, wird ein Chromogen (Farbstoff) bzw. ein Fluorogen (Fluoreszenzfarbstoff) freigesetzt. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Paranitroanilin (pNA) vom Substrat, einem Oligopeptid (Strukturformel von pNA s. **Abb. 15**).

Die Reaktionsrate steigt linear mit der steigenden Aktivität von Trypsin bis zu einem Wert von mindestens 4,8 $\mu\text{kat/l}$, was einer Trypsinkonzentration von 2 mg/l entspricht (www.diapharma.com). Durch eine Verfärbung kann eine Enzymaktivität detektiert werden.

Mittels der Intensität der Färbung kann die enzymatische Aktivität (Enzymkinetik) bestimmt werden. Es wurden zur Kontrolle auch Substrate für Chymotrypsin verwendet.

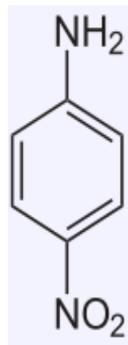


Abb. 15: Strukturformel von Paranitroanilin

Lösungen und Puffer:

Chromogene Substrate

- K-1305 (H-Gly-Arg-pNA)
- S-2222 (Bz-Ile-Glu γ OR-Gly-Arg-pNA)
- S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA-2HCl)
- S-2586 (MeOSuc-Arg-Pro-Tyr-pNA)
- L-1480 (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA)
- L-1455 (H-Glu-Gly-Arg-pNA)
- L-1515 (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA)
- L-2130 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-pNA)

3. Material und Methoden

	L-1330 (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Met-pNA) (Bachem)
10x Puffer	100 mM NaCl
	100 mM Tris-HCl pH 7,5

Durchführung

Je 100 µl der KLKs in einer Konzentration von 200 nM sowie eine Negativkontrolle und das Enzym uPA wurden auf Mikrotiterplatten zusammen mit 10 µl synthetischen Substrates (0,2 mM) bei 37 °C Raumtemperatur inkubiert. pNA wurde nach 60 min und über Nacht Inkubation in einem Mikrotiterplattenleser (SLT SPECTRA ELISA Reader Spectra II) bei 405 nm Absorbierfilter nachgewiesen. Es wurde anhand der Intensität der Verfärbung ermittelt, mit welcher Kinetik die verschiedenen Substrate von den KLKs bevorzugt werden.

Für die Substrattests mit fluorogenen Farbstoffen wurden an das Fluorophor AMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin) gekoppelte Di- und Tripeptide verwendet. AMC ist ein heterozyklisches Molekül mit zahlreichen konjugierten Doppelbindungen (*Abb. 16*). Seine Aminogruppe ist in den Substratmolekülen mit der terminalen Carboxylgruppe der Peptide Prolin-Arginin, Phenylalanin-Arginin bzw. Leucin-Arginin verbunden. Diese Peptidbindung wird von KLK15 gespalten, dadurch verschwindet eine der konjugierten Doppelbindungen und die optischen Eigenschaften des AMC ändern sich.

Man kann deshalb durch zweckmäßige Wahl der Messbedingungen die freie von der gebundenen Form unterscheiden. Die Messwellenlängen wurden so festgelegt, dass nur freies AMC fluoresziert. Die Aminosäuresequenzen der vier verwendeten Substrate wurden so gewählt, dass sie von KLK15 besonders gut umgesetzt werden. Die aktive Protease KLK15 spaltet die Substrate nach dem Arginin, das so frei gesetzte AMC fluoresziert. Zusätzlich dazu wurden auch zwei Substrate von Chymotrypsin getestet. Die Fluoreszenz von AMC wird bei 380 nm angeregt und zwischen 430-460 nm emittiert (*Abb. 17*). Die Fluoreszenzantwort wird in einem Fluorometer gemessen (Nicholson *et al.*, 1995).

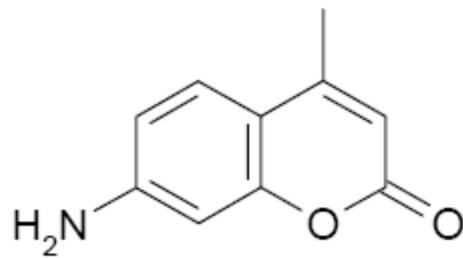


Abb 16: Strukturformel von AMC

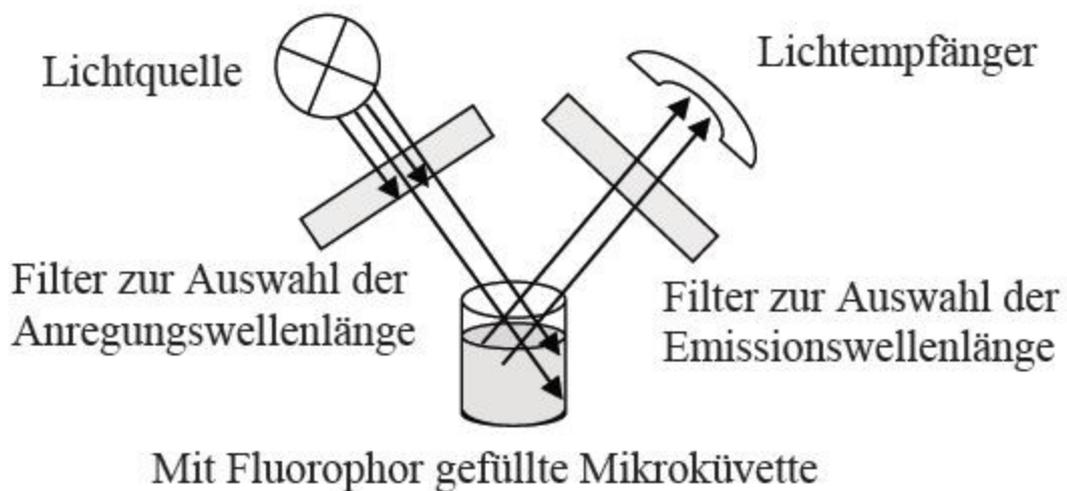


Abb. 17: Prinzip der Fluoreszenzmessung

Lösungen und Puffer:

Flourogene Substrate:

- (a) Ser-Pro-Arg-AMC
- (b) Gly-Pro-Arg-AMC
- (c) Leu-Arg-AMC
- (d) Phe-Arg-AMC
- (e) Ala-Ala-Pro-Phe-AMC
- (f) Ala-Ala-Pro-Tyr-AMC Bachem, USA

Ac-, Tos-, Z- und Suc- sind Schutzgruppen bei der Herstellung der jeweiligen AMC-Substrate

Die Substrat-Stammlösungen wurden in 100 mM DMSO verdünnt

Kallikrein-ähnliche Protease KLK15 (Konz. ~250 nM)

Pufferlösung 150 mM NaCl

3. Material und Methoden

50 mM Tris-HCl
0.05% Tween-20
T 25 °C
1 cm Quartzküvette

Durchführung

In einer 1cm Quartzküvette wurde 250 nM KLK15 mit einer Mischung aus Substrat-AMC-Stammlösung in 100 mM DMSO und Pufferlösung inkubiert.

Die Spaltungsreaktion wurde im Fluorometer bei 25 °C in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Anregung: 380 nm; Emmision: 460 nm). Alle 5 min wurde über den Zeitraum von 45 min gemessen. Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Emmisionszunahme von der Zeit.

Die Steigung der Meßgeraden ist proportional zur Aktivität von KLK15.

3.2.9.3 Inkubation von pro-KLK15 mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen

Lösungen und Puffer:

pro-KLK15, verdünnt in 100 mM Tris-HCl,

100 mM NaCl, pH 7.5

potentielle Aktivatoren KLK4 und KLK6,

in einem molaren Enzym/Substratverhältnis von 1:10 und 1:100.

Anti-*His-Tag*-mAntikörper (Penta-His, Qiagen, Hilden, Germany; 1 mg/ml)

Anti-*Tag100* -mAntikörper (Qiagen; 0,5 mg/ml)

Durchführung

pro-KLK15 wurde unbehandelt als Kontrolle (NT), oder aktivem KLK4 bzw. KLK6 ausgesetzt in einem molaren Enzym/Substratverhältnis von 1:100 sowie 1:10 und über 1h bei 37 °C inkubiert.

Nach Inkubation der aktiven Enzyme mit pro-KLK15 wurde die Reaktion auf Eis beendet und die Proben wurden für die Elektrophorese oder für proteolytische Aktivitätsmessungen vorbereitet.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch *Immunoblot* analysiert, indem man einen Anti-*His-Tag*-mAk und dann einen Anti-*Tag100*-mAk verwendete.

4. Ergebnisse

Herstellung von Expressionssystemen von KLK15 und Varianten in *E. coli*

Für die Produktion von Proteinen sind Prokaryoten oder einzellige Eukaryoten, wie z.B. Hefe, oft die geeigneten Organismen, da sie leicht mit Expressionsplasmiden transformiert werden können und durch ihre hohe Proliferationsrate eine hohe Menge an rekombinanten Proteinen produzieren. Zur rekombinanten Proteingewinnung werden meist *E. coli*-Stämme oder die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* benutzt. In unseren Labors wurde ein Expressionssystem für die Darstellung enzymatisch aktiver Serinproteasen in *E. coli* M15 [pRep4] entwickelt (Sperl PNAS; Debela JMB, PNAS).

Die erfolgreiche Produktion dieser Enzyme erfordert folgende Prozesse: Expression, Reinigung und Rückfaltung der Proteine gefolgt von der Aktivierung durch Enterokinase oder Trypsin. In der vorliegenden Arbeit wurden neben den maturen Formen der Kallikrein-ähnlichen Protease KLK15 und ihrer Spleißvariante KLK15ntfl auch deren pro-Enzym-Formen rekombinant in *E. coli* exprimiert.

4.1 Herstellung eines Expressionsplasmids für mature KLK15 und KLK15ntfl in *E. coli*

In früheren Untersuchungen zur Expression von KLK-Proteasen beim Ovarialkarzinom konnte P. Victorov nicht nur die *full-length*-cDNA von *KLK15*, sondern auch eine neue Spleißvariante *KLK15ntfl* im Tumorgewebe von Ovarialkarzinompatientinnen identifizieren und in den Vektor pRcRSV klonieren. Die klonierte cDNA enthält jeweils die gesamte kodierende Sequenz, also mit prä- (= Signalpeptid), pro-Peptid und dem maturen Enzym.

4.1.1 Klonierungsstrategie für das mature Enzym KLK15 und KLK15ntfl

Zunächst wurde die kodierende Sequenz des maturen Enzyms (ohne prä- und pro-Sequenz) amplifiziert. Anschließend wurde am 5'-Ende des PCR-Fragments eine DNA-Sequenz angeheftet, welche die Enterokinase-Spaltstelle kodiert. Diese enthält die Aminosäure-Sequenz Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Im Anschluß daran erfolgte einerseits die Anheftung einer *Bam* *HI*-Spaltstelle am 5'-Ende oberhalb der Enterokinase-*Site* und andererseits die Generierung einer *Hind* *III*-Spaltstelle am 3'-Ende unterhalb des Stopkodons. Um eine effiziente Spaltung der Restriktionsenzyme zu gewährleisten, wurden darüber hinaus am 5'-Ende oberhalb der *Bam* *HI* und am 3'-Ende unterhalb der *Hind* *III*- Spaltstelle irrelevante Sequenzen von 5 bp angeheftet (**Abb. 18**).

4. Ergebnisse

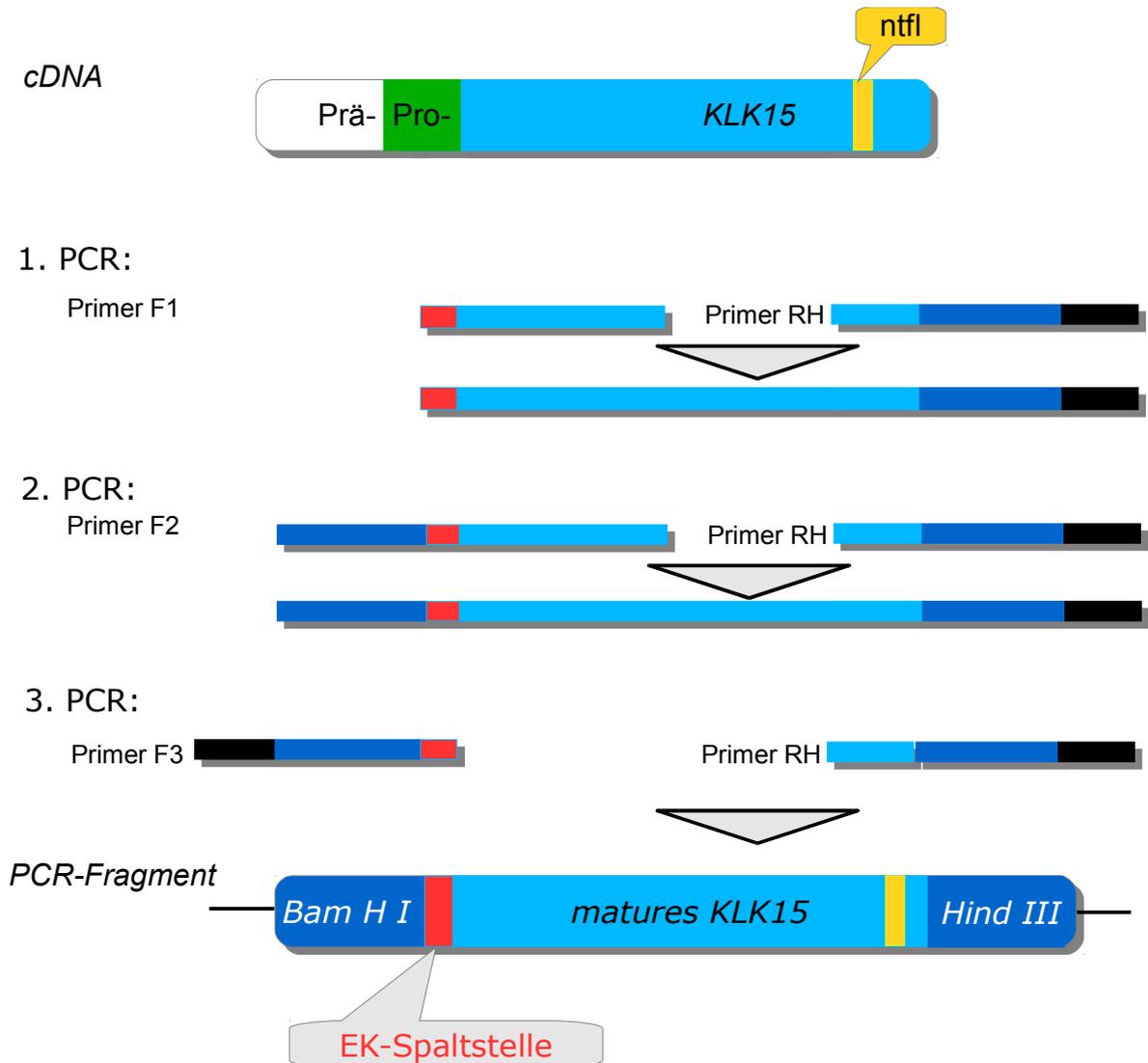


Abb. 18: Klonierungsstrategie für das mature Enzym KLK15 und KLK15ntfl in drei Schritten. Die schematische Darstellung zeigt die Anheftung einer Enterokinase-Spaltstelle (für die späteren Aktivierungsversuche), sowie die Anheftung einer *Bam HI*-Spaltstelle am 5'-Ende und am 3'-Ende die Anheftung einer *Hind III*-Spaltstelle (für die spätere Ligation in den Vektor pQE30). Die gelbe Fläche markiert schematisch den Bereich, der bei *KLK15ntfl* aufgrund der Deletion von 42 bp fehlt. Die Vorgehensweise war bei der Klonierung von *KLK15ntfl* analog.

Klonierung in pQE30

Der Vektor pQE30 enthält ein Ampizillin-Resistenzgen und eine *multiple cloning site* zur Einfügung von DNA-Fragmenten. Weiterhin ist der 6x *His-Tag* vorhanden, der für die Bindungsstelle für Nickelionen (6x*His-Tag*) kodiert, über die auch eine Identifizierung des späteren Proteins erfolgen kann. Der Vektor pQE30 wird mit den Restriktionsenzymen *Bam HI* und *Hind III* gespalten, auch das Fragment wurde mit diesen Enzymen vorbereitet. Diese Klonierung ergibt dadurch einen offenen Leserahmen mit dem N-Terminus:

4. Ergebnisse

Startkodon → Histidin-Tag → Enterokinase-site → matures Enzym → Stopkodon

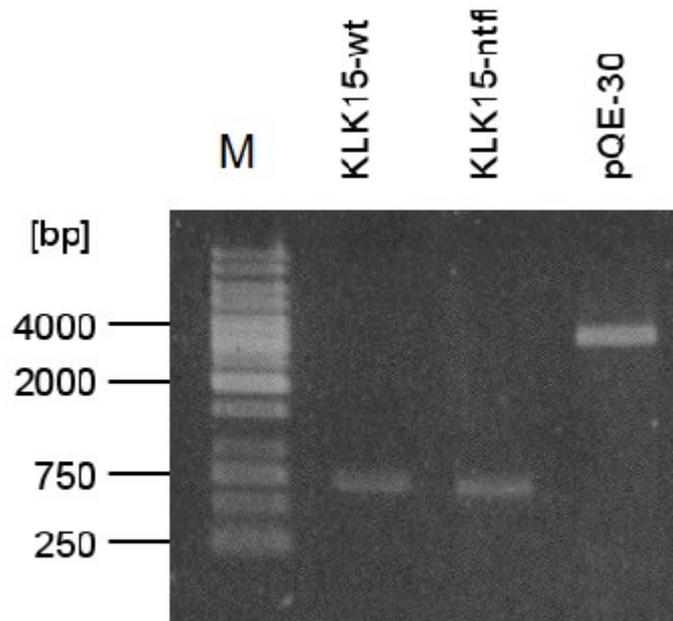


Abb. 19: Agarose-Gel mit dem Marker pEqGold 10 µl in Spur 1 und dem PCR-Produkt von *KLK15* und *KLK15ntfl* in den darauf folgenden Spuren. Das Migrationsverhalten von *KLK15ntfl* ist aufgrund der Deletion von 42 bp etwas schneller im Vergleich zum Wildtypfragment. Die beiden Fragmente stellen sich bei 747 und 705 Basenpaaren dar, der Vektor pQE30 weist eine Größe von 3461 Basenpaaren auf.

4.1.2 Ligation der DNA-Fragmente mit dem pQE30-Plasmid

Die Spaltung mit *Bam HI*- und *Hind III*-Restriktionsendonukleasen erzeugte an Vektor und *KLK15*-DNA-Fragmenten sogenannte "*sticky ends*", deren genaue DNA-Sequenzen aufeinander abgestimmt sind. So konnte eine richtungsorientierte Klonierung des Fragments in den Vektor erreicht werden. Zunächst wurden die verschiedenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel (**Abb. 19**) extrahiert und isoliert. Der linearisierte Vektor pQE30 und das jeweilige *Insert* wurden im Verhältnis 1:5 (Vektor : *Insert*) mit *T4-Ligase* ligiert (**Abb. 21**). Anschließend folgte die Transformation in kompetente Zellen (*E. coli* X11blue).

4.1.3 Restriktionsanalyse von isolierten Klonen von maturem *KLK15* und *KLK15ntfl*

Eine Restriktionsanalyse ist ein Vorgang, bei dem doppelsträngige DNA von spezifischen Restriktionsendonukleasen an Stellen mit bestimmter Erkennungssequenz zerschnitten wird. So können Plasmide auf ihre Größe oder das Vorhandensein eines inklonierten Fragments

4. Ergebnisse

überprüft werden. Durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese werden die geschnittenen DNA-Stücke auf ihre Größe und ihr Schnittmuster überprüft.

Bei der Klonierung wurden 5'- und 3'- Ende des Vektors und des einzuklonierenden Fragments mit zwei unterschiedlichen Enzymen geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (*Bam HI* und *Hind III*) behandelt, deren Schnittstellen zuvor bei der PCR eingefügt worden waren. Anschließend wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (**Abb. 20**). Nach der Restriktion konnten für *KLK15ntfl* zwei starke Banden visualisiert werden, eine 3461 bp starke Bande für den Vektor und eine kleinere, 705 bp starke Bande für das *KLK15ntfl*-Fragment.

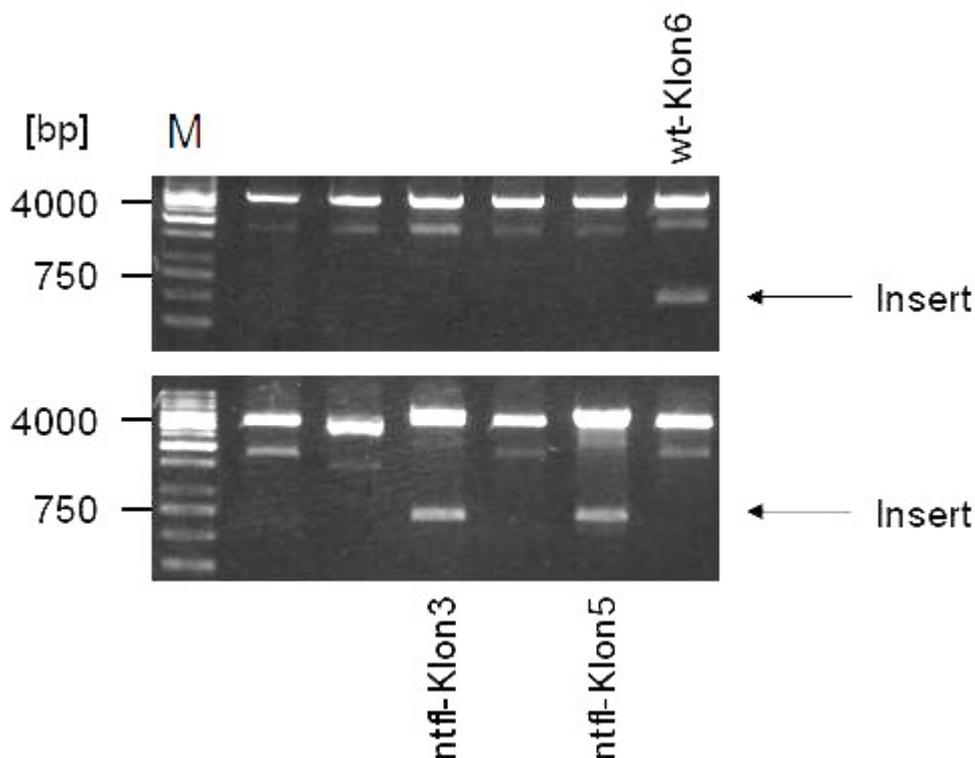


Abb. 20: Identifizierung eines 747 Basenpaare umfassenden *Inserts* *KLK15*-Wildtyp (oberes Gel, Spur 6) und zweier 705 Basenpaare umfassender *Inserts* *KLK15ntfl* im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Nach Transformation von *E. coli* mit DNA wurde die Plasmid-DNA von je sechs Klonen (Spur 1 bis 6; M = Molekulargewichtsstandard) mit *Bam HI* und *Hind III* verdaut. Dadurch entstand für das Wildtyp-Protein ein Fragment von 747 bp, sowie bei zwei Klonen für die Spleißvariante Fragmente von 705 bp (Pfeile), die die Klone 3 und 5 als Träger der *KLK15ntfl* Sequenz identifizierten.

PCR-Fragment

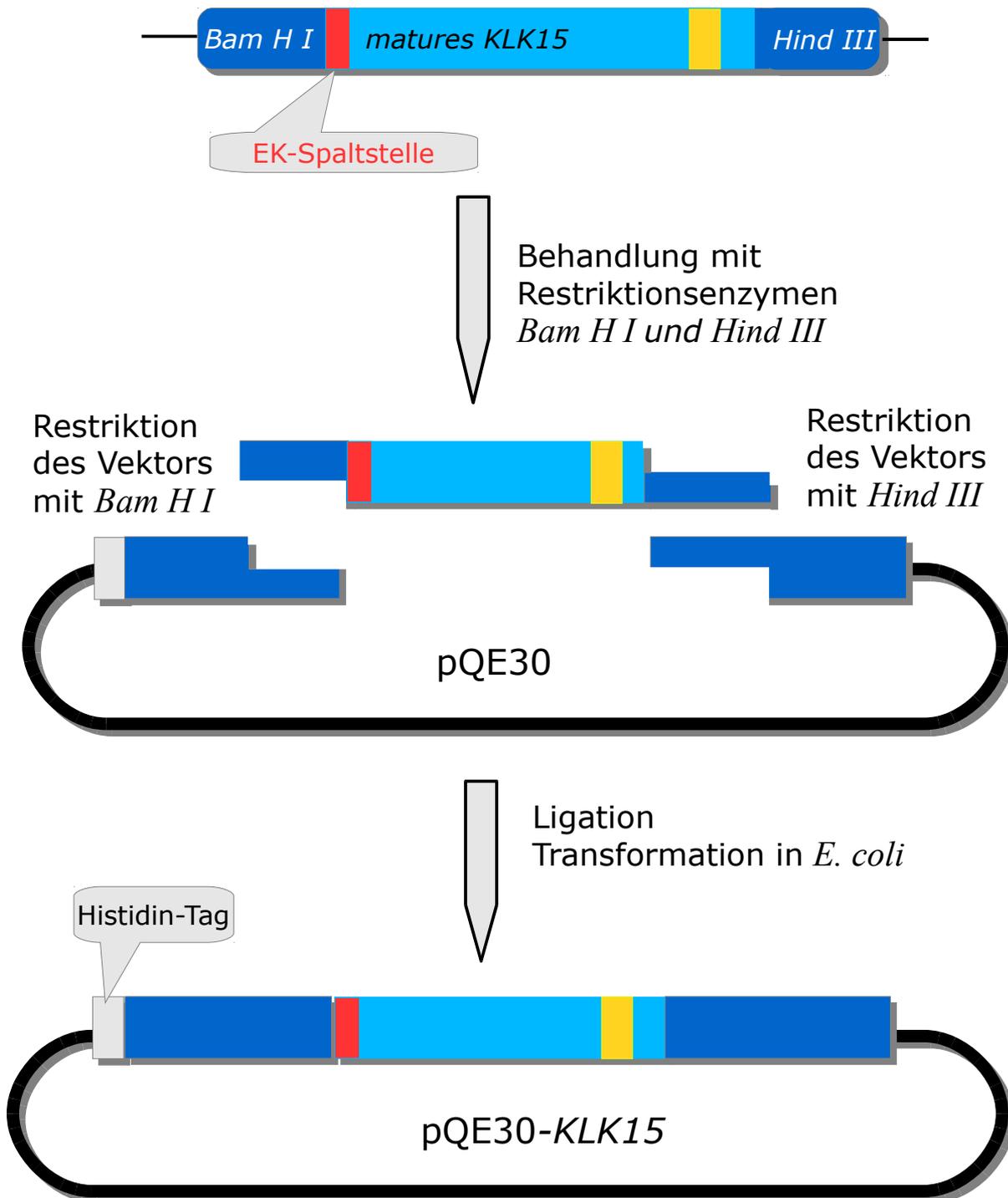


Abb. 21: Schematische Darstellung der Konstruktion des Expressionsplasmids pQE30/KLK15 bzw. analog für *KLK15ntfl*. Zur Vervielfältigung der *Templates* wurden jeweils geeignete *forward* und *reverse primer* entworfen. PCR-Produkt und Vektor wurden anschließend mit Restriktionsenzymen behandelt, um eine spätere Ligation von Vektor und *Insert* zu ermöglichen. Der Vektor pQE30 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam HI* und *Hind III* behandelt, das ebenfalls mit *Bam HI* und *Hind III*

4. Ergebnisse

behandelte PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das fertige Expressionsplasmid wurde schließlich in *E. coli* transformiert. Die gelbe Fläche markiert schematisch den Bereich, der bei *KLK15ntfl* aufgrund der Deletion von 42bp fehlt. Die Vorgehensweise war bei der Klonierung von *KLK15ntfl* analog.

4.1.4 Sequenzierungsergebnisse

Um nachzuweisen, dass das Plasmid im Klon 6 des Wildtyp-Proteins von KLK15 und die Plasmide in den Klonen 3 und 5 der Spleißvariante *KLK15ntfl* aus **Abb. 20** auch wirklich Fragmente mit korrekter Nukleotidsequenz enthielten, wurde deren Plasmid-DNA zur Plasmidsequenzierung eingeschickt. Anschließend analysierte die Firma Medigenomix (Martinsried) die Nukleotidsequenz des rekombinanten murenen *KLK15*-Klons (mit Enterokinase-spaltestelle) und der beiden *KLK15ntfl*-Klone (**Abb. 22**). Diese Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen verglichen, und es wurden keinerlei Abweichungen detektiert.



Abb. 22: Sequenzen der Fusionsgene für rekombinantes *KLK15*-Wildtyp (in pQE30) mit Enterokinase-spaltestelle (magenta Box). Wichtige strukturelle Elemente sind angedeutet: Der Histidin-Tag für die spätere Reinigung der Proteine (blaue Box), Restriktionsspaltestelle (roter Balken) und die Sequenz, die bei *KLK15ntfl* fehlt (schwarz unterstrichen). Klone mit einem *Insert* wurden von der Firma Medigenomix Martinsried mittels DNA-Sequenzierung überprüft und entsprachen der erwarteten Sequenz.

4.2 Herstellung eines Expressionsplasmids für *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl*

Die vorhandenen pro-Formen von *KLK15* und *KLK15ntfl* lagen zu Versuchsbeginn in pRcRSV-Vektoren ligiert in Form von Plasmid-cDNA vor (P. Viktorov, pers. Mitteilung). Für die Klonierung des pro-Enzyms wurde die Produktion eines rekombinanten Proteins angestrebt, welches nicht nur eine Klonierungsstelle am N-Terminus enthalten sollte, die es dort detektierbar macht, sondern auch am C-Terminus. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass man dadurch die pro-Form von *KLK15* und die aktive Form in *Westernblot*-Analysen durch Antikörper anschaulich voneinander unterscheiden kann. Daher fiel die Wahl des Plasmids für die Produktion von pro-*KLK15* und pro-*KLK15ntfl* auf den Vektor pQE100, der am 5'-Ende einen Histidin-Tag und am 3'-Ende ein *Tag100-Epitop* enthält. Dieses *Epitop* wird von spezifischen Anti-*Tag100*-Antikörpern erkannt, und signalisiert den intakten C-Terminus des Proteins, während ein Signalverlust des *His-Tags* auf die Abspaltung der pro-Sequenz, und somit auf die erfolgreiche Aktivierung hinweist.

4.2.1 Klonierungsstrategie für die pro-Formen von *KLK15* und *KLK15ntfl*

Zur Klonierung der Proteasen pro-*KLK15* und pro-*KLK15ntfl* wurden zunächst die kodierenden Sequenzen von pro-Peptid und maturem Enzym amplifiziert.

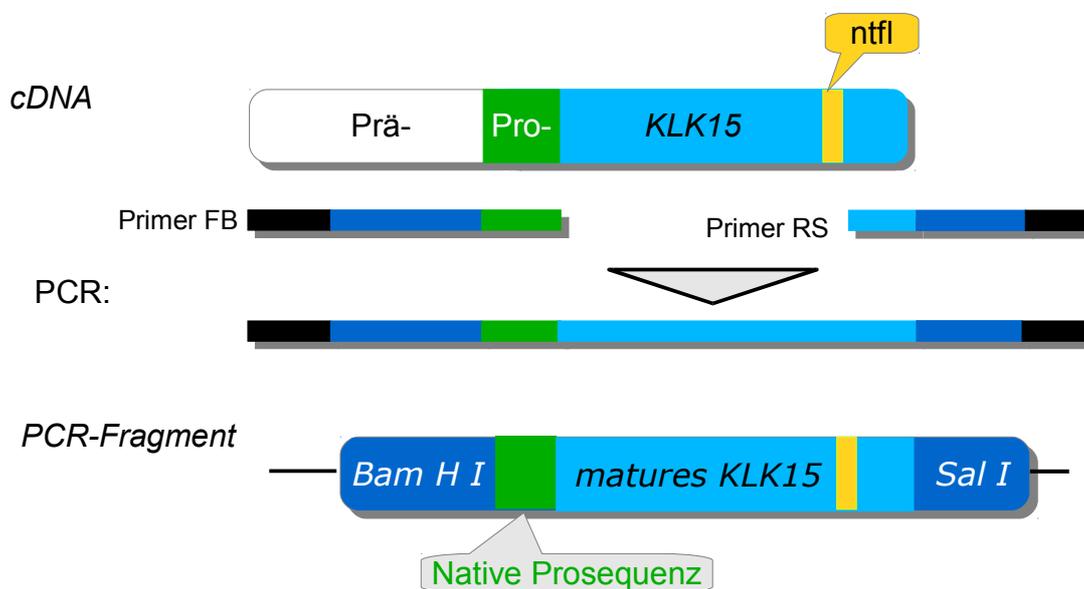


Abb. 23: Klonierungsstrategie für die pro-Form von *KLK15* und *KLK15ntfl*. Die schematische Darstellung zeigt die Anheftung einer *Bam HI*-Spaltstelle am 5'-Ende und am 3'-Ende die Anheftung einer *Sal I*-Spaltstelle (für die Ligation in den Vektor pQE100). Die gelbe Fläche markiert schematisch den Bereich, der bei *pro-KLK15ntfl* aufgrund der Deletion von 42bp fehlt. Die Vorgehensweise war bei der Klonierungsstrategie für *pro-KLK15ntfl* analog.

Anschließend erfolgte die Anheftung einer *Bam HI* und *Sal I*-Site (**Abb. 23**). Auch hier wurden darüber hinaus am 5'-Ende oberhalb der *Bam HI* und am 3'-Ende unterhalb der *Sal I*-Spaltstelle irrelevante Sequenzen von 5 bp angeheftet, um eine effiziente Spaltung der Restriktionsenzyme zu gewährleisten.

4.2.2 Ligation der DNA-Fragmente mit dem pQE100-Plasmid

Der Vektor pQE100 enthält zwei *Tags* (Erkennungsstellen), einen 6 x *His-Tag* (6 Histidinreste hintereinander) und das sogenannte *Tag100-Epitop*. An diese *Tags* können spezifische Antikörper binden, sodass pro-Sequenz und matures Enzym voneinander unterschieden werden können, wenn man zwei *Westernblot*-Analysen vergleicht. Nach Ligation der *pro-KLK15*-Sequenz in pQE100 befindet sich der Histidin-*Tag* am N-terminalen Ende, der *Tag100* am C-terminalen Ende. Die Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Bam HI* und *Sal I* erzeugt an Vektor und *pro-KLK15*-DNA-Fragmenten sogenannte "*sticky ends*", deren genaue DNA-Sequenzen aufeinander abgestimmt sind. So kann eine richtungsorientierte Klonierung des Fragments in den Vektor erreicht werden. Zunächst wurden die verschiedenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert und isoliert. Der linearisierte Vektor pQE100 und das jeweilige *Insert* wurden im Verhältnis 1:5 (Vektor : *Insert*) mit *T4-Ligase* ligiert. Anschließend folgte die Transformation in kompetente Zellen (*E. coli* X11blue). Der Vektor pQE100 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam HI* und *Sal I* gespalten, auch das Fragment wurde mit diesen Enzymen vorbereitet. Diese Klonierungsschritte ergaben einen offenen Leserahmen (ORF) mit folgendem Aufbau:

Startkodon → Histidin-*Tag* → native pro-Sequenz → matures Enzym → *Tag100-Epitop* → Stopkodon

Selbstverständlich mußte man die *primer* so konzipieren, dass der ORF auch wirklich entsteht.

Für *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl* wurden die Sequenzen für die Schnittstellen *Bam HI* und *Sal I* eingefügt (**Tab. 7**). Das 5'-Ende des *primers* begann mit der Sequenz AATAT, gefolgt von der Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam HI*. Anschließend an die Restriktionsschnittstelle folgten die ersten 18 Basenpaare der pro-Sequenz der Kallikrein-ähnlichen Peptidase. Auch das 3'-Ende begann mit der Sequenz AATAT und einer Restriktionsschnittstelle, in diesem Fall *Sal I*. Es mußte noch eine zusätzliche Base (Cytosin) nach der Schnittstelle für *Sal I* eingefügt werden, da sich sonst das Leseraster verschoben hätte. Durch Einfügen der zusätzlichen Base gelangt das Leseraster wieder *in frame*.

4. Ergebnisse

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') des <i>forward primers B</i> und <i>reverse primers S</i>
QE100-KLK 15-B	5' - AATAT GGA TCC GCC CAG GAT GGT GAC AAG – 3'
QE100-KLK 15-S	5' - AATAT GTC GAC C GTT CCT CTT CAT GGT TTC – 3'

Tab. 7: Nukleotidsequenzen des *forward*- und des *reverse*-primers. QE100 steht für den Vektor pQE100, die Buchstaben B und S stehen für die Restriktionsenzyme *Bam HI* und *Sal I*, mit denen die Plasmid-DNA von *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl* geschnitten wird. Die *primer* beginnen mit der **AATAT**-Sequenz. Es folgen die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bam HI* bzw. *Sal I*, sowie die ersten Basenpaare der *pro*-Sequenz.

4.2.3 Restriktionsanalyse von isolierten Klonen von *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl*

Die DNA-Fragmente von *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl* wurden am 5'- und 3'- Ende mit den Restriktionsenzymen *Bam HI* und *Sal I* behandelt, deren Schnittstellen zuvor mittels PCR eingefügt worden waren (s. Kap. 4.2.2). Anschließend wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und zur Größen- und Konzentrationsbestimmung elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kap. 4.1.3). Auch der Vektor pQE100 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam HI* und *Sal I* behandelt, und das PCR-Produkt anschließend in den Vektor ligiert (**Abb. 24**). Dazu wurde der linearisierte Vektor pQE100 und das jeweilige *Insert* im Verhältnis 1:5 (Vektor : *Insert*) mit *T4-Ligase* ligiert. Das fertige Expressionsplasmid wurde schließlich in kompetente *E. coli*-Zellen (*XI1blue*) transformiert. Potentielle Klone wurden gepickt und mit einer Restriktionsanalyse *gescreent*. Die Plasmid-cDNA der positiven Klone wurde wiederum zur Nukleotidsequenz-Analyse eingeschickt.

4. Ergebnisse

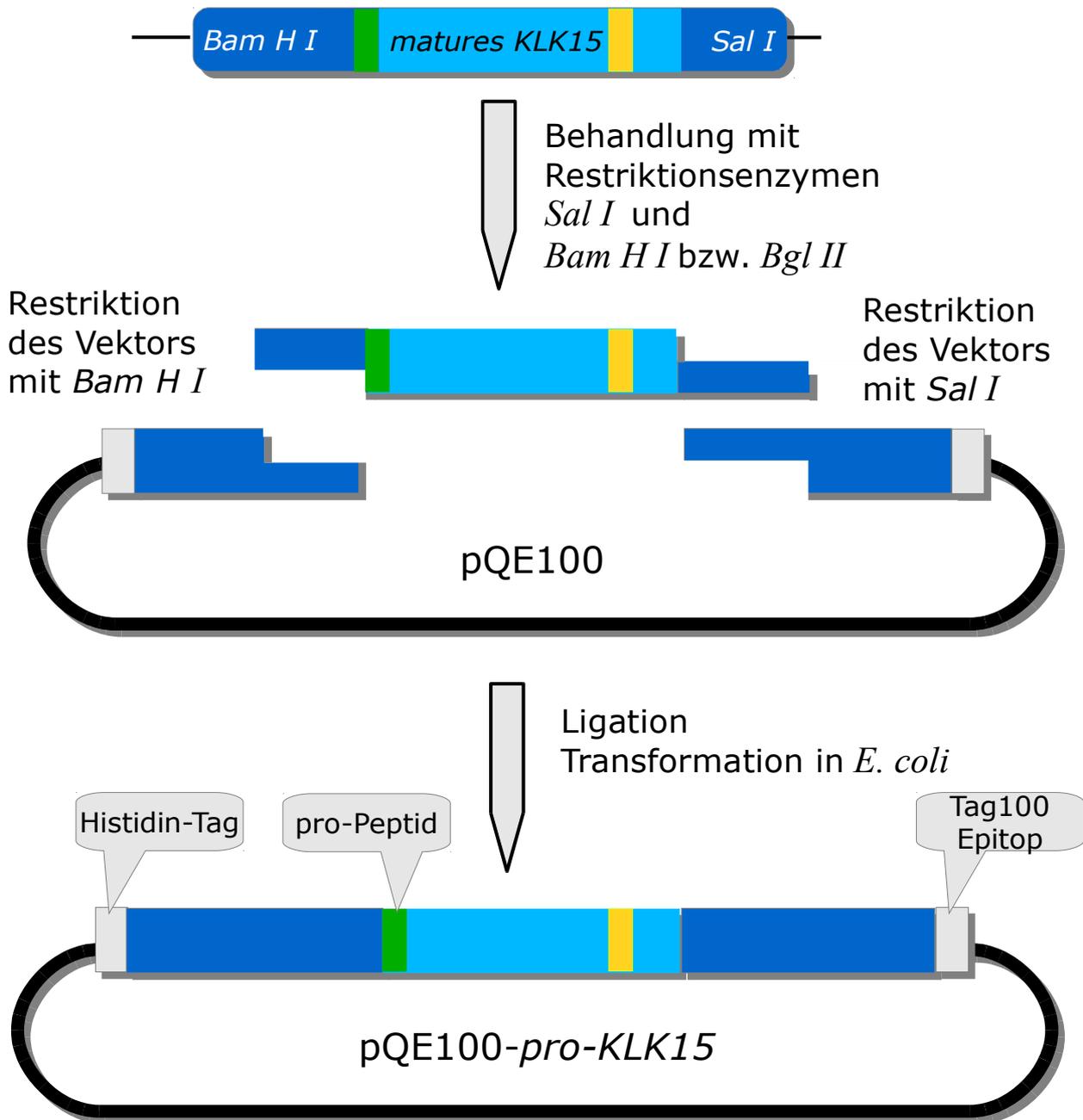


Abb. 24: Schematische Darstellung der Konstruktion des Expressionsplasmids pQE100/*pro-KLK15*. Zur Vervielfältigung der *Templates* wurden jeweils geeignete *forward*- und *reverse-primer* entworfen. PCR-Produkt und Vektor wurden anschließend mit Restriktionsenzymen behandelt, um eine spätere Ligation von Vektor und *Insert* zu ermöglichen. Der Vektor pQE100 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam HI* und *Sal I* behandelt, und das mit *Bam HI* und *Sal I* behandelte PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das fertige Expressionsplasmid wurde schließlich in *E. coli* transformiert. Die gelbe Fläche markiert schematisch den Bereich, der bei *pro-KLK15ntfl* aufgrund der Deletion von 42 bp fehlt. Die Vorgehensweise war bei der Klonierungsstrategie für *pro-KLK15ntfl* analog.

4. Ergebnisse

4.2.4 Sequenzierungsergebnisse

Die Firma Medigenomix (Martinsried) analysierte durch Plasmidsequenzierung die Nukleotidsequenz der *pro-KLK15*-Klone und der *pro-KLK15ntfl*-Klone (**Abb. 25**). Im Vergleich mit bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen entsprachen sie diesen vollumfänglich und wiesen keinerlei Abweichungen auf.

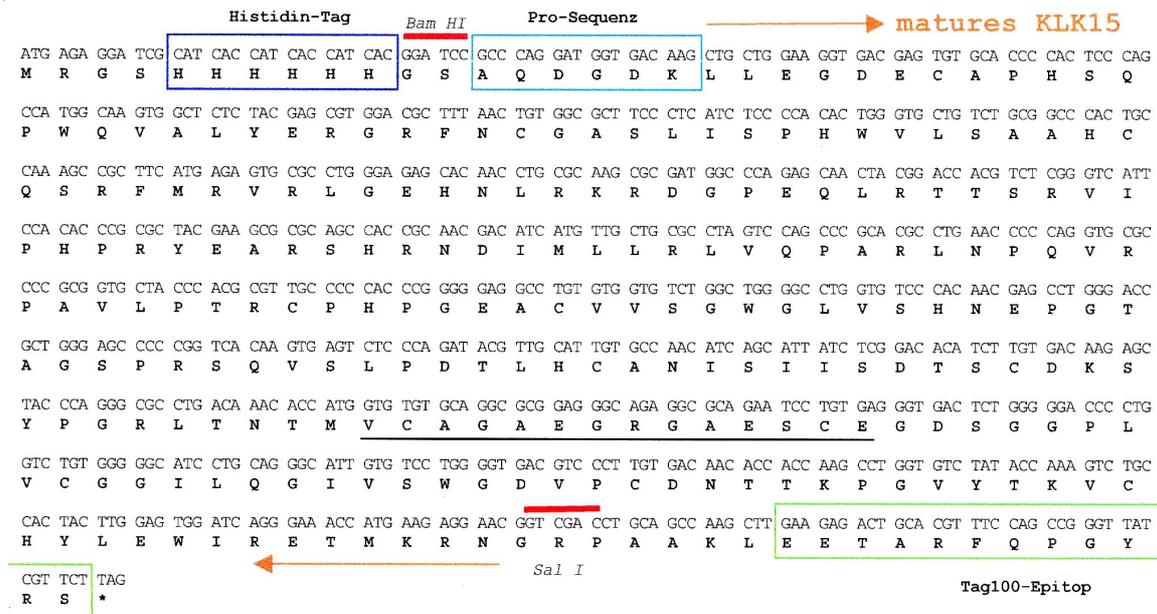


Abb. 25: Sequenzen der Fusionsgene für rekombinantes *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl* (in pQE100, der ein *Tag100-Epitop* beinhaltet, (grüne Box). Der *Histidin-Tag* für die spätere Reinigung der Proteine (blaue Box), Restriktionsspaltstelle (roter Balken) und die Sequenz, die bei *pro-KLK15ntfl* fehlt (schwarz unterstrichen). Klone mit einem *Insert* wurden von der Firma Medigenomix Martinsried mittels DNA-Sequenzierung überprüft und entsprachen der erwarteten Sequenz.

4.3 Transformation der neu gebildeten Plasmide in *E. coli* M15[pREP4]

Anschließend wurden die Plasmide in *E. coli*-M15[pREP4]-Zellen transformiert und auf Agarplatten ausgesät. Da sowohl der Vektor pQE30 als auch der Vektor pQE100 als Selektionskriterium ein Ampizillin-Resistenzgen tragen, werden alle zur Anzucht verwendeten Medien mit Ampizillin versetzt. Nach über-Nacht-Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C werden mit sterilen Zahnstochern Bakterienkolonien gepickt (siehe dazu Kapitel 3.2.3).

4.4 Expression und Reinigung von KLK15, KLK15ntfl, pro-KLK15 und pro-KLK15 ntfl

In der DNA der Vektoren pQE30 und pQE100 ist die *lac*-Operator-Stelle zweifach vorhanden, an die der *lac*-Repressor in Abwesenheit von Lactose bindet. Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wirkt als Aktivator, indem es an den Repressor bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert. Im Gegensatz zur Lactose wird IPTG im natürlichen Metabolismus von Bakterien nicht umgesetzt, seine Konzentration bleibt deshalb während des Versuchs konstant und das Gen bleibt aktiv. Mit Expressionsanalysen wurde nachgewiesen, dass die transformierten *E. coli*-Zellen die gewünschten Proteine produzieren.

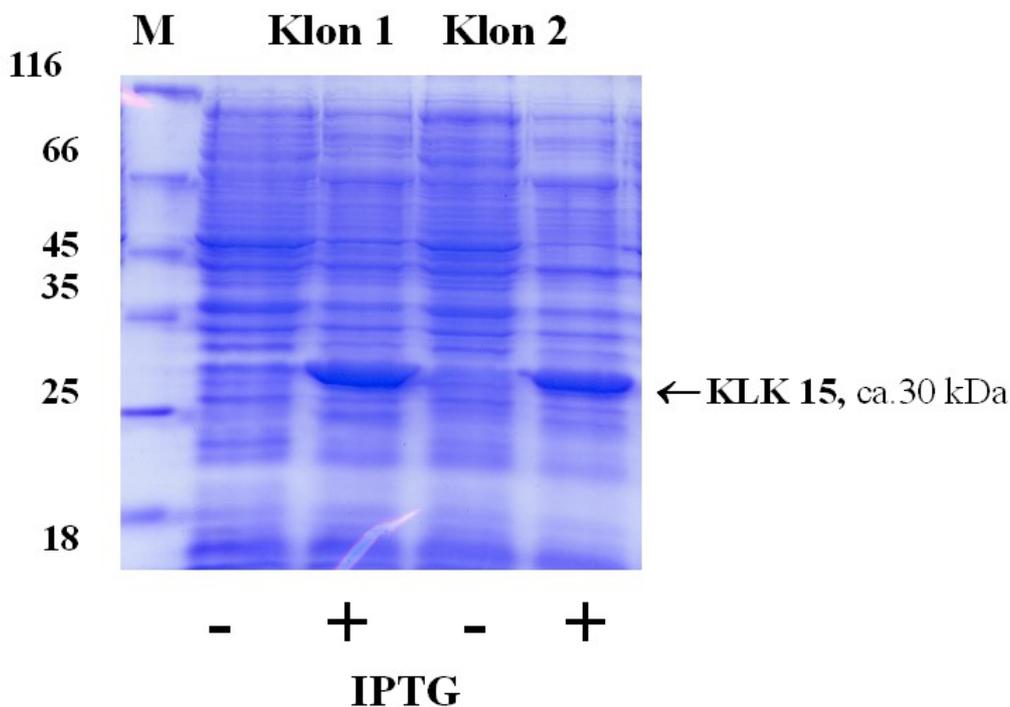


Abb. 26: Die Abbildung zeigt exemplarisch die Expressionsanalyse von KLK15 in *E. coli*-M15[pREP4].

Um nachzuweisen, ob die mit Expressionsplasmiden transformierten *E. coli*-Zellen das gewünschte Protein produzieren, wurden diese sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von IPTG inkubiert. Es zeigte sich, dass die Produktion von KLK15 in Anwesenheit von IPTG erheblich höher ausfällt, mit bis zu 50% des Gesamtproteins. IPTG wirkt als Aktivator (*Induktor*) des *lac*-Operons, indem es an den *lac*-Repressor (das Proteinprodukt des *lacI* Gens) bindet. Dadurch erfolgt eine allosterische Konformationsänderung des Repressors, die seine Wechselwirkung mit den *lac*-Operatoren inhibiert. IPTG wird im natürlichen Metabolismus von Bakterien nicht umgesetzt, seine Konzentration ist deshalb während eines Versuchs konstant. Ebenso wurde mit KLK15ntfl, pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl verfahren. Die Position des angereicherten KLK15 Proteins ist durch einen Pfeil markiert; M = Molekulargewichtsstandard.

4. Ergebnisse

Wie **Abb. 26** am Beispiel von rekombinantem, maturem KLK15 zeigt, wurden die Bakterienzellen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von IPTG inkubiert.

Weiterhin enthalten pQE30 und pQE100 eine Basensequenz, die für 6 aufeinander folgende Aminosäuren Histidin, einen *6xHis-Tag*, kodiert. Nach der Proteinexpression befinden sich diese 6 Histidine, die durch eine große Affinität zu Nickelionen gekennzeichnet sind, am aminoterminalen Ende der KLK-Proteine. Diese Affinität ermöglicht eine spätere säulenchromatographische Reinigung der überexprimierten Proteine an Ni²⁺-NTA mittels IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*). NTA ist ein Chelatbildner, der vier der sechs Ligandbindungsstellen eines Nickelions besetzt und diese dadurch an der Säulenmatrix fixiert. Die zwei freibleibenden Ligandbindungsstellen können mit je einem Histidinrest der KLKs über den Imidazolring interagieren. Durch langsames Absenken des pH-Wertes werden die Histidin-Reste des *6 x His-Tags* protoniert und können dadurch nicht mehr an die Nickelionen binden. Die Absenkung des pH erfolgt in kleinen Schritten von pH 8,0 auf pH 4,0. Meist erfolgt die Lösung der Proteine bei ca. pH 6,0-4,0.

In den folgenden Abbildungen sind die verschiedenen Elutionspuffer-Fractionen dargestellt. In der 10. Spur befindet sich der Marker Peqlab-Gold. Die größten Proteinkonzentrationen zeigten sich in den Elutionsfraktionen E1-1 bis 1-3 (pH 4,5). **Abb. 27** zeigt Proben, die nach Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarosesäulen mit SDS-PAGE analysiert wurden.

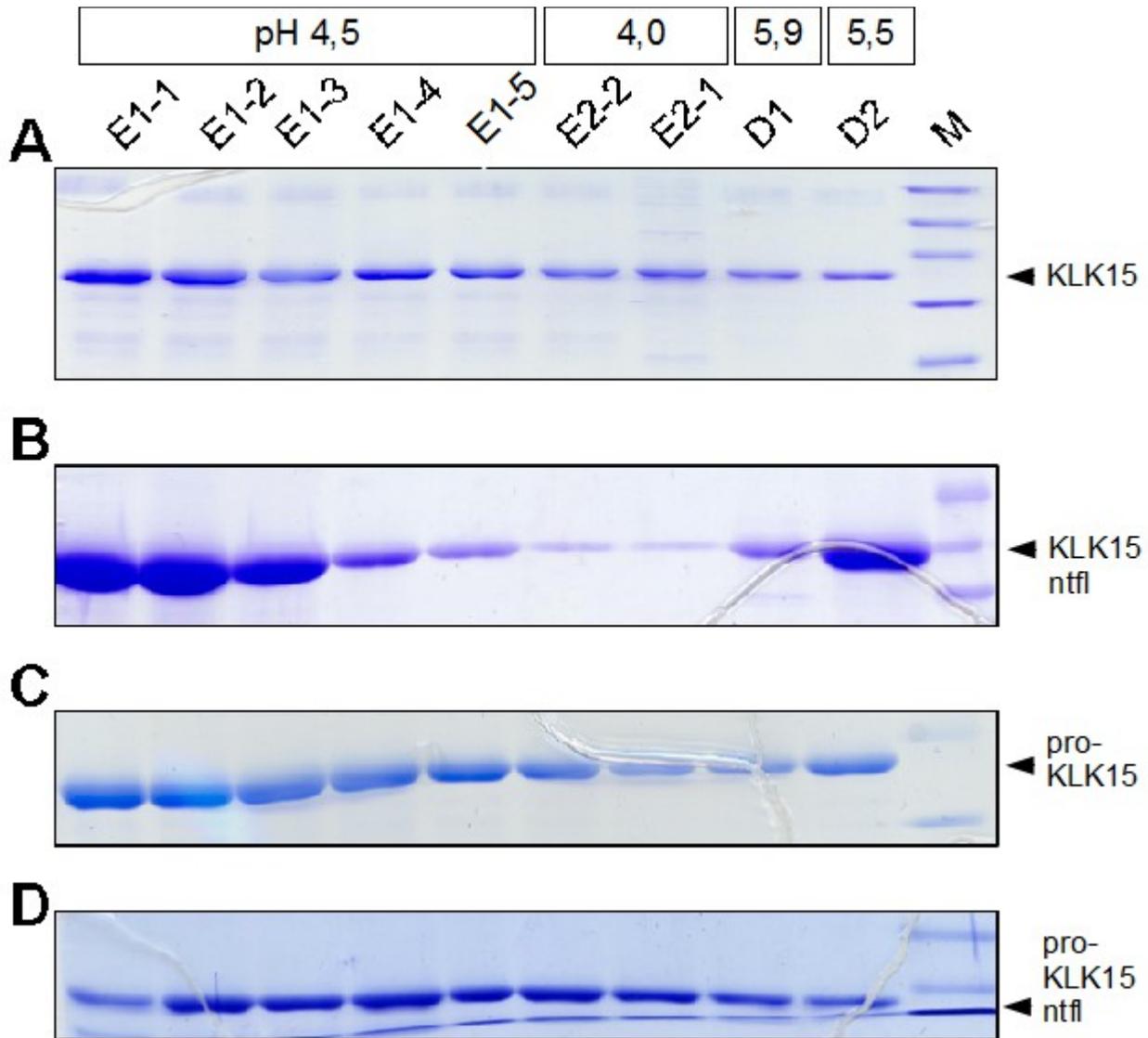


Abb. 27: Aufreinigung der einzelnen (pro-)KLK15-Formen. (A) KLK15. (B) KLK15ntfl. (C) pro-KLK15. (D) pro-KLK15ntfl. Zu erkennen sind die höchsten eluierten Proteinmengen bei Probe E1-1 bis E1-3, was einem pH von 4,5 entspricht. Nur bei pro-KLK15ntfl wird die größte Proteinmenge bei pH 4,5-4,0 eluiert. In der Spur ganz rechts zum Vergleich der Marker Peqlab-Gold.

Die obigen Abbildungen zeigen die mittels Nickelaffinitätschromatographie gereinigten Proteasen pro-KLK15, pro-KLK15ntfl, KLK15 sowie KLK15ntfl. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine s. Kap. 3.2.5.

4.5 Rückfaltung der (pro-)KLKs

Für jedes Protein gilt es, bei der Erstellung seines Rückfaltungsprotokolls individuellen Regeln zu beachten. Leider existieren keine universellen Rezepte, die die Rückfaltung eines Proteins oder seiner Proteinfamilie garantieren oder den Ablauf einer Rückfaltung beschleunigen. Die Zusammensetzung der Rückfaltungspuffer muss in wiederholten Versuchen optimiert und an das

4. Ergebnisse

jeweilige Protein angepasst werden. Wird ein aktives Protein rückgefaltet, gestaltet sich die Rückfaltung noch komplizierter als bei einer inaktiven Vorstufe, da sich dessen enzymatische Funktion sofort entwickeln kann. So erweist sich die Rückfaltung von Proteinen oft als langwierig und kompliziert. In vorliegender Arbeit wurden zwei Rückfaltungsprotokolle in Dialyseschläuchen und die „drop-wise“-Methode angewandt, mit der bereits gute Erfahrungen bei der Rückfaltung anderer KLKs gemacht wurden. Die Ausbeute war bei allen drei Vorgehensweisen sehr gering, dennoch gelang es, ein lösliches Protein zu produzieren, mit dem nachfolgend aussagekräftige Aktivitätstests durchgeführt werden konnten (**Abb. 28**).

Rückgefaltet wurden alle vier rekombinant exprimierten Varianten von KLK15. Die Klonierungsstrategie orientierte sich am Vorbild von Dr. Mekdes Debela und Dr. Peter Goettig (*Proteinase Research Group* des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried), die bereits die Kallikrein-ähnlichen Proteasen KLK4 und KLK7 mit synthetischem pro-Peptid kloniert und rückgefaltet hatten, um, unter anderem, deren räumliche Struktur zu untersuchen (Debela *et al.*, 2006). Ihre synthetisierten pro-KLK-Formen unterschieden sich von der Wildtyp-Form in der Sequenz des pro-Peptides, das eine Enterokinasespaltstelle für spätere Aktivierungsversuche enthielt. Diese erfolgreichen enzymatischen Aktivierungen regten für vorliegende Arbeit dazu an, dieselbe Verfahrensweise bei der Klonierung, Rückfaltung und Aktivierung von KLK15 (und Varianten) anzuwenden. Für KLK3, 4, 6, 7, 10, 11 und 14 liegen von dieser Gruppe schon Rückfaltungsprotokolle vor. Diese setzten sich aus vier Puffern, drei Rückfaltungspuffern mit abfallender Harnstoffkonzentration und einem Lagerungspuffer zusammen. Das erste Rückfaltungsprotokoll hatten Debela *et al.* schon für die Rückfaltung von KLK3 optimiert, eine Kallikrein-ähnliche Protease, die mit KLK15 strukturell zu 41% übereinstimmt.

Der erste Rückfaltungspuffer, enthielt neben 4M Harnstoff und NaCl den Bestandteil HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure), ein organisches Pufferreagenz, das man verwendet, um einen physiologischen pH-Wert zu erhalten.

Im zweiten Rückfaltungspuffer war die Harnstoffkonzentration noch 2 Molar, weitere Bestandteile des Puffers waren NaCl, HEPES, Glyzin, L-Arginin, Gluthation, Tween20 und die Faltungshelfer MgCl₂ und CaCl₂ in verschiedenen Molaritäten. Der dritte Rückfaltungspuffer enthielt die gleichen Komponenten in zum Teil veränderter Konzentration mit Ausnahme von Harnstoff, der nicht mehr hinzugefügt worden war. Der vierte Puffer, der Lagerungspuffer bestand aus NaCl, Tris/HCl und Tween20. Die Proteinkonzentration betrug anfangs ca. 0,5-1mg/ml.

Das zweite Rückfaltungsprotokoll orientierte sich an einem Protokoll, das von Debela *et al.* zur Rückfaltung einer pro-Form von KLK14 entworfen worden war. Es setzt sich aus drei

4. Ergebnisse

Rückfaltungspuffern und einem Lagerungspuffer zusammen. Der erste Rückfaltungspuffer bestand aus Harnstoff in 4M Konzentration sowie Tris/HCL und NaCl. Der zweite Rückfaltungspuffer enthielt neben CaCl_2 und MgCl_2 , die Bestandteile des Gluthathion-Redoxsystems sowie Glyzin, Tween20 und Saccharose. Bei den rückzufaltenden Proben wurden wiederum Proteinkonzentrationen von ca. 0,5-1 mg/ml gewählt. Es zeigte sich im Verlauf bei beiden Rückfaltungsprotokollen in den Dialyseschläuchen ein deutlicher Proteinmengenverlust aufgrund von Präzipitation und Degradation sowie Fehlfaltungen während des Rückfaltungsprozesses (**Abb. 29**). Etwas bessere Ausbeuten an rückgefaltetem Protein ergab die kompliziertere „*drop-wise*“-Methode, bei der ebenfalls drei Rückfaltungspuffer mit abfallender Harnstoffkonzentration und ein Lagerungspuffer eingesetzt wurden (zur Zusammensetzung und Aufgabe der Faltungshelfer s. Kap. 3.2.6).

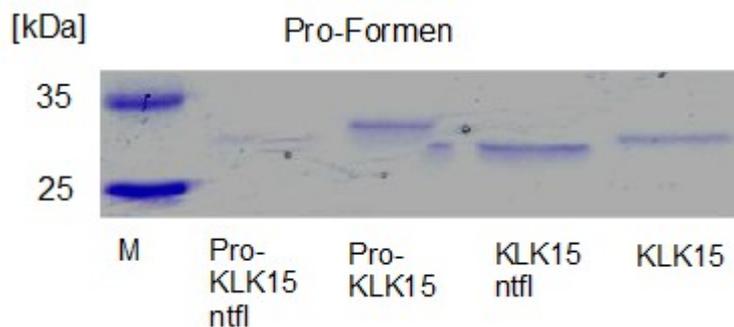


Abb. 28: Rückfaltung der KLK15-Proteasen. Wie die SDS-PAGE Abbildung bekräftigt, sind die rückgefalteten rekombinanten Kallikrein-ähnlichen Proteasen 15 und ihre anerkannte Spleißvariante 15ntfl sowie deren jeweiliger Wildtyp offensichtlich rein und enthalten keine Abbauprodukte oder Spaltprodukte.

4. Ergebnisse

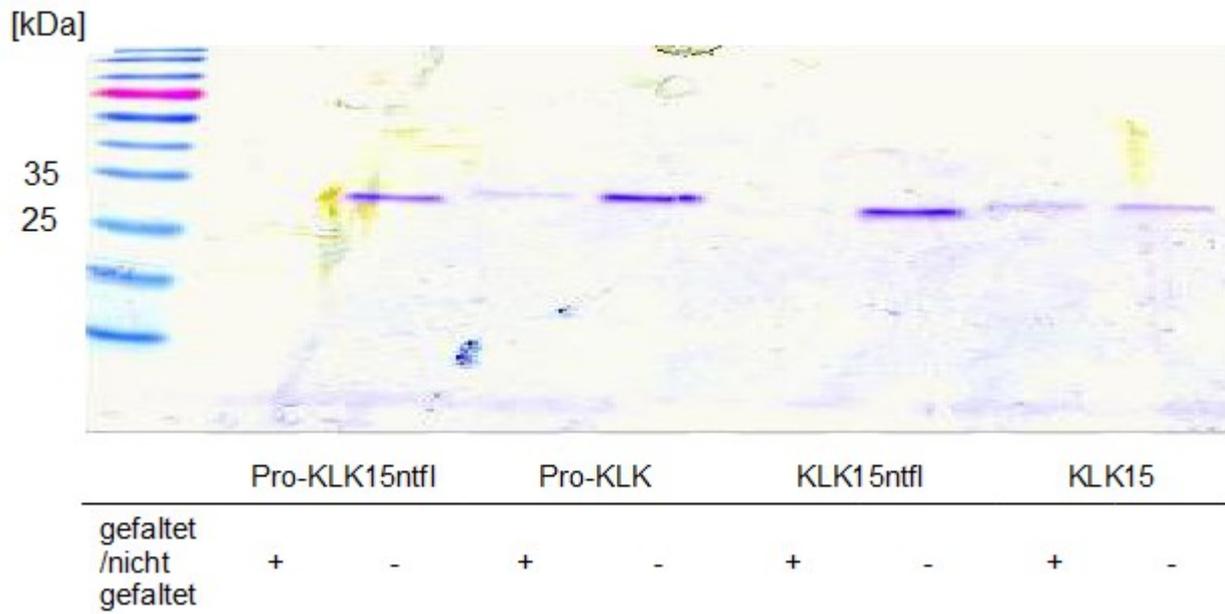


Abb. 29: SDS-PAGE der Proteinmengenanalyse von pro-KLK15, pro-KLK15ntfl, KLK15 und KLK15ntfl mit dem Ergebnis der rückgefalteten pro-KLK15=0,75 μ g, pro-KLK15ntfl=1 μ g, KLK15=1 μ g und KLK15ntfl=0,5 μ g. Es zeigt sich ein deutlicher Proteinmengenverlust aufgrund von Präzipitation und Degradation sowie Fehlfaltungen während des Rückfaltungsprozesses.

4.6 Aktivierungsversuche mit Enterokinase und Trypsin

Die synthetische pro-Form mit Enterokinasespaltstelle von KLK15 kann mit dem Enzym Enterokinase gespalten und dadurch aktiviert werden. Für die „natürliche“ pro-Form von KLK15 wurde bereits beschrieben, dass diese mit Trypsin (gekoppelt an Sepharose zur Abtrennung nach Aktivierung) in die aktive Form übergeführt werden kann (Takayama *et al.*, 2001).

4.6.1 Enterokinaseaktivierung von KLK15/KLK15ntfl mit Enterokinasespaltstelle

Nach 1h Inkubationszeit von synthetischer KLK15 mit Enterokinase tritt eine Abspaltung des kurzen Propeptids auf, längere Inkubation führt zur Degradation. Im Fall von KLK15ntfl degradiert das Protein sofort (nicht dargestellt), da es proteolytisch abgebaut wird. Neben den KLK-ähnlichen Proteasen produziert unser Labor auch die katalytisch aktive Serinprotease uPA.

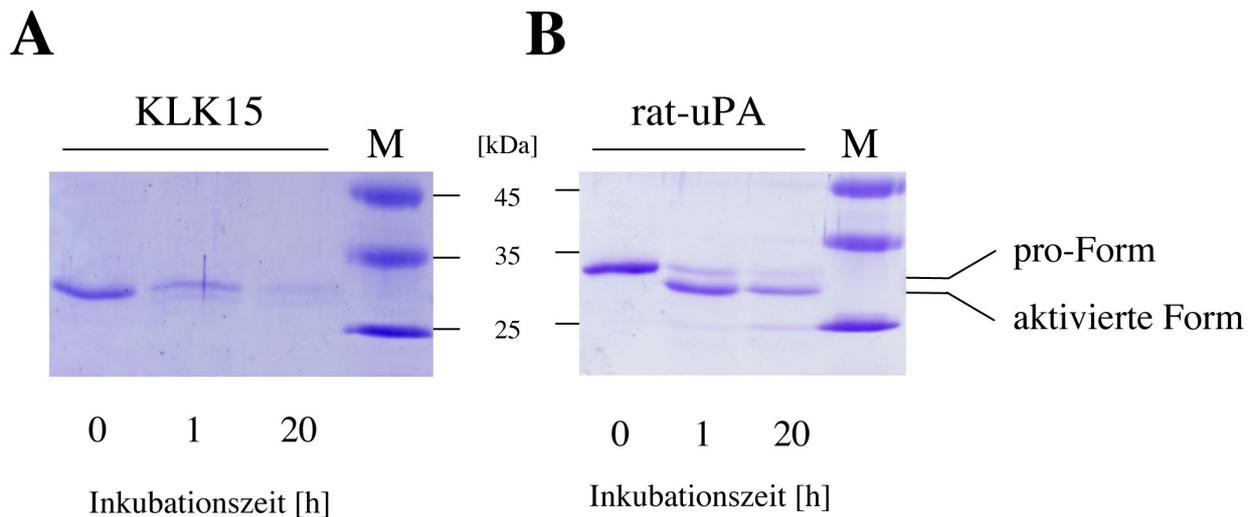


Abb. 30: **A** SDS-Page nach Coomassie-Färbung mit KLK15 jeweils nach Enterokinaseaktivierung (0,5 U/ μ g), zum Zeitpunkt der Aktivierung in Spur 1 gefolgt von einer Spur KLK15 nach 1 h bzw. nach 20 h und Marker MW in der dritten Spur. Bereits in den ersten Minuten erfolgt die Abspaltung des N-Terminus, es tritt eine etwas verkürzte Form des Proteins auf (zweite Bande). Im Zeitverlauf degradiert das gesamte Protein. In der Literatur wird dies bereits für KLK6 beschrieben, was auf Selbstverdau zurückgeführt wird (Blaber, Scarisbrick, *et al.*, 2002). Eine weitere Erklärung für die schnelle Degradation der Proteine bereits 1h nach Zugabe von Enterokinase könnte auch sein, dass dieses Enzym seine Spezifität verliert und das Protein an verschiedenen Stellen unspezifisch schneidet. **B** Dargestellt wird zum Vergleich die erfolgreiche Enterokinaseaktivierung von rekombinantem Ratten-pro-uPA, das unter identischen Bedingungen als Positivkontrolle in der ersten Stunde nach proteolytischer Abspaltung seiner A-Kette als aktives Protein vorliegt.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen mit KLK15 fällt in der Positivkontrolle mit

4. Ergebnisse

Ratten-uPA die nahezu vollständige Umwandlung in die mature Form auf, das freundlicherweise von S. Creutzburg zur Verfügung gestellt wurde (*Abb. 30*). Bereits nach 1h liegt ein stabiles Molekül vor, nach 20h ist das gesamte Protein umgewandelt und stellt sich in verkürzter, aktiver Form dar.

4.6.2 Trypsinaktivierung von pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl

Zur Aktivierung der "natürlichen" pro-Form von KLK15 wurde Trypsin eingesetzt. Es gehört zu den Endopeptidasen, ist ebenfalls eine Serinprotease und spaltet selektiv Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein. Bei Inkubation von pro-KLK15 mit Trypsin konnte man ebenfalls eine geringe Entstehung einer potentiell aktiven Form feststellen, aber längere Inkubation war wiederum mit Degradation des Proteins verbunden. pro-KLK15ntfl war dagegen sehr instabil und wurde unspezifisch gespalten. Dieses Protein ist wahrscheinlich nicht funktional, fehlgefaltet und wird daher abgebaut (*Abb. 31*).

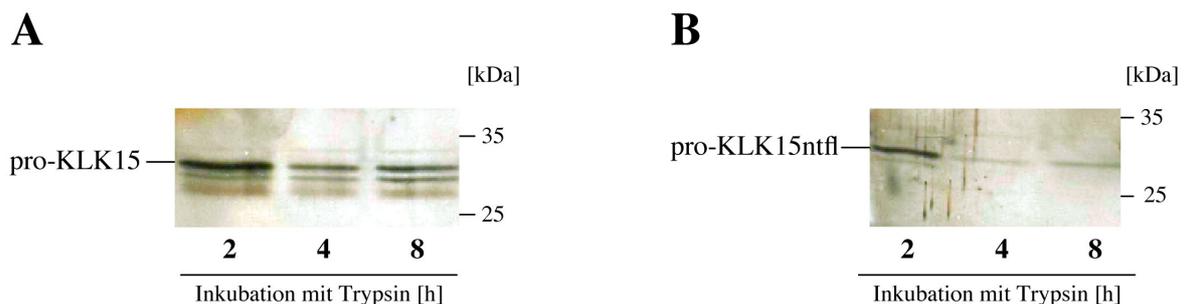


Abb. 31: Silberfärbung nach Trypsinaktivierungsversuchen mit Probenentnahme zum Zeitpunkt der Trypsinzugabe bzw. jeweils 2h, 4h, 8h sowie über-Nacht-Inkubation bei 37 °C (variiert nach Takayama 2001). Während pro-KLK15 offenbar an verschiedenen Stellen von Trypsin unspezifisch gespalten wurde, degradierte pro-KLK15ntfl bereits nach 4h.

4.7 Substrattests mit chromogenen und fluorogenen Substraten

Das aktivierte Enzym aus *Abb. 30* wird anschließend verwendet, um Aktivitätstests mit chromogenen und fluorogenen Substraten durchzuführen.

4.7.1 Substrattests mit chromogenen Substraten

Serinproteasen verfügen charakteristischerweise über einen Serinrest im aktiven Zentrum des

4. Ergebnisse

Enzyms. In Verbindung mit zwei weiteren Aminosäuren, Histidin₅₇ und Aspartat₁₀₂, bildet dieser die sogenannte katalytische Triade der Serinproteasen. In seiner aktiven Form kann dieser Serinrest Peptidbindungen katalytisch hydrolysieren. Nach der Aminosäuresequenz der katalytischen Reste werden die Serinproteasen weiter differenziert. Die Trypsin-ähnliche Gruppe der Serinproteasen spaltet Peptidbindungen, die auf basische Aminosäuren folgen, wie beispielsweise Arginin oder Lysin, denn sie verfügen über einen Aspartat- oder Glutamat- Rest in der substratbindenden Tasche. Mit den basischen Aminosäuren kann dieser starke elektrostatische Bindungen eingehen.

Die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen dagegen haben eine unpolare substratbindende Tasche und bevorzugen eine aromatische oder unpolare Aminosäure wie Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin oder Leucin als Substrat. Zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen werden chromogene und fluorogene Substrate verwendet. Spaltet ein aktives Enzym diese Substrate, wird ein Chromogen (Farbstoff) bzw. ein Fluorogen (Fluoreszenzfarbstoff) freigesetzt. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Paranitroanilin (pNA) vom Substrat, einem Oligopeptid (**Tab. 9**). Durch eine Verfärbung kann eine Enzymaktivität detektiert werden. Mittels der Intensität der Färbung kann die enzymatische Aktivität (Enzymkinetik) bestimmt werden. Es wurden zur Kontrolle auch Substrate für Chymotrypsin verwendet. Siehe dazu auch Kap.3.2.9.2.

Chromogenes Substrat Aminosäuresequenz

K-1305	H-Histidin-pNA
L-1455	H-Glutamat-Glycin-Arginin-pNA
L-1480	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA
L1515	Tos-Glycin-Prolin-Lysin-pNA
S-2222	Bz-Isoleucin-GlutamatγOR-Glycin-Arginin-pNA

Tab. 9: Aminosäuresequenzen der verwendeten, pNA-gekoppelten Oligopeptidsubstrate. H-, Tos- und Bz- sind Schutzgruppen bei der Herstellung der jeweiligen pNA-Substrate, die an den N-Terminus der Peptidsequenz gebunden sind.

In diesen chromogenen Versuchen zeigt KLK15 (mit synthetischem pro-Peptid inkl. Enterokinasespaltstelle, das durch Enterokinase aktiviert wurde, die anschließend wieder eliminiert wurde), keine nachweisbare Aktivität bei den verwendeten Substraten im Vergleich zur Pufferkontrolle. Als Positivkontrolle spaltete Ratten-uPA dagegen die Substrate S-2222, L-1480 und L-1455 erfolgreich. Bei diesen Substrattests ist die Aktivität von KLK15 und KLK15ntfl somit noch unklar (**Abb. 32**).

4. Ergebnisse

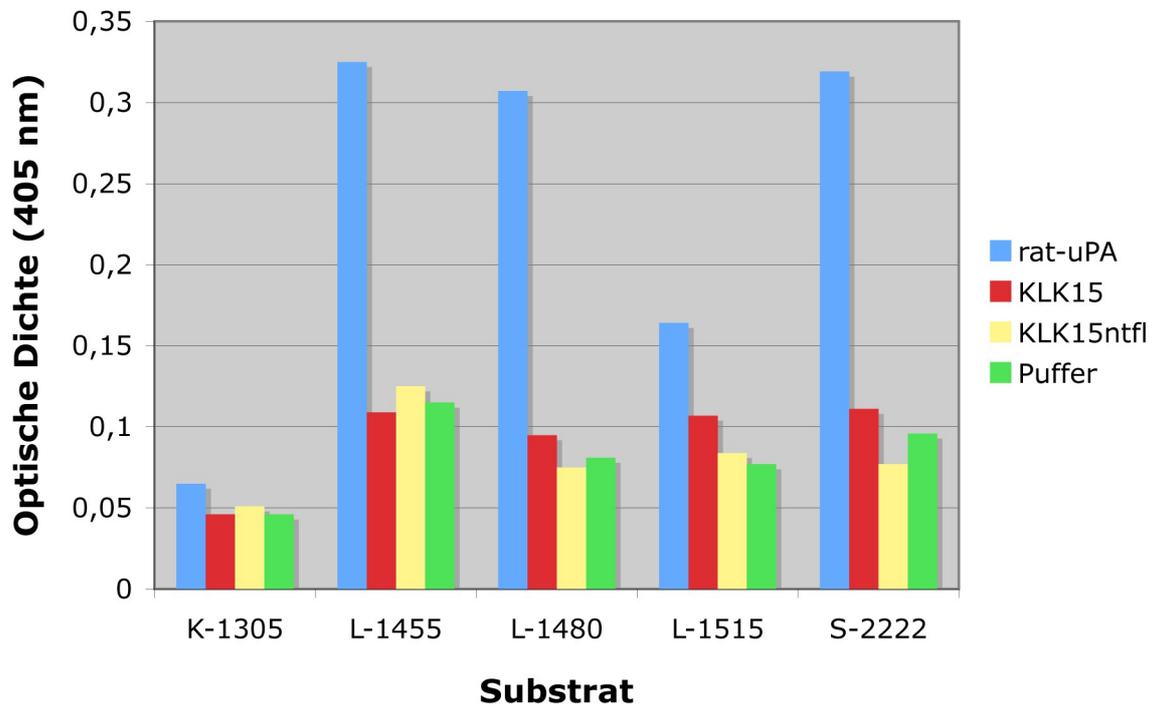


Abb. 32: Ergebnisse der Inkubationstests mit fünf chromogenen Substraten (Bachem) mit KLK15 und Ratten-uPA(1U/ μ l) als Positivkontrolle. Es zeigt sich im Aktivitätstest nach 1h keine Favorisierung eines bestimmten Substrates durch KLK15 im Vergleich zur Negativkontrolle (Puffer), was sich sowohl bei KLK15 als auch bei KLK15ntfl (nicht abgebildet) beobachten lässt.

4.7.2 Substrattests mit fluorogenen Substraten

Da die Substrate, die für die chromogenen Essays eingesetzt wurden, möglicherweise nicht sensitiv genug sind, werden nachfolgend fluorogene Substrate zum Nachweis einer enzymatischen Aktivität von KLK15 ausgetestet.

Für die Substrattests mit fluorogenen Farbstoffen wurden an das Fluorophor AMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin) gekoppelte Di- und Tripeptide verwendet. AMC ist ein heterozyklisches Molekül mit zahlreichen konjugierten Doppelbindungen. Seine Aminogruppe ist in den Substratmolekülen mit der terminalen Carboxylgruppe der Peptide Prolin-Arginin, Phenylalanin-Arginin bzw. Leucin-Arginin verbunden. Wenn diese Peptidbindung von KLK15 gespalten wird, verschwindet dadurch eine der konjugierten Doppelbindungen und die optischen Eigenschaften des AMC ändern sich.

Man kann deshalb durch zweckmäßige Wahl der Messbedingungen die freie von der gebundenen Form unterscheiden. Die Messwellenlängen wurden so festgelegt, dass nur freies AMC fluoresziert.

4. Ergebnisse

Die Aminosäuresequenzen der vier verwendeten Substrate wurden so gewählt, dass sie von KLK15 besonders gut umgesetzt werden sollten (**Tab. 10**). Die aktive Protease KLK15 sollte die Substrate nach dem Arginin spalten, das so frei gesetzte AMC fluoresziert. Zusätzlich dazu werden auch zwei Substrate von Chymotrypsin getestet. Die Fluoreszenz von AMC wird bei 380 nm angeregt und zwischen 430-460 nm emittiert (Nicholson *et al.*, 1995). Die Fluoreszenzantwort wird in einem Fluorometer gemessen (**Abb. 33**).

Fluorogenes Substrat	Aminosäuresequenz
Ac-SPR	Serin-Prolin-Arginin-AMC
Tos-GPR	Glycin-Prolin-Arginin-AMC
Z-LR	Leucin-Arginin-AMC
Tos-FR	Phenylalanin-Arginin-AMC
Suc-AAPF	Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-AMC
Suc-AAPY	Alanin-Alanin-Prolin-Tyrosin-AMC

Tab. 10: Aminosäuresequenzen der verwendeten, AMC-gekoppelten Oligopeptidsubstrate. Ac-, Tos-, Z- und Suc- sind Schutzgruppen bei der Herstellung der jeweiligen AMC-Substrate, die an den N-Terminus der Peptid-Sequenz gebunden sind.

Mit den fluorogenen Substraten Ac-SPR und Tos-GPR wurde nun eine deutliche Aktivität von KLK15 meßbar (**Tab. 11**).

min	Ac-SPR	Tos-GPR	Z-LR	Tos-FR	Suc-AAPF	Suc-AAPY
0	0	0	0	0	0	0
5	30	12	6	4	2	4
10	55	19	9	7	1	6
15	78	32	18	17	3	5
20	100	63	20	20	3	7
25	148	95	27	26	2	7
30	172	111	36	35	3	8
35		128	43	42	4	9
40		141	56	58	4	8
45		158	72	74	4	9

Tab. 11: Fluoreszenz-Meßwerte der 6 AMC-gekoppelten Oligopeptidsubstrate. Die Spaltungsreaktion wird im Fluorometer bei 25 °C in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Anregung: 380 nm; Emmision: 460 nm). Alle 5 min wird über den Zeitraum von 45 min gemessen.

Aktivitätstest mit KLK15

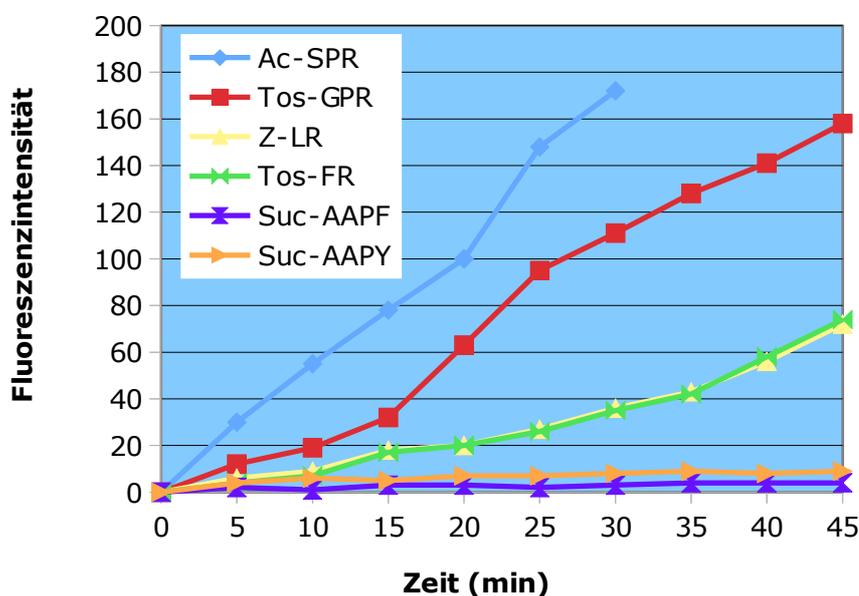


Abb. 33: Fluorometrische Erfassung der Abspaltung von AMC. Die Spaltungsreaktion wird im Fluorometer bei 25 °C in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Anregung: 380 nm; Emmision: 460 nm). Ac-, Tos-, Z- und Suc- sind Schutzgruppen bei der Herstellung der jeweiligen AMC-Substrate. Die Steigung der Meßgeraden ist proportional zur Aktivität von KLK15. Hellblau dargestellt ist das Tripeptid Ser-Pro-Arg-AMC, rot das Tripeptid Gly-Pro-Arg-AMC, gelb das Dipeptid Leu-Arg-AMC, grün das Dipeptid Phe-Arg-AMC, orange das Tetrapeptid und Substrat von Chymotrypsin Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, sowie violett das Tetrapeptid Ala-Ala-Pro-Tyr-AMC, das auch von Chymotrypsin bevorzugt wird. Die letzten beiden Substrate werden offenbar von KLK15 nicht gespalten.

4.8 Inkubation von pro-KLK15 mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen

Wenn man pro-KLKs enzymatisch aktiven KLKs exponiert, können sie von diesen aktiviert, degradiert oder inaktiviert werden. Infolgedessen wurde in einem anderen Versuchsansatz die potentielle Aktivierung der pro-Form von KLK15 durch andere KLKs untersucht. Dieser Ansatz verlief positiv am Beispiel von pro-KLK11, das durch KLK4 in die aktive Form überführt wurde (**Abb. 34**). Um die Abspaltung der den *His-Tag* enthaltenden pro-Sequenz, also des N-Terminus, bei pro-KLK11 zu veranschaulichen, wurden *Westernblot*-Analysen durchgeführt. Spezifische Antikörper gegen die N-terminalen sechs Histidine, die nach Zugabe von aktivem KLK4 mit der pro-Sequenz abgespalten wurden, verdeutlichten diesen Vorgang durch Signalverlust. Mit Antikörpern gegen das C-terminale *Tag100-Epitop* wurde aufgezeigt, wie das mature, aktive Protein KLK11 in diesem Zeitintervall zunimmt. Es ist etwas kürzer als pro-KLK11, da mit den sechs

Histidinen auch die pro-Sequenz mittels Zugabe von KLK4 abgespalten wurde und es migriert daher im elektrischen Feld schneller.

Semi-dry-Westernblot-Analysen:

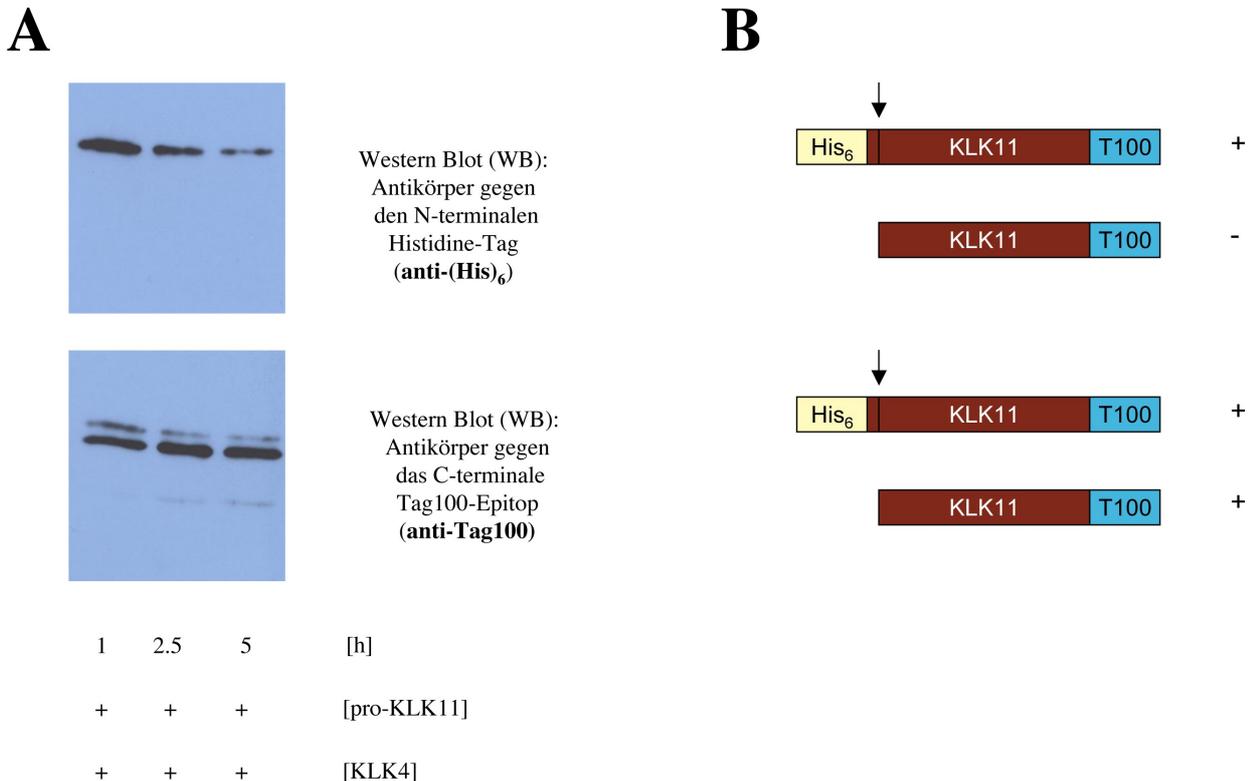


Abb. 34: **A** Westernblot-Analysen, um die Abspaltung der den *His-Tag* enthaltenden pro-Sequenz, also des *N-Terminus*, bei pro-KLK11 aufzuzeigen. Verwendet wurden Antikörper gegen die N-terminalen sechs Histidine, die nach Zugabe von aktiver KLK4 mit der pro-Sequenz abgespalten wurden. Dieser Vorgang wurde jeweils 1h, 2,5h bzw. 5h nach Enzymzugabe detektiert. Dargestellt werden hier die Ausschnitte des Films, die der Lokalisation des relevanten Antigens, also dem *His-Tag* entsprechen. Im Bild darunter wurde mit Antikörpern gegen das C-terminale *Tag100-Epitop* aufgezeigt, wie das mature, aktive Protein KLK11 in diesem Zeitintervall zunimmt. Es ist etwas kürzer als pro-KLK11, da mit den sechs Histidinen auch die pro-Sequenz mittels Zugabe von KLK4 abgespalten wird und es migriert daher im elektrischen Feld schneller. Hier kann man auch beobachten, dass KLK4 mit fortschreitender Zeit die Proteine unspezifisch zu lysieren beginnt, was die schwach sichtbaren kleineren Fragmente erklärt. Die Ausschnitte des Films werden dargestellt, die der Lokalisation des relevanten Antigens, also des *Tag100-Epitops* entsprechen.

B Schematische Darstellung der Aktivierung von pro-KLK11 zu KLK11 mithilfe der Kallikrein-ähnlichen aktiven Protease KLK4 (Pfeil). Spezifische Antikörper gegen das C-terminale *Tag100-Epitop* verdeutlichen die Umwandlung in das mature, aktive Protein KLK11 in diesem Zeitintervall, es zeigt sich eine Signalzunahme, während das Signal der Anti-*His-Tag*-Antikörper abnimmt.

4. Ergebnisse

Um daher in gleicher Weise die Auswirkungen von aktiven Proteasen auf pro-KLK15 aufzuzeigen, wurde dieses unbehandelt als Kontrolle (NT), oder aktiver KLK6 bzw. KLK4 in einem molaren Enzym/Substratverhältnis von 1:100 sowie 1:10 ausgesetzt und über 1h bei 37 °C inkubiert.

Nach Inkubation der aktiven Enzyme mit pro-KLK15 wurde die Reaktion auf Eis beendet und die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch einen *Immunoblot* analysiert, indem man einen *Anti-His-Tag*-mAk und dann einen *Anti-Tag100*-mAk verwendet.

4.8.1 Inkubation von pro-KLK15 mit KLK6

Bei der Inkubation von pro-KLK15 mit aktivem KLK6 ist keine Reaktion zu beobachten, was darauf hinweist, dass keine proteolytische Spaltung auftritt. pro-KLK15 bleibt stabil mit unverändertem *N-Terminus*, der *Histidin-Tag* wird selbst nach 1h Inkubationszeit und einem Enzym/Substratverhältnis von 1/10 nicht abgespalten. Auch der *C-Terminus* mit dem *Tag100-Epitop* ist nach diesem Zeitintervall offenbar unverändert vorhanden, was darauf hinweist, dass unter Exposition mit aktivem KLK6 auch keine unspezifische Spaltung auftritt, was die *Westernblot*-Analyse (**Abb. 35A**) veranschaulicht.

4.8.2 Inkubation von pro-KLK15 mit KLK4

Bei Inkubation mit aktivem KLK4 stellt sich pro-KLK15 zunächst unverändert dar, weshalb das Enzym/Substratverhältnis von 1/100 auf 1/10 erhöht wird. Jetzt stellt es sich heraus, dass pro-KLK15 bereits nach einer Stunde unter dem Enzym/Substratverhältnis von 1/10 degradiert. Aktives KLK4 ist demzufolge in der Lage, pro-KLK15 zu spalten. Sowohl der *N-Terminus* mit dem *Histidin-Tag*, als auch der *C-Terminus* mit dem *Tag100-Epitop* werden abgespalten, was also auf einen unspezifischen Abbau des Proteins durch aktives KLK4 hindeutet (**Abb. 35B**).

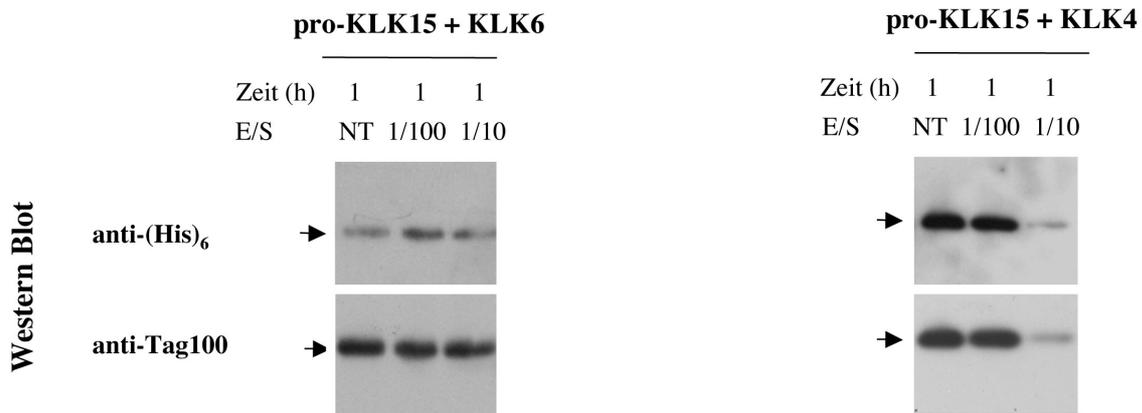
A**B**

Abb. 35: pro-KLK15 wird unbehandelt als Kontrolle (NT), oder KLK6 bzw. KLK4 ausgesetzt in einem molaren Enzym/Substratverhältnis von 1:100 sowie 1:10, über 1h bei 37 °C. Anschließend wird das Reaktionsgemisch durch *Immunoblot* analysiert, indem man einen Anti-*His-Tag*-mAk (obere Fläche), und dann einen Anti-*Tag100*-mAk (untere Fläche) verwendet. Die Ausschnitte des Films werden dargestellt, die der Lokalisation des relevanten Antigens entsprechen und die mindestens zwei unabhängige Experimente repräsentieren. Bei der Inkubation mit KLK6 ist keine Reaktion zu beobachten, während sich bei Inkubation mit KLK4 eine deutliche Degradation von pro-KLK15 zeigt.

4.8.3 Auswirkungen von 7 KLKs auf pro-KLK15

Insgesamt wurde das Spaltungsmuster von 7 KLK-Proteasen und pro-KLK15 analysiert. Keine der verwendeten KLKs war jedoch in der Lage, das N-terminale pro-Peptid von KLK15 abzuspalten (**Tab. 12**), sondern hatte entweder keinen Effekt oder baute pro-KLK15 ab. Im Gegensatz dazu wurde pro-KLK11 von 4 der getesteten Proteasen aktiviert (**Tab. 13**).

4. Ergebnisse

	pro-KLK15
KLK4	D
KLK5	D
KLK6	N
KLK7	D
KLK8	N
KLK10	N
KLK11	N

Tab. 12: Unter Exposition mit 7 KLKs zeigt pro-KLK15 Degradation oder keine Auswirkung. Die Auswertung mit *Immunoblot* wird in der Legende D=Inaktivierung/Degaradation und N=keine Auswirkung bezeichnet.

5. Diskussion und Schlussfolgerung

Die mRNA von *KLK15* ist in Ovarialkarzinomgewebe verglichen mit benignem Ovarialgewebe in höherer Konzentration nachweisbar (Mavridis *et al.*, 2010). Somit liegt der Verdacht nahe, dass sie möglicherweise an tumorassoziierten Prozessen beteiligt sein könnte. Nicht nur bei dieser, meist erst im fortgeschrittenen Stadium erkannten Tumorerkrankung, sondern auch bei Tumoren anderer endokrin aktiver Gewebe, wie der Prostata, dem Pankreas oder der Schilddrüse könnte sie proteolytische Vorgänge verursachen, die den Krankheitsprozeß beschleunigen. Um daher diese Protease biochemisch charakterisieren zu können, werden große Mengen an diesem Protein benötigt. Deshalb muß sie im Labor möglichst unter ähnlichen Bedingungen wie dem menschlichen Organismus produziert und rückgefaltet werden. Außerdem müssen sowohl potentielle Substrate als auch Inhibitoren erprobt werden. So kann seine biochemische Funktion im menschlichen Enzymnetzwerk ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurde das Mitglied der humanen KLK-Familie und seine Spleißvariante KLK15ntfl, sowie deren pro-Formen als rekombinante Proteine in *E. coli* produziert. pro-KLK15 unterscheidet sich vom maturen, enzymatisch aktiven Protein durch das Vorhandensein eines pro-Peptides, das sehr klein ist (6 Aminosäuren) und nach Aktivierung der pro-Form abgespalten wird.

5.1 Klonierung der maturen Formen und der pro-Formen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen

Das erste Klonierungsmodell einer synthetischen pro-Form von KLK15, bei der das natürlich vorhandene pro-Peptid aus 6 Aminosäuren durch ein synthetisches mit einer Enterokinasespaltstelle ersetzt wird, ist für die Produktion des maturen aktiven Enzyms KLK15 geeignet. Enterokinase (oder auch Enteropeptidase genannt) ist eine Hydrolase, die bei Wirbeltieren von Enterozyten in der Duodenalschleimhaut gebildet wird. Durch Abspaltung eines Hexapeptids (V-[D]₄-K) wandelt die membrangebundene Enterokinase das inaktive pro-Enzym Trypsinogen in dessen aktive Form Trypsin um, wodurch es indirekt weitere Enzyme des Pankreassekrets für Verdauungsvorgänge aktiviert. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Klonierung zunutze, da die Enterokinase spezifisch hinter der Erkennungssequenz [D]₄-K spaltet. Aus diesem Grund befindet sich der Histidin-Tag, den man für die Reinigung des Proteins benötigt, N-terminal, also vor der Enterokinasespaltstelle.

Inkubiert man also die synthetische pro-Form von KLK15 mit dem Enzym Enterokinase, spaltet diese spezifisch alle N-terminal gelegenen Aminosäuren inklusive Histidin-Tag ab. Bei nachfolgenden *Westernblot*-Analysen kann man durch den Signalverlust des Histidin-Tags

nachweisen, dass nun die mature, aktive Form von KLK15 vorliegt und das pro-Peptid vollständig abgespalten wurde. Zur Klonierung der maturen Formen und der pro-Formen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen *KLK15* und *KLK15ntfl* war es daher wichtig, zunächst geeignete Vektoren auszuwählen. Für das mature Protein fiel die Wahl auf den Vektor pQE30, der die Sequenz 6 x His unmittelbar vor der Klonierungsstelle kodiert. Dieser 6 x *His-Tag* (6 Histidinreste hintereinander) wird auch für die Reinigung der Proteine mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitäts-Chromatographie benötigt. Ein zweites Klonierungsmodell für die Produktion von pro-KLK15, der „natürlichen“ Vorstufe von KLK15 mit einem pro-Peptid von 6 Aminosäuren, wurde entworfen, um potentielle Aktivatoren zu ermitteln und Aktivierungsversuche zu veranschaulichen. Um das aktivierte Enzym KLK15 im *Westernblot* von der inaktiven pro-Form eindeutig differenzierbar zu machen, wurde das *Template* von *pro-KLK15* in einen Vektor ligiert, der neben dem Histidin-Tag zusätzlich ein *Tag100-Epitop* enthält (**Abb. 36**). Deshalb bot sich für die Klonierung von *pro-KLK15* und *pro-KLK15ntfl* der Vektor pQE100 an, der zwei *Tags*, den 6 x *His-Tag* und das *Tag100-Epitop* enthält.

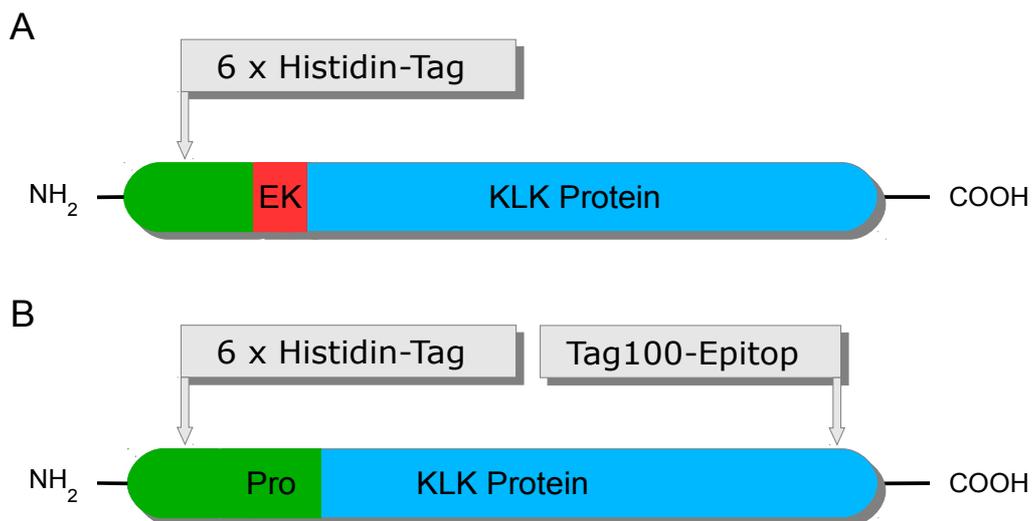


Abb. 36: **A** Schematische Darstellung der KLK15-Protease mit synthetischem pro-Peptid inklusive Enterokinasespaltstelle nach Klonierung in den Vektor pQE30. Der Pfeil markiert den 6 x *His-Tag* über den eine Identifikation der Proteine in pro-Form ermöglicht wird. Der 6 x *His-Tag* besteht aus 6 Histidinresten, die von anti-*His-Tag*-Antikörpern in *Westernblot*-Analysen spezifisch detektiert werden und über die eine Bindung an Nickelionen mit späterer Reinigung über Nickel²⁺-Affinitäts-Chromatographie erfolgen kann. **B** Schematische Darstellung der pro-KLK-Proteasen nach Klonierung in den Vektor pQE100. An den zusätzlichen *Tag100* können spezifische Antikörper binden, so dass pro-Sequenz enthaltendes und matures Enzym exakt voneinander unterschieden werden können. Nach erfolgreicher Aktivierung bleibt das Signal des C-terminalen *Tag100-Epitops* im *Westernblot* an den verkürzten Proteinen erhalten, während das Signal der anti-*His-Tag*-Antikörper im Zeitverlauf abnimmt.

Nach Ligation der *pro-KLK15*-Sequenz in pQE100 befindet sich der Histidin-*Tag* am N-terminalen Ende und das *Tag100-Epitop* am C-terminalen Ende. Dadurch konnte das aktivierte Protein mittels *Westernblot*-Analysen und speziellen Antikörpern erkannt und von der pro-Form unterschieden werden. Diese Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Form der KLK-Proteasen war die Grundvoraussetzung, um die Aktivierungsmuster der Kallikrein-ähnlichen Proteasen weiter untersuchen zu können, denn spezifische Antikörper gegen dieses *Epitop* signalisieren im Westernblot eine Aktivierung, Degradation /Inaktivierung oder auch eine fehlende Spaltung durch potentielle Aktivatoren auf das pro-Enzym.

5.2 Transformation der Expressions-Plasmide in *E. coli*, Expression und Reinigung von KLK15, KLK15ntfl, pro-KLK15 und pro-KLK15ntfl

Debela *et al.* (2006) zeigten am Beispiel von 7 Kallikrein-ähnlichen Proteasen (KLK3/PSA, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK10, und KLK11), dass das *E. coli*-Bakterienmodell zur Produktion von KLKs eine Reihe von Vorteilen mit sich bringt. Die hervorragende Steuerbarkeit durch Induktion der Expression mit IPTG führt zu einer großen Ausbeute an erwünschtem Protein. Die Reinigung über Ni²⁺-NTA-Säulen ergibt einen hohen Anteil an reinem, ungefaltetem Protein. Auch im Fall von KLK15, pro-KLK15, KLK15ntfl und pro-KLK15ntfl ließen sich in diesem Bakterienmodell mit *E. coli* zunächst recht große Mengen reinen Proteins produzieren.

5.3 Die Rückfaltungen der Kallikrein-ähnlichen Proteasen KLK15, KLK15ntfl und deren pro-Form

Es stellt sich jedoch anschließend heraus, dass bei der Rückfaltung dieser Proteine in die natürliche Tertiärstruktur, im Gegensatz zu vielen anderen KLKs, offenbar ein erheblicher Anteil in den Dialyseschläuchen präzipitierte. Dieser Proteinmengenverlust zog weitere Probleme bei anschließenden Aktivierungsversuchen nach sich.

Möglicherweise werden sich bei der Produktion von KLK15 und Varianten andere Modelle, wie beispielsweise mittels Hamster- oder Hefezellen, als erfolgversprechender herausstellen, was die Menge an korrekt rückgefaltetem, aktivem Protein betrifft. Die beiden getesteten Rückfaltungsprotokolle in Dialyseschläuchen erwiesen sich als relativ unproduktiv, denn es zeichnete sich im Laufe der Rückfaltungsversuche ab, dass pro-KLK15, KLK15ntfl und rekombinante KLK15 sowie rekombinante KLK15ntfl kompliziert rückzufalten sind, da sie auch bei wechselnden Bedingungen in den verschiedenen Protokollen aufgrund hoher Präzipitationsraten zu mäßiger Ausbeute führten. Die kompliziertere „*drop-wise*“- Methode dagegen erbrachte bei der

Rückfaltung von KLK15 etwas effizientere Ergebnisse. Der Vorteil dieser Methode, der sie den anderen Rückfaltungsprotokollen in Dialyseschläuchen überlegen macht, ist das große Puffervolumen, in dem sich die kleine Menge eingetropftes Protein ungehemmter rückfalten kann, als in engen Dialyseschläuchen. Die Proteine treten weniger häufig miteinander in Wechselwirkung, und bilden daher leichter stabile Komplexe. Dieses große Volumen muß anschließend selbstverständlich wieder aufkonzentriert werden.

5.4 Substrattests mit chromogenen und fluogenen Substraten

Bei den Serinproteasen besteht das aktive Zentrum, die katalytische Triade, aus den drei Aminosäuren Serin₁₉₅, Histidin₅₇ und Aspartat₁₀₂. Im Fall von KLK15 befindet sich im aktiven Zentrum außerdem das ungewöhnliche Glutamat₁₈₉, (bei allen anderen KLKs befindet sich hier typischerweise ein Aspartat, das charakteristisch für die Enzymspezifität ist). Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade stehen über Wasserstoffbrückenbindungen in Verbindung (**Abb. 37**).

Nach Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt ein nukleophiler Angriff des Serin-Sauerstoffs auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung unter Ausbildung einer kovalenten Tetraeder-Zwischenstufe. Dabei wird das Proton der Hydroxylgruppe der Serins₁₉₅ zum Histidin₅₇ übertragen. Im zweiten Schritt dient das soeben übertragene Proton zur Protonierung des Peptid-Stickstoffs, wodurch die Peptidbindung gespalten wird. Das entstandene C-terminale Fragment des Proteins diffundiert weg und wird durch Wasser ersetzt, unter Ausbildung eines Acyl-Enzym-Komplexes. Eine Wasserstoffbrücke zum Histidin-Rest ermöglicht den nukleophilen Angriff des Wassers am seringebundenen Carbonyl-Kohlenstoff. Nach vollständiger Übertragung des Wasserstoffs zum Histidin erfolgt im letzten Schritt die Ausbildung der ursprünglichen Wasserstoffbrücke zwischen Serin₁₉₅ und Histidin₅₇.

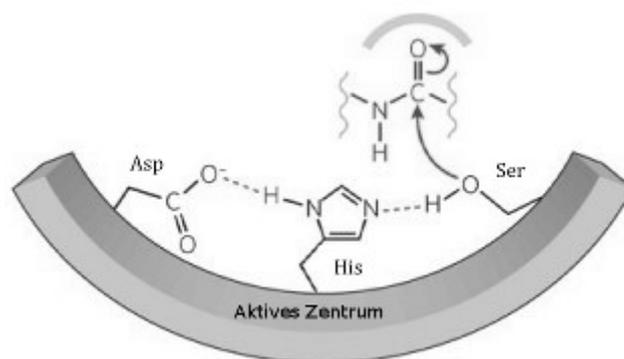


Abb. 37: Das aktive Zentrum mit den 3 Aminosäuren Histidin₅₇, Serin₁₉₅ und Aspartat₁₀₂, die die katalytische Triade bilden. Serinproteasen modifizieren Peptidbindungen durch einen nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung des Zielproteins bei der Hydroxylgruppe der Seitenkette von Serin. So erfolgt die Bindung

des Substrates an das aktive Zentrum. Modifiziert nach Erez *et al.*, 2009.

Nun wird die kovalente Bindung zum Substrat gespalten und der neuentstandene C-Terminus des gespaltenen Proteins kann abdiffundieren (Voet *et al.*, 1994). Untersuchungen zur Rolle des Aspartat₁₀₂ haben gezeigt, dass die mit dem Imidazolrest von Histidin₅₇ ausgebildete Wasserstoffbrücke zur Stabilisierung des Übergangszustandes beiträgt (Löffler und Petrides, 2006). Die Aktivierungsversuche mit Enterokinase erzeugten nach Abspaltung des pro-Peptids ein instabiles Protein. Während des Enterokinase-induzierten Aktivierungsschrittes von KLK15 und KLK15ntfl wurde eine schnelle Degradation beobachtet. Dies könnte entweder darauf hinweisen, dass KLK15 ein hervorragendes Substrat für Enterokinase darstellt und effizient verdaut wird, oder dass KLK15 infolge seiner Aktivierung durch Enterokinase möglicherweise autoproteolytisch wirkt.

Um aufzuzeigen, inwieweit KLK15 und ihre Spleißvariante KLK15ntfl enzymatisch aktiv sind, wurden Substrattests mit chromogenen und fluorogenen Substraten durchgeführt. In vorliegenden chromogenen Versuchen war keine enzymatische Aktivität von KLK15 nachweisbar, da aufgrund der Problematik eines enormen Enzymmengenverlusts während der Rückfaltung zu wenig aktives Enzym eingesetzt werden konnte. KLK15 zählt zu den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, sie spaltet hinter Lysin oder Arginin, denn in ihrer S1-Tasche befindet sich ein Glutamatrest (Glu₁₈₉). Doch auch bei den Trypsin-ähnlichen Substraten trat keine Spaltung auf. Aus diesem Grund wurde ein sensitiveres Modell zum Nachweis enzymatischer Aktivität ausgewählt, in dem fluorogene Substrate zum Einsatz kamen. Bei zwei fluorogenen Substraten, Ac-SPR und Tos-GPR war eine deutliche Aktivität von KLK15 meßbar. Sie deutete, wie erwartet, auf eine trypsinähnliche proteolytische Aktivität hin. Die beiden Chymotrypsin-Substrate mit Phenylalanin oder Tyrosin an P1 wurden von KLK15 nicht gespalten. Offenbar wird das AMC deutlich schneller vom Tripeptid Ser-Pro-Arg abgespalten als von Gly-Pro-Arg. Die Tripeptide mit Arginin werden von KLK15 gegenüber den Dipeptiden mit Arginin bevorzugt, es könnte sein, dass sie besser als die Dipeptide an das Enzym binden.

5.5 Inkubation von pro-KLK15 mit anderen Kallikrein-ähnlichen Proteasen

Da bei vielen KLKs bereits Autoaktivierung, sowie gegenseitige Aktivierung der Proteine in aktiver oder inaktiver Form beobachtet wurden, stellte sich die Frage, ob die Vorstufe von KLK15 durch andere KLKs in die aktive Form umgewandelt werden kann. Die Strategie, die Aktivierung von *double-tagged* pro-KLKs zu analysieren, erlaubt bei hohem Durchsatz die *in vitro* Analyse von dutzenden pro-KLK/KLK-potentiellen Aktivatorpaaren (Beaufort *et al.*, 2010).

5. Diskussion und Schlussfolgerung

Dieser Versuchsansatz verlief bei pro-KLK11 positiv, mit den 4 aktiven KLK-Proteasen KLK4, KLK5, KLK6 und KLK8. Die *Westernblot*-Analysen wiesen die Entstehung einer verkürzten Form der Protease pro-KLK11 während der Inkubation mit diesen aktiven KLKs nach. Das Signal des Histidin-*Tags* wurde immer schwächer und verschwand im Zeitverlauf, während der Hauptbereich des Proteins in einer um 12 Aminosäuren verkürzten Form als neue Bande im elektrischen Feld etwas weiter migrierte. Dies belegt die erfolgreiche Abspaltung des 6 Aminosäuren umfassenden pro-Peptids und des 6xHistidin-*Tags* (**Abb. 34**).

Werden pro-KLKs mit enzymatisch aktiven KLKs konfrontiert, können sie von diesen aktiviert, degradiert oder inaktiviert werden. Bei der Inkubation von pro-KLK15 mit aktiviertem KLK6 war keine Reaktion zu beobachten, was darauf hinweist, dass keine proteolytische Spaltung auftrat. pro-KLK15 blieb stabil mit unverändertem N-*Terminus*, auch der C-*Terminus* mit dem *Tag100-Epitop* war nach einer Stunde offenbar unverändert vorhanden, was darauf hinweist, dass unter Exposition mit aktiviertem KLK6 auch keine unspezifische Spaltung auftrat. Bei Inkubation mit KLK4 hingegen degradierte pro-KLK15 bereits nach einer Stunde. Aktives KLK4 ist demzufolge in der Lage, pro-KLK15 unspezifisch proteolytisch zu spalten. Sowohl der N-*Terminus* mit dem Histidin-*Tag*, als auch der C-*Terminus* mit dem *Tag100-Epitop* wurden abgespalten.

	pro-KLK11	pro-KLK15
KLK4	A	D
KLK5	A	D
KLK6	A	N
KLK7	N	D
KLK8	A	N
KLK10	N	N
KLK11	N	N

Tab. 13: Unter Exposition mit 7 KLKs zeigte pro-KLK11 Aktivierung oder keine Auswirkung, während pro-KLK15 degradierte oder unverändert blieb. Die Auswertung mit *Immunoblot* wird in der Legende mit A= Aktivierung, D= Inaktivierung/Degradation und N= keine Auswirkung bezeichnet (Tab. modifiziert nach Beaufort *et al.*, 2010).

Übereinstimmend zeigten die Ergebnisse von Yoon *et al.* (2009), dass die Hydrolyse von pro-KLK15 durch KLK4 in einer permanent inaktiven Form von KLK15 resultiert. Somit inhibiert KLK4 offenbar die Aktivierung von pro-KLK15 (Yoon *et al.*, 2007, Yoon *et al.*, 2009). Desweiteren beobachtete diese Gruppe, dass KLK15 signifikante Aktivität sowohl gegenüber Arg- als auch Lys-enthaltenden KLK pro-Sequenzen aufweist. Es stellte sich heraus, dass KLK15 erfolgreich pro-

KLK8 und 14 aktiviert. Diese Resultate deuten darauf hin, dass aktives KLK15 möglicherweise mit weiteren Signalkaskaden von pro-KLKs kommunizieren könnte. Interessanterweise zeigte KLK15 höchste Produktivität darin, seine eigene pro-Peptidsequenz zu hydrolysieren, was eine autokatalytische Aktivität nahelegt. Darüber hinaus zeigte es sich, dass KLK11 in der Lage ist, pro-KLK15 zu spalten (Hydrolyse nach dem P1 Leuzinrest), was auf KLK11 als möglichen Aktivator von pro-KLK15 hinweist (Yoon *et al.*, 2007). In vorliegender Untersuchung trat die Spaltung von pro-KLKs zu einem stabilen maturen Enzym selten auf, verglichen mit den umfangreichen Aktivationskaskaden, die in der Literatur erwartet werden (Borgono *et al.*, 2004; Pampalakis *et al.*, 2007). Tatsächlich stellten Yoon *et al.* die These auf, dass im Hinblick auf 225 mögliche Kombinationen das sogenannte “*KLK activome*” aus nicht weniger als 99 pro-KLK/KLK-Paaren bestehen könnte (Yoon *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2009). Konzentriert man sich auf die (pro-)KLK Teilmenge, die in vorliegender Untersuchung analysiert wurde, so beschreiben Yoon und Mitarbeiter 20 positive Reaktionen, während vorliegende Prozedur nur aufzeigte, dass KLK4, 5, 6 und 8 eine Aktivierung von pro-KLK11 auslösen (**Tab. 13**). Es ist bemerkenswert, was die Wirksamkeit dieser Aktivierung angeht, dass KLK4 und 5 potenter erschienen als KLK6 und 8, eine Tendenz, die mit den Beobachtungen von Yoon *et al.* übereinstimmt. Was die Diskrepanzen angeht, resultieren diese wahrscheinlich aus methodischen Unterschieden zwischen den zwei Ansätzen.

Auf der einen Seite muß eingeräumt werden, dass eine geringere Sensitivität unseres Antikörper-basierenden Detektionssystems manche Unterschiede erklären könnte. Auf der anderen Seite stellten Yoon und Mitarbeiter synthetische Proteine her, die einen N-terminalen *His-Tag* enthielten, dem das pro-KLK Peptid und die sechs aminoterminalen Reste der maturen KLK- Domäne folgten. Diese waren an ein lösliches, proteaseresistentes, globuläres Transportprotein (z.B. humaner Fibroblastenwachstumsfaktor) gekoppelt. Dieses interessante Modell spart jedoch die Anwesenheit weiterer potentieller proteasesensitiver Peptidbindungen innerhalb der katalytischen Domäne von Enzymen aus, da es nur die Spaltung um die Aktivierungsstelle herum aufzeigt. Tatsächlich erschienen in unserem Modell (pro-)KLKs eher empfindlich auf proteolytische Inaktivierung/Degradation, während die KLK-aktivierte Serinproteasedomäne von uPA unter ähnlichen experimentellen Bedingungen sehr stabil war (Beaufort *et al.*, 2010). Allerdings könnte *in vivo* eine Glykosylierung die (pro-)KLKs stabilisieren. Interne Spaltung wurde jedoch *in vitro* über einige humane KLKs berichtet, ob nun glykosyliert oder nicht (Borgono und Diamandis *et al.*, 2004; Pampalakis und Sotiropoulou *et al.*, 2007).

5.6 Die Spleißvariante KLK15ntfl

Unter den unzähligen Veränderungen in Krebszellen gibt es zahlreiche alternative mRNA-Transkripte. Es ist noch nicht sicher, ob irreguläre Gentranskription ein Nebenprodukt zellulärer Transformation ist, oder ob es ein vorgegebenes Element repräsentiert, das zu den Eigenschaften von Krebszellen beiträgt. Die Hinweise verdichten sich, dass alternative mRNA-Transkripte zu wesentlichen Phänotypen beitragen, die mit Krebszellen assoziiert sind. Dies weist darauf hin, dass Veränderungen im Spleißmechanismus nicht unüblich sind und funktionell bedeutsam für die Krebsentstehung. Die Proteine, die von diesen ungewöhnlichen Transkripten kodiert werden, sind oft verkürzt, oder es fehlen ihnen Domänen. Dadurch verändert sich ihre Funktion oder sie erhalten neue Funktionen. Demzufolge hat das alternative Spleißen Genom-umfassende Effekte, indem die Genexpression in vielen Krebs-assoziierten Signalwegen verändert wird (Fackenthal *et al.*, 2008).

Von KLK15 sind derzeit 6 verschiedene Spleißvarianten bekannt. Über eine Spleißvariante (KLK15-IRIII), bei der das *Intron* III beibehalten wurde, berichteten Kurlender *et al.* (2005), dass sie ein möglicher Kandidat als Biomarker für Prostatakrebs zu sein scheint.

Da die Spleißvariante KLK15ntfl im Ovarialkarzinomgewebe hoch exprimiert ist, stellte sich hier die Frage ihrer pathologische Relevanz. Bei enzymkinetischen Versuchen zeigte sie keine eindeutige Aktivität, sondern erwies sich als instabil. Es liegt nahe, dass die „*in frame*“-Deletion von 14 Aminosäuren dazu führt, dass ein inaktives, proteasesensitives Enzym synthetisiert wird. Diese Deletion, die aufgrund der Verwendung einer alternativen „*splice site*“ entstand, liegt unmittelbar in der Nähe des Serin-Restes des aktiven Zentrums (Ser₁₉₅) und umfasst interessanterweise den Glu₁₈₉-Rest. Dieses Glutamat paßt aufgrund der Verhältnisse in der Tertiärstruktur optimal in die „substratbindende Tasche“, sein Fehlen könnte auch die fehlende Aktivität von KLK15ntfl als Serinprotease erklären.

94% der menschlichen Gene sind diskontinuierlich, so dass Segmente, die als RNA exprimiert werden, in *Exons* enthalten sind, und durch intervenierende Segmente, genannt *Introns*, getrennt werden. Nachfolgend auf die Transkription werden Gene als Vorläufer-RNAs exprimiert (prä-mRNAs), welche ko-transkriptionell gespleißt werden. Die benachbarten *Exons* werden verbunden, um eine kontinuierliche mRNA zu bilden. Ein Vorteil dieser Ausführung ist, dass sie alternatives Spleißen zuläßt, indem die *Exons* unterschiedlich verwendet werden, um mehrere mRNAs von individuellen Genen zu erzeugen. Der Spleißkomplex wird sowohl von regulierenden Elementen gelenkt, die in den *Introns* lokalisiert sind, als auch von den *Exons*. Das Spleißosom und zusätzliche RNA-Bindungsproteine korrigieren die *Sites* auf *Intron*-Entfernung und *Exon*-Verbindungen. Fehlregulation beim Spleißen und alternativen Spleißen kann aus Mutationen in cis-regulierenden

Elementen innerhalb des betroffenen Gens oder aus Mutationen resultieren, die die Aktivität von Faktoren beeinflussen, die Komponenten der Spleißmaschinerie sind. Mutationen, die sich auf das Spleißen auswirken, können eine Krankheit direkt verursachen, oder zur Anfälligkeit für eine Krankheit bzw. deren Schweregrad beitragen. Das Verständnis der Rolle, die das Spleißen bei Krankheiten spielt, erweitert potentielle Möglichkeiten für die therapeutische Intervention, da entweder die Ursache direkt angesprochen werden kann, oder neue Ansätze entstehen, Krankheitsprozesse zu umgehen (Ward *et al.*, 2010).

5.7 KLK15 (ACO; HSRNASPH; Prostinogen) in der Literatur

In den vergangenen 12 Jahren widmeten sich Forschergruppen aus verschiedensten medizinischen und molekularbiologischen Disziplinen auf der ganzen Welt der Erforschung von KLK15 und ihrer Bedeutung im menschlichen Enzymnetzwerk. Als erste Forschergruppe beschrieben Takayama *et al.* (2001) Prostinogen, eine Serinprotease, die in der Vorsteherdrüse (Prostata) hoch exprimiert wird und die später KLK15 genannt wurde. Sie nahmen an, dass diese Protease ein möglicher Kandidat für die Aktivierung von pro-KLK3 sein könnte (Pampalakis *et al.*, 2007) und produzierten KLK15 im Bakterienmodell. Rückgefaltete KLK15 wurde mit Trypsinagarose aktiviert und ihre Aktivität beurteilt, indem das chromogene Substrat S-2222 gespalten wurde. Bemerkenswerterweise hatte diese Gruppe bei der Produktion von aktivem KLK15 Erfolg. Dies kann an einer Reihe von Gründen liegen, wie beispielsweise einem alternativen Konstrukt, an effektiveren Expressionsmethoden oder an der Aktivierungstechnik mit Trypsinagarose. Eine gewisse Aktivität könnte aber auch durch zurückgebliebenes Trypsin simuliert worden sein, welches unvollständig aus der Lösung entfernt wurde, und dann selbst das chromogene Substrat S-2222 spaltete. In demselben Jahr, 2001, berichteten Yousef, Diamandis und Mitarbeiter der Abteilung für Pathologie und Labormedizin am Mount-Sinai-Krankenhaus in Toronto von der molekularen Klonierung des Gens für humane KLK15. In LNCaP-Prostatakarzinomzelllinien wird dieses Gen durch Steroidhormone hochreguliert und ist assoziiert mit aggressiveren Formen des Prostatakarzinoms (s. Kap. 1.2.2 Regulation durch Steroidhormone und Kap. 1.7.3 Urologie).

Ein Jahr später, 2002 berichtete dieselbe Gruppe, dass das Androgen-regulierte Gen der humanen Kallkrein-ähnlichen Protease KLK15 ein unabhängiger und, bemerkenswerterweise, günstiger prognostischer Marker für das Mammakarzinom sei. Die Expression von KLK15 stellte einen signifikanten Vorhersagewert sowohl für das Progressions-freie Überleben (Hazard Ratio von 0.41 und P=0.011) als auch für das Gesamtüberleben dar (Hazard Ratio von 0.34 und P=0.009).

Höhere Konzentrationen an mRNA von KLK15 waren häufiger bei Lymphknoten-negativen

Patientinnen (P=0.042). Keine Assoziation wurde gefunden zwischen KLK15-Expression und anderen klinisch-pathologischen Variablen. Desweiteren war KLK15 ein unabhängiger prognostischer Marker für Progressions-freies Überleben und Gesamtüberleben in der Untergruppe von Patientinnen mit niedrigerem Differenzierungsgrad und bei Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-negativen Tumoren in univariaten und multivariaten Analysen. KLK15-Expressions-Spiegel waren leicht erhöht (obwohl nicht statistisch signifikant) bei der Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-negativen Patientinnenuntergruppe. KLK15 wird in Brustkrebszelllinien von Androgenen hochreguliert. Diese Regulation wird möglicherweise über den Androgenrezeptor vermittelt (Yousef und Diamandis *et al.*, 2002). Drei Jahre später (2005) meldeten Kurlender *et al.*, dass eine Spleißvariante von KLK15, nämlich KLK15-IRIII, als möglicher Kandidat für einen neuen Biomarker beim Prostatakarzinom in Frage komme. So haben die ersten sechs zentromerischen Mitglieder der KLK-Genfamilie Spleißvarianten, die das *Intron III* beibehalten. Manche dieser Varianten weisen gewebspezifische Expression auf.

Auch Clements *et al.* (2005) ermittelten ein alternativ gespleißtes Transkript bei dieser Erkrankung, dass zusätzlich zum "*full-length-KLK4-(KLK4-254)* Transkript", bei dem das *Exon 1* deletiert ist. Im Speziellen ist dieses um 50bp verkürzt (KLK4-205 Transkript) und wird ebenso bei Prostatakrebs exprimiert.

Zwei Jahre darauf entwickelten Diamandis *et al.* (2007) eine immunfluorometrische Versuchsreihe für humane KLK15 zu ihrer Identifizierung in Geweben und biologischen Flüssigkeiten. Sie setzten es sich zum Ziel, ein rekombinantes Protein und spezifische Antikörper für einen sensitiven und spezifischen ELISA-Immuntest zu generieren. Zunächst produzierte die Gruppe hierfür humane, rekombinante pro-KLK15 in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Diese wurde durch verschiedene chromatographische Schritte gereinigt und verwendet, um Hasen und Mäuse für die Produktion von Antikörpern gegen KLK15 zu immunisieren. Diese polyklonalen Hasen- und Mäuse- Antikörper wurden anschließend zur Entwicklung eines hochsensitiven und spezifischen Immuntests für KLK15 verwendet, um ihre Expression in verschiedenen Geweben und biologischen Flüssigkeiten nachzuweisen. Dieser Immuntest wies ein niedriges Detektionslimit von 0,05 µg/l auf, und zeigte keinerlei Kreuzreaktion mit den anderen 14 Kallikrein-ähnlichen Proteasen. So wurde KLK15 sowohl in der Prostata, dem Kolon und der Schilddrüse, als auch in Muttermilch und Samenplasma nachgewiesen und könnte daher, was ihre mRNA-Spiegel betrifft, als Biomarker für das Prostata-, Ovarial-, und Mammakarzinom von Nutzen sein.

2007 und 2009 berichteten Yoon, Blaber, Debela und Mitarbeiter der Abteilung für Chemie und

Biochemie in Florida über Aktivierungsprofile der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLKs) als festgelegt auf ein KLK-pro-Peptid-Fusions-Protein-System (siehe Kap. 5.5). Dieser Bericht beschrieb die Aktivierungsprofile von 12 der 15 muren KLKs versus 15 verschiedene pro-KLK-Sequenzen. Die fehlenden Profile im früheren Bericht, einschließlich KLK9, 10, und 15, wurden 2009 berichtet.

Diamandis und Mitarbeiter der urologischen Abteilung an der Berliner Charité (2010) gaben im Jahr darauf bekannt, dass KLK15 ein unabhängiger prognostischer Tumormarker für progressionsfreies Überleben bei Patienten nach radikaler Prostatektomie ist. Zeitgleich untersuchten Scorilas und Mitarbeiter der Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie der Universität von Athen 2010, welche Rolle mRNA-Spleißvarianten von KLK15 beim Prostatakarzinom und bei benigner Prostatahyperplasie spielen. Da das Gen von KLK15 in der Prostata exprimiert wird, war der Zweck dieser Untersuchung die Expressionsanalyse und die klinische Evaluation der mRNA-Spleißvarianten von KLK15 beim Prostatakarzinom (CaP) und Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH). Die Daten zeigten einen statistisch signifikanten ($P < 0.001$) Anstieg im Vorkommen einer Überexpression von KLK15-Transkripten, die sowohl für die aktive Isoform kodieren als auch für die Isoform 3 bei CaP verglichen mit BPH-Gewebeproben. Darüber hinaus wurden Transkripte von KLK15 in aggressiveren Tumoren ($P = 0.017$) hoch exprimiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expressionsanalyse von KLK15 als wertvolles Werkzeug zum Einsatz kommen könnte, um zwischen BPH und CaP-Gewebe zu unterscheiden sowie als ein ungünstiger prognostischer Marker für das Prostatakarzinom.

In dieser Zeit wurde auch der Zusammenhang zwischen Genvarianten von KLK15 und dem Risiko, am Prostatakarzinom zu erkranken, sowie dessen Aggressivität durch eine Meta-Analyse von GWAS-Daten in Australien erforscht. Clements *et al.* (2011) bezeichneten die Kallikrein-ähnliche Protease KLK15 als plausiblen Kandidaten für Prostatakarzinomanfälligkeit. Erhöhte Expression von KLK15 wurde beim Prostatakarzinom bereits schon früher berichtet, und als ungünstiger prognostischer Marker für diese Erkrankung beschrieben. Sie analysierten daher flächendeckend den Zusammenhang zwischen Varianten innerhalb des Gens von KLK15 und Prostatakarzinomrisiko bzw. dessen Aggressivität. Zu diesem Zweck genotypisierten sie *tag*SNPs, "single nucleotide polymorphisms", und identifizierten funktionelle SNPs, also funktionelle einzelne Nukleotidpolymorphismen im Gen von KLK15, mittels extensiver bioinformatischer Erbgutanalysen. Außerdem sollte die Verbindung zwischen diesen beurteilt werden, sowie KLK15 im internationalen *HapMap*-Projekt verzeichnet werden. Ihre Resultate deuten darauf hin, dass

genetische Variationen von KLK15 bei der Ätiologie des Prostatakarzinoms unter Männern mit europäischer Abstammung eine Rolle spielen.

Es wird außerdem von dieser Gruppe berichtet, dass die Überexpression von KLK15 einen signifikanten Vorhersagewert für reduziertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei Ovarialkrebs darstellt. Hierzu wurden Gruppen von erkrankten Personen mit Gruppen nicht erkrankter Personen verglichen. Diejenigen Chromosomen-Bereiche, in denen die Gruppen in der Haplotyp-Häufigkeit Abweichungen voneinander aufwiesen, könnten Gene enthalten, die Einfluß auf Ovarialkrebs ausüben. Theoretisch ist es möglich, hierzu die gesamten genetischen Abweichungen von jeweils einem Basenpaar (die oben genannten "*single nucleotide polymorphisms*", SNPs) zu genotypisieren. *In-silico*-Analysen wurden durchgeführt, um Elemente zu identifizieren, die KLK15 regulieren, und potentielle funktionelle SNPs in diesen Regionen zu klassifizieren. Nach Validierung der SNPs und Identifizierung mittels DNA-Sequenzierung von Ovarialkarzinomzelllinien und Patientinnen, bei denen das Ovarialkarzinom aggressiv metastasierte, wurden 9 SNPs gelistet und genotypisiert. Verwendet wurde dazu die "*Sequenom iPLEX Mass Array platform*" in einer Kohorte von australischen Patientinnen, die am Ovarialkarzinom erkrankt waren (N = 319). Es wurde beobachtet, dass die australischen Daten auf ein signifikant schlechteres Überleben hinwiesen für den SNP rs266851 von KLK15 in einem dominanten Modell (Hazard Ratio HR 1.42, 95% CI 1.02-1.96). Diese Assoziierung wurde in der gleichen Richtung in zwei unabhängigen Datensätzen beobachtet, mit einer kombinierten HR für die drei Studien von 1.16 (1.00-1.34). Dieser SNP liegt 15 bp unterhalb eines neuen *Exons* und es wird vermutet, dass er beim mRNA-Spleißen beteiligt ist. Das mutierte Allel ist daher im Verdacht, eine HSF-2 bindende *Site* außer Kraft zu setzen. Als Hitzeschockfaktor (HSF) wird ein Transkriptionsfaktor bezeichnet, der die Expression des Hitzeschockproteins (HSP) reguliert. Diese stellen eine Klasse von funktionell verwandten Proteinen dar, die an der Faltung und Entfaltung anderer Proteine beteiligt sind. Ihre Expression steigt an, wenn Zellen erhöhten Temperaturen oder anderem Stress ausgesetzt werden (De Maio, 1999).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Formen der Kallikrein-ähnlichen Protease 15 (KLK15) rekombinant in *E.coli* produziert, gereinigt und rückgefaltet. Ein Teilprojekt bildete die Herstellung der maturen Form des Enzyms, sowie einer KLK15-Spleißvariante (KLK15ntfl) als synthetische pro-Enzymform. Dieses synthetische pro-Peptid enthielt einen sogenannten Histidin-*Tag*, der eine Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni²⁺-NTA-Säulenchromatographie erlaubte, gefolgt von einer Enterokinase-Spaltstelle. Die Inkubation mit Enterokinase bewirkt die Abspaltung des pro-Peptids und erzeugt mature Wildtyp-KLK15 bzw. KLK15ntfl. Die Ausbeute an maturer KLK15 bzw. KLK15ntfl erwies sich als gering. Es zeigte sich, dass zum einen eine erhebliche Menge bei der Rückfaltung der gereinigten Proteine präzipitierte, und zum anderen die generierten nativen Proteine bei der Aktivierung durch Enterokinase instabil waren, aufgrund unspezifischer proteolytischer Spaltung mit Enterokinase oder durch Autoproteolyse. Um aufzuzeigen, inwieweit KLK15 und KLK15ntfl enzymatisch aktiv sind, wurden Substrattests mit chromogenen und fluorogenen Substraten durchgeführt. Mit chromogenen Substraten konnte sowohl für KLK15, als auch für KLK15ntfl keine Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde durch ein sensitiveres Meßverfahren mit zwei fluorogenen Substraten, Ac-SPR und Tos-GPR, eine deutliche, trypsin-ähnliche Aktivität von KLK15 meßbar. Für KLK15ntfl konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass dies auf die Deletion von 14 Aminosäuren zurückzuführen ist. Diese Deletion liegt in unmittelbarer Nähe des Serin-Rests des aktiven Zentrums. Für eine weiterführende biochemische Charakterisierung von KLK15 sollten alternative Expressionsprotokolle verfolgt werden, beispielsweise in eukaryotischen Zellen, um die Ausbeute an maturem Enzym zu verbessern.

Das zweite Teilprojekt befaßte sich mit der Expression und Reinigung des „natürlichen“ pro-Enzyms von KLK15 und KLK15ntfl, um potentielle Aktivatoren zu identifizieren. Diese „natürlichen“ pro-Enzymformen enthielten zusätzlich zum N-terminalen Histidin-*Tag* ein C-terminales *Tag100*-Epitop, das die Analyse der Aktivierung der pro-Enzymformen mittels *Westernblot*-Analysen ermöglichte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Aktivierungspotential von insgesamt sieben KLK-Proteasen (KLK4-8, 10, 11) gegenüber pro-KLK15 getestet. Es zeigte sich, dass keine dieser Proteasen als Aktivator wirkt: während KLK6, KLK8, KLK10 und KLK11 pro-KLK15 nicht spalteten, führte die Inkubation mit den übrigen Proteasen zur Degradation von pro-KLK15. Unsere Untersuchungen zum proteolytischen KLK-Netzwerk deuten darauf hin, dass neben der Aktivierung von pro-Formen auch der proteolytische Abbau (Inaktivierung) von KLK-Proteasen untereinander eine regulative Rolle zu spielen scheint.

7. Literaturverzeichnis

- Anisowicz A, Sotiropoulou G, Stenman G, Mok SC, Sager R (1996) A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol Med* 2, 624-636
- Beaufort N, Plaza K, Utzschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, Magdolen V (2010) Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem* 391, 581–587
- Becker-Pauly C, Howel M, Walker T, Vlad A, Aufenvenne K, Oji V, Lottaz D, Sterchi EE, Debela M, Magdolen V (2007) The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 127, 1115–1125
- Berek JS, Bast RC Jr (1995) Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. *Cancer* 76, 2092-2096
- De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R (1999) Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol* 309, 217-236
- Bernett MJ, Blaber SI, Scarisbrick IA, Dhanarajan P, Thompson SM, Blaber M (2002) Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 277, 24562-24570
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M (2001) Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13790-13795
- Blaber SI, Scarisbrick IA, Bernett MJ, Dhanarajan P, Seavy MA, Jin Y, Schwartz MA, Rodriguez M, Blaber M (2002) Enzymatic properties of rat myelencephalon-specific protease. *Biochemistry* 41, 1165-1173
- Bode W, Huber R (1976) Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-Terminus of trypsin. *FEBS Lett* 68, 231-236
- Borgono CA, Grass L, Soosaipillai A, Yousef GM, Petraki CD, Howarth DH, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP (2003) Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 63, 9032-9041
- Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP (2004) Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2, 257-280
- Brattsand M, Egelrud T (1999) Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274, 30033-30040

7. Literaturverzeichnis

- Bridgewater JA, Nelstrop AE, Rustin GJ, Gore ME, McGuire WP, Hoskins WJ (1999) Comparison of standard and CA-125 response criteria in patients with epithelial ovarian cancer treated with platinum or paclitaxel. *J Clin Oncol* 17, 501-508
- Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stüber D, Müller M, Ibrahimi I, Häuptle MT, Dobberstein B (1987) A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol* 155, 416-433
- Burke HB, Goodman PH, Rosen DB, Henson DE, Weinstein JN, Harrell FE Jr, Marks JR, Winchester DP, Bostwick DG (1997) Artificial neural networks improve the accuracy of cancer survival prediction. *Cancer* 79, 857-862
- Chang A, Yousef GM, Jung K, Meyts ER, Diamanids EP (2001) Identification and molecular characterization of five novel kallikrein gene 13 (KLK13;KLK-L4) splice variants: differential expression in human testis and testicular cancer. *Anticancer Res* 21, 3147-3152
- Chi DS, Venkatraman ES, Masson V, Hoskins WJ (2000) The ability of preoperative serum CA-125 to predict optimal primary tumor cytoreduction in stage III epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 77, 227-231
- Choong PF, Nadesapillai AP (2003) Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop* 415, 46-58
- Clements JA, Mukhtar A, Ehrlich A, Yap B (1994) Glandular kallikrein gene expression in the human uterus. *Braz J Med Biol Res* 27, 1855-1863
- Clements JA, Dong Y, Bui LT, Odorico DM, Tan OL, Myers SA, Samaratunga H, Gardiner RA (2005) Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms. *Endocr Relat Cancer* 12, 875-889
- Clements JA, Batra J, Nagle CM, O'Mara T, Higgins M, Dong Y, Tan OL, Lose F, Skeie LM, Srinivasan S, Bolton KL, Song H, Ramus SJ, Gayther SA, Pharoah PD, Kedda MA, Spurdle AB (2011) A Kallikrein 15 (KLK15) single nucleotide polymorphism located close to a novel *Exon* shows evidence of association with poor ovarian cancer survival. *BMC Cancer* 11, 119
- Clements JA, Batra J, O'Mara T, Lose F, Marquart L, Stephens C, Alexander K, Srinivasan S, Eeles RA, Easton DF, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Guy M, Muir K, Lophatananon A, Rahman AA, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Chambers S, Gardiner RA, Aitken J, Yaxley J, Kedda MA, Spurdle AB (2011) Association between Prostate-specific Antigen (PSA) genetic variants and prostate cancer risk and aggressiveness in Australia and a meta-analysis of GWAS data. *PLoS One* 6, e26527
- Cleutjens KB, van der Korput HA, Ehren-van Eekelen CC, Sikes RA, Fasciana C, Chung LW, Trapman J (1997) A 6-kb promoter fragment mimics in transgenic mice the prostate-specific and androgen-regulated expression of the endogenous prostate-specific antigen gene in humans. *Mol Endocrinol* 11, 1256-1265

7. Literaturverzeichnis

- David A, Mabjeesh N, Azar I, Biton S, Engel S, Bernstein J, Romano J, Avidor Y, Waks T, Eshhar Z, Langer SZ, Lifschitz-Mercer B, Matzkin H, Rotman G, Toporik A, Savitsky K, Mintz L (2002) Unusual alternative splicing within the human kallikrein genes KLK2 and KLK3 gives rise to novel prostate-specific proteins. *J Biol Chem* 277, 18084-18090
- Day CH, Fanger GR, Retter MW, Hylander BL, Penetrante RB, Houghton RL, Zhang X, McNeill PD, Filho AM, Nolasco M, Badaro R, Cheever MA, Reed SG, Dillon DC, Watanabe Y (2002) Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera. *Oncogene* 21, 7114-7120
- Debela M, Magdolen V, Grimminger V, Sommerhoff C, Messerschmidt A, Huber R, Friedrich R, Bode W, Goetting P (2006) Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4: Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *J Mol Biol* 362, 1094-1107
- Debela M, Magdolen V, Schechter N, Valachova M, Lottspeich F, Craik CS, Choe Y, Bode W, Goetting P (2006) Specificity Profiling of Seven Human Tissue Kallikreins Reveals Individual Subsite Preferences. *J Biol Chem* 281, 22678-25688
- De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR, Clark GM, Ravdin PM (1999) A prognostic model that makes quantitative estimates of probability of relapse for breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 4133-4139
- De Maio A, Wong HR (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11, 1-12
- Denmeade SR, Lovgren J, Khan SR, Lilja H, Isaacs JT (2001) Activation of latent protease function of pro-hK2, but not pro-PSA, involves autoprocessing. *Prostate* 48, 122-126
- Deperthes D, Frenette G, Brillard-Bourdet M, Bourgeois L, Gauthier F, Tremblay RR, Dubé JY (1996) Potential involvement of kallikrein hK2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *J Androl* 17, 659-665
- Desrivieres S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Ménashi S (1993) Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J Cell Physiol* 157, 587-593
- Dhar S, Bhargava R, Yunes M, Li B, Goyal J, Naber SP, Wazer DE, Band V (2001) Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/Kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 7, 3393-3398
- Diamandis EP, Fritsche H, Lilja H, Chan DW, Schwartz M (2002) *Tumor Markers: Physiology Technology and Clinical Application*. AAC Press Washington DC, 3-8
- Diamandis EP, Yousef GM (2002) Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 48, 1198-1205
- Diamandis EP, Okui A, Mitsui S, Luo LY, Soosaipillai A, Grass L, Nakamura T, Howarth DJ, Yamaguchi N (2002) Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res* 62, 295-300

7. Literaturverzeichnis

- Diamandis EP, Rabien A, Fritzsche FR, Jung M, Tölle A, Miller K, Jung K, Kristiansen G, Stephan C (2010) KLK15 is a prognostic marker for progression-free survival in patients with radical prostatectomy. *Int J Cancer* 127, 2386-2394
- Dong Y, Kaushal A, Bui L, Chu S, Fuller PJ, Nicklin J, Samaratunga H, Clements JA (2001) Human kallikrein 4 (KLK4) is highly expressed in serous ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 7, 2363-2371
- Dong Y, Kaushal A, Brattsand M, Nicklin J, Clements JA (2003) Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin Cancer Res* 9, 1710-1720
- Dong Y, Bui LT, Odorico DM, Tan OL, Myers SA, Samaratunga H, Gardiner RA, Clements JA (2005) Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms. *Endocr Relat Cancer* 12, 875-889
- Dorn J, Schmitt M, Kates R, Schmalfeldt B, Kiechle M, Scorilas A, Diamandis EP, Harbeck N (2007) Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Research* 13, 1742-1748
- Duffy MJ (2001) Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38:225-262
- Dvorak, HF (1986) Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England J Medicine* 315, 1659-1659
- Fortier AH, Nelson BJ, Grella DK, Holaday JW (1999) Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 91, 1635-1640
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174
- Ekholm E, Egelrud T (1999) Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 291, 195-200
- Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T (2000) Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol* 114, 56-63
- Emami N, Diamandis EP (2007) Human tissue kallikreins: A road under construction. *Clin Chim Acta* 381, 78-84
- Erez E, Fass D, Bibi E (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* 459, 371-378
- Fackenthal JD, Godley LA (2008) Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells. *Dis Model Mech* 1, 37-42

7. Literaturverzeichnis

- Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY (1997) Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer* 71, 897-899
- Gaberc-Porekar V, Menart V (2001) Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 49, 335-360
- Gomis-Rüth FX, Baye's A, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Tsetsenis T, Villegas V, Avile's FX, Coll M (2002) The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. *J Biol Chem* 277, 27273-27281
- Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH (1982) The roussarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eucaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 6777-6781
- Goyal J, Smith KM, Cowan JM, Wazer DE, Lee SW, Band V (1998) The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res* 58, 4782-4786
- Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio-Harmainen H, Soini Y, Vihko R (1993) Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using northern-blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int J Cancer* 55, 590-597
- Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T (1994) Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 269, 19420-19426
- Heidtmann HH, Nettelbeck DM, Mingels A, Jager R, Welker HG, Kontermann RE (1999) Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br J Cancer* 81, 1269-1273
- Heuze-Vourc'h N, Leblond V, Courty Y (2003) Complex alternative splicing of the hKLK3 gene coding for the tumor marker PSA (prostate-specific-antigen). *Eur J Biochem* 270, 706-714
- Hooper JD, Bui LT, Rae FK, Harvey TJ, Myers SA, Ashworth LK, Clements JA (2001) Identification and characterization of klk14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle. *Genomics* 73, 117-122
- Horl WH (1989) Proteinases: potential role in health and disease. Design of enzyme inhibitors as drugs. Oxford university press, 573-581
- Hu JC, Zhang C, Sun X, Yang Y, Cao X, Ryu O, Simmer JP (2000) Characterization of the mouse and human PRSS17 genes, their relationship to other serine proteases, and the expression of PRSS17 in developing mouse incisors. *Gene* 251, 1-8
- Hural JA, Friedman RS, McNabb A, Steen SS, Henderson RA, Kalos M (2002) Identification of naturally processed CD4 T cell epitopes from the prostatespecific antigen kallikrein 4 using peptide-based *in vitro* stimulation. *J Immunol* 169, 557-565

7. Literaturverzeichnis

- Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH (2003) Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* 63, 8614-8622
- Irmen-Ernst E, Senekowitsch R, Jänicke F, Schmitt M, Pabst HW (1990) Kathepsin D. Ein neuer Faktor der Tumorprognostik. *Aktuell* 12, 11
- Jerez-Aragones JM, Gomez-Ruiz JA, Ramos-Jimenez G, Munoz-Perez J, Alba-Conejo E (2003) A combined neural network and decision trees model for prognosis of breast cancer relapse. *Artif Intell Med* 27, 45-63
- Kapadia C, Chang A, Sotiropoulou G, Yousef GM, Grass L, Soosaipillai A, Xing X, Howarth DH, Diamandis EP (2003) Human kallikrein 13: production and purification of recombinant protein and monoclonal and polyclonal antibodies, and development of a sensitive and specific immunofluorometric assay. *Clin Chem* 49, 77-86
- Khan AR, James MN (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 7, 815-836
- Komai S, Matsuyama T, Matsumoto K, Kato K, Kobayashi M, Imamura K, Yoshida S, Ugawa S, Shiosaka S (2000) Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 1479-1486
- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, Saijoh K (2003) Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J Invest Dermatol* 121, 542-549
- Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS (1997) Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res* 57, 3111-3114
- Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, and Diamandis EP (2005) A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta* 1755, 1-14
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lai LC, Erbas H, Lennard TW, Peaston RT (1996) Prostate-specific antigen in breast cyst fluid: possible role of prostate-specific antigen in hormone-dependent breast cancer. *Int J Cancer* 66, 743-746
- Laskowski M Jr, Qasim MA, Lu SM (2000) Canonical protein inhibitors with serine proteases. Protein-protein recognition: the frontiers in molecular biology series. Chapter 8. Oxford University Press
- Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, Wazer DE, Band V (2001) CpG methylation as a basis for breast tumorspecific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res* 61, 8014-

8021

Light A, Janska H (1989) Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects. *Biochemical Science* 14, 110-112

Lilja H (1985) A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76, 1899-1903

Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, Dobbins JR, Wyrick T, Miller JR, MacKellar W, Hepburn D, Corvalan J, McClure D, Liu X, Stephenson D, Clemens J, Johnstone EM (1997) Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 272, 25135-25142

Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, Band V (1996) Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res* 56, 3371-3379

Löffler und Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Lehrbuch 8. Aufl. 2006, S.121

Lopez-Otin C, Bond JS (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283, 30433-30437

Lovgren J, Airas K, Lilja H (1999) Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors. *Eur J Biochem* 262, 781-789

Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H (1997) Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 549-555

Luo LY, Grass L, Diamandis EP (2000) The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene is up-regulated by steroid hormones in the breast carcinoma cell line BT-474. *Anticancer Res* 20, 981-986

Luo LY, Rajpert-De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP (2001) Expression of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1; KLK10) candidate tumour suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. *Br J Cancer* 85, 220-224

Lundstrom A, Egelrud T (1990) Cell shedding from human plantar skin *in vitro*: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin-like enzyme. *Arch Dermatol Res* 282, 234-237

Lundstrom A, Egelrud T (1990) Evidence that cell shedding from plantar stratum corneum *in vitro* involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein I. *J Invest Dermatol* 94, 216-220

Lundstrom A, Egelrud T (1991) Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta*

Derm Venereol 71, 471-474

Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Olsson AY, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman UH, Stephan C, Talieri M and Yousef GM (2006) A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem* 387, 637–641

Magdolen V, Sommerhoff CP, Fritz H, Schmitt M (2012): Kallikrein-related peptidases Volume 1 + 2. Berlin, de Gruyter

Magklara A, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, Danese S, Diamandis EP (2001) The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7, 806-811

Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, Diamandis EP (2003) Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 948-955

Martin L P, Schilder R J (2009) Management of recurrent ovarian carcinoma: current status and future directions. *Seminars in Oncology* 36, 112-125

Mavridis K, Avgeris M, Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A (2010) Expression analysis and study of the KLK15 mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Sci* 101, 693-699

Mavridis K, Scorilas A (2010) Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncology* 6, 269-285

Meyer T, Rustin GJ (2000) Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 82, 1535-1538

Michael IP, Kurlender L, Memari N, Yousef GM, Du D, Grass L, Stephan C, Jung K, Diamandis EP (2005) Intron Retention: A Common Splicing Event within the Human Kallikrein Gene Family. *Clin Chem* 51, 506-515

Mitsui S, Tsuruoka N, Yamashiro K, Nakazato H, Yamaguchi N (1999) A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *Eur J Biochem* 260, 627-634

Mitsui S, Yamada T, Okui A, Kominami K, Uemura H, Yamaguchi N (2000) A novel isoform of a kallikrein-like protease, TLSP/hippostasin, (PRSS20), is expressed in the human brain and prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 205-211

ole-MoiYoi OK, Pinkus GS, Spragg J, Austen KF (1979) Identification of human glandular kallikrein in the beta cell of the pancreas. *N Engl J Med* 300, 1289-1294

Myers SA, Clements JA (2001) Kallikrein 4 (KLK4), a new member of the human kallikrein gene family is up-regulated by estrogen and progesterone in the human endometrial cancer cell line,

KLE. J Clin Endocrinol & Metab 86, 2323-2326

Naito K, Fujikawa K (1991) Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. J Biol Chem 266, 7353-7358

Nakamura T, Stephan C, Scorilas A, Yousef GM, Jung K, Diamandis EP (2003) Quantitative analysis of hippostasin /KLK11 gene expression in cancerous and noncancerous prostatic tissues. Urology 61, 1042-1046

Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinias R, Hood L, Wang K (1999) Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. Proc Natl Acad Sci USA 96, 3114-3119

Nicholson, DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376, 37-43

Nylander-Lundqvist E, Back O, Egelrud T (1996) IL-1h activation in human epidermis. J Immunol 157, 1699-1704

Nylander-Lundqvist E, Egelrud T (1997) Formation of active IL-1h from pro-IL-1h catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme *in vitro*. Acta Derm Venereol 77, 203-206

Obiezu CV, Diamandis EP (2005) Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. Cancer Lett 224, 1-22

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

Oka T, Akisada M, Okabe A, Sakurai K, Shiosaka S, Kato K (2002) Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. Neurosci Lett 321, 141-144

Okabe A, Momota Y, Yoshida S, Hirata A, Ito J, Nishino H, Shiosaka S (1996) Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. Brain Res 728, 116-120

Pampalakis G, Sotiropoulou G (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. Biochim Biophys Acta 1776, 22-31

Petraki CD, Karavana VN, Skoufogiannis PT, Little SP, Howarth DJ, Yousef GM, Diamandis EP (2001) The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues as assessed by immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 49, 1431-1441

Petraki CD, Karavana VN, Luo LY, Diamandis EP (2002) Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 50, 1247-1261

7. Literaturverzeichnis

- Petraki CD, Karavana VN, Revelos KI, Luo LY, Diamandis EP (2002) Immunohistochemical localization of human kallikreins 6 and 10 in pancreatic islets. *Histochem J* 34, 313-322
- Petraki CD, Karavana VN, Diamandis EP (2003) Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 51, 493-501
- Petraki CD, Gregorakis AK, Papanastasiou PA, Karavana VN, Luo LY, Diamandis EP (2003) Immunohistochemical localization of human kallikreins 6, 10 and 13 in benign and malignant prostatic tissues. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6, 223-227
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD (1996) Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 32, 39-47
- Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput HA, Romijn JC, Trapman J (1991) Identification and androgen-regulated expression of two major human glandular kallikrein-1 (hGK-1) mRNA species. *Mol Cell Endocrinol* 76, 181-190
- Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW (1998). Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35, 275-368
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2004) The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 362-365
- Rubin SC, Hoskins WJ, Hakes TB, Markman M, Reichman BS, Chapman D, Lewis JL Jr (1989) Serum CA125 levels and surgical findings in patients undergoing secondary operations for epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 160, 667-671
- Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C, Bartlett JD, Simmer JP (2002) Porcine kallikrein- 4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Eur J Oral Sci* 110, 358-365
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Scarisbrick IA, Towner MD, Isackson PJ (1997) Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J Neurosci* 17, 8156-8168
- Scarisbrick IA, Asakura K, Blaber S, Blaber M, Isackson PJ, Bieto T, Rodriguez M, Windebank AJ (2000) Preferential expression of myelencephalon-specific protease by oligodendrocytes of the adult rat spinal cord white matter. *Glia* 30, 219-230
- Scarisbrick IA, Isackson PJ, Ciric B, Windebank AJ, Rodriguez M (2001) MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *J Comp Neurol* 431, 347-361

- Scarlsbrick IA, Blaber SI, Lucchinetti CF, Genain CP, Blaber M, Rodriguez M (2002) Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain* 125, 1283-1296
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162
- Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E (2001) Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 2396-2404
- Schmidt-Matthiesen H, Bastert H (1995): *Gynäkologische Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge der bösartigen Genitaltumoren und des Mammakarzinoms*. Stuttgart, New York, Schattauer Verlag, 51-71
- Shaw J, Grass L, Sotiropoulou G, Diamandis E P (2006) Development of an immunofluorometric assay for human kallikrein 15 (KLK15) and identification of KLK15 in tissues and biological fluids. *Clinical Biochemistry* 40, 104-110
- Simon M, Jonca N, Guerrin M, Haftek M, Bernard D, Caubet C, Egelrud T, Schmidt R, Serre G (2001) Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J Biol Chem* 276, 20292-20299
- Slawin KM, Shariat SF, Nguyen C, Leventis AK, Song W, Kattan MW, Young CY, Tindall DJ, Wheeler TM (2000) Detection of metastatic prostate cancer using a splice variant-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for human glandular kallikrein. *Cancer Res* 60, 7142-7148
- Sondell B, Thornell LE, Stigbrand T, Egelrud T (1994) Immunolocalization of stratum corneum chymotryptic enzyme in human skin and oral epithelium with monoclonal antibodies: evidence of a proteinase specifically expressed in keratinizing squamous epithelia. *J Histochem Cytochem* 42, 459-465
- Sondell B, Thornell LE, Egelrud T (1995) Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 104, 819-823
- Sondell B, Dyberg P, Anneroth GK, Ostman PO, Egelrud T (1996) Association between expression of stratum corneum chymotryptic enzyme and pathological keratinization in human oral mucosa. *Acta Derm Venereol* 76, 177-181
- Sotiropoulou G, Rogakos V, Tsetsenis T, Pampalakis G, Zafiropoulos N, Simillides G, Yiotakis A, Diamandis EP (2003) Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncol Res* 13, 381-391
- Stenman UH, Alfthan H, Vartiainen J, Lehtovirta P (1995) Markers supplementing CA125 in ovarian cancer. *Ann Med* 27, 115-120
- Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Bharaj BS,

7. Literaturverzeichnis

- Nakamura T, Loening SA, Diamandis EP (2003) Quantitative analysis of kallikrein 15 gene expression in prostate tissue. *J Urol* 169, 361-364
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516
- Stryer L. (2003): *Biochemie*. München, Springer Spektrum
- Sun Z, Pan J, Balk SP (1997) Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acids Res* 25, 3318-3325
- Suzuki Y, Koyama J, Moro O, Horii I, Kikuchi K, Tanida M, Tagami H (1996) The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br J Dermatol* 134, 460-464
- Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW (1997) Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem* 272, 21582-21588
- Takayama TK, Carter CA, Deng T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 2001;40:1679-87.
- Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K (2001) Characterization of hK4 (Prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 40, 15341-15348
- Tanimoto H, Underwood LJ, Shigemasa K, Yan Yan MS, Clarke J, Parmley TH, O'Brien TJ (1999) The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 86, 2074-2082
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 28, 1-8
- Tye CE, Pham CT, Simmer JP, Bartlett JD (2009) DPPI may activate KLK4 during enamel formation. *J Dent Res* 88, 323-327
- Underwood LJ, Tanimoto H, Wang Y, Shigemasa K, Parmley TH, O'Brien TJ (1999) Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res* 59, 4435-4439
- Valdes G, Chacon C, Corthorn J, Figueroa CD, Germain AM (2001) Tissue kallikrein in human placenta in early and late gestation. *Endocrine* 14, 197-204
- Valdes G, Germain AM, Corthorn J, Chacon C, Figueroa CD, Muller-Esterl W (2001) Tissue kallikrein and bradykinin B2 receptor in human uterus in luteal phase and in early and late gestation. *Endocrine* 16, 207-215

7. Literaturverzeichnis

- Vasilev SA, Schlaerth JB, Campeau J, Morrow CP (1988) Serum CA125 levels in preoperative evaluation of pelvic masses. *Obstet Gynecol*, 71751-71756
- Voet D, Voet JG (1994): *Biochemie*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 368 ff
- Ward AJ, Cooper TA (2010) The pathobiology of splicing. *J Pathol* 220, 152-163
- Webber MM, Waghray A, Bello D (1995) Prostate-specific antigen, a serine protease, facilitates human prostate cancer cell invasion. *Clin Cancer Res* 1, 1089-1094
- Wilkinson DL, Harrison RG (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 9, 443-448
- Wong, HR, De Maio A (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11, 1-12
- Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs IJ, Yu Y, Daly L, Davies AP, O'Briant K, Berchuck A, Soper JT (1995) Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 59, 111-116
- Yamamoto T, De Crombrughe B, Pastan I (1980) Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of rous sarcoma virus. *Cell* 22, 787-797
- Yamanaka H, He X, Matsumoto K, Shiosaka S, Yoshida S (1999) Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 71, 217-224
- Yoi OO, Seldin DC, Spragg J, Pinkus GS, Austen KF (1979) Sequential cleavage of proinsulin by human pancreatic kallikrein and a human pancreatic kininase. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3612-3616
- Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogot JM, Scarisbrick IA, Blaber M (2007) Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 282, 31852–31864
- Yoon H, Blaber SI, Debela M, Goettig P, Scarisbrick IA, Blaber M (2009) A completed KLK activome profile: investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. *Biol Chem* 390, 373–377
- Young CY, Andrews PE, Tindall DJ (1995) Expression and androgenic regulation of human prostate-specific kallikreins. *J Androl* 16, 97-99
- Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Black MH, Diamandis EP (1999) Prostase/KLKL1 is a new member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated. *Cancer Res* 59, 4252-4256
- Yousef GM, Luo LY, Scherer SW, Sotiropoulou G, Diamandis EP (1999) Molecular characterization of Zyme/Protease M/Neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like serine protease. *Genomics* 62, 251-259

7. Literaturverzeichnis

- Yousef GM, Chang A, Diamandis EP (2000) Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be down-regulated in breast cancer tissues. *J Biol Chem* 275, 11891-11898
- Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP (2000) KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family—differential expression in breast cancer. *Genomics* 69, 331-341
- Yousef GM, Magklara A, Chang A, Jung K, Katsaros D, Diamandis EP (2001) Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res* 61, 3425-3431
- Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Ashworth LK, Diamandis EP (2001) Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15). Up-regulation in prostate cancer. *J Biol Chem* 276, 53-61
- Yousef GM, Polymeris ME, Yacoub GM, Scorilas A, Soosaipillai A, Popalis C, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP (2003) Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. *Cancer Res* 63, 2223-2227
- Yousef GM, Polymeris ME, Grass L, Soosaipillai A, Chan PC, Scorilas A, Borgoño C, Harbeck N, Schmalfeldt B, Dorn J, Schmitt M, Diamandis EP (2003) Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 63, 3958-3965
- Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzzone R, Sismondi P, Biglia N, Abd Ellatif M, Diamandis EP (2002) The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer* 87, 1294-1300
- Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Fracchioli S, Iskander L, Borgono C, Rigault de la Longrais IA, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP (2003) Prognostic value of the human kallikrein gene 15 expression in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 3119-3126
- Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP (2003) Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 329, 1-8
- Yousef GM, Stephan C, Scorilas A, Ellatif MA, Jung K, Kristiansen G, Jung M, Polymeris ME, Diamandis EP (2003) Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues. *Prostate* 56, 287-292
- Yousef GM, Yacoub GM, Polymeris ME, Popalis C, Soosaipillai A, Diamandis EP (2004) Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer* 90, 167-172
- Yu H, Levesque MA, Clark GM, Diamandis EP (1998) Prognostic value of prostate-specific antigen for women with breast cancer: a large United States cohort study. *Clin Cancer Res* 4, 1489-1497
- Zhang Z, Barnhill SD, Zhang H, Xu F, Yu Y, Jacobs I, Woolas RP, Berchuck A, Madyastha KR, Bast RC Jr (1999) Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 73, 56-61

7. Literaturverzeichnis

Zhao H, Dong Y, Quan J, Smith R, Lam A, Weinstein S, Clements J, Johnson NW, Gao J (2010) Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 566-572

Zurawski VR Jr, Orjaseter H, Andersen A, Jellum E (1988) Elevated serum CA125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 42, 677-680

8. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AMC	7-Aminomethyl-4-Cumarin
Amp.	Ampizillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARE	Androgen Response Elements
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
BRCA 1/2	Breast cancer Gene 1/2
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG-Inseln	Genomische Region mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleotiden
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GdnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GSH	Glutathion (reduziert)

8. Abkürzungsverzeichnis

GSSG	Glutathion (oxidiert)
GTP	Guanosintriphosphat
<i>His-Tag</i>	Histidin- <i>Tag</i> (His6-Peptid)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatographie
IPTG	Isopropyl- -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamyzin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLK	Kallikrein-ähnliche Protease (Protein)
<i>KLK</i>	Kallikrein-ähnliche Protease (Gen)
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
LMW	Low molecular weight-Marker
M	Musculus (lat.)
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MW	Molekulargewicht
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
pNA	Paranitroanilin
PAA	Polyacryl-Amid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen Emissions Tomographie
pH	pH-Wert
pro-KLK	pro-Form einer Kallikrein-ähnlichen Protease (Protein)
<i>pro-KLK</i>	pro-Form einer Kallikrein-ähnlichen Protease (Gen)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen

8. Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBT	Substratbindende Tasche
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sog.	Sogenannt/e
SPINK5	Serinprotease-Inhibitor Kazal-Typ 5
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNM	Klassifikation zur Tumor-Stadieneinteilung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
UPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Erklärung

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

“Rekombinante Expression, Rückfaltung und biochemische Charakterisierung verschiedener Formen der Kallikrein-ähnlichen Protease 15 (KLK15)”

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Assling, den 18.04.2013, Amélie Michaela Schwarz

9. Publikationen und Teilnahmen an Konferenzen

Beaufort N, Plaza K, Utzschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, Magdolen V (2010) Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem* 391, 581–587

-*"1st International Symposium on Kallikreins"*, 2005, Lausanne, Schweiz

-*"3rd International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-related Peptidases"*, 2009, München

Medizinische Fortbildungen und Kongresse:

Teilnahme an den wöchentlich stattfindenden, interdisziplinären Tumorkonferenzen in den zertifizierten Brustzentren Klinik am Eichert, Göppingen (04/2006-04/2007) und Amperklinik, Dachau (04/2010-08/2010)

26.12.2011: SMV-Hormontherapie in der Menopause: Wie gut für Herz und Gefäße? Heidelberg

26.12.2011: SMV-Aktuelle Therapieoptionen bei Rosazea, Heidelberg

25.12.2011: SMV-Der kleine Schmerzpatient - Akuttherapie bei Kindern und Jugendlichen, Heidelberg

25.12.2011: SMV-Individuelle Therapie für die schwangere krebserkrankte Frau, Heidelberg

30.11.2010: RDÄ-Diagnostik und Therapie der Lese-Rechtschreib-Störung, Köln

07.11.2010: SMV-Schwangerschaft und Geburt nach assistierter Reproduktion, Heidelberg

28.10.2010: SMV-Sexualstörungen bei Frauen, Heidelberg

18.10.2010: Die Pille als Therapeutikum, gynäkologie + geburtshilfe, 9/2010; www.cme-punkt.de, Fachzeitschrift

25.03.2010: Geriatrie Aktuell 2010, München

08.03.2010: Management der Terminüberschreitung, gynäkologie+geburtshilfe 1/2010; www.cme-punkt.de

07.03.2010: SMV-Harninkontinenz bei Frauen und Männern aus beckenbodenchirurgischer Sicht, Heidelberg

03.03.2010: Aktuelles zur Diagnostik und Therapie des Brustkrebses, Dachau

06.02.2010: Symposium Winter 2010: Am Beispiel Down-Syndrom, München

22.10.2009: SMV-Wenn Frühschwangerschaften pathologisch werden, Heidelberg

24.09.2009: SMV-Das Wochenbett, Heidelberg

02.04.2009: SMV - Kindliche Fußfehlformen: Pathologien erkennen und richtig behandeln, Heidelberg

02.04.2009: SMV-Asthma oder COPD: was steckt hinter der Atemnot? Heidelberg

02.04.2009: SMV-Verschlossene Gelenke richtig behandeln - Diagnostik und Therapie der Arthrose im Überblick, Heidelberg

31.03.2009: 152. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis "Typ 2-Diabetes" Therapie: Wann oral? Wann Insulin? Wann Kombination? München

30.03.2009: SMV-Hypertrichose, Heidelberg

26.03.2009: SMV-Diabetesschulung - ein kritischer Überblick, Heidelberg

23.03.2009: SMV-Botulinumtoxin Piksen gegen Schiefhals und Zerebralparese, Heidelberg

23.03.2009: SMV-Polymyalgia rheumatica, Heidelberg

23.03.2009: SMV-Hautveränderungen durch "targeted therapies" - Richtige Diagnose und Therapie bei onkologischen Patienten, Heidelberg

23.03.2009: SMV-Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose, Heidelberg

21.03.2009: SMV-Akne möglichst früh in die Schranken weisen - Überblick zu Pathogenese und Therapie, Heidelberg

9. Publikationen und Teilnahmen an Konferenzen

- 20.03.2009: SMV-Dem Krebs zuvorkommen: Früherkennung in der Praxis, Heidelberg
- 20.03.2009: SMV-Medikamentöse Therapie der Akne, Heidelberg
- 20.03.2009: SMV-Funktionelle Magen- und Darmerkrankungen, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Nach dem Brustkrebs: Rezidive und Risiken erkennen. Ein leitlinienorientiertes Update, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Nicht immer ist eine Erkältung schuld Ursachen, Diagnostik und Therapie von Husten im Überblick, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Von Bandscheibe bis Bechterew: Was plagt das Kreuz? Differenzialdiagnose bei Rückenschmerz, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Mit dem richtigen Antidot Leben retten - Patienten bei toxikologischen Notfällen gezielt versorgen, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, Heidelberg
- 18.03.2009: SMV-Zu jung für Diabetes? - Das gibts nicht! Typ-1- und Typ-2-Diabetes im Kindes- und Jugendalter, Heidelberg
- 29.01.2009: Pneumologie Aktuell 2009, München
- 25.09.2008: Endokrinologie Aktuell 2008, München
- 15.07.2008: 148. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis "Patientenwille", München
- 22.04.2008: 143. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis 'Erektile Dysfunktion' München
- 12.12.2007: Herz & Diabetes - Was muss man wissen - was muss man tun? München
- 18.09.2007: Standard in der Carotisstenose 2007. Hat sich etwas geändert? München
- 27.07.2007: Kommunikation und Gesprächsführung mit onkologischen Patientinnen, München
- 21.06.2007: Anaesthesie Aktuell, München
- 27.03.2007: 132. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis, München
- 20.02.2007: Asthma/COPD, München
- 27.01.2007: 3. Schwabinger Neuro-Seminar, München
- 13.01.2007: Aktuelle Diabetologie 2006 - Spezielle Endokrinologie 2006, München
- 30.11.2006: Pneumologie Aktuell 2006, München
- 21.11.2006: Metabolisches Syndrom und Komplikationen, München
- 12.10.2006: Onkologie - Hämatologie Aktuell 2006, München
- 10.10.2006: 128. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis "Inflammation und Arteriosklerose - eine Impfindikation?", München
- 27.09.2006: 4. Schilddrüsensymposium 'Der benigne Knotenkropf', München
- 26.09.2006: Adipositas - Metabolischer Risikofaktor, München
- 19.09.2006: Lunge trifft Insulin, München
- 22.06.2006: Kardiologie Aktuell 2006/1, München
- 01.06.2006: 38. Bogenhausener Kardiologie Seminar, München
- 04.04.2006: 124. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis: Endoskopische Therapie der akuten Pankreatitis - Pro und Contra, München
- 09.03.2006: Nephrologie Aktuell 2006/2: Fortschritte in Diagnostik und Therapie, München
- 18.01.2006: Beckenbodeninsuffizienz - Prävention und heutige therapeutische Möglichkeiten, München
- 22.10.2005: Dialog der Disziplinen-Endokrinologie, München
- 21.09.2005: Neue Konzepte zur zielgerichteten Therapie des malignen Melanoms und des Nierenzellkarzinoms, München
- 27.07.2005: Nichtinvasive Koronardiagnostik, München
- 05.07.2005: 119. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis - Moderne Insulintherapie, München

9. Publikationen und Teilnahmen an Konferenzen

- 09.06.2005: Angiologie Aktuell 2005/2, München
- 11.05.2005: Forum Interdisziplinäre Onkologie Themenschwerpunkt II:Rektumkarzinom, München
- 26.04.2005: Dyspnoe - kardial oder pulmonal bedingt? München
- 20.04.2005: Interdisziplinäre Gastroenterologie Klinikum rechts der Isar: Pankreas-Raumforderung - eine klinische Herausforderung, München
- 06.04.2005: 4. Forum Frauenklinik, München
- 22.03.2005: 116. Gesprächsrunde zwischen Klinik und Praxis"Gastroenterologie Update", München
- 16.03.2005: Kropf - Wann abwarten, wann handeln? München
- 23.02.2005: Gastrointestinale Blutung - eine Standortbestimmung, München
- 17.02.2005: 'Diabetes aktuell 2005 - Fokus: Risikostratifizierung, differenzierte Therapie, neue Entwicklungen der oralen Therapie', München
- 10.02.2005: 39. Abendkolloquium "Gynäkologische Onkologie: Neue Entwicklungen in der operativen Therapie", München
- 02.02.2005: Forum Interdisziplinäre Onkologie - Aktuelle Therapieaspekte beim Ovariakarzinom, München
- 12.01.2005: Interaktive-interdisziplinäre Schmerzkonzferenz am KH der Barmherzigen Brüder, München
- 09.12.2004: Kardiologie Aktuell 2004/3, München
- 25.11.2004: Kardiologie Aktuell 2004/2, München

Lebenslauf

Amélie Schwarz, Wollwies 1a, 85617 Assling, Tel.: 08092/8619232, amelieschwarz@gmail.com

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 07.07.1976 in Sigmaringen

verheiratet, 1 Tochter, 1 Sohn

10/07-04/2013 Elternzeit/Erziehungszeit und medizinische Fortbildungen

Berufspraxis

04/2010-08/2010 Amperklinik Dachau GmbH
04/07 - 09/07 Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe
Geisenhoferklinik München GmbH
04/06 - 04/07 Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe
Frauenklinik am Eichert, Göppingen
Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe

Ausbildung

05/05 - 04/06 Dissertation in der Forschergruppe der Frauenklinik Rechts der Isar
(experimenteller Teil)
04/05 3. Staatsexamen TU München
04/04 - 03/05 PJ: Gynäkologie und Geburtshilfe,
Frauenklinik Rechts der Isar, München
PJ: Innere, KH Barmherzige Brüder, München
PJ: Chirurgie, KH Barmherzige Brüder, München
03/04 2. Staatsexamen TU München
03/02 1. Staatsexamen TU München
03/01 Physikum
04/98 - 03/01 Ludwig-Maximilians Universität München

Lebenslauf

Praktika

10/03 – 11/03	Frauenklinik vom Roten Kreuz, Taxisstraße, Famulatur
02/03 - 03/03	Praxis Dr.Volk (Internist) München, Famulatur
08/01 - 10/01	Navy Hospital Devonport Neuseeland, Famulatur
03/00 - 04/00	KH München Bogenhausen, Praktikum Anästhesie
08/96 - 09/96	Krankenhaus Barmherzige Brüder, München, Pflegepraktikum

Zusatzqualifikationen / Nebentätigkeiten

04/00 - 01/04	Aicher Ambulanz München Rettungssanitäterin
04/98 - 04/00	Aicher Ambulanz München Rettungsdiensthelferin
11/97 - 04/98	Aicher Ambulanz München Sanitätshelferin
01/97 - 10/97	Deutsches Herzzentrum München - Schwesternhelferin
10/96 - 12/96	Praxis Dr. Volk (Internist) - Arzthelferin
EDV-Kenntnisse	MS-Office (Word, Excel, Powerpoint), Openoffice (Writer, Calc, Impress), SAP, Kreissaal Software
Fremdsprachen	Englisch (fließend in Wort und Schrift), Französisch, Neuhebräisch (Grundkenntnisse)

Assling, den 18.04.2013

Danksagung

Allen voran danke ich Prof. Dr. rer. nat. Viktor Magdolen von der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München, für die Überlassung des Themas, die Vermittlung seines immensen Expertenwissens und für die freundliche und ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit. Bei Frau Univ.-Prof. Dr. Marion Kiechle, Direktorin der Frauenklinik der TU München und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt, Leiter der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München, möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung der Doktorarbeit in den hervorragenden Laboratorien der Frauenklinik bedanken.

Bei den technischen Assistentinnen, insbesondere Frau Sabine Creutzburg, und allen medizinischen und naturwissenschaftlichen DoktorandInnen möchte ich mich für die Unterstützung, die zahlreichen Ratschläge und deren Hilfsbereitschaft bedanken. Daniel, Melanie, Clemens und meiner tüchtigen Zwillingschwester Julia danke ich ganz herzlich fürs Gegenlesen und die wertvollen Kommentare. Bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanke ich mich außerdem besonders fürs Babysitten, ohne sie wäre diese Arbeit niemals vollendet worden.

Und nicht zuletzt bedanke ich mich bei René und Wolfgang, die mir mit unerschöpflicher Geduld beim Verfassen dieser Arbeit in der englischen Version und beim Formatieren behilflich waren.

Assling, 2013

Amélie Michaela Schwarz