

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Regulation der Sekretion und
Zelloberflächenassoziation von Cathepsin X
durch Interaktionen mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ und
seinem Liganden Vitronektin**

Annette Maria Lechner

aus

Landshut

2008

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. Marianne Jochum und Frau Dr. Dorit Nägler (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Medizinischen Fakultät) betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar (Pharmazeutische Biologie des Departments Pharmazie) vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17.01.08

.....
(Annette Lechner)

Dissertation eingereicht am 17.01.08

1. Gutachter Frau Prof. Dr. M. Jochum

2. Gutachter Frau Prof. Dr. A. Vollmar

Mündliche Prüfung am 28.04.08

Meiner Familie gewidmet

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.

- Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	3
B.1 Proteasen: Allgemeine Aspekte	3
B.2 Cysteinproteasen	4
B.2.1 Humane Cathepsine.....	4
B.2.1.1 Aufbau humaner Cathepsine	4
B.2.1.2 Regulierung der Aktivität.....	5
B.2.1.3 Biologische Funktionen humaner Cathepsine.....	6
B.2.2 Cathepsin X	7
B.2.2.1 Entdeckung.....	7
B.2.2.2 Struktur und Aktivität von Cathepsin X.....	8
B.2.3 Vergleich der Proregionen von Cathepsin L, B und X	9
B.3 Integrine	10
B.3.1 Familie und Aufbau.....	11
B.3.2 Integrin-vermittelte Signaltransduktion	13
B.3.3 Integrin $\alpha_v\beta_3$	13
B.3.4 Vitronektin, ein natürlicher Ligand von $\alpha_v\beta_3$	14
B.4 Proteasen, Integrine und EZM-Proteine	15
B.5 Ziele der Arbeit	18
B.5.1 Zielsetzung 1: Analyse der Regulation der Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X im THP-1-Zellmodell.....	18
B.5.2 Zielsetzung 2: Niederregulation von (Pro)Cathepsin X zur Funktionsanalyse im HUVEC-Modell.....	18
B.5.3 Zielsetzung 3: Evaluierung von Procathepsin X als Bindungspartner RGD-abhängiger Integrine	18
B.5.4 Zielsetzung 4: Suche nach physiologischen Liganden von (Pro)Cathepsin X mittels affinitätschromatographischer Methoden.....	19

C	MATERIAL UND METHODEN	20
C.1	Material.....	20
C.1.1	Geräte.....	20
C.1.2	Bioinformatische Hilfsmittel.....	22
C.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	23
C.1.3.1	Allgemeine Chemikalien.....	23
C.1.3.2	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken.....	24
C.1.3.2.1	Vektoren.....	25
C.1.3.2.2	Oligonukleotide.....	26
C.1.3.3	Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken.....	27
C.1.3.4	Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken.....	27
C.1.3.5	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken.....	29
C.1.3.6	Substrate und Inhibitoren.....	29
C.1.3.7	Proteine und Antikörper/Konjugate.....	30
C.2	Methoden.....	31
C.2.1	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	31
C.2.1.1	Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen.....	31
C.2.1.1.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	31
C.2.1.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	31
C.2.1.1.3	Restriktion von DNA-Fragmenten.....	32
C.2.1.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
C.2.1.1.5	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	32
C.2.1.1.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	33
C.2.1.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	33
C.2.1.1.8	Reinigung von Oligonukleotiden und Plasmiden.....	33
C.2.1.1.9	DNA-Sequenzierung.....	33
C.2.1.2	Herstellung von Cathepsin-X-Mutanten mittels zielgerichteter Mutagenese.....	34
C.2.1.3	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen.....	34
C.2.1.4	cDNA-Synthese.....	34
C.2.1.5	Quantitative RT-PCR.....	34
C.2.1.6	Design von siRNAs.....	35
C.2.2	<u>Mikrobiologische Methoden</u>	36
C.2.2.1	Herstellung von Wachstumsmedien für <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	36
C.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	36
C.2.2.3	Langzeitlagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	36
C.2.2.4	Elektroporation von <i>P. pastoris</i>	36
C.2.2.5	Selektion von transformierten <i>P. pastoris</i> -Stämmen.....	37
C.2.2.6	Anzucht von <i>P. pastoris</i> für die Gewinnung von rekombinanten Proteinen.....	38
C.2.2.7	Langzeitlagerung von <i>P. pastoris</i> -Stämmen.....	38
C.2.3	<u>Proteinbiochemische Methoden</u>	39
C.2.3.1	Ankonzentrieren und Dialyse von Proteinlösungen.....	39
C.2.3.2	Ionenaustauschchromatographie.....	39
C.2.3.3	Messung der Aktivität von Cathepsin-X-C31A.....	41

C.2.3.4	Zirkulardichroismus-Spektroskopie von Cathepsin-X-C31A.....	41
C.2.3.5	Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose	41
C.2.3.6	Proteinextraktion aus Säugerzellen	42
C.2.3.7	Isolierung des Zellkulturüberstandes	42
C.2.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
C.2.3.9	Deglykosylierung von Proteinen.....	43
C.2.3.10	Herstellung von Gelen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	43
C.2.3.11	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillantblau	44
C.2.3.12	Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen	45
C.2.3.13	Koimmunpräzipitation	46
C.2.3.13.1	Koimmunpräzipitation von rekombinanten Procathepsin-X-Varianten mit Integrin $\alpha_v\beta_3$	46
C.2.3.13.2	Koimmunpräzipitation von Procathepsin X mit $\alpha_v\beta_3$ aus HUVEC	46
C.2.3.14	Affinitätschromatographie mit Cathepsin-X-C31A	47
C.2.3.15	Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse.....	47
C.2.3.15.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	47
C.2.3.15.2	Immundetektion der Zielproteine.....	48
C.2.3.16	Immobilisierung und Färbung von Proteinen für die N-terminale Proteinsequenzierung	48
C.2.3.16.1	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	48
C.2.3.16.2	Färbung der PVDF-Membran	49
C.2.3.17	Oberflächenplasmonresonanz-Studien.....	49
C.2.3.17.1	Prinzip der Methode	49
C.2.3.17.2	Durchführung	50
C.2.4	<u>Zellbiologische Methoden</u>	52
C.2.4.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	52
C.2.4.2	Kultivierung von Säugetierzellen.....	52
C.2.4.3	Subkultivierung von Säugetierzellen	52
C.2.4.4	Zellzahlbestimmung	53
C.2.4.5	Isolierung von Monozyten und Granulozyten aus Vollblut	53
C.2.4.6	Stimulierung von Zellen.....	54
C.2.4.6.1	Differenzierung der Zelllinie THP-1 mit PMA und ATRA	54
C.2.4.6.2	Stimulierung von Zellen mit Vitronektin	54
C.2.4.7	siRNA-Transfektion von HUVEC	55
C.2.4.8	Bestimmung der Adhäsion	55
C.2.4.9	Bestimmung der Transmigrationsrate von HUVEC	56
C.2.4.10	Immunfärbung von HUVEC	57
C.2.4.10.1	Epifluoreszenzmikroskopie	57
C.2.4.10.2	Konfokale Mikroskopie.....	58
C.2.4.10.3	Transmissionselektronenmikroskopie	59

D	ERGEBNISSE	60
D.1	Regulation der Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X.....	60
D.1.1	Expression von (Pro)Cathepsin X in Leukozyten	60
D.1.2	Differenzierung von THP-1-Zellen mit PMA und ATRA: Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X	61
D.1.3	Stimulierung der Freisetzung von Cathepsinen durch physiologische Agentien	62
D.1.3.1	Wirkung von Zytokinen und EZM-Proteinen auf die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X.....	62
D.1.3.2	Wirkung von Vitronektin auf die Freisetzung von Cathepsin B und Cathepsin L	64
D.1.3.3	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Vitronektin	65
D.1.3.4	Verstärkte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X aus verschiedenen Zelltypen nach Vitronektinstimulation	67
D.1.3.5	Integrin $\alpha_v\beta_3$ als Bindungspartner der RGD-abhängigen Freisetzung von (Pro)Cathepsin X durch Vitronektin	67
D.1.3.6	Einfluss von Tunicamycin, Brefeldin A und Cycloheximid auf die Vitronektin-induzierte (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung.....	68
D.2	Niederregulation von (Pro)Cathepsin X zur Funktionsanalyse.....	70
D.2.1	Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mittels siRNA in HUVEC.....	71
D.2.1.1	Überprüfung der siRNA-Effizienz auf RNA-Ebene	71
D.2.1.2	Überprüfung der siRNA-Effizienz auf Proteinebene	72
D.2.2	Evaluierung von (Pro)Cathepsin X bei der Invasionsfähigkeit von HUVEC.....	73
D.3	Procathepsin X als Bindungspartner von RGD-abhängigen Integrinen	76
D.3.1	Herstellung und Expression von Procathepsin-X-Mutanten.....	76
D.3.2	Adhäsion von HUVEC über Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Procathepsin X	79
D.3.3	Bindung von löslichem (Pro)Cathepsin X an HUVEC über $\alpha_v\beta_3$	81
D.3.4	Mikroskopischer Nachweis der Kolo-kalisation von (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$	81
D.3.5	Koimmunpräzipitation von Procathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$	85
D.3.6	Analyse der Bindung von Procathepsin X an Integri-ne mittels Oberflächenplasmonresonanz	86

D.4	Suche nach physiologischen Liganden von (Pro)Cathepsin X mittels affinitätschromatographischer Methoden	89
D.4.1	Koimmunpräzipitation mit einem Kit der Firma Pierce.....	89
D.4.2	Koimmunpräzipitation mit einem Kit der Firma Miltenyi.....	91
D.4.3	Affinitätschromatographie mit einer inaktiven Cathepsin-X-Mutante	92
D.4.3.1	Herstellung und Isolierung einer inaktiven Cathepsin-X-Mutante	92
D.4.3.2	Charakterisierung der inaktiven Mutante	93
D.4.3.2.1	Analyse der Sekundärstruktur durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie	93
D.4.3.2.2	Messung der Aktivität	94
D.4.3.3	Affinitätschromatographie mit der katalytisch inaktiven Mutante Cathepsin-X-C31A.....	95
E	DISKUSSION	96
E.1	Differenzielle Expression von (Pro)Cathepsin X.....	96
E.2	Vermehrte Freisetzung von Cathepsinen nach Vitronektinstimulation	98
E.3	Spezifische Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mittels siRNA.....	102
E.4	Verringerte Invasion von HUVEC nach siRNA-vermittelter Niederregulation von (Pro)Cathepsin X.....	103
E.5	RGD-abhängige Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$.....	105
E.6	Integrine, Proteasen und Zellmigration	108
E.7	Suche nach weiteren Liganden von (Pro)Cathepsin X über verschiedene Arten der Affinitätschromatographie	109
E.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	110
F	LITERATURVERZEICHNIS	113
G	CURRICULUM VITAE	123
H	DANKSAGUNG	125

Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit gelten die allgemein gültigen Ein- und Dreibuchstabenkodizes für Aminosäuren nach der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur.

Abkürzungen für Einheiten

AU	<i>arbitrary units</i>
bp	Basenpaare
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Min	Minute
nt	Nukleotid
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
rpm	<i>revolutions per minute</i>
Sek	Sekunde
Std	Stunde
U	<i>unit</i>
V	Volt
v/v	Volumenanteil in Prozent
w/v	Gewichtsanteil in Prozent

Abkürzungen für Proteine, Proteindomänen und andere Moleküle

Abz	Anthranilsäure/ortho-Aminobenzoyl
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-trans Retinsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CM	Carboxymethyl
CNBr	Zyanbromid
DABCO	1,2-Diazobicyclo-octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBM-2	<i>endothelial basal medium-2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGM-2	<i>endothelial growth medium-2</i>
Endo H	Endo-N-acetyl- β -glucosaminidase H
ERGIC	<i>endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FN	Fibronectin

Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Koll IV	Kollagen IV
LB	<i>Luria Broth</i>
LM	Laminin
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
(Pro)Cat	(Pro)Cathepsin
RGD	Arginin-Glyzin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>tris buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
uPA	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
VCP	<i>valosin containing protein</i>
VN	Vitronektin
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

Sonstige Abkürzungen

As	Aminosäure(n)
CD	<i>circular dichroism</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
HEK293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MD	minimal Dextrose
Mut ^S	<i>methanol utilisation slow</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
RU	<i>response units</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>

A Zusammenfassung

Cathepsine sind lysosomale Cysteinproteasen, die neben der allgemeinen Proteindegradation in Lysosomen auch spezifische Funktionen ausüben, die eine limitierte Proteolyse erfordern. Zudem werden Cathepsine sezerniert, weshalb man sie auch im Extrazellulärraum findet, wo sie ebenfalls an verschiedenen biologischen Vorgängen, wie etwa der Zellmigration/Invasion, teilnehmen.

Über Cathepsin X, einen relativ neu entdeckten Vertreter dieser Proteinklasse, war zu Beginn der Promotionsarbeit noch wenig bekannt. Die Struktur und das Aktivitätsprofil konnten zwar bereits gelöst werden, über mögliche (patho-)physiologische Funktionen gab es jedoch noch keine Erkenntnisse. Das Hauptziel meiner Untersuchungen war daher, mittels geeigneter Methoden nähere Aufschlüsse über die Rolle von Cathepsin X oder seiner Proform innerhalb und außerhalb der Zelle zu erlangen. Dies sollte vorwiegend durch die Analyse der Expression und Sekretion dieser Protease, sowie durch das Auffinden von Interaktionspartnern erfolgen.

Wie sich in Vorversuchen zeigte, wird Cathepsin X in humanen Leukozyten unterschiedlich stark exprimiert. Da eine hohe Expression insbesondere in Monozyten vorlag, wurde für weitere Analysen das Zellmodell THP-1 eingesetzt, das auch für die Differenzierung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen durch Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder all-trans Retinsäure (ATRA) verwendet werden kann. Interessanterweise zeigten diese Agenzien unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression und Sekretion von Cathepsin X. So wurde mit PMA eine starke intra- und extrazelluläre Erhöhung der Protease verzeichnet, während mit ATRA das Gegenteil der Fall war.

Da eine differenzielle Expression von Cathepsin X in Leukozyten auf eine mögliche Funktion in der Entzündungsantwort hindeutet, schien eine Untersuchung der Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen und extrazellulären Matrix (EZM)-Proteinen sinnvoll, weil diese Faktoren ebenfalls die Sekretion von Proteasen beeinflussen können. Die untersuchten Zytokine hatten allerdings keinen Effekt auf die Sekretion von Cathepsin X aus THP-1-Zellen, wohingegen mit dem EZM-Protein Vitronektin eine Verdopplung der Cathepsin-X-Konzentration im Medium beobachtet wurde. In diesem Kontext konnte nachgewiesen werden, dass Vitronektin durch die Interaktion mit dem Zelloberflächenrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ den Sekretionsapparat der Zelle beeinflusst, wobei offensichtlich das Sequenzmotiv Arginin-Glyzin-Aspartat (RGD), welches in Vitronektin enthalten ist, für diesen Vorgang entscheidend ist. Neben Cathepsin X wurde auch für die Cathepsine B und L eine erhöhte Freisetzung nach Inkubation mit Vitronektin gemessen, was zeigt, dass dieser durch das EZM-Protein ausgelöste Mechanismus nicht auf Cathepsin X beschränkt ist.

Umgekehrt ließ sich in einem weiteren Zellmodell (HUVEC) durch den Einsatz von „*small-interfering RNA*“ (siRNA) die Expression von Cathepsin X erniedrigen, was zu einer verminderten Migration der HUVEC in einem Invasionsversuch führte. Dies deutet auf eine Funktion von Cathepsin X in der Zellmotilität hin. Da Cathepsin X nur Carboxypeptidaseaktivität besitzt, muss eine Rolle in der Invasion von Zellen durch eine direkte Degradation der EZM allerdings ausgeschlossen werden und eine andere, eventuell indirekte Wirkweise in Betracht gezogen werden.

Weil Cathepsin X, ähnlich wie Vitronectin, ein exponiertes RGD-Motiv in seiner Proregion aufweist, sollte nun eine mögliche Interaktion mit Integrinen untersucht werden. Dies schien auch im Hinblick auf das Ergebnis des Invasionsversuches sinnvoll, da Integrine für die Migration von Zellen essentiell sind. Tatsächlich ließ sich eine RGD-abhängige Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Zellexperimenten zeigen und mittels Oberflächenplasmonresonanz auf molekularer Ebene bestätigen. Fluoreszenzmikroskopie und Koimmunpräzitationsversuche lassen die Annahme zu, dass diese Interaktion nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* stattfindet.

Neben dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ als Bindungspartner deuteten unterschiedliche Arten der Affinitätschromatographie auf zwei weitere mögliche Liganden für Cathepsin X, nämlich auf den „*macrophage migration inhibitory factor*“ und das „*valosin containing protein*“, hin. Eine nähere Untersuchung ließ jedoch eher auf eine unspezifische Wechselwirkung als eine spezifische Interaktion schließen.

Somit werden in dieser Arbeit zwei wesentliche neue Aspekte in der Regulation der Sekretion und seiner Beteiligung an Migrationsvorgängen gezeigt, wobei die Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine besondere Rolle zu spielen scheint. Ob diese beiden Vorgänge miteinander gekoppelt sind, konnte mit den bisherigen Ergebnissen noch nicht bewiesen werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass extrazelluläres (Pro)Cathepsin X neben seiner Rolle als Protease auch nicht-proteolytische Funktionen, beispielsweise als Ligand bestimmter Zelloberflächenstrukturen ausüben kann. Dieser Aspekt könnte im Hinblick auf eine therapeutische Inhibition von Angiogenese und Metastasierung von Tumorzellen durch Antikörper gegen Cathepsin X und/oder Integrine von großem Nutzen sein.

B Einleitung

B.1 Proteasen: Allgemeine Aspekte

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren und dadurch eine breite Vielfalt von essentiellen Vorgängen in lebenden Organismen steuern. Ihre Bedeutung wird durch die Tatsachen untermauert, dass 2 % aller Gene für Proteasen kodieren und sie fast 10 % aller Enzyme der EC Liste der IUBMB umfassen (EC = *Enzyme Committee*; IUBMB = „*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“) (Barrett, Rawlings & O'Brien, 2001). Im Gegensatz zu anderen Modifikationen von Proteinen, wie z.B. der Phosphorylierung oder Ubiquitinierung, ist die Proteolyse irreversibel. Man unterscheidet zwischen einer relativ unspezifischen, allgemeinen Degradation und der limitierten Proteolyse. Die allgemeine Degradation dient der Inaktivierung und dem Abbau von Proteinen, wodurch wieder Aminosäuren für die Synthese freigesetzt werden. Bei der limitierten Proteolyse erfolgt die Hydrolyse an einer definierten Stelle in einem Protein, wodurch spezifische biologische Aktivitäten in Gang gesetzt und reguliert werden. Diese können sowohl intrazellulär in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle als auch extrazellulär ablaufen.

Man kann Proteasen nach ihren Spaltungsmustern in Gruppen unterteilen. Dabei unterscheidet man Endopeptidasen, die innerhalb einer Proteinsequenz schneiden, von Exopeptidasen, die eine oder mehrere Aminosäuren vom Ende eines Proteins entfernen. Je nachdem, ob eine, zwei oder drei Aminosäuren vom N-Terminus entfernt werden, spricht man von Mono-, Di- oder Triaminopeptidasen. Bei Proteasen, die den C-Terminus angreifen, differenziert man Monopeptidyl-Carboxypeptidasen, welche eine einzelne Aminosäure abspalten, von Dipeptidyl-Carboxypeptidasen, die zwei Aminosäuren entfernen. Im Prinzip wirken alle Proteasen über den gleichen Mechanismus, nämlich durch den nukleophilen Angriff auf eine Carbonylgruppe mit der anschließenden Spaltung der Peptidbindung unter Bildung eines Säureanhydrids als Zwischenprodukt. Die Reste des Substrats auf der Aminoseite der Spaltstelle werden in Richtung zum N-Terminus hin als P1, P2, P3 etc. bezeichnet, die Reste in Richtung C-Terminus als P1', P2', P3'. Entsprechend werden die jeweiligen gebundenen Aminosäurereste des Enzyms mit S („*subsites*“) durchnummeriert (Schechter & Berger, 1967).

Auf Grund der großen Variabilität der Proteasen war eine sinnvolle Systematik notwendig, weshalb die MEROPS Datenbank gegründet wurde, die für die Einteilung sowohl die Molekülstruktur als auch die evolutionäre Herkunft der Proteasen heranzieht (<http://www.merops.ac.uk>) (Rawlings & Barrett, 1993). So erfolgt eine Zuordnung entsprechend der verwendeten katalytischen Strategie in die Hauptgruppen Aspartat (A)-, Cystein (C)-, Glutamat (G)-, Metallo (M)-, Serin (S)-, Threonin (T)- und noch nicht klassifizierte Proteasen (U). Eine weitere Unterteilung der katalytischen Hauptgruppen wird in Klans und Familien vorgenommen, wobei ein Klan eine Gruppe von Familien darstellt, die

einen gemeinsamen Vorfahren haben (Barrett et al., 2001). Die Zugehörigkeit einer Protease zu einer Familie ergibt sich aus ihrer Sequenzhomologie zu einem bereits beschriebenen Mitglied der Familie. Dabei ist wichtig, dass sich der Vergleich auf den katalytisch aktiven Teil der betreffenden Protease beschränkt (Barrett, Rawlings & Woessner, 2003).

Da sich diese Dissertation auf Cathepsin X, einen Vertreter der lysosomalen Cysteinproteasen fokussiert, soll im Folgenden nur diese Hauptgruppe näher beschrieben werden.

B.2 Cysteinproteasen

Proteasen, die als Nukleophil bei der Katalyse die Thiolgruppe eines Cysteins verwenden, bezeichnet man als Cysteinproteasen. Der Klan CA umfasst Cysteinproteasen, die die katalytischen Reste Cys, His und Asn (oder Asp) als katalytische Triade im aktiven Zentrum aufweisen. C1 stellt die Papain-Familie im Klan CA dar, welche in zwei Subfamilien unterteilt ist: Eine Subfamilie (C1B) besteht aus den Enzymen, die mit den Bleomycin-Hydrolasen verwandt sind, die andere Subfamilie (C1A) beinhaltet Enzyme, die dem Papain, dem ersten identifizierten Vertreter dieser Familie, ähneln. In die Familie C1A sind auch die Vertreter der humanen, Cystein-abhängigen Cathepsine eingeordnet ((Rawlings, Morton & Barrett, 2006), <http://www.merops.ac.uk>).

B.2.1 Humane Cathepsine

Von den humanen, lysosomalen Cathepsinen der C1A-Familie sind mittlerweile 11 Vertreter (Cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, W und X) bekannt. Der Name Cathepsin wurde zum ersten Mal von Willstätter und Bamann verwendet und ist dem griechischen Wort „καθέρπειν“ für „verdauen“ entlehnt (Willstätter & Bamann, 1929). Diese Namensgebung bezieht sich jedoch nicht nur auf Cysteinproteasen, sondern betrifft auch Serin- bzw. Aspartatproteasen (Cathepsine A und G, bzw. D und E). Diese sollen hier jedoch nicht weiter behandelt werden.

B.2.1.1 Aufbau humaner Cathepsine

Alle bekannten humanen Cathepsine zeigen einen ähnlichen Aufbau, bestehend aus Signalpeptid, Propeptid und katalytischer Domäne, welche dem reifen, aktiven Enzym entspricht. Das Signalpeptid dient dem Transport der Polypeptidkette ins endoplasmatische Retikulum (ER), wo es sofort durch die Signalpeptidase abgespalten wird. Die Proregion erfüllt verschiedene Zwecke. Zum einen dient sie als Chaperon für die Faltung der katalytischen Domäne und für den späteren Transport der Protease. Es benötigen aber nicht alle Cathepsine die Proregion als Faltungshilfe, so bilden z.B. Cathepsin X und B zusätzliche Schleifen in der katalytischen Domäne aus, von denen angenommen wird, dass sie ebenfalls die richtige Faltung unterstützen können (Cunningham et al., 1999). Zum anderen ist die Proregion ein hochaffiner, reversibler Inhibitor des Enzyms, um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Auch wirkt sie stabilisierend, wenn sich das Enzym in einer Umgebung mit

neutralem pH-Wert befindet (Mach, Mort & Glossl, 1994; Tao et al., 1994). Die Länge der Proregionen ist sehr variabel (38-250 Aminosäuren), während die Länge des katalytischen Teils der Protease in der Regel 220-260 Aminosäuren beträgt.

Proteasen der Papain-Familie besitzen eine ähnliche Faltung. Diese besteht aus zwei Domänen, die durch das V-förmige aktive Zentrum getrennt sind. Dort finden sich die katalytisch aktiven Reste Cys25 und His159 (Papain-Nummerierung), die jeweils in einer der beiden Domänen liegen. Der größte Teil der linken (L-)Domäne besteht aus dem N-terminalen Teil des Proteins und enthält eine zentrale α -Helix, die ca. 30 Reste lang ist. Entsprechend besteht die rechte (R-)Domäne hauptsächlich aus der C-terminalen Hälfte und bildet eine β -Faltblattstruktur aus, die eine kleine α -Helix enthält. Die Enzyme sind Monomere, mit der Ausnahme von Cathepsin C, welches ein Homotetramer ausbildet (Dolenc et al., 1995; Olsen et al., 2001). Das V-förmige aktive Zentrum erstreckt sich bei den Endopeptidasen über das ganze Molekül, während bei den Exopeptidasen zusätzliche Strukturen vorhanden sind, die die Furche, welche das aktive Zentrum enthält, eingrenzen und durch elektrostatische Wechselwirkungen die Bindung der N- oder C-terminalen Enden der Peptide ermöglichen (Turk, Turk & Turk, 2003).

B.2.1.2 Regulierung der Aktivität

Die Aktivität der Cathepsine kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. So wirkt, wie bereits erwähnt, die Proregion als Inhibitor und verhindert damit weitgehend eine vorzeitige Aktivierung der Protease. Die Abspaltung der Proregion kann bei Cathepsinen, die Endopeptidaseaktivität besitzen, autokatalytisch erfolgen, wobei durch einen niedrigen pH-Wert und Glykosaminoglykane die Prozessierung erleichtert wird (Turk, Turk & Turk, 2000). Allerdings können sich nicht alle Cathepsine autokatalytisch aktivieren. So benötigt z.B. Cathepsin X zur Aktivierung Cathepsin L (Nägler et al., 1999).

Die Aktivität wird zusätzlich durch die Halbwertszeiten der Enzyme gesteuert, wobei die meisten Cathepsine nur bei einem lysosomalen pH von 5,0-5,5 und reduzierenden Bedingungen stabil sind. Sollten sie durch eine Verletzung der lysosomalen Membran ins Zytosol der Zelle gelangen, so würden sie durch die oxidierenden Bedingungen und den neutralen pH rasch an Stabilität und somit ihre Aktivität verlieren.

Des Weiteren gibt es natürliche Inhibitoren, die die aktivierten Proteasen reversibel binden und deren Aktivität je nach Konzentration und Affinität modulieren. Diese Hemmstoffe werden in die Cystatin-Superfamilie eingeordnet, welche die Stefin-, die Cystatin- und die Kininogenfamilie beinhaltet (Barrett et al., 1986).

Auch Glykosaminoglykane bieten eine Möglichkeit, die Aktivität von Cathepsinen zu regulieren. So wurde unter anderem nachgewiesen, dass die Bindung von Heparin und Heparansulfat an Papain und Cathepsin B die Proteasenstruktur stabilisiert und dadurch die Inaktivierung bei alkalischem pH verhindert (Almeida et al., 2001; Almeida et al., 1999). Für

Cathepsin K wurde gezeigt, dass Chondroitinsulfat und Keratansulfat die Kollagenaseaktivität dieser Protease verstärken, während Heparin, Heparansulfat und Dermatansulfat deren Aktivität vermindern (Li et al., 2004).

B.2.1.3 Biologische Funktionen humaner Cathepsine

Einige Cathepsine, wie z.B. Cathepsin B, H und L, sind ubiquitär in Lysosomen vorhanden und scheinen hauptsächlich „*housekeeping*“-Funktionen innezuhaben, wobei mit relativ unspezifischen Cathepsin-Inhibitoren bis zu 40 % der zellulären Proteindegradation inhibiert werden kann (Shaw & Dean, 1980). Dagegen läßt die Tatsache der limitierten Gewebs-expression mancher Cathepsine (S, V, K) auf teilweise spezifische Funktionen schließen. Durch die Generierung von „*knock-out*“-Mäusen konnten zudem neue Einblicke in die speziellen Aufgaben von Cathepsinen gewonnen werden.

Für die große Vielfalt in ihren biologischen Funktionen scheint unter anderem das breite Substratspektrum dieser Enzymklasse verantwortlich zu sein. In diesem Kapitel sollen nur einige gut untersuchte Beispiele genannt werden, die zum Teil auch klinische Relevanz haben.

Cathepsin K ist ein potentes kollagenolytisches und elastolytisches Enzym, das vorwiegend in Osteoklasten exprimiert wird (Bromme et al., 1996; Inaoka et al., 1995). Diese Protease spielt eine wichtige Rolle beim Knochenabbau, wie auch der Phänotyp der „*knock-out*“-Mäuse zeigt, die eine Osteopetrose ausbilden (Saftig et al., 1998). Mutationen im Cathepsin-K-Gen führen zu einer erblichen Krankheit, genannt Pyknodysostose, die sich in Veränderungen im Knochenaufbau manifestiert, ähnlich dem „*knock-out*“-Maus Phänotyp (Gelb et al., 1996). Auch führt eine Deregulation der Cathepsin-K-Aktivität zu Osteoporose, weshalb Inhibitoren dieses Enzyms durchaus interessant für den klinischen Einsatz sind (Deaton & Kumar, 2004).

Einige Cathepsine sind für das Immunsystem bedeutend, da sie zur Bildung und zum Transport der MHC („*major histocompatibility complex*“)-Klasse-II-Moleküle beitragen, indem sie die invariante Kette Ii prozessieren, welche ein Chaperon für diese Moleküle darstellt. Ein Beispiel dafür ist Cathepsin V, das Ii zu CLIP („*Class II-associated invariant chain peptide*“) umwandeln kann (Tolosa et al., 2003). In der Maus dürfte Cathepsin L für diesen Prozess verantwortlich sein, da das „*knock-out*“-Modell im Beladen der MHC-Molekülen mit Antigenen beeinträchtigt ist (Nakagawa et al., 1998). In Makrophagen scheint Cathepsin F die Prozessierung von Ii durchzuführen (Shi et al., 2000). Ebenso ist Cathepsin S in diesen Prozess involviert, wie durch ein entsprechendes „*knock-out*“-Mausmodell gezeigt werden konnte (Nakagawa et al., 1999). Obgleich mehrere Cathepsine an der Prozessierung der invarianten Kette beteiligt sind, scheint ihre Funktion jedoch auf bestimmte Zell- und Gewebstypen beschränkt zu sein (Vasiljeva et al., 2007). Eine andere Rolle im Immunsystem spielt Cathepsin C, das die Serinproteasen Granzym A und B, neutrophile Elastase und Cathepsin G aktivieren kann (Pham & Ley, 1999). Ist das Cathepsin-C-Gen durch Mutationen betroffen, so können je nach allelischer Variante das Papillon-Levèvre oder das Haim-Munk

Syndrom auftreten. Die Krankheiten ähneln sich sehr in ihrer Symptomatik, vor allem findet man eine schwerwiegende Periodontitis (Hart et al., 2000).

Interessant ist auch, wie Viren die Aktivität von Wirtsproteasen ausnützen. So ermöglichen zelluläre Proteasen die Spaltung viraler Polyproteine oder den Eintritt in die Wirtszelle. Diesbezüglich wurde kürzlich eine Rolle für Cathepsin B und L beim Eindringen des Ebola-Virus in die Zelle aufgedeckt. Indem sie ein virales Glykoprotein spalten, kann die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran eingeleitet werden (Chandran et al., 2005).

Bei Tumoren findet man häufig eine erhöhte Expression von zahlreichen Cathepsinen, was nicht selten mit einer schlechten Prognose korreliert. Eine Hochregulation wurde u.a. bei Brust-, Lungen-, Hirn-, Gastrointestinaltrakt-, Haut- und Prostatatumoren beschrieben (Jedezko & Sloane, 2004). Durch ihre primäre Wirkung auf die EZM (extrazelluläre Matrix) spielen Cathepsine bei verschiedenen tumorassoziierten Prozessen, wie Tumorstadium, Angiogenese und Metastasierung, eine wichtige Rolle. So können sie direkt am Abbau der EZM beteiligt sein oder indirekt, indem sie andere Proteine aktivieren. Beispielsweise kann Cathepsin B u.a. Kollagen IV, Laminin und Fibronectin degradieren, die Komponenten der Basallamina darstellen (Buck et al., 1992). Indirekt können Cathepsin B und Cathepsin L die Proteolyse verstärken, indem sie Pro-uPA (Urokinasentyp-Plasminogen Aktivator) aktivieren (Goretzki et al., 1992; Kobayashi et al., 1991). uPA ist zusammen mit seinem Rezeptor uPAR (uPA-Rezeptor) ein potenter Effektor beim Abbau der EZM, da durch uPA/uPAR weitere Proteasen, z.B. Plasminogen und verschiedene Mitglieder der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) aktiviert werden, die ebenfalls stark zur Degradation der EZM beitragen (Gocheva & Joyce, 2007). Interessanterweise wurde kürzlich auch eine erhöhte Expression von Cathepsin X vor allem bei Prostata- und Magenkarzinomen beschrieben (Nägler et al., 2004; Krueger et al., 2005), wobei allerdings die funktionelle Bedeutung dieser Protease für das Tumorgeschehen noch völlig unklar ist.

B.2.2 Cathepsin X

Cathepsin X gehört zusammen mit den Cathepsinen W, O, V, K und F zu den neueren beschriebenen cysteinabhängigen Cathepsinen. Genbankrecherchen zeigen, dass mit ihrer Entdeckung die Gruppe von elf humanen cysteinabhängigen Cathepsinen vollständig ist, und dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch keine weiteren zu finden sind (Turk et al., 2003).

B.2.2.1 Entdeckung

Schon im Jahr 1985 ist eine Arbeitsgruppe auf ein Ortholog von humanem Cathepsin X gestoßen, als sie eine cDNA-Bibliothek aus Rinderherz untersuchten und dabei einen Teil der C-terminalen Sequenz identifizierten (Gay & Walker, 1985). Diese Sequenz konnten sie den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen zuordnen und nannten das bis dahin noch unentdeckte Protein Cathepsin X. Erst 13 Jahre später wurde fast zeitgleich von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen (Nägler & Menard, 1998; Santamaria et al., 1998) die cDNA von humanem

Cathepsin X isoliert und beschrieben, wobei Santamaria et al. den Namen Cathepsin Z verwendeten. Das Gen für Cathepsin X wurde auf Chromosom 20q13 kartiert (Santamaria et al., 1998). Der Name Cathepsin P wurde ebenfalls für das humane Enzym verwendet (Pungercar & Ivanovski, 2000).

B.2.2.2 Struktur und Aktivität von Cathepsin X

Nachdem die komplette humane cDNA-Sequenz identifiziert war, wurde das rekombinant exprimierte Protein beschrieben (Nägler et al., 1999). Die Auflösung der Kristallstruktur gelang nach kurzer Zeit und bestätigte verschiedene Besonderheiten dieser Protease, die schon aus der Sequenz vermutet wurden (Sivaraman et al., 2000). Nicht nur die Proregion, die in Abschnitt B.2.3 näher erläutert wird, sondern auch der reife Teil des Enzyms weisen auffällige Charakteristika auf. So findet man eine Insertion von drei Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums. Diese bildet mit zwei weiteren Aminosäuren eine kleine Schleife, den sog. „*mini-loop*“, aus (Nägler et al., 1999). Sie scheint die Hauptursache für die Carboxypeptidaseaktivität des Enzyms zu sein. Eine weitere Schleifeninsertion bestehend aus zwei β -Faltblättern wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert und weist vom aktiven Zentrum weg, weshalb sie keinen Einfluss auf die Substratbindung haben dürfte. Welche Funktion dieser Insertion zukommt, ist jedoch noch nicht bekannt. Im reifen Teil der Protease befindet sich zudem ein Integrin-Erkennungsmotiv mit der Sequenz Glu-Cys-Asp (ECD), das eine Interaktion mit β_2 -Integrinen ermöglicht (Obermajer et al., 2006). Interessanterweise zeigen die letzten 25 Aminosäuren des C-Terminus keine Homologie zu bekannten Proteinsequenzen, obwohl durch diesen Teil der Sequenz in Papain-ähnlichen Proteasen der mittlere Strang des zentralen β -Faltblattes der C-terminalen Domäne gebildet wird. Da allerdings auch bei Cathepsin X durch diese Aminosäuren die entsprechende β -Faltblattstruktur ausgebildet wird, scheint diese Beobachtung hauptsächlich für evolutionäre Untersuchungen von Bedeutung zu sein.

Durch enzymkinetische Messungen mit dem rekombinant exprimierten Enzym konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase handelt. Die strukturelle Voraussetzung für diese Aktivität konnte schon vor der Aufklärung der Kristallstruktur von Procathepsin X vorhergesagt werden, indem durch den Sequenz- und Strukturvergleich mit anderen Cathepsinen ein molekulares Modell des reifen Enzymes erstellt wurde (Nägler et al., 1999). Von den humanen Cathepsinen ist nur Cathepsin X eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase. Cathepsin B, das die höchste Homologie zu Cathepsin X aufweist, besitzt abhängig vom pH-Wert neben Endopeptidaseaktivität ebenfalls Carboxypeptidaseaktivität. Diese wurde jedoch nicht als Mono-, sondern als Dipeptidase-Aktivität identifiziert (Musil et al., 1991). Die Ursache für die Besonderheit von Cathepsin X als Mono-peptidyl-Carboxypeptidase ist im „*mini-loop*“ begründet, der die S2'-Position bedeckt und das C-terminale Carboxylat des Substrates mit His23 und Tyr27 Seitenketten in der P1'-Position verankert (Devanathan et al., 2005). Für kurze Zeit wurde auch eine Dipeptidaseaktivität von aus Leber isoliertem Cathepsin X postuliert (Guncar et al., 2000; Klemencic et al., 2000), wobei es sich jedoch um Verunreinigungen mit Cathepsin B handeln dürfte (Puzer et al., 2005).

Eine systematische Messung der Cathepsin-X-Aktivität zeigte, dass das Enzym eine breite Spezifität für Aminosäuren in S2, S1 und S1' aufweist, lediglich Prolin wird in keiner dieser Positionen toleriert (Devanathan et al., 2005). Deshalb ist es schwierig, über eine Datenbanksuche ein spezifisches Substrat zu finden, das einen Hinweis auf die biologische Bedeutung von Cathepsin X geben könnte. Eine spezifische proteolytische Funktion ist daher wahrscheinlich eher durch räumliche Kolo-kalisation mit einem Substrat gegeben.

B.2.3 Vergleich der Proregionen von Cathepsin L, B und X

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Mitglieder der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen erheblich in der Länge ihrer Proregionen. Karrer et al. schlugen deshalb eine weitere Unterteilung in zwei Subfamilien vor, die auf verschiedenen Sequenzmotiven und der Länge der Proregion basiert (Karrer, Peiffer & DiTomas, 1993). Die eine Subfamilie besitzt ein hochkonserviertes ERFNIN-Motiv und eine lange Proregion. Nach ihrem Hauptvertreter Procathepsin L spricht man auch von der Procathepsin-L-ähnlichen Unterfamilie. Die zweite Subfamilie ist durch eine kurze Proregion und das Fehlen des ERFNIN-Motives charakterisiert. Zu dieser Gruppe zählen die Procathepsin-B-ähnlichen Cysteinproteasen. Schließlich wurde mit der Entdeckung der Cathepsine W und F noch eine dritte Subfamilie definiert, deren Mitglieder ein modifiziertes ERFNIN-Motiv, die ERFNAQ-Sequenz, aufweisen (Wex et al., 1999).

Vergleicht man die Proregionen von Cathepsin L und B, so fällt neben der unterschiedlichen Länge (100 bzw. 60 Aminosäuren) auf, dass die Proregionen kaum Sequenzhomologien, jedoch durchaus strukturelle Ähnlichkeiten zeigen (Groves et al., 1998). Die Proregion von Cathepsin L besteht aus einer N-terminalen, globulären Domäne, die drei α -Helices ausbildet, gefolgt von einem gestreckten Teil mit einer kurzen β -Faltblattstruktur (Coulombe et al., 1996). Wie in Abb.B1 dargestellt ist, enthält die kürzere Cathepsin-B-Proregion hingegen nur zwei α -Helices, die in der strukturellen Ausrichtung den α -Helices 2 und 3 von Procathepsin L entsprechen (Cygler et al., 1996; Turk et al., 1996). Die Ursache für die verkürzte Proregion liegt vermutlich am sogenannten „occluding loop“ im reifen Teil von Cathepsin B, der für die Exopeptidaseaktivität verantwortlich ist (Musil et al., 1991). Diese Schleife ermöglicht zusätzliche hydrophobe und elektrostatische Kontakte zwischen dem katalytischen Teil und der Proregion, würde jedoch die Bindung einer längeren Proregion verhindern (Groves et al., 1998).

Als die Kristallstruktur von Procathepsin X gelöst war, wurde deutlich, dass sich dessen Proregion völlig von den Cathepsin-L- und B-Proregionen unterscheidet (Sivaraman et al., 2000) (Abb.B1). Mit nur 38 As ist es das kürzeste Prosegment von allen humanen Cathepsinen. Auch besitzt die Proregion keine Sequenzhomologie zu einer der beiden Cathepsin-Subfamilien oder irgendeiner anderen bekannten Proteinsequenz. Zudem bildet sie keine Sekundärstrukturen aus, so dass auch auf dieser Ebene keine Ähnlichkeiten bestehen (Nägler & Menard, 2003; Sivaraman et al., 2000). Dennoch wirkt auch in diesem Fall die

Proregion als Inhibitor des Enzyms, wobei über ein Cystein in der Proregion (Cys10p) mit dem Cystein des aktiven Zentrums (Cys31) eine Disulfidbrückenbindung ausgebildet wird und die Inhibition durch eine so kurze Proregion erst möglich wird. Bisher ist kein weiteres Zymogen bekannt, bei dem die Inhibition durch das Propeptid über eine reversible kovalente Bindung mit dem Cystein des aktiven Zentrums erfolgt (Sivaraman et al., 2000).

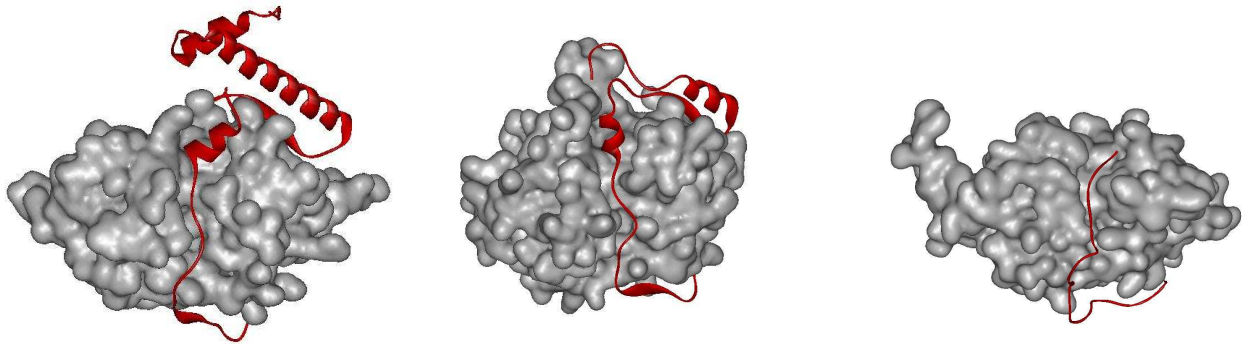


Abb.B1: Vergleich der Proregionen von Procathepsin L, B und X.

Links: Procathepsin L, Mitte: Procathepsin B, rechts: Procathepsin X. Der katalytische Teil des Proenzym ist als Oberflächenmodell (grau) dargestellt, das Prosegment als Bändermodell (rot). Cathepsin L besitzt die längste Proregion mit drei α -Helizes. Die kürzere Proregion von Cathepsin B ist strukturell ähnlich, mit nur zwei α -Helizes. Die Proregion von Cathepsin X besitzt keine Sekundärstruktur.

Eine weitere Besonderheit der Proregion ist das Vorhandensein eines RGD-Motives, dessen Bedeutung in der vorliegenden Promotionsarbeit untersucht werden sollte. Die Sequenz RGD, die als Bindemotiv für eine Integrin-Klasse bekannt ist, befindet sich in einer exponierten Lage im Procathepsin X (Abb.B2) und könnte somit die Interaktion mit Integrinen ermöglichen.

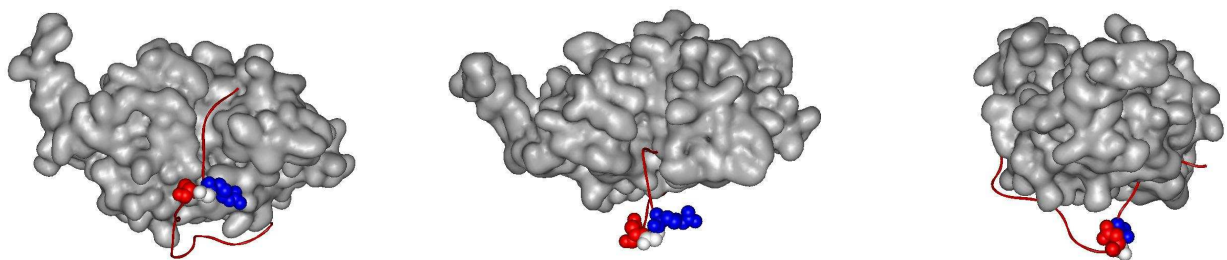


Abb.B2: Das RGD-Motiv in der Procathepsin-X-Proregion.

Links: Darstellung von Procathepsin X, mit Hervorhebung der RGD-Sequenz als Kalottenmodell (blau = R, weiß = G, rot = D). Mitte: Ansicht von Oben. Rechts: Drehung um 90°. Die Abbildung verdeutlicht die exponierte Lage des RGD-Motives.

Die Abbildungen wurden mit dem Programm WebLab ViewerPro 4.0 erstellt, unter Verwendung folgender PDB („Protein Data Bank“)-Kodices: Procathepsin L: 1CS8; Procathepsin B: 3PBH; Procathepsin X: 1DEU

B.3 Integrine

Der Name „Integrin“ wurde 1986 eingeführt, um die Rolle dieser Proteinklasse der Adhäsionsmoleküle bei der Integration der EZM mit dem Zytoskelett zu beschreiben und ihre integrale Membranständigkeit zu verdeutlichen (Tamkun et al., 1986). Sie sind verantwortlich für zelluläre Adhäsion und Migration und somit in einer Vielzahl biologischer Vorgänge involviert, die auch pathologischer Natur sein können. Zu ihnen zählen u.a. Embryogenese, Hämostase, Entzündungsvorgänge, Wundheilung und Angiogenese.

B.3.1 Familie und Aufbau

Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimere Zelloberflächenproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind. Es sind bisher 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die sich zu mindestens 24 unterschiedlichen Dimeren paaren können. Durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen kann diese Variabilität noch erhöht werden (van der Flier & Sonnenberg, 2001).

Wie in Abb.B3 dargestellt, werden Integrine nach verschiedenen Aspekten, wie Ligandenspektrum, evolutionäre Herkunft und Expressionsmuster, in vier Gruppen eingeteilt (Hynes, 2002). Die Leukozyten-spezifischen Integrine haben als Gemeinsamkeit eine β_2 -Untereinheit und eine auf Leukozyten eingeschränkte Expression. Daneben findet man noch die Gruppen der Kollagen- und der Laminin-erkennenden Rezeptoren. Eine vierte Gruppe betrifft die RGD-Rezeptoren, die vorwiegend das Motiv Arg-Gly-Asp erkennen. Diese Dissertation befasst sich hauptsächlich mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$, einem prominenten Mitglied dieser Gruppe.

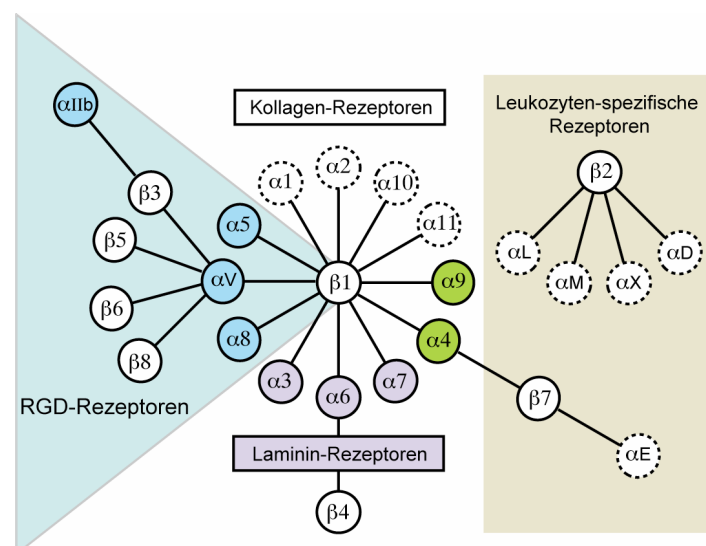


Abb.B3: Die Integrin-Familie. Integrine sind heterodimere Typ-I-Rezeptoren, bei denen sich je eine α - mit einer β -Kette paaren kann. Dargestellt sind die aus Säugerzellen bekannten Untereinheiten und ihre bisher identifizierten Kombinationen. Nach Aspekten der evolutionären Herkunft, Ligandenspektrum und Expressionsmuster können Integrine in verschiedene Gruppen eingeordnet werden. α -Untereinheiten gleicher Farbe sind evolutionär verwandt. Die Leukozyten-spezifischen Integrine sind gelb unterlegt. Integrine, die ein RGD-Motiv erkennen, sind blau unterlegt. α -Untereinheiten mit gestrichelter Kreislinie besitzen eine Insertionsdomäne (I-Domäne). Modifiziert nach Richard O. Hynes (Hynes, 2002)

Die beiden Integrinuntereinheiten sind ähnlich strukturiert, mit einer großen extrazellulären Domäne, einer membrandurchspannenden Region und einem, mit Ausnahme von β_4 , kurzen zytoplasmatischen Teil (Shimaoka & Springer, 2003). Einige der α -Untereinheiten sind nahe der Plasmamembran in der extrazellulären Domäne proteolytisch gespalten, wobei die beiden Teile von einer Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Am N-terminalen Ende der α -Untereinheit findet man sieben homologe Wiederholungen, jede ca. 60 Aminosäuren lang, die potentielle Kationenbindestellen darstellen. Dieses Strukturmotiv wird β -Propeller genannt. Der β -Propeller enthält bei ungefähr der Hälfte der α -Untereinheiten eine I-Domäne (Insertionsdomäne), die besonders wichtig für die Ligandenbindung ist. Sofern in einer α -Untereinheit diese Domäne fehlt, liegt in der Regel eine I-ähnliche Domäne in der β -Untereinheit vor. Sind beide Domänen vorhanden, so wirkt die I-ähnliche Domäne regulierend auf die I-Domäne. Jede der Domänen enthält ein konserviertes MIDAS-Motiv („*metal ion dependent adhesion site*“) aus fünf Aminosäuren. Das MIDAS-Motiv hat eine zentrale Rolle bei der Ligandenerkennung durch die I- oder I-ähnliche Domäne und stellt eine Bindestelle für Mg^{2+} oder Mn^{2+} dar. Des Weiteren findet man bei β -Untereinheiten nahe der Plasmamembran vier EGF-ähnliche Struktur motive, über deren Funktion jedoch noch wenig bekannt ist, die aber auch in Protein-Protein-Interaktionen involviert zu sein scheinen.

Integrine können in unterschiedlichen Aktivierungszuständen vorkommen, die mit starken Konformationsänderungen einhergehen. Besteht eine globuläre Konformation der beiden Heterodimere, so werden Liganden nur schwach gebunden. Durch zelluläre Signale oder Wechselwirkungen mit Ionen kann ein hoch affiner Zustand induziert werden, indem das Integrin zu einer lang gestreckten Konformation „ausgeklappt“ wird (Shimaoka & Springer, 2003). Sehr interessant für die klinische Anwendung ist die Tatsache, dass durch die Konformationsänderung auch neue Antikörper epitope frei werden. Diese werden LIBS („Liganden-induzierte Bindestelle“) genannt.

Da jedes Integrin-Heterodimer 3-5 Bindestellen für divalente Kationen besitzt, kann man daraus ableiten, dass das Vorhandensein dieser Kationen für die Funktion von Integrinen wichtig ist. Die gebundenen divalenten Ionen können je nach Art und Konzentration die Ligandenbindung fördern, inhibieren und auch die Selektivität für Liganden beeinflussen (Plow et al., 2000). Dabei können dieselben Kationen auf verschiedene Integrine unterschiedliche Einflüsse haben. So fördert z.B. Ca^{2+} die Ligandenbindung von $\alpha_{IIB}\beta_3$, während es die Ligandenbindung von $\alpha_v\beta_3$ inhibiert (Smith, Piotrowicz & Mathis, 1994). Mn^{2+} ist ein starker Aktivator für die Ausbildung der hochaffinen Konformation von Integrinen (Diamond & Springer, 1994; Dransfield et al., 1992). Dies wird durch die Bindung des Metallions an das MIDAS-Motiv reguliert, da je nach Ausrichtung des Mn^{2+} -Ions dieses Motiv unterschiedliche Konformationen einnehmen kann (Lee et al., 1995).

B.3.2 Integrin-vermittelte Signaltransduktion

Integrine sind nicht nur nötig, um die Zelladhäsion oder die Migration zu ermöglichen, sondern sie stellen auch wertvolle bidirektionale Signalvermittler dar. Durch Integrine können Signale von außen empfangen und in das Innere der Zelle geleitet werden, wodurch verschiedene Reaktionen hervorgerufen werden. In diesem Fall spricht man von „*outside-in*“-Signaltransduktion. So kann z.B. die Beschaffenheit der EZM über die Integrine von den Zellen erkannt werden. Dadurch sind sie in der Lage, auf die äußere Umgebung zu reagieren, indem sie z.B. eine Differenzierung einleiten oder die Genexpression verändern. Wenn Signale aus dem Inneren der Zelle die Aktivität des Integrins ändern, so spricht man von „*inside-out*“-Signaltransduktion. Dadurch können die Zellen z.B. steuern, ob Migration oder Anheftung durchgeführt werden sollen (Shimaoka & Springer, 2003).

Wenn Integrine an die EZM binden, werden sie aktiviert und sammeln sich in Gruppen auf der Zelloberfläche. Über eine positive Rückkopplung kommt es zur weiteren Aktivierung von Integrinen und auch zur Rekrutierung von intrazellulären Adapterproteinen. Zudem können Integrine auch lateral mit anderen Zelloberflächenrezeptoren assoziieren. Diese Ansammlungen von Integrinen und Integrin-assoziierten Proteinen nennt man fokale Adhäsionen. Da die zytoplasmatischen Domänen von Integrinen in der Regel sehr kurz sind und auch keine enzymatischen Eigenschaften aufweisen, sind Adapterproteine nötig, über die eine Signaltransduktion oder die Verbindung des Integrins mit dem Aktin-Zytoskelett erfolgt. Die Signalweiterleitung über Integrine ist sehr komplex, da unterschiedliche Signaltransduktionswege begangen werden können, die auch miteinander in Wechselwirkung stehen. Viele der Signaltransduktionswege hängen von der Tyrosinkinase FAK („*focal adhesion kinase*“) ab.

Für Integrine existiert eine Klasse natürlicher Antagonisten, die so genannten Disintegrine. Es handelt sich dabei um Proteine mit niedrigem Molekulargewicht (ca. 70 As), die die Integrinspezifischen Erkennungssequenzen und dadurch die Bindestellen blockieren können. Disintegrine werden vorwiegend in Schlangengiften gefunden und enthalten häufig ein RGD-Motiv, mit dem sie z.B. über das Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ die Gerinnung hemmen (Huang, 1998). Eine den Disintegrinen verwandte Gruppe stellen die ADAMs („*a disintegrin and metalloprotein*“) dar. Durch ihre Fähigkeit, mit Integrinen interagieren zu können und als Metalloprotease zu wirken, sind sie in Zelladhäsion, Zellfusion, Migration und dem Abspalten von Membranproteinen involviert (Mochizuki & Okada, 2007).

B.3.3 Integrin $\alpha_v\beta_3$

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde zunächst als Rezeptor für das EZM-Protein Vitronectin charakterisiert und isoliert (Pytela, Pierschbacher & Ruoslahti, 1985a), später stellte sich jedoch heraus, dass auch noch eine Reihe anderer Liganden wie Fibronectin, Thrombospondin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Prothrombin und Osteopontin erkannt werden

(Plow et al., 2000). Die Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha_v\beta_3$ im Komplex mit einem Peptidliganden konnte bereits gelöst werden (Xiong et al., 2002). Demnach gehört $\alpha_v\beta_3$ zu der Gruppe von Integrinen, deren Haupt-Erkennungsmotiv Arg-Gly-Asp (RGD) ist. Am höchsten exprimiert ist $\alpha_v\beta_3$ auf Osteoklasten, wo es mit der Knochenmatrix interagiert und eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption inne hat. Des Weiteren findet man $\alpha_v\beta_3$ auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Blutplättchen. Auch besteht häufig eine Hochregulation von $\alpha_v\beta_3$ auf malignen Melanomzellen, wodurch die Zellen die Fähigkeit zur verstärkten Migration und somit Metastasierung gewinnen (Kuphal, Bauer & Bosserhoff, 2005). Da $\alpha_v\beta_3$ zudem für die Angiogenese entscheidend ist, stellt es ein attraktives Ziel für die Tumortherapie dar. Eine humanisierte Form des monoklonalen Antikörpers LM609 (Vitaxin) ist bereits erfolgreich im Einsatz (Gutheil et al., 2000).

Auch für Integrine sind genetische Erkrankungen bekannt. Ist beispielsweise die β_3 -Untereinheit mutiert, so entwickeln die Betroffenen das sog. Glanzmann-Syndrom. Diese Krankheit äußert sich vorwiegend in einer gestörten Plättchenaggregation und einer daraus folgenden Hämorrhagie, da diese Mutation insbesondere das Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ betrifft (Nurden, 2006). Weil jedoch andere biologische Funktionen nicht beeinträchtigt sind, kann man auf eine redundante Wirkweise von $\alpha_v\beta_3$ schließen. Möglicherweise kann das Integrin $\alpha_v\beta_5$ kompensatorisch wirken, da es ähnliche Aufgaben wie $\alpha_v\beta_3$ hat. Für die α_v -Untereinheit ist keine humane genetische Defizienz bekannt (Horton, 1997).

B.3.4 Vitronektin, ein natürlicher Ligand von $\alpha_v\beta_3$

Vitronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, das sowohl im Blut als auch in der EZM vorkommt. Der Name Vitronectin stammt aus der Eigenschaft des Proteins, sehr gut an Glas adhären zu können (lat. vitro = Glas) (Hayman et al., 1983). Seine molekulare Masse beträgt ca. 75 kDa. Im Blutplasma liegt Vitronectin entweder als Einzelkette vor oder als prozessierte Form, bei der zwei Ketten von 10 und 65 kDa über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Hauptsyntheseort für Vitronectin ist die Leber. Vitronectin kann, ähnlich wie Fibronectin, mit verschiedenen Molekülen interagieren und wirkt deshalb bei mehreren biologischen Prozessen mit. Allerdings dürften seine Funktionen redundant sein, da „knock-out“-Mäuse keine offensichtliche Veränderungen im Phänotyp zeigen (Zheng et al., 1995).

Am N-terminalen Ende findet man eine Domäne, die identisch mit Somatomedin B ist. Sie scheint für die Bindung an PAI-1 („Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1“) verantwortlich zu sein (Seiffert & Loskutoff, 1991). Darauf folgt ein RGD-Motiv, das die Interaktion mit bestimmten Integrinen vermittelt. An die RGD-Sequenz schließt sich ein Bereich an, in dem vorwiegend negativ geladene Aminosäuren vertreten sind. Es wird vermutet, dass diese saure Region mit einer basischen Region am C-terminalen Ende des Proteins interagieren kann, und somit die Konformation stabilisiert wird (Johansson, 1996). Auch scheint sich in diesem Abschnitt eine kryptische Kollagenbindestelle zu befinden (Schvartz, Seger & Shaltiel, 1999).

Des Weiteren liegen zwei Hämopexin-ähnliche Domänen vor. Diese Region beinhaltet auch die Disulfidbrücke, welche die 10 kDa-Kette mit der 65 kDa-Kette in der prozessierten Form verbindet. Weiter in Richtung C-Terminus folgt der bereits oben erwähnte basische Bereich, der auch Heparin-Bindestellen enthält, über die Vitronektin mit bestimmten Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen interagieren kann.

Die Vielzahl an unterschiedlichen Proteinbindestellen macht bereits deutlich, dass Vitronektin viele funktionelle Möglichkeiten hat. So kann es die körpereigenen Zellen vor einem Angriff durch das Komplementsystem schützen, indem es mit terminalen Komplementproteinen interagiert und so ihre lytische Funktion unterbindet (Tschopp et al., 1988). Auch erkennt Vitronektin die Protease Thrombin im Komplex mit Antithrombin und anderen Serpinen (Ill & Ruoslahti, 1985). Interessanterweise führt diese Interaktion anscheinend zu einer Konformationsänderung von Vitronektin, so dass Proteoglykane mit höherer Affinität gebunden werden können (Panetti & McKeown-Longo, 1993). Womöglich handelt es sich um einen Mechanismus für die Internalisierung des Proteinkomplexes, um so die Thrombin-Antithrombin-Komplexe aus der Zirkulation zu entfernen (de Boer et al., 1993). Als Bestandteil der EZM ermöglicht Vitronektin die Anheftung und Migration von Zellen, wodurch deren Morphologie und Funktion beeinflusst wird. Auf Grund dieser Beobachtung wurde Vitronektin ursprünglich auch „*serum spreading factor*“ genannt (Whateley & Knox, 1980).

Im folgenden Kapitel wird näher erörtert, wie RGD-haltige EZM-Proteine mit Integrinen zusammenwirken, um proteolytische Systeme zu regulieren.

B.4 Proteasen, Integrine und EZM-Proteine

In der Literatur findet man einige Beispiele, wie Integrine und EZM-Proteine direkt oder indirekt mit Proteasen interagieren. Oftmals scheint durch die Integrine eine genaue Lokalisierung der Proteasen auf der Zelloberfläche zu erfolgen, um eine zielgerichtete Proteolyse durchzuführen. Dies ist z.B. für die Migration von Zellen nötig. Zudem bewirken EZM-Proteine durch die Interaktion mit Integrinen in vielen Fällen eine Veränderung in der Sekretion von Proteasen. Die folgenden Beispiele sollen zeigen, wie vielfältig die Interaktionen von Proteasen, Integrinen und EZM-Proteinen sein können.

Mittlerweile relativ gut charakterisiert ist das uPA/uPAR-System aus der Klasse der Serinproteasen, welches bei der Tumordinvasion und –metastasierung eine entscheidende Rolle spielt. uPA ist ein potenter Aktivator des Proenzym Plasminogen. Das aus dessen Proteolyse entstehende Plasmin kann eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen degradieren und auch indirekt zum EZM-Abbau durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beitragen. Indem Pro-uPA an seinen Rezeptor uPAR bindet, der seinerseits mit Integrinen assoziiert ist, entsteht aktives uPA, wobei die proteolytische Aktivität auf der Zelloberfläche zielgerichtet lokalisiert und gesteuert wird (Irigoyen et al., 1999). Außerdem beeinflusst auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix das uPA/uPAR-System, da

sich die Expression von uPA, uPAR und dem spezifischen Plasminogen-Aktivator Inhibitor PAI-1 ändert, je nachdem, auf welchen Matrixproteinen die Zellen kultiviert werden (Hapke et al., 2001). Die Sekretion von uPA und PAI-1 wird zudem durch die Interaktion von Integrinen mit extrazellulären Matrixproteinen reguliert (Vacca et al., 2001).

Neben Plasmin können insbesondere MMPs Komponenten der EZM effizient degradieren. Interessanterweise steuern auch hierbei Integrine die Expression und Sekretion der verschiedenen MMPs. Ähnlich wie bei dem uPA/uPAR-System wird aber nicht nur eine verstärkte Sezernierung nach Integrinstimulation beobachtet, sondern auch eine Interaktion der freigesetzten Proteasen mit Integrinen. So konnte z.B. die direkte Interaktion von MMP-2 mit $\alpha_v\beta_3$ gezeigt werden (Brooks et al., 1996). Auch MMP-9 kooperiert mit $\alpha_v\beta_3$ bei der Migration von Brustkarzinomzellen. Bemerkenswert ist, dass MMP-9 wie Procathepsin X ein RGD-Motiv besitzt, wobei jedoch eine RGD-abhängige Bindung an $\alpha_v\beta_3$ noch nicht belegt werden konnte (Rolli et al., 2003). Dennoch dient die Interaktion von MMPs mit Integrinen der genauen Lokalisierung der Proteaseaktivität an der Zelloberfläche. Zudem wurde nachgewiesen, dass MMPs die Tumorzellmigration durch Modifizierung von Integrinuntereinheiten und damit den Aktivierungsstatus der Integrine fördern können. (Deryugina et al., 2002; Ratnikov et al., 2002). Ein möglicher negativer Rückkopplungsmechanismus besteht in der Generierung des sog. PEX-Fragmentes aus der Hemopexindomäne von MMP-2. PEX kompetitiert mit MMP-2 um die Bindestelle am Integrin $\alpha_v\beta_3$ und blockiert so die Aktivität der Protease (Brooks et al., 1998).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit Vitronectin oder Fibronectin stimulierte Lymphomzellen vermehrt aktive MMP-2 und MMP-9 in den Zellkulturüberstand freisetzen (Vacca et al., 2001). Bei Melanomzellen führte die Behandlung mit Vitronectin zu einer erhöhten Expression und Freisetzung von MMP-2 und TIMP-2 und daraus resultierend zu einer verstärkten Migration der Zellen (Bafetti et al., 1998).

Bemerkenswerterweise enthält auch die Serinprotease Thrombin ein RGD-Motiv, für das eine Interaktion mit Integrinen diskutiert wird. Nach Aufklärung der Kristallstruktur wurde diese Möglichkeit zunächst verworfen, da die RGD-Sequenz fast vollständig von einer Proteinschleife bedeckt wird (Bode, Turk & Karshikov, 1992). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Thrombin über die RGD-abhängige Bindung an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Adhäsion und Migration von Endothelzellen ermöglicht (Tsopanoglou, Andriopoulou & Maragoudakis, 2002). Deshalb wird vermutet, dass durch eine Konformationsänderung die RGD-Bindestelle für das Integrin zugänglich werden kann (Papaconstantinou et al., 2005).

Schließlich mehren sich auch für lysosomale Cathepsine die Hinweise, dass sie wichtige extrazelluläre Funktionen ausüben, die teilweise im Zusammenspiel mit Integrinen und EZM-Proteinen erfolgen. So scheinen Cathepsin L und Integrin $\alpha_3\beta_1$ bei der Migration von Podozyten zusammenzuwirken, indem u.a. die subzelluläre Verteilung von Cathepsin L über das Integrin gesteuert wird. Eine direkte Interaktion von Cathepsin L mit $\alpha_3\beta_1$ wurde zwar nicht gezeigt, die Autoren postulieren jedoch eine intrazelluläre Wechselwirkung von

Cathepsin L mit der α_3 -Untereinheit (Reiser et al., 2004). Ein Mechanismus für diese Interaktion ist allerdings noch nicht bekannt. Für Cathepsin S wurde eine Kollokalisierung mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ gezeigt, die sich auf die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen auswirkt. Die genaue molekulare Grundlage der Interaktion konnte jedoch noch nicht gelöst werden, da auf Cathepsin S bisher keine eindeutige Bindedomäne für das Integrin identifiziert werden konnte (Cheng et al., 2006). Auch zeigte sich, dass die Sezernierung von Cathepsinen über Komponenten der EZM reguliert wird. So wird z.B. über Kollagen-bindende Integrine die Sekretion von Cathepsin B in humanen Brustfibroblastenzellen induziert (Koblinski et al., 2002).

B.5 Ziele der Arbeit

Da über die biologische Funktion des humanen (Pro)Cathepsin X zu Beginn der Dissertation noch nichts bekannt war, sollten vor allem mit Hilfe von Zellkulturmodellen verschiedene Aspekte möglicher Regulationsmechanismen für die Expression und Sekretion dieser Protease unter primärer Berücksichtigung einer eventuellen Interaktion mit Integrinen und EZM-Proteinen bearbeitet werden. Im Folgenden werden kurz die einzelnen Zielsetzungen und die Mittel zu ihrer Erreichung angeführt.

B.5.1 Zielsetzung 1: Analyse der Regulation der Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X im THP-1-Zellmodell

Zunächst sollten THP-1-Zellen als Modell zur Analyse der Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X evaluiert werden, um damit in nachfolgenden Experimenten die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen aufklären zu können. Mit diesem Zellmodell sollte als erstes der Einfluss unterschiedlicher Stimulatoren (Differenzierungsfaktoren, Zytokine, EZM-Proteine) auf Veränderung in den intra- und extrazellulären (Pro)Cathepsin-X-Konzentrationen mit einem spezifischen Sandwich-ELISA bzw. durch Western Blot gemessen werden.

B.5.2 Zielsetzung 2: Niederregulation von (Pro)Cathepsin X zur Funktionsanalyse im HUVEC-Modell

Einige Vertreter der Cathepsine wie z.B. Cathepsin B spielen bei zellulären Invasions- und Migrationsvorgängen eine wichtige Rolle. Da auch für Cathepsin X eine Hochregulation bei verschiedenen Tumorarten beschrieben ist, die gegebenenfalls eine Metastasierung der Tumorzellen begünstigt, sollte über siRNA-induzierte Niederregulierung ein möglicher Hemmeffekt auf die Migration von Zellen durch eine extrazelluläre Matrix (Transmigration/Invasion) untersucht werden. Hierbei sollte ein HUVEC-Modell zum Einsatz kommen und die Zellinvasivität mittels eines Transwell-Systems (Boyden-Kammer) untersucht werden.

B.5.3 Zielsetzung 3: Evaluierung von Procathepsin X als Bindungspartner RGD-abhängiger Integrine

Da sich die Proform von Cathepsin X insbesondere durch das Vorliegen einer RGD-Sequenz im Propeptid auszeichnet, sollte als nächstes geklärt werden, ob Procathepsin X mit RGD-abhängigen Integrinen interagiert. Zur Lösung dieser Zielsetzung sollten Procathepsin-X-Mutanten hergestellt und ihre Interaktion mit diversen Integrinen mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) am BIACORE-Gerät untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine Assoziation von Procathepsin X und Integrinen auch im HUVEC-Modell evaluiert werden.

B.5.4 Zielsetzung 4: Suche nach physiologischen Liganden von (Pro)Cathepsin X mittels affinitätschromatographischer Methoden

Die physiologische Funktion von Proteinen ergibt sich aus ihrer Interaktion mit anderen Molekülen. Daher war die Suche nach weiteren natürlichen Liganden oder Substraten von (Pro)Cathepsin X ein zusätzlicher Schwerpunkt dieser Arbeit. Dieser Aspekt sollte durch unterschiedliche zellbiologische, proteinchemische und molekularbiologische Vorgehensweisen bearbeitet werden. Über verschiedene Varianten der Affinitätschromatographie und Immunpräzipitation sollten zum einen aus Zellysaten Interaktionspartner von natürlich exprimiertem (Pro)Cathepsin X isoliert werden, zum anderen sollte auch eine inaktive, rekombinant hergestellte Protease zur Identifizierung von Liganden eingesetzt werden.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte

Autoklaven:

3850 Systec GmbH, Wettenberg
VST 500-C 12D Zirbus, Bad Grund

Biosensor

BIACORE 2000 Biacore AB, Uppsala, Schweden

Chromatographieeinheit

BioPilot™ Pharmacia, Freiburg

CO₂-Inkubatoren:

Forma Scientific Modell 3682 Forma Scientific, Marietta, USA
Galaxy S Nunc, Wiesbaden
Jouan IG 150 Jouan GmbH, Unterhaching

Eismaschine:

AF-10 Scotsman, Frimont, Italien

Elektroporationsgerät

Gene Pulser™ mit BIO-RAD, Hercules, USA
Capacitance Extender BIO-RAD, Hercules, USA
Pulse Controller BIO-RAD, Hercules, USA

Gel-Bilderfassungssysteme:

Gel Imager Intas GmbH, Göttingen
Image Master® VDS Pharmacia, Freiburg

Horizontale DNA Elektrophoreseapparatur:

HE 33 mini *submarine unit* Hoefer, Heidelberg
HE 99X max *submarine unit* Hoefer, Heidelberg

Magnetrührer:

Ika-Combimag RCO Janke & Kunkel, Staufen
Ikamag RET Janke & Kunkel, Staufen

Mikrotiterplatten-Lesegerät

Microtec Laborsysteme, Overath

Mikroskope:

IX50 mit Olympus, Feldkirchen-Westerham
CCD Kamera Typ 3CCD Sony, Köln
UV-Lampe U-RFL-T Olympus, Feldkirchen-Westerham
IX70 mit Olympus, Feldkirchen-Westerham
SensiCam QE PCO CCD Imaging, Kehlheim
Uniblitz® VCM-D1 Shutter Vincent Associates, Rochester, USA
UV-Lampe BH2-RFL-T3 Olympus, Feldkirchen-Westerham
Zeiss LSM 510 Carl Zeiss, Jena

Mikrowellenofen:

R-6270

Sharp, Osaka, Japan

Orbitalschüttler:Certomat[®] R

Braun Biotech International, Melsungen

Infrons TR150 mit

Infrons AG, Bottmingen, Schweiz

Heissluft Inkubatorofen ITE

Infrons AG, Bottmingen, Schweiz

PCR Thermal Cycler:

Gene Amp 2400

Perking Elmer, Langen

LightCycler[™] II

Roche, Mannheim

Primus 25

MWG Biotech, Ebersberg

T *personal*

Whatman Biometra, Göttingen

pH-Meter:

Typ 114D

WTW, Weilheim

pH Elektrode

Ingold, Steinbach-Taunus

Proteintransfereinheiten:MilliBlot[™]-SDE System

Millipore, Eschborn

Fastblot B33

Whatman Biometra, Göttingen

Rotationsgerät

Rotator Drive STR4

Stuart Scientific, Staffordshire, England

Scanner:

Image Scanner

Pharmacia, Freiburg

Sicherheitswerkbänke:

BDK 7419, Modell UVF 6.18S

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Herasafe Typ HS12

Heraeus Instruments, Göttingen

Spannungsquellen:

EPS 500/400

Pharmacia, Freiburg

Mighty Slim[™]

Hoefler, Heidelberg

Stickstofftank:

Cryosystem 4000

MVE Cryosystems, Jüchen

Locator Jr.

Sigma, Taufkirchen

Locator 4

Sigma, Taufkirchen

Spektrophotometer:

LKB Ulstrospec III

Pharmacia, Freiburg

Uvikon 930

Kontron Instruments, Eching

Spektrofluorimeter:

Safire 2

Tecan, Crailsheim

FluoroMax[®] mit

SPEX Instruments, Edison, USA

Wasserbad RM6

LAUDA, Lauda-Königshofen

Tiefkühlgefrierschrank:

Colora UF 85-300S (-80°C)

Colora, Lorch

Transilluminator:

DarkReader™

Clare Chemical Research, Dolores, USA

Ultraschalllanze:

Branson Sonifier 250

Branson, Danbury, USA

Vertikale Proteinelektrophoreseeinheit:

Mighty Small II

Hofer, Heidelberg

Vortexer:

Vortex Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Waagen:

Analysenwaage, A 120 S

Satorius, Göttingen

Technische Waage, MA AF200

Satorius, Göttingen

Wärmeschränke:

B30

Memmert, Schwabach

BE30

Memmert, Schwabach

Wasserbäder:

WB-14

Memmert, Schwabach

Thermomix ME

Braun Biotech, Melsungen

Wasserdeionisierungseinheit:

Membrapure

MembraPURE, Bodenheim

Zentrifugen:

Centrikon H-401 (mit Rotoren A6.9 und A8.24)

Kontron Instruments, Eching

Varifuge 3.0 R

Heraeus Sepatech, München

Varifuge 3.2 RS

Heraeus Sepatech, München

Sepatech Biofuge *primo*

Heraeus Sepatech, München

Sepatech Biofuge 15

Heraeus Sepatech, München

Eppendorf 3200

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Eppendorf 5415 D

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Küvetten Zentrifuge, Helma Roto-vette 310

Bachofer, Reutlingen

C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

BIAevaluation 4.1

Biacore AB, Uppsala, Schweden

Image-Pro® PLUS

Media Cybernetics, Silver Spring, USA

LightCycler Software 3.5

Roche, Mannheim

Magic Scan V4.4

Pharmacia, Freiburg

WebLab ViewerPro 4.0

Molecular Simulations Inc., Cambridge

XFluor4 Safire2

Tecan, Crailsheim

C.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien hatten „p. a.“ Qualität. Die Reaktions- und Kultivierungsgefäße wurden entweder steril bezogen oder vor der Verwendung bei 121°C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

C.1.3.1 Allgemeine Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
1,4-Diazobicyclo-octan	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Glyzerol	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol 4.88	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumborat	Sigma, Deisenhofen

Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Sigma, Deisenhofen
Octyl- β -D-Glukopyranosid	Sigma, Deisenhofen
Orange G	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

C.1.3.2 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
CIP („ <i>calf intestine phosphatase</i> “)	New England Biolabs, Beverly, USA
dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)	Pharmacia, Freiburg
GeneRuler [™] DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR green I-Kit	Roche, Mannheim
QIAEX II Gel-Extractionsystem	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi- und Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
QuikChange [®] Multi Site-Directed Mutagenesis-Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA
	Roche, Mannheim
RNeasy MinElute-Kit	Qiagen, Hilden
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, Beverly, USA
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
TITANIUM [™] Taq Polymerase	BD-Clontech, Palo Alto, USA
XL10-Gold [®] Ultracompetent Cells-Kit	Stratagene, La Jolla, USA

C.1.3.2.1 Vektoren

E. coli Klonierungs-Vektor: pGEM[®]-11Zf(+) (Promega, Mannheim):

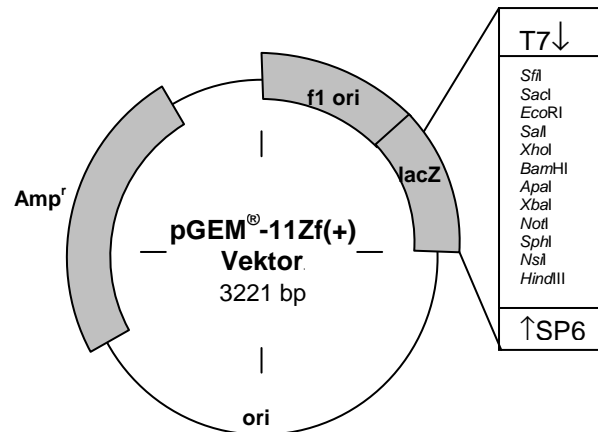


Abb.C.1: Schematische Darstellung des *E. coli* Klonierungs-Vektors pGEM[®]-11Zf(+). Dieser Vektor wurde als Hilfsmittel für die Klonierung und Mutagenese von Cathepsin X verwendet. AmpR= Ampicillinresistenzgen, ori = Replikationsstart in *E. coli* („*origin of replication*“), lacZ = lacZ-Gen (Möglichkeit für die Blau-Weiß-Selektion), f1 ori = Replikationsstart für Phage f1. Im Kasten sind die Enzyme aufgeführt, die in der MCS („*multiple cloning site*“) schneiden. Mit dem Primerpaar T7 und SP6 können die MCS und eingefügte DNS-Fragmente mittels PCR amplifiziert werden.

P. pastoris Expressionsvektor: pPIC9 (Invitrogen, Karlsruhe):

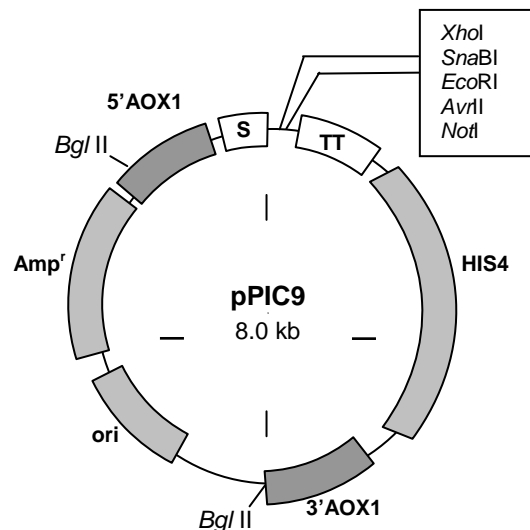


Abb.C.2: Schematische Darstellung des *P. pastoris* Expressions-Vektors pPIC9. Dieser Vektor wurde als Expressionsvektor für Cathepsin X und den daraus abgeleiteten Mutanten verwendet. AmpR= Ampicillinresistenzgen, ori = Replikationsstart („*origin of replication*“) in *E. coli*, HIS4 = Gen für die Histidinol-dehydrogenase (Möglichkeit der Selektion von Transformanten mit dem Histidin-auxotrophen *P. pastoris*-Stamm GS115), 5'AOX1 und 3'AOX1 = Homologe Sequenzen im AOX1-Gen für die homologe Rekombination, S = α-Faktor Sekretionssignal (führt zur Sezernierung des rekombinanten Proteins in das Hefemedium), TT = Transkriptionstermination. Im Kasten sind die Enzyme aufgeführt, die in der MCS („*multiple cloning site*“) schneiden. Mit dem Restriktionsenzym Bgl II wurde der Vektor linearisiert und gleichzeitig der Vektoranteil entfernt, welcher für die Selektion und Produktion in *E. coli* nötig ist.

C.1.3.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung und Kolonien-PCR:

T7 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

SP6 ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA

pPIC9reverse GTC TTC TCG TAA GTG CCC AAC

pPIC9forward TCC AAC AGC ACA AAT AAC G

(PCR-Bedingungen: 95°C 5 Min (Anfangsdenaturierung), 95°C 30 Sek, 50°C 90 Sek, 72°C 90 Sek (Amplifikation, 30 Zyklen), 72°C 7 Min (Endsynthese))

Oligonukleotide für die Mutagenese:

RAD-CatX CTA CCG GCC TCT GCG GGC AGA CGG GCT AGC TCC GCT GG

AAA-CatX CTA CCG GCC TCT GGC TGC AGC CGG GET AGC TCC GCT GG

C31AbamHI CAA TAC TGC GGA TCC GCC TGG GCC CAC G

(PCR-Bedingungen: 95°C 1 Min (Anfangsdenaturierung), 95°C 1 Min, 55°C 1 Min, 65°C 8 Min (2 Min/kb Plasmid-Länge) (Amplifikation, 30 Zyklen), 65°C 1 Min (Endsynthese))

Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR:

Alle Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR wurden von Search LC (Heidelberg) bezogen.

siRNA-Oligonukleotide (Qiagen, Hilden):

„Nonsilencing“ (Negativkontrolle)

Zielsequenz AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT

Sense UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT

Antisense ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT

CatX304mis („mismatch“)

Zielsequenz AAC GGA GCG GAT CAA TAT CAA

Sense CGG AGC GGA UCA AUA UCA AdTdT

Antisense UUG AUA UUG AUC CGC UCC GdTdT

CatX304

Zielsequenz AAC GGA TCG GAT CAA CAT CAA

Sense CGG AUC GGA UCA ACA UCA AdTdT

Antisense UUG AUG UUG AUC CGA UCC GdTdT

CatX 913

Zielsequenz AAT CGT GAC CAG CAC CTA TAA

Sense UCG UGA CCA GCA CCU ACG AdTdT

Antisense UUA UAG GUG CUG GUC ACG AdTdT

C.1.3.3 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken

Ampicillin Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco, Augsburg
Bacto Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Bacto Trypton	Difco, Augsburg
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Dextrose	Sigma, Deisenhofen
Erlenmeyerkolben	Wagner und Munz, München
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Pepton	Difco, Augsburg
Petrischalen, Polystyrol 9 cm Ø	Greiner, Nürtingen
Sorbitol	Sigma, Deisenhofen
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Sigma, Deisenhofen

Bakterienstämme:

Die Bakterienstämme der Stammsammlung wurden durch Transformation der nachfolgend aufgeführten *E. coli*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden erhalten.

JM110 (Stratagene, La Jolla, USA)

Genotyp: *rps*, (*Str^r*), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F' *traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15]

XL-10 GOLD (Stratagene, La Jolla, USA)

Genotyp: *Tet^r* Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, Hte [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (*Tet^r*) Amy Cam^r]

C.1.3.4 Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken

1,8 ml Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Accutase	PAA, Linz, Österreich
ATRA	Sigma, Deisenhofen
BD CultureSlides	BD Biosciences, Bedford, USA
CD14 und CD15 MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm Ø, 8 µm PorenØ	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Linz, Österreich
EGM-2 Bullet Kit	Cambrex, Walkersville, USA
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
Ficoll Paque [®]	Amersham, Braunschweig
HiPerFect	Qiagen, Hilden

Humanes Serum	PAA, Linz, Österreich
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MaxiSorp-Mikrotiterplatten (96-well)	Nunc, Wiesbaden
Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container	Nunc, Wiesbaden
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nutridoma	Roche, Mannheim
PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei)	PAA, Linz, Österreich
PMA	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Trypanblau, 0,5 % (w/v) in PBS	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Linz, Österreich
VenorGeM® - Kit (Mykoplasmen-Nachweis)	Minerva Biolabs, Berlin
Zellkulturgefäße (T25, T75, T175)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96well)	Nunc, Wiesbaden

Säugerzelllinien und primäre Zellen:

DU145: Humane Prostatakarzinomzellen (ATCC*¹)

HEK293-Flp-inTM-RExTM:Embryonale Nierenzellen (Invitrogen, Karlsruhe)

HeLa: Zervix-Adenokarzinomzellen (DSMZ*²)

HUVEC: Nabelschnur-Endothelzellen (Cambrex, Walkersville, USA)

LNCap: Humane Prostatakarzinomzellen (ATCC*¹)

PNT1A: humane Prostatazellen (ECACC*³)

THP-1: Monozytäre Leukämiezellen (DSMZ*²)

*¹ = „American Type Culture Collection“

*² = „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“

*³ = „European Collection of Cell Cultures“

C.1.3.5 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Albumin-Standardlösung	Pierce, Rockford, USA
BC Assay Reagenz A und B	Interchim, Montluçon, Frankreich
BioMax Filme	Kodak, Rochester, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, Rochester, USA
Butyl-Sepharose	Amersham, Braunschweig
CM5-Sensorchip	Biacore AB, Uppsala, Schweden
CM-Sepharose™ Fast Flow	Amersham, Braunschweig
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham, Braunschweig
DEAE-Sepharose Fast Flow	Amersham, Braunschweig
D-Tube™ Dialyzer Mini	Merck, Darmstadt
Endo H	New England Biolabs, Beverly, USA
Hyperfilm-MB Filmkassette	Amersham, Braunschweig
Kopplungschemie für CM5-Sensorchip	Biacore AB, Uppsala, Schweden
„low range“-Molekularstandard	BIO-RAD
Macrosep® Centrifugal Devices	PALL, Ann Arbor, USA
Membranen für Ultrafiltration	Millipore, Bedford, USA
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell, Kassel
Quantikine® pro-Cathepsin B Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
SeeBlue® Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette	Pierce, Rockford, USA
Spectra/Por® Dialyseschläuche	Spectrum Labs, Los Angeles, USA
Ultrafiltrationszellen	Amicon, Beverly, USA
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch
µMACS Protein G MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach

C.1.3.6 Substrate und Inhibitoren

Inhibitorcocktail III	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
Single Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
Zyklisches RAD-Peptid	Bachem, Weil am Rhein
Zyklisches RGD-Peptid	Bachem, Weil am Rhein

C.1.3.7 Proteine und Antikörper/Konjugate

Proteine (alle hier genannten Proteine sind humane native Proteine):

Vitronektin	Promega, Mannheim
Extrazelluläre Matrix (EZM)	BD Biosciences, Bedford, USA
Fibronektin	Tebu-Bio, Norwood, USA
Integrin $\alpha_v\beta_3$	Chemicon, Temecula, USA
Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	Hämochrom Diagnostica, Essen
Integrin $\alpha_5\beta_1$	Chemicon, Temecula, USA

Antikörper (alle hier genannten Antikörper erkennen humane Antigene):

<i>rabbit anti-Cathepsin X</i>	Nägler et al., 2006
<i>mouse anti-Aktin (AC-40)</i>	Sigma, Deisenhofen
<i>mouse anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (LM609)</i>	Chemicon, Temecula, USA
<i>goat anti-Cathepsin X</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>goat anti-MIF</i>	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>goat-anti-Integrin β_3</i>	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
<i>rabbit-anti-Cathepsin L</i>	Calbiochem/Merck, Darmstadt
<i>mouse-anti-Integrin β_3 (MAB2008)</i>	Chemicon, Temecula, USA

Konjugate:

<i>goat anti-mouse HRP-linked</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>goat anti-rabbit HRP-linked</i>	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>mouse-anti-goat/sheep HRP-linked</i>	Sigma, Deisenhofen
<i>Rhodamine RedTM-X goat anti-mouse IgG (H+L)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)</i>	Invitrogen, Karlsruhe

C.2 Methoden

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, welche für die Generierung und Isolierung von rekombinantem (Pro-)Cathepsin X und dessen mutierten Formen durchgeführt wurden. Es handelte sich dabei um eine katalytisch inaktive Mutante (Cathepsin-X-C31A) und um zwei Mutanten, bei denen ein Bindemotiv für Integrine verändert wurde (AAA-Procathepsin X und RAD-Procathepsin X). Zudem werden die in dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen und biochemischen Versuche dargestellt.

C.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die meisten verwendeten molekularbiologischen Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Abweichende Methoden und neu etablierte Techniken werden einzeln erläutert.

C.2.1.1 Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen

C.2.1.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Plasmidisolierungen aus Übernachtskulturen von *E. coli* wurden nach den Protokollen der Fertigkits von Qiagen für Mini- und Midipäparationen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 bzw. 50 ml LB-Medium (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 17 mM NaCl, pH 7,5) mit dem entsprechenden Klon beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Das LB-Medium wurde mit einem passenden Selektionsantibiotikum zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt.

C.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Ihre Konzentration ist daher mit einem Spektralphotometer gut bestimmbar. Für die photometrische Messung wurden Verdünnungen der DNA- oder RNA-Lösung von 1:100 und/oder 1:200 hergestellt. In einer Quarzküvette wurde bei 260 nm die Extinktion gegen dH₂O als Nullwert gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration (in ng/µl) wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$c = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon \times d^{-1}$$

c =	Nukleinsäurekonzentration (ng/µl)
OD ₂₆₀ =	Extinktion bei 260 nm
d =	Schichtdicke in cm (bei der verwendeten Quarzküvette gilt: d = 1)
ε =	Extinktionskoeffizient

Je nach Art der verwendeten Nukleinsäure hat der Extinktionskoeffizient folgende Werte:

dsDNA:	ε = 50
RNA:	ε = 40

Verunreinigungen mit Proteinen wurden durch den Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} ermittelt. Bei einem Verhältnis von $> 1,8$ konnte von proteinfreien Nukleinsäurelösungen ausgegangen werden.

C.2.1.1.3 Restriktion von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu spalten, indem sie die Phosphodiesterbindungen beider Stränge hydrolytisch trennen. Sie wurden ursprünglich in Bakterien entdeckt, wo sie als Schutz gegen fremde Nukleinsäuren z.B. Phagen-DNA fungieren. Damit das Bakterienchromosom selbst nicht abgebaut wird, sind die Erkennungssequenzen modifiziert, meistens durch Methylierung.

In einen Restriktionsansatz wurde 0,5-1 μg DNA eingesetzt. Für ein Endvolumen von 30 μl wurden 3 μl 10 x Puffer zugegeben sowie 1 U Enzym. Die Wahl des Puffers ist vom Enzym abhängig (siehe 2.3.4). Der Ansatz wurde für mindestens 1 Stunde bei 37°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme, inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Verdau durch den Auftrag auf ein Agarosegel analysiert.

C.2.1.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Dazu wurden in einen 10 μl -Ansatz 20-30 ng verdaute Vektor-DNA und 5-10 ng Fragment-DNA eingesetzt. Zusätzlich wurden 0,5 μl T4-DNA-Ligase (1 U/ μl) und die entsprechende Menge 10x Ligationspuffer zugesetzt. Der Ansatz wurde für eine halbe Stunde auf Eis und anschließend für zwei Stunden oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Ein Teil des Ansatzes (3-5 μl) wurde für die Transformation verwendet.

C.2.1.1.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Da die Oligonukleotide für PCR-Reaktionen unphosphoryliert waren, musste zunächst eine Phosphorylierungsreaktion durchgeführt werden. Dazu wurden 200 pmol des entsprechenden Oligonukleotides (100 pmol/ml) in einem 30 μl -Ansatz mit 30 U T4 PNK (Polynukleotid Kinase), 3 μl 10 x Puffer für T4 PNK und 100 mM ATP versetzt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei 70°C für 10 Minuten hitzeinaktiviert, um unerwünschte Phosphorylierungen in den nachfolgenden PCR-Reaktionen zu vermeiden.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation von linearisiertem Vektor zu verringern, werden 5'-Phosphate mittels „*calf intestine alkaline phosphatase*“ (CIP) entfernt. Die Phosphate am DNA-Fragment reichen für eine erfolgreiche Ligation aus. Für die Dephosphorylierung wurde 1 U CIP und die entsprechende Menge CIP-Puffer eingesetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die CIP wurde anschließend durch eine Aufreinigung der Vektor-DNA entfernt.

C.2.1.1.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Plasmiden und PCR-Ansätzen wurden Proben der DNA über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Je nach gewünschter Auftrennung wurden 0,5-1,5 %ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose mit TAE-Laufpuffer (40 mM Tris/Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) versetzt und in einem Mikrowellenofen bei 600 Watt so lange erhitzt, bis sie vollständig gelöst war (ca. 3 Min). Nachdem die Lösung auf ca. 40°C abgekühlt war, wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen. Die jeweilige DNA-Probe wurde mit 6x Probenpuffer (30 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Orange G) verdünnt, in die Geltaschen geladen und in TAE-Laufpuffer mit 5-7 V/cm für 0,5-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter einem UV-Transilluminator (302 nm) visualisiert.

C.2.1.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die Isolierung von bestimmten Restriktionsfragmenten wurde der gesamte Restriktionsansatz auf ein Agarosegel (1-1,2 %) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die betreffende Bande wurde unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten. Für die folgende Aufreinigung wurde das „*QIAEX II Gel-Extractionssystem*“ (Qiagen, Hilden) verwendet, wobei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

C.2.1.1.8 Reinigung von Oligonukleotiden und Plasmiden

Für die Reinigung von Oligonukleotiden z.B. nach der 5'-Phosphorylierung wurde das Volumen des Ansatzes wenn nötig mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde der Ansatz durch kräftiges Schütteln gemischt und für 1 Minute bei 12 000 g abzentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und nach der Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2 nochmals gemischt und bei -20°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde die präzipitierte DNA für 2 Stunden bei 4°C in der Tischzentrifuge (16 000 g) abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und nochmals bei RT für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Sediment zusätzlich noch für 10-15 Minuten bei RT luftgetrocknet und im letzten Arbeitsschritt in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

C.2.1.1.9 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung mittels Fluorescein-markierten Didesoxynukleotiden wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Die Sequenzier-PCR-Reaktionen erfolgten mit dem „*BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*“ von Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Nach der PCR-Reaktion wurde der Ansatz für die Analyse zur Firma Medigenomix (Martinsried) geschickt. Teilweise wurde auch eine Plasmid-Probe in dH₂O eingereicht. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels NCBI *BLAST*.

C.2.1.2 Herstellung von Cathepsin-X-Mutanten mittels zielgerichteter Mutagenese

Für die Mutagenese von Proteinen wurde der „*QuikChange[®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Für die PCR wurde als Matrize Procathepsin X im Vektor pGEM-11Zf(+) eingesetzt. Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass sowohl die gewünschten Mutationen als auch gegebenenfalls Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, die ein schnelles Auffinden von passenden Klonen erlauben sollten. Mittels *PfuTurbo[®] DNA Polymerase* konnten mehrere Amplifikationsrunden durchgeführt werden. Durch ein weiteres Enzym wurden Einzelstrangbrüche verbunden. Anschließend erfolgte der Verdau der nicht mutierten Matrize durch ein methylierungs-sensitives Restriktionsenzym.

C.2.1.3 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Transkriptanalyse mittels quantitativer RT-PCR wurde RNA aus HUVEC isoliert. Dazu wurde der „*RNeasy Kit*“ (Qiagen, Hilden) verwendet und genau nach Herstellerangaben verfahren. Für einen effektiven Zellaufschluss wurde zusätzlich der „*QIAshredder Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach beigefügter Anleitung eingesetzt.

C.2.1.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde der „*iScriptTM cDNA Synthesis Kit*“ (BIO-RAD, Hercules, USA) nach Anleitung verwendet. Zuvor wurde die Konzentration der isolierten RNA-Proben bestimmt und diese durch Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser angeglichen, so dass in der Synthesereaktion gleiche Konzentrationen und Volumina eingesetzt werden konnten. Nach der Synthesereaktion wurden die Ansätze mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

C.2.1.5 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Messung von mRNA-Transkripten wurde mittels der LightCyclerTM-Technologie (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Quantifizierung von Transkripten durch die Analyse der log-Phase einer PCR, in der eine Amplifizierung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung eines Fluoreszenzsignales einhergeht. Das Signal resultiert aus der Zunahme von dsDNA, die durch interkalierendes „*SYBR Green*“ fluoreszent wird.

Spezifische Oligonukleotide und Standards wurden von der Firma Search LC GmbH, Heidelberg, hergestellt und optimiert. Reagenzien für den SYBR Green-MasterMix waren in dem „*LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*“-Kit der Firma Roche enthalten und wurden nach dem beigefügten Protokoll vorbereitet und eingesetzt. Für einen typischen Reaktionsansatz wurden die cDNA-Proben 1:10 in RNase-freiem H₂O verdünnt und davon 5 µl verwendet. Zusätzlich wurden zu einem Ansatz aus der Oligonukleotidlösung und aus dem SYBR Green-MasterMix je 1 µl pipettiert. Das Endvolumen von 10 µl wurde durch das

Auffüllen mit RNase-freiem H₂O erlangt. Ebenso wurden eine Standardreihe (1:10, 1:100 und 1:1000) und eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die Ansätze wurden in Glaskapillaren pipettiert und bei 500 g in einer vorgekühlten Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Glaskapillaren in ein LightCycler Kapillar-Rondell eingesetzt und die PCR-Reaktion gestartet. Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet: 95°C/10 Min; [95°C/10 Sek → 68°C/10 Sek/58°C → 72°C/16 Sek] x 35 Zyklen, Fluoreszenzverstärkung 5. Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurvenanalyse mit den Parametern 95°C → 58°C/10 Sek → dT/dt 0,1°C/Sek durchgeführt, die es erlaubt, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren.

C.2.1.6 Design von siRNAs

Die Suche nach passenden siRNAs erfolgte aus einer Kombination von Datenbankrecherche und Anwendung von Regeln nach Reynolds et al. (Reynolds et al., 2004). Zunächst wurden verschiedene Suchmaschinen (Qiagen: <https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx>, GenScript: <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) für das Auffinden von möglichen siRNA-Oligonukleotiden verwendet. Die siRNA-Kandidaten wurden anschließend nach dem System von Reynolds et al. gewichtet. Dazu werden die siRNAs nach verschiedenen Aspekten beurteilt und dabei Punkte vergeben. Die höchste Punktzahl von 10 wäre nach diesem System die am besten geeignete siRNA. Wie in dieser Veröffentlichung gezeigt wurde, sind siRNAs mit einer Punktzahl von mindestens 6 in der Regel funktionell, während die meisten nichtfunktionellen siRNAs Werte von 5 bis -1 aufwiesen. In Tabelle C.1 sind die angewendeten Regeln und ihre Bewertung aufgelistet. Die Spezifität der siRNA-Zielsequenzen wurde abschließend in einem transkriptomweiten Vergleich mit dem Programm *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sichergestellt.

Tabelle C.1: Regeln nach Reynolds et al. zur Bewertung von siRNA-Molekülen (Reynolds et al., 2004).
(Siehe Text für nähere Erläuterungen)

Aspekt	Punkte (P)	
	Ja	Nein
1. GC-Gehalt zwischen 36 und 52 %	+ 1 P	
2. Das Vorhandensein von einem oder mehr A/U bp an den Positionen 15-19 ^{*1}	+ 1 P für jedes A/U bp (5 P gesamt möglich)	
3. Das Fehlen von internen Wiederholungen (T _M <20°C)	+ 1 Punkt	
4. A an Position 19	+ 1 P	
5. A an Position 3	+ 1 P	
6. U an Position 10	+ 1 P	
7. Absenz von G oder C an Position 19		- 1 P
8. Absenz von G an Position 13		- 1 P

^{*1} Definition der Positionen:

- Referenz ist der sense-Strang

- erstes Nukleotid des 5'-Endes ist Position 1 (entspricht Position 19 des antisense-Stranges)

C.2.2 Mikrobiologische Methoden

Mikrobiologische Methoden, die für die Herstellung von rekombinantem (Pro)Cathepsin X und seiner Mutanten eingesetzt wurden, sind vorwiegend nach Angaben von Sambrook et al. durchgeführt worden (Sambrook et al., 1989). Abweichende Methoden werden nachfolgend detailliert wiedergegeben.

C.2.2.1 Herstellung von Wachstumsmedien für *E. coli* und *P. pastoris*

Medien für die Kultivierung und Selektionierung von *E. coli* und *P. pastoris* Stämmen wurden mittels Autoklavieren für 20 Minuten bei 121°C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration keimfrei filtriert und dem Medium zugegeben, nachdem dieses auf RT abgekühlt war. Für die Herstellung solider Kultivierungsplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % Agar versetzt. Für Selektionsplatten/Medien für *E. coli* wurde Ampicillin in einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben. Eine detaillierte Übersicht der verwendeten Medien und deren Herstellung für *P. pastoris* findet sich im Invitrogen-Methodenhandbuch „Pichia Expression Kit“ Version M.

C.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* wurde mit dem „XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells“-Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Wurden andere chemisch kompetente Stämme verwendet, so wurde nach dem gleichen Protokoll verfahren.

C.2.2.3 Langzeitlagerung von *E. coli*-Stämmen

Charakterisierte *E. coli*-Klone wurden in einer Stammsammlung aufgenommen. Dazu wurden von den entsprechenden Klonen Übernachtskulturen angezogen. Zwei Volumina der Kultur wurden mit einem Volumen 50 % sterilem Glycerol vermischt und in einem Kryoröhrchen bei -80°C aufbewahrt.

C.2.2.4 Elektroporation von *P. pastoris*

Für die Transformation von *P. pastoris* wurde eine Hefekultur in 250-300 ml YPD-Medium (1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Dextrose) bei 29°C auf dem Schüttler (100 rpm) angezogen und während der log-Phase die Zellkonzentration durch Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Bei einer OD von ca. 1 wurde mit dem Transformationsprotokoll begonnen. Dazu wurden die Zellen auf vier 50 ml-Gefäße (Falcons) aufgeteilt und bei 4°C und 1000 g 5 Minuten abzentrifugiert und die Zellsedimente in je 40 ml eiskaltem dH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und nochmals in je 20 ml eiskaltem dH₂O resuspendiert. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurden die Zellsedi-

mente in je 5 ml 1 M eiskaltem Sorbitol aufgenommen und vereinigt. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert und nochmals in 0,5-1 ml 1 M eiskaltem Sorbitol resuspendiert.

Es folgte die Elektroporation, bei der 80 µl der Zellsuspension mit 10 µl DNA (0,5 µg/µl) für 5 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Gene Pulser einem elektrischen Schock mit 1500 V, 25 µF und 400 Ω ausgesetzt. Anschließend wurden zu dem Elektroporationsansatz 0,5 ml 1 M Sorbitol zugegeben und die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 29°C inkubiert.

C.2.2.5 Selektion von transformierten *P. pastoris*-Stämmen

Eine ausführliche Beschreibung der hier verwendeten Selektionsmethode findet man im Methodenhandbuch zum „*Pichia Expression Kit*“ von Invitrogen. Hier soll die Methode nur kurz zusammengefasst werden.

P. pastoris ist eine methylotrope Hefe, die Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen kann. Dafür ist das Enzym Alkoholoxidase vonnöten, das von den Genen AOX1 und AOX2 kodiert wird, wobei der AOX1-Lokus für den größten Anteil an Alkoholoxidase verantwortlich ist. Der Promoter für AOX1 ist streng reguliert und durch Methanol induzierbar, wobei die Alkoholoxidase mehr als 30 % der Gesamtmenge an löslichem Hefeprotein ausmachen kann. Dieser Promoter wird für die Expression des rekombinanten Proteins verwendet. Wird AOX2 verwendet, so ist das Wachstum auf Methanol stark verlangsamt, was die Isolierung von Mut^S-Stämmen („*Methanol utilisation slow*“) erlaubt. Dieser Phänotyp entsteht, wenn ein Verlust des AOX1-Gens eintritt. Der hier verwendete Vektor pPIC9 enthält zwei Sequenzstücke die zum 3' und 5'-Ende des AOX1-Gens homolog sind. Dadurch kommt es bei der Transformation des linearisierten Vektors zur homologen Rekombination. Zusammen mit dem gewünschten rekombinanten Protein wird auch ein essentielles Gen für die Histidin-Synthese (Histidinoldehydrogenase) in das Hefegenom eingebracht. Auf diese Weise können die Hefen mit Rekombinationsereignissen selektioniert werden, da der Stamm GS115 auxotroph für Histidin ist. Weil auch Rekombinationen in anderen Bereichen des Hefegenoms stattfinden können, werden die Hefen zusätzlich auf ihr Wachstumsverhalten auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle untersucht. Klone mit einem Mut^S-Phänotyp sollten die gewünschte Rekombination am AOX1-Lokus besitzen.

Nach der Elektroporation werden die Hefen zunächst auf MD-Platten („*minimal dextrose*“, 1,34 % YNB, 4 x 10⁻⁵ % Biotin, 2 % Dextrose, 1,5 % Agar) ausplattiert und bei 29°C 2 Tage kultiviert. Anschließend erfolgt die Suche nach Mut^S-Stämmen. Dazu werden von den MD-Platten Klone gepickt und sowohl MD- als auch MM-Platten („*minimal methanol*“, 1,34 % YNB, 4 x 10⁻⁵ % Biotin, 0,5 % Methanol, 1,5 % Agar) beimpft. Durch beschriftete Zahlenfelder wird jeder Klon markiert. Nach 1-2 Tagen bei 29°C können bereits Unterschiede im Wachstum erkannt werden. Klone mit Mut^S-Phänotyp werden anschließend in einer analytischen Anzucht auf die Expression des gewünschten Proteins hin getestet.

C.2.2.6 Anzucht von *P. pastoris* für die Gewinnung von rekombinanten Proteinen

Für die Anzucht von *P. pastoris* Stämmen in größerem Maßstab wurden zunächst 2 x 10 ml BMGY („buffered glycerol-complex medium“) (1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,0, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 1 % (v/v) Glycerol) als Vorkultur mit den entsprechenden Stämmen inokuliert. Nach Inkubation für 2 Tage bei 29°C auf dem Schüttler (200 rpm) wurde die Vorkultur zum Beimpfen der Hauptkultur (4 x 600 ml BMGY-Medium) verwendet. Diese wurde wiederum für 2 Tage bei 29°C auf dem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Für die Induktion der Expression wurden die Kulturen in sterilen Zentrifugenbechern abzentrifugiert (10 Min, 1000 g) und das Hefesediment in 480 ml (2 x 240 ml) BMMY („buffered methanol-complex medium“) (1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,0, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 0,5 % (v/v) Methanol) aufgenommen und für 3 Tage bei 29°C geschüttelt (100 rpm). Am zweiten Tag wurde Methanol zu einer Endkonzentration von 0,7 % zugegeben, um verbrauchtes Methanol zu ersetzen und auf diese Weise eine optimale Promoterinduktion zu gewährleisten. Für die nachfolgende Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins aus dem Hefekulturüberstand wurde die Kultur für 10 Minuten bei 4000 g und anschließend nochmals bei 6000 g für weitere 10 Minuten abzentrifugiert, um die Hefen möglichst effektiv zu entfernen. In den nächsten Schritten wurde der Überstand ankonzentriert und das gewünschte Protein chromatographisch aufgereinigt.

C.2.2.7 Langzeitlagerung von *P. pastoris*-Stämmen

Charakterisierte *P. pastoris*-Klone wurden in einer Stammsammlung aufbewahrt und katalogisiert. Für die Langzeitlagerung wurden je 10 ml BMG-Medium (100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,0, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 1 % (v/v) Glycerol) mit den entsprechenden Klonen beimpft und für 2 Tage bei 29°C auf dem Schüttler (250 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert und die Zellsedimente in je 2 ml BMG-Medium + 15 % (v/v) Glycerol aufgenommen. Je Klon wurden zwei Kryoröhrchen à 1 ml bei -80°C eingefroren. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde von der eingefrorenen Zellsuspension mit einer sterilen Impföse ein kleiner Teil abgekratzt und damit das gewünschte Medium beimpft.

C.2.3 Proteinbiochemische Methoden

C.2.3.1 Ankonzentrieren und Dialyse von Proteinlösungen

Das Ankonzentrieren von Proteinlösungen wurde je nach Volumina auf verschiedene Weisen durchgeführt. Für größere Volumina (30 - 1000 ml) wurden Amicon-Ultrafiltrationszellen verwendet. Durch das Anlegen eines Gasdrucks von 3 bar wird die proteinhaltige Lösung durch einen Filter (Millipore, Bedford, USA) gepresst, wobei Moleküle, die größer als der „*molecular weight cutoff*“ (MWCO) sind, zurückgehalten werden. Ein Magnetrührer verhindert dabei das Verschließen der Filterporen durch größere Partikel. Durch Auffüllen der ankonzentrierten Proteinlösung mit Puffer und erneutem Ankonzentrieren kann auf diese Weise auch ein Pufferwechsel erzielt werden. Für kleinere Mengen an Proteinlösungen wurden spezielle ProteinfILTER für die Zentrifuge verwendet („*Macrosep[®] Centrifugal Devices*“, PALL, Ann Arbor, USA). Bei dieser Methode wird durch die Zentrifugalkraft ein Ankonzentrieren der Proteinlösungen erreicht.

Dialyseschritte wurden entweder mit Dialysekammern („*Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassette*“, Pierce, Rockford, USA) oder Dialyseschläuchen („*Spectra/Por[®]*“, Spectrum Laboratories, Los Angeles, USA) durchgeführt. Für besonders geringe Mengen (20-500 µl) wurden „*D-TubeTM Dialyzer Mini*“-Einheiten (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den jeweiligen beigefügten Anleitungen.

C.2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie für die Aufreinigung von (Pro)Cathepsin-X-Mutanten (Cathepsin-X-C31A, AAA-Procathepsin X und RAD-Procathepsin X) wurde am BioPilotTM-System (Pharmacia) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch gefiltert (0,8 µm) und entgast. Da die Chromatographieeinheit in 20 % Ethanol gelagert wird, wurde vor Beginn das System zunächst mit dH₂O und anschließend mit den entsprechenden Puffern gespült. Superloop, die Pumpen A und C wurden mit Puffer A, Pumpe B mit Puffer B gewaschen. Daraufhin folgte die Äquilibrierung der Säule mit Puffer A bei 1 ml/Minute, wobei mindestens das 10fache Säulenvolumen an Puffer verwendet wurde. Anschließend wurde der Superloop mit der aufzureinigenden Probe befüllt. Die Probe war in einem vorherigen Arbeitsschritt auf 50 ml ankonzentriert und gegen Puffer A dialysiert worden. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 1 ml/Minute mit der Probe beladen und anschließend mit Puffer A gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht wurde. Daraufhin wurde das Elutionsprogramm gestartet. Die Flussrate während der Elution betrug 2 ml/Minute. Eluiertes Protein wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt und in einer SDS-PAGE auf seine Reinheit überprüft.

Cathepsin-X-C31A

Durch gezielte Mutation wurde eine proteolytisch inaktive Mutante von Cathepsin X hergestellt (siehe C.2.1.2), um diese als „Substratfalle“ für die Affinitätschromatographie zu verwenden. Dazu wurde das für die Katalyse essentielle Cystein 31 des aktiven Zentrums durch Alanin ersetzt. Das auf diese Weise veränderte Protein wurde Cathepsin-X-C31A genannt. Die Aufreinigung erfolgte zunächst über eine „CM-SepharoseTM Fast Flow“-Säule, wobei ca. 15 ml Säulenmaterial eingesetzt wurden. Als Puffer A wurde 50 mM Na-Acetat pH 5,0 verwendet; Puffer B bestand aus 50 mM Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 5,0. Der Elutionsgradient wurde so angelegt, dass nach 150 ml Puffer ein Salzgehalt von 0,5 M erreicht war, der über weitere 10 ml beibehalten wurde. Die Mutante eluierte im Bereich von 0,2 M NaCl. Fraktionen mit einer $OD_{280} > 1$ wurden vereinigt und mit Cathepsin L prozessiert, um so die Proregion von Procathepsin X C31A abzuspalten. Auf diese Weise wurde das katalytische Zentrum freigelegt, um eine Bindung von potentiellen Substraten und/oder Liganden zu ermöglichen.

Prozessierung von Procathepsin-X-C31A mit Cathepsin L:

Für die Prozessierung wurden 36 ml der Mutante (ca. 0,2 mg/ml) mit 360 μ l DTT (200 mM) versetzt, um eine Endkonzentration von 2 mM DTT zu erhalten. Dies ist für die Aktivität des thiolabhängigen Cathepsin L entscheidend, das der Lösung in rekombinanter Form (25 nM Endkonzentration) beigegeben wurde. Nach 3stündiger Rotation bei RT, wurde der Ansatz anschließend gegen 20 mM bis-Tris, pH 7,3 über Nacht bei 4°C dialysiert, um aktives Cathepsin L zu inaktivieren. Mit dem folgenden zweiten Chromatographieschritt wird sichergestellt, dass sowohl die abgespaltene Proregion als auch Cathepsin L von der Mutante abgetrennt werden.

Am nächsten Tag folgte eine zweite Dialyse gegen 20 mM bis-Tris, pH 7,0 (Puffer A). Der resultierende Ansatz wurde danach zur Isolierung des prozessierten Cathepsin-X-C31A erneut chromatographiert. Als Puffer B wurde 20 mM bis-Tris, 1 M NaCl, pH 7,0 verwendet, als Säulenmaterial diente „DEAE-Sepharose Fast Flow“ (Amersham Biosciences). Die Elution wurde entsprechend der ersten Chromatographie durchgeführt. Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden vereinigt und mit NaN_3 zu einer Konzentration von 0,02 % versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Eine Probe des Proteins wurde für die N-terminale Proteinsequenzierung geblottet.

RAD- und AAA-Procathepsin X

Für die Untersuchung der RGD-Abhängigkeit der Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurden Mutanten der Protease hergestellt, bei denen das RGD-Bindemotiv nicht mehr vorhanden ist. Dazu wurde die Aminosäureabfolge RGD durch RAD bez. AAA mittels zielgerichteter Mutagenese (siehe C.2.1.2) ersetzt. Die resultierenden Mutanten RAD- und AAA-Procathepsin X wurden über Butyl-Sepharose gereinigt. Als Puffer A wurde 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7 verwendet. Der entsprechende Puffer B enthielt kein Ammoniumsulfat. Das Elutionsprogramm wurde so eingestellt, dass nach 120 ml eine

100 %ige Konzentration von Puffer B erreicht wurde. Diese Konzentration wurde für 5 Minuten beibehalten. Für die Regeneration der Säule wurde das Gerät so programmiert, dass anschließend nach weiteren 5 Minuten wieder eine 100 %ige Konzentration von Puffer A erreicht wurde. Auch bei dieser Aufreinigung betrug die Flussrate für die Elution 2 ml/Minute. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE überprüft und Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden vereinigt. Ein Teil des Proteins wurde bei -20°C gelagert, ein anderer Teil wurde mit NaN_3 zu einer Endkonzentration von 0,02 % versetzt und bei 4°C gelagert.

C.2.3.3 Messung der Aktivität von Cathepsin-X-C31A

Um zu überprüfen, ob der Austausch von Cys31 durch Ala bei der Cathepsin-X-Mutante C31A erfolgreich war, wurde die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Cathepsin X bestimmt. Dazu wurden beide Enzyme zunächst aktiviert, indem sie in Citrat-Puffer (50 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 5,0) und unter Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 2 mM für 15 Minuten bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurden beide Enzyme bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Messung erfolgte mit 5 μM Substrat (Abz-Phe-Arg-Tyr(3- NO_2)-OH; synthetisiert von PD Dr. Norbert Schaschke, Universität Bielefeld) und 6 nM Enzym in einem 2 ml-Ansatz. Als Reaktionspuffer wurde Citrat-Puffer (s.o) verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet und mit dem Spektrofluorimeter FluoroMax[®] der Firma SPEX gemessen.

C.2.3.4 Zirkulardichroismus-Spektroskopie von Cathepsin-X-C31A

Zirkulardichroismus ist der Unterschied in der Absorption von links- versus rechtspolarisiertem Licht, welcher durch die strukturelle Asymmetrie der Aminosäuren entsteht. Durch die Messung spiegelt sich der Gehalt an α -Helices und β -Faltblattstrukturen eines Proteins wider. Dadurch können z.B. Konformationsänderungen nachgewiesen oder, wie in unserem Fall, die Integrität der Sekundärstrukturen überprüft werden.

Für die Messung wurden Cathepsin X und Cathepsin-X-C31A gegen PBS dialysiert und die Konzentrationen auf 10 μM eingestellt. Die Messung wurde am Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, von Elisabeth Weyher-Stingel durchgeführt.

C.2.3.5 Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose

Alle Puffer wurden vor der Verwendung über eine Membran (0,8 μm) filtriert. Die zu koppelnden Proteine wurden über Nacht gegen den Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,3) dialysiert. 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in 50 ml Waschlösung (1 mM HCl) suspendiert. Anschließend wurde die Sepharose über eine Fritte (Filter aus Glas oder Keramik) mit 200 ml Waschlösung gewaschen. Das Gel wurde mit einem Spatel von der Fritte entfernt, in ein Falcon-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 5 ml Kopplungspuffer aktiviert. Nach der Aktivierung wurde das Gel sofort mit der Proteinlösung

vereinigt und für 2 Stunden bei RT rotiert. Anschließend wurde das Gel auf der Fritte mit 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Vor dem Waschen wurde der Durchlauf (ungebundenes Protein) in ein neues Gefäß überführt, um die Proteinkonzentration mittels Messung der OD_{280} zu bestimmen. Das Gel wurde wieder in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 20 ml Terminationspuffer (1 M Ethanolamin, pH 8,0) vereinigt. Es folgte eine erneute 2stündigen Inkubation bei RT auf dem Rotator. Anschließend wurde das Gel auf der Fritte abwechselnd mit je 100 ml Waschpuffer 1 (0,1 M Na-Acetat, 1 M NaCl pH 4,0) und Waschpuffer 2 (0,1 M Tris/HCl, 1 M NaCl pH 8,0) gewaschen. Die Waschschrte wurden 4-5x wiederholt. Das Gel wurde entweder sofort eingesetzt oder für eine längere Aufbewahrung bei 4°C in PBS+ 0,02 % NaN_3 gelagert.

C.2.3.6 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Für die Lyse von Säugerzellen (siehe C.1.3.4) wurde ein nicht-denaturierender Lysispuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, pH 6,0) hergestellt, der kurz vor Verwendung mit einem Inhibitorcocktail 1:100 substituiert wurde (Inhibitorcocktail Nr. 3, Calbiochem). Für die Lyse von adhärenen Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und der Lysispuffer direkt auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden 10 Minuten bei RT geschüttelt und die Lyse bzw. das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde das Lysat in Reaktionsgefäße überführt und nochmals für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, wobei alle 2-3 Minuten kurz ein „Vortexer“ eingesetzt wurde. Anschließend wurde das Lysat (3 x 2 Sek) auf Eis mit der Ultraschalllanze behandelt. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 16 000 g, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort analysiert oder bei -20°C aufbewahrt. Suspensionszellen wurden ebenso kurz vor der Lyse mit PBS gewaschen und das Zellsediment in Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert und mit dem „Vortexer“ alle 2-3 Minuten behandelt. Die übrigen Schritte wurden wie bei adhärenen Zellen durchgeführt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde entweder ein BCA-Assay (siehe C.2.3.6) durchgeführt, oder vor der Lyse die Zellzahl bestimmt, um anschließend mit Lysispuffer die gleiche Zellkonzentration einstellen zu können. Diese betrug $0,25 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml. Abweichende Lysemethoden werden in den einzelnen Kapiteln erläutert.

C.2.3.7 Isolierung des Zellkulturüberstandes

Um die Konzentration an sezerniertem Procathepsin X in Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurden Suspensionszellen für 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei adhärenen Zellen wurde der Überstand abpipettiert und ebenfalls abzentrifugiert, um abgelöste oder abgestorbenen Zellen zu entfernen. Gegebenenfalls erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

C.2.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die kolorimetrische BCA-Methode verwendet. Dabei wird die Entstehung eines blauen Cu^{2+} -Komplexes gemessen, der sich zwischen Peptidbindungen und Bicinchonininsäure (BCA) in Gegenwart von Cu^{2+} bildet. Dafür wurden 100 μl Lysat in geeigneter Verdünnung mit 100 μl BCA/ Cu^{2+} (24:1)-Lösung pro Kavität in einer 96-well-Platte versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Standardkurve mit BSA-Standardlösungen bekannter Konzentrationen verwendet. Die Bestimmung der Proben erfolgte in Duplikaten.

Die Konzentration gereinigter Proteinlösungen wurde über ihren jeweiligen Extinktionskoeffizienten durch eine spektralfotometrische Messung (OD_{280}) bestimmt.

C.2.3.9 Deglykosylierung von Proteinen

Für die Proteininteraktionsstudien mit rekombinantem Protein wurden Procathepsin X und die Mutanten RAD- und AAA-Procathepsin X deglykosyliert, um mögliche sterische Behinderungen durch Hefeglykosylierung auszuschließen. Für die Deglykosylierung wurde das Enzym Endo-N-acetyl- β -glucosaminidase H (Endo H) aus *Streptomyces plicatus* verwendet. Diese Glukosidase spaltet die $\beta(1-4)$ -Bindung zwischen den ersten zwei GlcNAc von N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten. Ein Vorteil dieses Enzyms besteht in seiner Proteasenresistenz. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Protokoll für Endo H der Firma NEB angesetzt.

C.2.3.10 Herstellung von Gelen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen komplexer Lysatgemische wurde die diskontinuierliche Elektrophorese verwendet. Durch die Gegenwart von SDS in den Gelen ist die Denaturierung und negative Ladung der Proteine sichergestellt, so dass die Auftrennung nur in Abhängigkeit von der Molekularmasse erfolgt. Trenn- und Sammelgele wurden nach dem in Tabelle C.2 gezeigten Pipettierschema hergestellt.

Tabelle C.2: Pipettierschema für die Herstellung von Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE. In der Tabelle sind die verwendeten Volumina der Komponenten für SDS-Gele unterschiedlicher Konzentrationen aufgeführt. TEMED und APS wurden kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

	Trenngel (für 2 Gele á 0,75 mm oder 1 Gel á 1,5 mm Breite)				Sammelgel
	12 %	8 %	10 %	15 %	
dH₂O	4,5 ml	5,5 ml	5 ml	3,75 ml	5,675 ml
Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
40 % (w/v) (Bis-)Acrylamid	3 ml	2 ml	2,5 ml	3,75	1,65 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Je nach benötigter Auflösung wurden Trenngele mit unterschiedlichen (Bis-)Acrylamidkonzentrationen gegossen. Zunächst wurden alle Komponenten außer TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) vereinigt und vermischt. TEMED und APS wurden am Schluß beigefügt, um die Polymerisierung einzuleiten. Beim Trenngelpuffer handelt es sich um 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8. Der Sammelgelpuffer ist 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8.

Proben wurden mit 5x Probenpuffer (0,625 M Tris/HCl, 10 % SDS (w/v), 50 % (v/v) Glycerin, 25 % (w/v) DTT, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen. Anschließend wurden die Proben bei 5000 rpm für 10 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese des Gels wurde in Laufpuffer (250 mM Tris/HCl, 192 mM (w/v) Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3) bis zur gewünschten Trennung der Proteine bei 120 - 140 V durchgeführt. Mittels vorgefärbter Markerbanden konnte die Trennung während des Laufs abgeschätzt werden.

C.2.3.11 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillantblau

Um Proteinbanden direkt im Gel zu visualisieren, wurden Gele mit einer Coomassie-Brillantblau-Lösung (0,5 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 10 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte das Entfärben des Gels durch Inkubation in Entfärberlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 2 – 3 Stunden. Um die Gele zu trocknen und haltbar zu machen, wurden sie zunächst für 15 Minuten in dH₂O auf dem Schüttler und daraufhin für 20 Minuten in Trocknungslösung (20 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Glycerol) inkubiert. Zum Schluss wurde das Gel zwischen zwei Zellophanblättern eingespannt und bei RT getrocknet.

C.2.3.12 Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen

Der in dieser Arbeit verwendete Sandwich-ELISA zum Nachweis von (Pro)Cathepsin X wurde bereits veröffentlicht (Nägler et al., 2006). Die Durchführung wird im Folgenden kurz beschrieben:

Zunächst erfolgte das Beschichten einer Mikrotiterplatte mit einem polyklonalem Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X aus Kaninchen. Der Antikörper wurde in unserem Labor isoliert. Die optimale Verdünnung des Antikörpers wurde in Vorversuchen ausgetestet. Es wurden 10 µl Antikörperlösung in 10 ml Beschichtungspuffer (15,9 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) verdünnt und je 100 µl/Kavität mit einer Multipette eingebracht. Um eine optimale Adsorption der Antikörper an die Platte zu gewährleisten, wurde die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte ausgeklopft und 5 x mit je 200 µl Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,05 % (w/v) Tween 20, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation für 1 Stunde bei RT mit je 100 µl/Kavität Blockierungspuffer (Waschpuffer + 4 % (w/v) BSA) abgesättigt. Vor dem Auftrag von Standard und Proben erfolgte zweimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer. Eine Standardreihe mit rekombinanten Procathepsin X in den Konzentrationen 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 und 62,5 pg/ml verdünnt in Probenpuffer (Waschpuffer + 2 % (w/v) BSA) wurde aufgetragen. Proben wurden je nach erwarteter (Pro)Cathepsin-X-Konzentration ebenfalls in Probenpuffer verdünnt und in Dupletts pipettiert. Zelllysate wurden i.d.R. 1/50 – 1/100 verdünnt, Zellkulturüberstände 1/5. Pro Kavität wurden 100 µl Standard oder Probe aufgetragen. Die Platte wurde für 1 Stunde bei RT geschüttelt (100 rpm). Die Platte wurde erneut ausgeklopft und 5 x mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Als zweiter polyklonaler Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X wurden anti-Cathepsin X-IgGs aus Ziege (R&D Systems) 1/200 in Probenpuffer eingesetzt und erneut für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Nach nochmaligem Waschen (5x) folgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen Ziege (Sigma) in der Verdünnung 1/20 000. Nach dem Waschen (5x) wurden 100 µl/Kavität Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) auf die Platte gegeben und für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch Hinzufügen von 100 µl/Kavität einer Stopplösung (1 M H₂SO₄) wurde die Reaktion beendet. Die Absorption bei 450 nm wurde an einem Mikrotitermessgerät bestimmt und mit dem Standard und den Kontrollen (Auslassen von jeweils einer Komponente) verrechnet.

Bei dem ELISA zur Bestimmung der (Pro)Cathepsin-B-Konzentration handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Kit (Quantikine[®], R&D Systems), der nach Angaben der Firma durchgeführt wurde.

C.2.3.13 Koimmunpräzipitation

Mittels verschiedener Varianten der Koimmunpräzipitation sollten sowohl neue Liganden von (Pro-)Cathepsin X gefunden, als auch die Bindung mutmaßlicher Liganden bestätigt werden. Die Koimmunpräzipitationen wurden mit „*μMACS Protein G MicroBeads*“ (Miltenyi) nach Herstellerangaben durchgeführt.

C.2.3.13.1 Koimmunpräzipitation von rekombinanten Procathepsin-X-Varianten mit Integrin $\alpha_v\beta_3$

Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde in Bindungspuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Octyl- β -D-Glukopyranosid, 1 mM MnCl₂, pH 7,4) auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt. Procathepsin X, RAD-Procathepsin X oder AAA-Procathepsin X wurden in einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben und die Lösungen für 30 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 μ g des $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers LM609, mit dem das Integrin aus dem Proteingemisch spezifisch isoliert und auf mögliche Interaktionspartner untersucht werden könnte. Die weiteren Schritte wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurde der Antikörper über Protein G-gekoppelte Magnetbeads an eine Matrix gekoppelt. Dadurch konnten unspezifisch gebundene Proteine über mehrere Waschschrte entfernt und im letzten Schritt der Antikörper zusammen mit dem Antigen ($\alpha_v\beta_3$) und seinen Interaktionspartnern eluiert werden. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western Blot untersucht.

C.2.3.13.2 Koimmunpräzipitation von Procathepsin X mit $\alpha_v\beta_3$ aus HUVEC

Für die Herstellung des HUVEC-Lysates wurde ein modifiziertes Protokoll aus einer Publikation von Wang et al. verwendet (Wang et al., 2005). HUVEC in Passage 6 (1,6 x 10⁷ Zellen) wurden in EGM-2 mit 0,5 mM MnCl₂ für 30 Minuten im CO₂-Brutschrank inkubiert und anschließend mit DMEM + 0,2 mM MnCl₂ gewaschen. Die Zellen wurden mit Accutase abgedaut und 2x mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 2 ml Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, 10 % Glycerol (v/v), 1 % (v/v) Nonidet P40, 170 mM NaCl, 0,5 mM MnCl₂, 1/100 Inhibitorcocktail III) aufgenommen und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Nach einer kurzen Sonifikation (10 x 5 Sek) auf Eis wurde das Lysat für 10 Minuten bei 4°C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 μ g des $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers LM609 versetzt. Es folgte eine Inkubation auf dem Rotator bei 4°C für 1,5 Stunden. Daraufhin wurden 50 μ l Microbeads zugegeben und in den nächsten Schritten nach Kitanleitung verfahren. Der Erfolg der Koimmunpräzipitation wurde mittels Western Blot untersucht.

C.2.3.14 Affinitätschromatographie mit Cathepsin-X-C31A

Mittels Affinitätschromatographie sollten Liganden oder Substrate von Cathepsin X isoliert werden. Durch den Einsatz der proteolytisch inaktiven Mutante Cathepsin-X-C31A sollte eine Spaltung von Substraten, aber nicht deren Bindung verhindert werden.

Herstellung des Zellysates

Mehrere THP-1-Zellsedimente aus unterschiedlichen Passagen, die bei -80°C gelagert waren, wurden in 16 ml kaltem Lysepuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 6,0) vereinigt. Die Zellzahl betrug $1,4 \times 10^9$ Zellen. Für 1 Stunde wurde das Lysat alle 10 Minuten abwechselnd mit dem „Vortexer“ behandelt und sonifiziert (5 x 2 Sek). Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde mit dem Mikroskop überprüft. Anschließend wurde das Lysat abzentrifugiert (Heraeus-Zentrifuge, 4000 g, 20 Min, 4°C), um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde gegen 1 l des Laufpuffers für die Affinitätschromatographie (50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0) über Nacht bei 8°C dialysiert. Dazu verwendet wurde ein „Spectra/Por[®] 6“-Dialyseschlauch. Protein, das bei der Dialyse ausgefallen war, wurde am nächsten Tag nochmals abzentrifugiert (s.o.).

Affinitätschromatographie

Das so erhaltene Lysat (15 ml) wurde mit Laufpuffer auf 30 ml aufgefüllt und auf die bereits äquilibrierte Säule aufgetragen. An das Säulenmaterial (CNBr-aktivierte Sepharose) war die inaktive Mutante Cathepsin-X-C31A chemisch gekoppelt worden. Das Gelvolumen betrug 2 ml. Anschließend wurde die Säule mit dem Laufpuffer gewaschen, bis ungebundenes Protein entfernt war. Daraufhin wurde mit der Elution begonnen. Der dafür verwendete Puffer entspricht dem Laufpuffer mit zusätzlich 1 M NaCl. Das Eluat wurde fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen in einem SDS-Gel überprüft. In einem letzten Schritt wurde die Säule mit 200 mM Glyzin, pH 2,8 gereinigt und anschließend wieder mit Laufpuffer äquilibriert. Durch Zugabe von NaN_3 zu einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) kann die Säule bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

C.2.3.15 Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode, mit der bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch spezifisch identifiziert werden können. Die Detektion erfolgt über Antikörper, die ein oder mehrere Epitope auf dem gesuchten Protein erkennen. Daher spricht man auch von einem Immunoblot.

C.2.3.15.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Für die immunologische Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran durch ein „semi-dry“-Elektrotransferverfahren immobilisiert. Für den Transfer wurden 18 Whatman-Filterpapiere (1 mm) und die

Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel, die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden in Transblotpuffer (45 mM Tris/HCl, 39 mM Glyzin, 0,00375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol für 5 Minuten inkubiert und anschließend das „Transfersandwich“ wie folgt aufgebaut: ANODE – 9 Filterpapiere – Nitrozellulosemembran – Gel – 9 Filterpapiere – KATHODE. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 – 200 mA für 1,5 – 3 Stunden, je nach Molekulargewicht des Zielproteins.

C.2.3.15.2 Immundetektion der Zielproteine

Nach dem „semi-dry“-Transfer wurde die Membran für 3 x 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler in TBST (65 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween) mit 3 % (w/v) BSA inkubiert, um unspezifische Proteinbindstellen abzusättigen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit dem primären Antikörper (Tabelle C.3) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler zur Bindung an das Zielprotein inkubiert.

Tabelle C.3: Verdünnungen der im Western Blot verwendeten Antikörper. Details siehe Text. Die genaue Bezeichnung und Herkunft der Antikörper bzw. HRP-Konjugate sind in C.1.3.7 angegeben.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Anti-Procathepsin X	1 : 3000	Anti-Kaninchen IgG	1 : 20 000
Anti-Procathepsin L	1 : 2000	Anti-Kaninchen IgG	1 : 20 000
Anti-Integrin β_3	1 : 200	Anti-Schaf/Ziege	1 : 20 000
Anti-Aktin	1 : 400	Anti-Maus	1 : 20 000
Anti-MIF	1 : 2000	Anti-Schaf/Ziege	1 : 20 000

Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch Abspritzen mit dH₂O und anschließendes Waschen mit TBST (3 x 10 Min, Schüttler) entfernt. Der sekundäre Antikörper, ein HRP („horse radish peroxidase“-Konjugat, wurde in TBST verdünnt und für 1 Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch Waschen mit dH₂O und TBST von der Membran entfernt. Die Detektion erfolgte nach einer 5-minütigen Inkubation der Membran in einer Luminol/H₂O₂-Lösung durch Auflegen von Röntgenfilmen.

C.2.3.16 Immobilisierung und Färbung von Proteinen für die N-terminale Proteinsequenzierung

C.2.3.16.1 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Für die N-terminale Proteinsequenzierung wurden die Proteine aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Ähnlich wie für den Western Blot wurde hierbei auch das „semi-dry“-Elektrotransferverfahren angewendet, jedoch mit zwei unterschiedlichen Puffern. Filterpapiere, die mit der Kathode oder Anode in Kontakt waren, wurden entsprechend in Kathoden- (50 mM Na-Borat, 20 % (v/v) Methanol) oder Anodenpuffer (50 mM Na-Borat, 5 % Methanol, pH 9,0) getränkt. Die Membran wurde für 10 Minuten in 100 % Methanol inkubiert. Blotaufbau und -bedingungen waren identisch mit denen der Western Blot-Methode.

C.2.3.16.2 Färbung der PVDF-Membran

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese für 2 Minuten in einer Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) inkubiert. Anschließend wurde die Membran so lange in Entfärberlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol) geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Daraufhin wurde die Membran kurz in dH_2O gewaschen und zum Schluss an der Luft getrocknet. Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde mittels Edmann-Abbau am Max Planck-Institut durch R. Mentele (Arbeitsgruppe Prof. Lottspeich) durchgeführt.

C.2.3.17 Oberflächenplasmonresonanz-Studien

Durch Oberflächenplasmonresonanz-Studien mit dem BIACORE-Gerät (Fa. Biacore) sollte eine mögliche Interaktion von Procathepsin X mit verschiedenen Integrinen untersucht werden.

C.2.3.17.1 Prinzip der Methode

Mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) können Interaktionen zwischen Makromolekülen in Echtzeit gemessen werden. Dabei wird einer der (potentiellen) Bindungspartner kovalent an eine Festphase gekoppelt. Dieser wird als Ligand bezeichnet. Bei der Festphase handelt es sich um ein mit carboxymethyliertem Dextran beschichtetes Goldplättchen, das sich in einem Sensorchip befindet. Über den Sensorchip wird Puffer geleitet, der den zweiten Bindungspartner, den so genannten Analyten, enthält. Bei einer Interaktion des Analyten mit dem Liganden kommt es zu einer Massenzunahme auf dem Chip, die in einer Veränderung des Brechungsindex resultiert. Diese wird vom Gerät gemessen und in RU („*response units*“) angegeben. Der Verlauf der Bindung wird in einem Sensorgramm dargestellt, bei dem die RU auf der Y-Achse gegen die Zeit auf der X-Achse dargestellt sind. Um eine gleichzeitige Messung von Kontrollen und Proben zu ermöglichen, enthält ein Sensorchip vier Flusszellen, die unabhängig voneinander beschichtet werden können. Durch Verrechnen der Bindungsdaten mit einer Negativkontrolle (i.d.R. BSA oder Leerspur) können gerätespezifische Schwankungen ausgeglichen werden.

Der Verlauf eines Bindungszyklus lässt sich in vier Phasen einteilen (Abb.C.1).

Nach der Injektion beginnt die Assoziation, bei der der Analyt an den Liganden bindet. Es kommt zu einem Gleichgewicht der Bindung, wenn die Dissoziation des Liganden genau so schnell erfolgt wie die Assoziation. Sobald die Injektion beendet ist und nur noch Puffer über den Chip läuft, beginnt die Dissoziation. Bevor ein neuer Zyklus gestartet wird, muss der Chip regeneriert werden, damit alle Bindungsstellen wieder frei liegen.

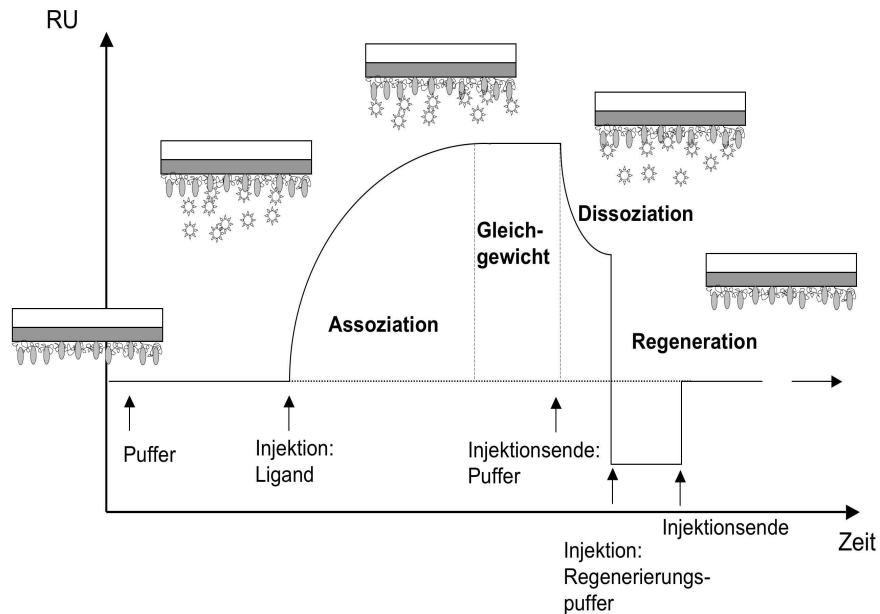


Abb.C.1: Bindungszyklus am BIACORE-Gerät. Die Bindungsdaten werden in einem Sensorgramm als RU („response units“) gegen die Zeit (in Sekunden) aufgetragen. Nähere Erläuterungen siehe Text. (Abbildung modifiziert nach: Rehm, 2002).

C.2.3.17.2 Durchführung

Alle selbst hergestellten Lösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert und entgast. Liganden wurden vor der Immobilisierung gegen PBS dialysiert.

Immobilisierung der Liganden

Die Kopplung des Liganden an die Chipoberfläche kann über verschiedene chemische Gruppen erfolgen. Die von uns verwendeten CM5-Sensorchips sind für die Kopplung über Aminogruppen geeignet. Das Beschichten der Chipoberfläche wurde nach dem Protokoll der Firma BIACORE durchgeführt (BIACORE, 1998). Bei der Aminkopplung werden die Carboxymethylgruppen auf der Chipoberfläche durch eine Lösung aus N-Hydroxysuccinimid und N-Ethyl-N`-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid) aktiviert. Es entstehen N-Hydroxysuccinimidester, die spontan mit Aminen oder anderen nukleophilen Gruppen des Liganden zu kovalenten Bindungen reagieren können. Die Reaktion wird mit einer Injektion von 1 M Ethanolamin-Hydrochlorid, pH 8,5 beendet. In einem ersten Versuchsansatz wurde Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf den Chip gekoppelt, allerdings konnte bei diesem Versuchsaufbau mit Vitronectin als Analyt keine Bindung festgestellt werden. Möglicherweise verhindert die

Immobilisierung die für die Bindung nötige Konformationsänderung des Integrins. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Vitronectin als Positiv- und BSA als Negativkontrolle einer Integrinbindung sowie neben Procathepsin X auch AAA-Procathepsin X als zusätzliche Kontrolle einer RGD-abhängigen Bindung immobilisiert.

Bindungsstudien

Um Schwankungen durch Unterschiede in den Salzkonzentrationen der Lösungen zu vermeiden, wurden die Analyten vor der Messung gegen den Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Octyl- β -D-Glukopyranosid, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MnCl₂, pH 7,4) dialysiert. Die Integrine wurde über den KINJECT-Befehl mit einem Volumen von 40 μ l bei einer Flussrate von 8 μ l/Minute injiziert. Mittels KINJECT-Befehl können Schwankungen in der Messung durch die Injektion des Analyten minimiert werden. Die Dissoziation erfolgte über 600 Sekunden bei der gleichen Flussgeschwindigkeit. Die anschließende Regeneration wurde durch Injektion von 5 μ l 4 M Guanidiniumhydrochlorid durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das BIAevaluation-Programm Version 4.1. Die BSA-Kontrollspur wurde dazu jeweils von den anderen Spuren abgezogen. Für die Bestimmung der Bindungskonstante von Procathepsin X an Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurden fünf unterschiedliche Konzentrationen an $\alpha_v\beta_3$ (50 – 500 nM) gemessen und unter Annahme eines bimolekularen Modelles gefittet. Sowohl eine Assoziationskonstante k_a als auch eine Dissoziationskonstante k_d konnten für Vitronectin und Procathepsin X erhalten werden. Die allgemeine Bindungskonstante K_d ergibt sich aus k_d/k_a .

Für die Blockierung der RGD-Bindestelle von Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde zudem das RGD-Peptid in einer Konzentration von 1 μ M (glöst in DMSO) der Integrinlösung zugesetzt und für 10 Minuten bei RT präinkubiert. In der Kontrolle wurde die entsprechende Menge an DMSO zugegeben.

C.2.4 Zellbiologische Methoden

Die meisten verwendeten zellbiologischen Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Celis durchgeführt (Celis, 1994). Abweichende Methoden anderen Ursprungs werden nachfolgend im Detail genannt.

C.2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden adhärenente Zellen und Suspensionszellen gezählt und anschließend bei 300 g für 10 Minuten sedimentiert. Daraufhin wurde das Sediment in sterilem Einfriermedium (Kulturmedium, 20 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen, so dass die Konzentration der Zellen $4 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ betrug und zu 1-1,5 ml in Kryoröhrchen verteilt. Ein schonendes, stufenweises Abkühlen der Zellen konnte mit Einfrierboxen der Firma Nunc („Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container“) auf Trockeneis erzielt werden. Zuletzt wurden die Zellen für die Langzeitlagerung in Flüssigstickstofftanks transferiert und katalogisiert.

Zellen, die in flüssigem Stickstoff gelagert waren, wurden zunächst für 1 Minute bei RT inkubiert und danach in einem Wasserbad bei 37°C kurz angetaut. Anschließend erfolgte eine sofortige Resuspension in 37°C warmem Kulturmedium, um das im Einfriermedium enthaltene, für die Zellen toxische DMSO zu verdünnen. Um das DMSO vollständig zu entfernen, wurden die Zellen anschließend für 10 Minuten bei 300 g sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen.

C.2.4.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Tumorzelllinien wurden in den Routinewachstumsmedien RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS (für THP-1-, PC3- und PNT1A-Zellen) oder DMEM + 10% (v/v) FCS (für HEK293-, HeLa-, LNCaP und DU145-Zellen) unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin-Lösung (1:100) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Konzentration und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für HUVEC wurde das Medium EBM-2 der Firma Cambrex verwendet, und mit den nötigen Zusätzen aus dem „Bullet Kit“ komplementiert (= Wachstumsmedium EGM-2). Alle verwendeten Zelllinien und primären Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen-Kontaminationen überprüft. Diese Kontrollen wurden mit dem Mykoplasmen-Kit von VenorGeM® nach Kitanleitung durchgeführt.

C.2.4.3 Subkultivierung von Säugetierzellen

Für das Splitten von Suspensionszellen (THP-1) wurden die Zellen zunächst sedimentiert (10 Min, 300 g) und mit 1x PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und ein Teil in einer neuen Zellkulturflasche verdünnt und weiterkultiviert.

Um adhärenzte Zellen (PNT1A, LNCap, HeLa, DU145, HEK293) zu splitten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellschicht mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine ausreichende Menge Trypsin-EDTA-Lösung (1x) auf die Zellen gegeben, so dass diese gerade bedeckt waren. Nach wenigen Minuten bei RT konnten die Zellen durch leichtes Klopfen an das Zellkulturgefäß von der Oberfläche gelöst werden. Durch die Aufnahme der Zellen in 10 ml frischem Medium mit anschließender 10minütiger Zentrifugation bei 300 g wurde die Trypsin-EDTA-Lösung entfernt. Die Zellen wurden erneut in frisches Medium aufgenommen, gezählt und in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

HUVEC wurden nach dem Protokoll der Firma Cambrex behandelt. Es war besonders darauf zu achten, dass diese Zellen höchstens 80 % konfluent wurden, da sonst ein kontakt-abhängiger Wachstumsstopp eingeleitet wird. Ein Mediumwechsel wurde spätestens alle zwei Tage durchgeführt.

C.2.4.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierbei handelt es sich um einen speziellen Objektträger, in den vier Großquadrate eingraviert sind, von denen jedes aus 16 Kleinquadraten besteht. Die Oberfläche einer Neubauer-Zählkammer sowie das dazugehörige Deckglas wurden mit 70 % Ethanol gereinigt. Nach leichtem Anfeuchten der Auflagestege wurde das Deckglas auf die Zählkammer aufgelegt und - falls nötig - angedrückt. Das Erscheinen von Newton-Ringen zeigt den korrekten Sitz des Deckglases und die richtige Höhe der Zählkammer (0,1 mm) an. Da die Lebendzellzahl bestimmt werden sollte, wurde ein Aliquot der Zellen 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS) gemischt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, während es von lebenden aktiv ausgeschlossen wird. Die verdünnte Zellsuspension wurde in den Zwischenraum pipettiert, wobei Kapillarkräfte die Suspension unter das Deckglas saugten. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Anzahl der lebenden Zellen in den vier Großquadraten bestimmt. Dabei wurden jeweils die Zellen, die auf zwei der Seitenkanten eines Quadrates liegen, mit berücksichtigt, während die Zellen auf den beiden anderen Kanten nicht mitgezählt wurden. Über einem Großquadrat (Fläche 1 mm², Abstand Zählkammer-Deckglas 0,1 mm) befindet sich ein Volumen von 0,1 µl. Zur Umrechnung auf die Zellzahl pro ml muss daher der Faktor 10 000 sowie die Verdünnung mit Trypanblau berücksichtigt werden (Zellzahl/ml = Mittelwert der vier Großquadrate x Verdünnungsfaktor x 10⁴).

C.2.4.5 Isolierung von Monozyten und Granulozyten aus Vollblut

Zur Isolierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten aus Vollblut wurde die MACS-Methode (Miltenyi Biotec) eingesetzt, wobei die Zellen über spezifische Antikörper isoliert werden, die mit mikroskopisch kleinen Eisenkügelchen (Beads) verbunden sind. In einem starken Magnetfeld, das an einem Säulchen angelegt wird, werden die mit den Antikörpern markierten Zellen festgehalten, die nicht-markierten Zellen können die Säule passieren. Zunächst wurden PBMC („*peripheral blood mononuclear cells*“) in einem ersten

Schritt aus Vollblut mittels Ficoll Paque[®] isoliert. Dazu wurden je 10 ml Blut von sechs Spendern in Citrat-Röhrchen abgenommen und 1:3 mit PBS/EDTA/Nutridoma (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Nutridoma), verdünnt. Mit dem verdünnten Blut wurden jeweils eine 15 ml Ficoll Paque[®] vorsichtig überschichtet und anschließend bei 500 g für 30 Minuten bei RT abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammelten sich die Monozyten (ca. 25 %) und die Lymphozyten (ca. 75 %) in einer Ebene, die vorsichtig abgenommen wurde. Die Granulozytenfraktion direkt über dem Erythrozytensediment wurde ebenfalls abpipettiert. Die entsprechende Leukozytensuspensionen wurden vereinigt und jeweils mit PBS/EDTA/Nutridoma 2-3x gewaschen (400 g, 10 Min, RT). Um verunreinigende Erythrozyten zu entfernen, wurde die Granulozytensuspension mit Ery-Lysepuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA) zunächst für 10 Minuten bei RT inkubiert und daraufhin mit diesem Puffer 2-3x gewaschen (400 g, 10 Min, RT). Anschließend wurden die Zellsedimente in je 500 µl PBS/EDTA/Nutridoma aufgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Es folgte die Inkubation der Monozyten und Lymphozyten mit CD14-MicroBeads und der Granulozytensuspension mit CD15-MicroBeads bei 4°C für 15 Minuten. Die eingesetzte Menge an MicroBeads wurde der Zellzahl angeglichen und nach dem vorliegenden Protokoll eingesetzt. Anschließend wurde die Separation der Zellen wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Die Zellzahl wurde nochmals bestimmt und Fraktionen von jeweils 1×10^7 Zellen/ml hergestellt.

C.2.4.6 Stimulierung von Zellen

Für die Stimulierung von Zellen wurde dem jeweiligen Medium statt FCS 1 % (v/v) Nutridoma beigegeben, um auf diese Weise ein definiertes Medium einzusetzen, da die Zusammensetzung von FCS chargenabhängig stark schwanken kann. Stimulierungen wurden in Dupletts oder Tripletts durchgeführt.

C.2.4.6.1 Differenzierung der Zelllinie THP-1 mit PMA und ATRA

Für die Stimulation von THP-1-Zellen mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und ATRA (all-trans Retinsäure) wurden 2×10^5 Zellen/ml in einer Zellkulturplatte in Wachstumsmedium ausgesät und 50 ng/ml PMA oder 1 µM ATRA zugegeben. Außerdem wurde eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Nach 1, 2, 3 und 4 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt, um Lysate gleicher Zellkonzentrationen herzustellen. Zudem wurde für die weitere Analyse der Zellkulturüberstand isoliert.

C.2.4.6.2 Stimulierung von Zellen mit Vitronektin

Alle Zelllinien wurden, sofern nicht abweichend angegeben, mit je 10 µg/ml Vitronektin für 24 Stunden stimuliert. THP-1-Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen ausgesät. Vitronektin wurde in Stimulationsmedium (RPMI + 1 % Nutridoma) zu einer Konzentration von 20 µg/ml vorverdünnt und anschließend eine entsprechende Menge in die Vertiefungen mit der Zellsuspension pipettiert, so dass die Endkonzentration an Vitronektin 10 µg/ml betrug. Adhärente Zellen wurden am Vortag ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der

Stimulation ca. 50 % konfluent waren. Für die Stimulation wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und Simulationsmedium mit 10 µg/ml Vitronektin auf die Zellen gegeben. Für jeden Messwert wurden mindestens zwei Kavitäten ausgesät.

C.2.4.7 siRNA-Transfektion von HUVEC

Für die Niederregulation von (Pro)Cathepsin X in HUVEC wurden die spezifischen siRNAs CatX304 und CatX913 eingesetzt, die an unterschiedliche Sequenzen im mRNA-Molekül binden. Als Kontrollen wurden sowohl eine unspezifische siRNA (Nonsilencing) als auch ein Derivat von CatX304 (die sog. „Mismatch“-Kontrolle) eingesetzt, welches zwei ausgetauschte Basen enthält.

Für die Transfektion wurden HUVEC am Vortag zu einer Menge von 4000 Zellen/cm² in 6-well Platten ausgesät. Die Transfektion wurden jeweils nach den Protokollen der Firmen Qiagen (HiPerFect) oder Invitrogen (Lipofectamin 2000) durchgeführt. Für die Transfektion mit HiPerFect wurde jede siRNA in einer Konzentration von 50 nM mit 16 µl HiPerFect eingesetzt. Entsprechend wurden die siRNAs mit Lipofectamin 2000 bei einer Konzentration von 40 nM und 4 µl/Kavität transfiziert. Nach einer 5stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt.

Um HUVEC mit einem niederregulierten (Pro)Cathepsin-X-Spiegel in einem Invasionsversuch zu testen, wurden die Zellen wie oben beschrieben transfiziert. Nach 24 Stunden folgte eine zweite Transfektion mit den siRNAs unter denselben Bedingungen. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1 : 1 gesplittet. Am darauffolgenden Tag wurde der Invasionsversuch wie in C.2.4.9 beschrieben durchgeführt.

C.2.4.8 Bestimmung der Adhäsion

Für den Adhäsionsversuch wurde am Vortag eine MaxiSorp-Mikrotiterplatte (96-well, Nunc) beschichtet. Dazu wurden die verwendeten Proteine (Fibronektin, BSA, Procathepsin X, AAA-Procathepsin X, RAD-Procathepsin X und Cathepsin X) in PBS zu je 5 µg/ml verdünnt. Pro Vertiefung wurden 50 µl Proteinlösung pipettiert, wobei die Beschichtung in Triplets oder Quadruplets erfolgte. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Platte entleert und Reste der Beschichtungslösungen mit einer Pipette komplett entfernt. Es folgte die Blockierung der Platte mit einer Lösung aus 7,5 % BSA in dH₂O. Dazu wurden je 100 µl/Vertiefung pipettiert und die Platte für 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Um die HUVEC hungern zu lassen, wurde währenddessen das Zellkulturmedium (EGM-2) durch Serum-freies Medium (DMEM) ersetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase abgedaut und in Bindungspuffer (DMEM, 1 % BSA, 0,2 mM MnCl₂) aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und die Zellzahl auf 4 x 10⁵ Zellen/ml mit Bindungspuffer eingestellt. Nach Entfernung der Blockierungslösung von der Mikrotiterplatte wurden je 100 µl der

Zellsuspension pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden für 1,5 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platte auf einem saugfähigem Zellstofftuch entleert und verbleibendes Medium mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Mit einer Multipette wurden daraufhin 100 µl pro Vertiefung Waschlösung (DMEM, 0,2 mM MnCl₂) zugegeben. Dieser Schritt wurde noch zwei Mal wiederholt und anschließend die Waschlösung mit einer Pipette komplett entfernt. Für die Fixierung wurden mit der Multipette 100 µl/Vertiefung 1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS auf die Zellen gegeben und die Platte für 10 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Fixierungslösung komplett entfernt und die Zellen gefärbt. Dazu wurde 100 µl/Vertiefung 0,1 % (w/v) Kristallviolett in dH₂O zugegeben und die Platte für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Platte wurde wiederum auf saugfähigem Zellstofftuch entleert und verbleibende Lösung mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Durch das mehrmalige Eintauchen der Platte in Leitungswasser wurde überschüssige Färbungslösung entfernt. Das Leitungswasser wurde mit einer Pipette komplett entfernt und die Platte bei RT 5-10 Minuten getrocknet. Für die Lyse der Zellen und damit der Freisetzung des Farbstoffes wurde mit der Multipette 50 µl/Vertiefung 0,5 % (v/v) Triton X-100 in dH₂O zugeben. Für die Auswertung wurde die OD bei 595 nm mit dem Gerät Safire 2 (Tecan Systems) bestimmt.

C.2.4.9 Bestimmung der Transmigrationsrate von HUVEC

Um die Transmigrationsrate von Zellen zu überprüfen, wurden Invasionsversuche mit Hilfe der Boyden-Kammer durchgeführt. Eine Boyden-Platte (Corning, 24-well, Porengröße 8 µm, 12 Einsätze) wurde mit 10 µg humaner EZM (BD Biosciences) pro Einsatz beschichtet. Dazu wurden die EZM in Serum-freiem Medium (DMEM) auf eine Endkonzentration von 50 ng/µl verdünnt und jeweils 200 µl in einen Einsatz gegeben. Die Platte wurde unter der Sterilbank über Nacht mit geöffnetem Deckel getrocknet. Am nächsten Tag wurde vor Beginn des Versuches die eingetrocknete Matrix rekonstituiert, indem 200 µl Serum-freies DMEM in die Einsätze gegeben wurden. Die Matrix wurde zum Quellen für 2 Stunden bei RT mit geschlossenem Deckel inkubiert. Währenddessen wurden HUVEC 1x mit PBS gewaschen und mit Accutase abgedaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 10 Min) und in DMEM + 1 % (v/v) Nutridoma aufgenommen und gezählt. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden Volumina an DMEM + 1 % (v/v) Nutridoma auf eine Konzentration von $7-8 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Das Medium in den Einsätzen wurde abgesaugt und durch je 200 µl Zellsuspension ersetzt. Es wurden Triplett-Werte ermittelt. In die Vertiefungen ohne Einsätze wurde je 600 µl DMEM + 1 % (v/v) Nutridoma + 10 % (v/v) humanes Serum pipettiert. Anschließend wurde die Boyden-Kammer für 45 Minuten im CO₂-Inkubator belassen, damit sich die Zellen an die EZM anheften und sich Temperatur und pH-Wert der Medien angleichen konnten. Nach der Inkubationszeit wurden die Einsätze mit einer sterilen Pinzette luftblasenfrei in die Vertiefungen mit dem Serum-haltigem Medium gesetzt. Es folgte eine Inkubation im CO₂-Brutschrank für 4,5 Stunden. Überschüssige Zellsuspension wurde lysiert und für die Western Blot bzw. ELISA-Analyse bei -20°C aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde die Invasion der Zellen bestimmt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und nicht-

invadierte Zellen auf der Oberseite der Einsätze wurden mit Hilfe von Wattestäbchen entfernt. Daraufhin wurden die Einsätze mit PBS (800 µl/Vertiefung) gewaschen. Anschließend wurden die verbleibenden Zellen auf der Unterseite der Einsätze durch die Zugabe von je 800 µl eiskaltem Methanol mit einer 10minütigen Inkubation bei 4°C fixiert. Der Methanol wurde abgesaugt, durch je 800 µl PBS + 0,2 % (v/v) Triton-X-100 ersetzt und für 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler (80 rpm) inkubiert, um die Zellen für die anschließende DAPI-Färbung zu permeabilisieren. DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol) lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an und emittiert unter Anregung von ultraviolettem Licht blaues Licht. Dadurch werden die Zellkerne blau angefärbt. Nach Entfernen der Permeabilisierungslösung wurden je 600 µl Färbelösung (PBS + DAPI, 1:7500) in die Vertiefungen gegeben und die Platte für 3 Minuten im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und die Einsätze mit 3x mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden je 1,6 ml PBS in die Vertiefungen gegeben und die Platten mittels Epifluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dazu wurde mit einem 4fach-Objektiv jeweils ein Gesichtsfeld fotografiert (SensiCam QE) und die fluoreszierenden Zellkerne unter Benützung der ImageProPlus- Software ausgezählt. Für eine Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Selbst nach mehreren Wochen konnte noch Fluoreszenz detektiert werden.

C.2.4.10 Immunfärbung von HUVEC

Um eine mögliche Kollokalisierung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit Procathepsin X zu untersuchen, wurden HUVEC mittels spezifischer Antikörper angefärbt. HUVEC schienen für diesen Zweck besonders geeignet, da ihre hohe Expressionsrate für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bekannt ist.

C.2.4.10.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Immunfärbung für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde nach einem Protokoll von Prof. Dr. Klaudia Brix (Jakobs-Universität Bremen), durchgeführt. Zunächst wurde eine PFA-Stocklösung (16 % (w/v) Paraformaldehyd) für die Fixierung der Zellen vorbereitet. Dazu wurden 16 g PFA in 60 ml dH₂O unter Rühren auf 60°C im Wasserbad erhitzt. Es folgte die tropfenweise Zugabe von 1 N NaOH bis das PFA vollständig gelöst war. Die Lösung wurde noch für 1 Minute weitererhitzt und anschließend mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt. Nach Filtration (0,2 µm) ist die Lösung bei 4°C für 2-3 Wochen haltbar. Desweiteren wurde vor der Färbung auch das Einbettmedium vorbereitet (Rodriguez & Deinhardt, 1960). Dazu wurden 5 g Mowiol 4.88 (Hoechst) in 20 ml 100 mM Tris pH 8,0 gelöst, indem es für 16 Stunden bei RT gerührt wurde. Daraufhin wurden 10 ml 100 % (v/v) Glycerin zugegeben und nochmals für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in 1 ml Aliquots abgefüllt und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde der Lösung 50 mg/ml DABCO (1,4-Diazobicyclo-octan, Sigma-Aldrich) als Antibleichmittel zugegeben, gemischt und anschließend bei 13 000 rpm für 20 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (Johnson et al., 1982)

Für die Immunfärbung von HUVEC wurden diese am Vortag in „*BD Chamber Slides*“ ca. 30 % konfluent ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde dem Wachstumsmedium 0,5 mM MnCl_2 zugesetzt und die Zellen für 10 Minuten bei RT stimuliert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 8 % PFA/200 mM Hepes, pH 7,4 für 10 Minuten bei 37°C. Daraufhin wurden die Objektträger zunächst mit 200 mM Hepes, pH 7,4, 6x für 5 Minuten und dann mit PBS 3x für 5 Minuten gewaschen. Die Waschschritte erfolgten auf einem Horizontalschüttler (80 rpm). Im nächsten Schritt wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit 3 % BSA in PBS bei 37°C für 30 Minuten blockiert. Im Anschluss folgte 6x Waschen für 5 Minuten mit 0,1 % BSA in PBS. Die Inkubation mit den primären Antikörpern wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurden sowohl der Antikörper gegen Procathepsin X (Kaninchen) als auch der Antikörper LM609 (Maus) gegen Integrin $\alpha_v\beta_3$ in 0,1 % BSA/PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt. Ebenso wurde ein Kontrollfeld ohne primären Antikörper mitgeführt. Durch 6x Waschen für je 5 Minuten wurde nach der Inkubation überschüssiger Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern inkubiert. An diese Antikörper sind fluorophore Moleküle gekoppelt, die bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren, d.h. Licht mit einer anderen Wellenlänge emittieren. Die Verdünnung dieser Antikörper erfolgte ebenfalls in 0,1 % BSA/PBS, wobei der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und der Antikörper gegen Maus in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei RT wurden die Zellen erneut gewaschen, zuerst 3 x für 5 Minuten mit PBS und dann 3 x für 2 Minuten mit dH_2O . Zum Schluss wurden die Präparate mit Mowiol/DABCO eingedeckelt.

C.2.4.10.2 Konfokale Mikroskopie

Die Färbung und Auswertung für die konfokale Mikroskopie wurde von PD Dr. Stefan Zahler am Department für Pharmazie der LMU München durchgeführt. Dazu wurden HUVEC isoliert und kultiviert (Gonscherowski et al., 2006). Vor der Färbung wurden die Zellen auf Objektträgern (μ -slides, Ividi, München) ausgesät und für 1 Stunde im CO_2 -Brutschrank mit den primären Antikörpern (anti-Procathepsin X, 1:100 und/oder anti- $\alpha_v\beta_3$ LM609, 1:100) inkubiert. Nach Waschen mit PBS (3x) wurden die Zellen mit 3,7 % PFA fixiert, erneut mit PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (Ziege-anti-Kaninchen markiert mit Alexa 488, oder Ziege-anti-Maus markiert mit Alexa 633 (Invitrogen)) inkubiert. Mit dieser Methode sollten nur extrazelluläre Proteine detektiert werden. Alternativ wurden adhärenente Zellen für 15 Minuten mit 3,7 % PFA fixiert und für 2 Minuten mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurde die Antikörperinkubation wie oben beschrieben durchgeführt. Nach Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurden die Zellen gewaschen und in Permafluor-Medium (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) eingedeckelt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 Invert, Zeiss, Jena, Deutschland).

C.2.4.10.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Färbung und Auswertung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde von Frau PD Dr. Stöckelhuber an der Anatomischen Anstalt der LMU München durchgeführt. Für diese Methode wurden HUVEC mittels Accutase abgedaut und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in EGM-2 + 0,5 mM MnCl₂ verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf Grids aufgetragen und für zwei Stunden im CO₂-Inkubator belassen, um die Adhäsion zu gewährleisten. Für die Färbung wurden die Grids mit je 50 µl unterschiedlicher Lösungen behandelt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS + 0,5 mM MnCl₂ gewaschen. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA und 0,5 % Glutaraldehyd in Soerensen Puffer (0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4) für 20 Minuten. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit 50 mM Glyzin für 15 Minuten und erneutem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit PBS + 2,5 % BSA + 2,5 % Ziegen Serum für 30 Minuten blockiert. Danach erfolgte die Färbung mit den ersten Antikörpern gegen (Pro)Cathepsin X (aus Kaninchen, 1:10 verdünnt) und die β₃-Integrinuntereinheit (Mab2008) für 1 Stunde bei RT, dann über Nacht bei 4°C und nochmals für 1 Stunde bei RT. Nach Waschen mit PBS wurde mit den zweiten Antikörpern für 2 Stunden bei RT inkubiert, die mit Goldpartikeln konjugiert sind (anti-Kaninchen mit 10 nm, anti-Maus mit 6 nm Partikelgröße, 1:100 verdünnt). Zusätzlich wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen die primären Antikörper weggelassen wurden. Nach der Inkubation wurden die Grids 4 x 5 Minuten mit PBS und 5 x 1 Minute mit dH₂O gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Kontrastierung der Zellen mit Uranylacetat für 15 Minuten. Die Auswertung wurde an einem Transmissionselektronenmikroskop („CM 10“, Philips, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt.

D Ergebnisse

Anmerkung: Im Folgenden wird der Name „Procathepsin X“ auf verschiedene Weisen geschrieben. Wenn nicht eindeutig davon ausgegangen werden kann, dass die Proform oder das gereifte Enzym detektiert wurde, so wird „Pro“ in Klammern gesetzt. Bei einer eindeutigen Identifizierung wird entweder „Procathepsin X“ oder „Cathepsin X“ angegeben. Dies gilt auch für andere Cathepsine.

D.1 Regulation der Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zu einer Veränderung der extra- und intrazellulären Konzentrationen von (Pro)Cathepsin X führen, kann zur Aufklärung der (patho-)physiologischen Funktion dieser Protease beitragen. Daher ist die Suche nach biologischen Stimulatoren oder Inhibitoren der Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X von großem Interesse.

D.1.1 Expression von (Pro)Cathepsin X in Leukozyten

Zunächst wurde die natürliche Expression von (Pro)Cathepsin X in Leukozyten untersucht. Dazu wurden Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten mit dem MACS-System aus humanem Vollblut isoliert, gezählt und Lysate gleicher Zellzahlen hergestellt. Der (Pro)Cathepsin-X-Gehalt wurde mittels ELISA und Western Blot bestimmt (Abb.D.1).

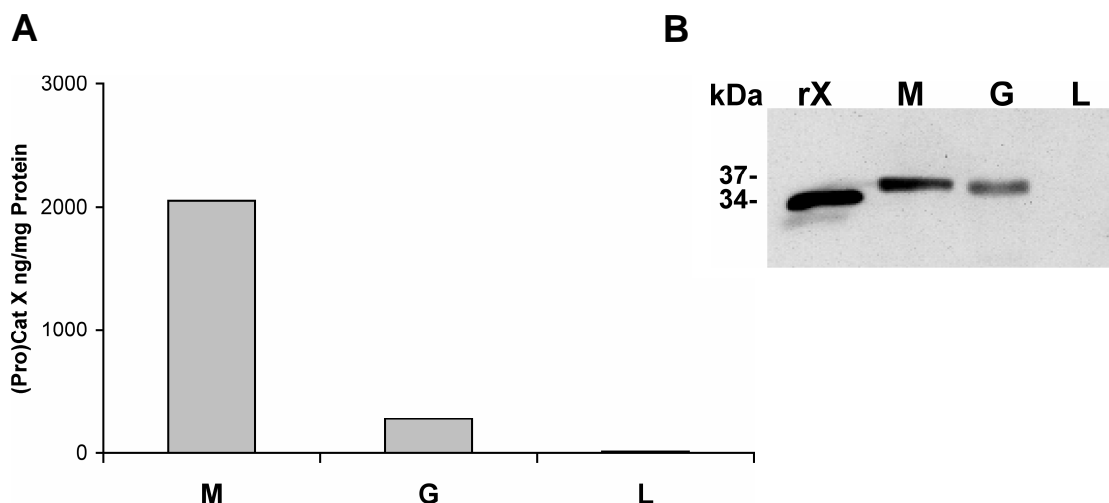


Abb.D.1: Expression von (Pro)Cathepsin X in Leukozyten. Humane Leukozyten wurden aus Vollblut isoliert und über Oberflächenmarker in Monozyten (M), Granulozyten (G) und Lymphozyten (L) getrennt. Lysate gleicher Zellzahlen wurden im ELISA (A) und Western Blot (B) auf (Pro)Cathepsin X hin untersucht. Die stärkste Expression zeigen Monozyten. Granulozyten exprimieren deutlich weniger (Pro)Cathepsin X, für Lymphozyten ist die Expression fast nicht nachweisbar. rX = rekombinantes, deglykosyliertes Cathepsin X; aufgrund der Deglykosylierung läuft diese Bande etwas unterhalb der nativen, glykosylierten Form.

(Pro)Cathepsin X wird am stärksten in Monozyten exprimiert (ca. 1,8 µg/mg Gesamtprotein) während in Granulozyten mit ca. 0,2 µg/mg Gesamtprotein deutlich weniger von der Protease vorhanden ist. In Lymphozyten ist (Pro)Cathepsin X kaum nachweisbar. Der Western Blot zeigt, dass fast ausschließlich die gereifte Form (Cathepsin X) mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa im Lysat zu finden ist. Procathepsin X wäre bei einem Molekulargewicht von ca. 39 kDa zu erwarten.

Um die differentielle Expression von (Pro)Cathepsin X in Leukozyten näher zu untersuchen, wurde in weiteren Versuchen ein Zellkulturmodell für die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen verwendet.

D.1.2 Differenzierung von THP-1-Zellen mit PMA und ATRA: Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X

Bei THP-1-Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie, die von einer akuten monozytären Leukämie stammt. Mit diesen Zellen können Differenzierungsstudien durchgeführt werden, da man *in vitro* die Entwicklung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen auslösen kann. Dazu werden unter anderem PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und ATRA (all-trans Retinsäure) verwendet. Nach Stimulation von THP-1-Zellen mit PMA werden die Zellen adhärent und ähneln in ihrer Morphologie Makrophagen, während der Effekt von ATRA phänotypisch weniger stark ausgeprägt ist, da die Zellen in Suspension bleiben und nur zum Teil leicht anhaften (Matikainen & Hurme, 1994).

Um die Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X während der Differenzierung zu untersuchen, wurden THP-1-Zellen sowohl mit PMA (50 ng/ml) als auch mit ATRA (300 ng/ml) stimuliert und die Menge an (Pro)Cathepsin X nach 24, 48, 72 und 96 Stunden quantitativ mittels ELISA bestimmt (Abb.D.2). In Lysaten nahm der Gehalt an (Pro)Cathepsin X bei ATRA-stimulierten Zellen ab, während er bei PMA-stimulierten Zellen (Pro)Cathepsin X stark anstieg, so dass, verglichen mit dem 24 Stunden-Wert, nach 96 Stunden die vierfache Menge an (Pro)Cathepsin X in THP-1-Zellen vorhanden war (Abb.D.2A).

Als Hinweis auf eine kontinuierliche Sekretion akkumulierte die Konzentration von (Pro)Cathepsin X im Zellkulturüberstand bereits in unstimulierten Zellen im Verlauf der Zeit (Abb.D.2B). Bei ATRA-stimulierten Zellen wurde jedoch weniger (Pro)Cathepsin X sezerniert. Die Unterschiede waren besonders nach 72 und 96 Stunden deutlich. Die Behandlung von Zellen mit PMA bewirkte hingegen eine verstärkte Ausschüttung von (Pro)Cathepsin X, so dass nach vier Tagen bis zu 750 ng (Pro)Cathepsin X/mg Gesamtprotein gemessen werden konnte.

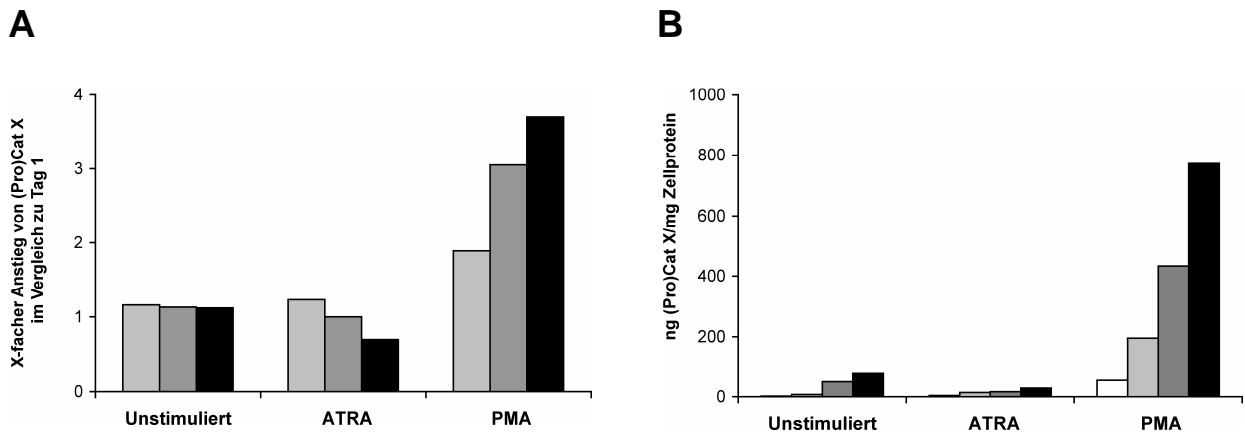


Abb.D.2: Zeitverlauf der Stimulation von THP-1-Zellen mit PMA und ATRA. THP-1-Zellen wurden mit PMA (50 ng/ml) oder ATRA (300 ng/ml) für 4 Tage inkubiert. Mittels ELISA wurde der (Pro)Cathepsin-X-Gehalt in Zelllysaten (A) und Zellkulturüberstand (B) bestimmt. PMA führt sowohl extra- als auch intrazellulär zu einem starken Anstieg von (Pro)Cathepsin X, während für ATRA der (Pro)Cathepsin-X-Gehalt im Vergleich zur Negativkontrolle sinkt. weiß = 24 Stunden, hellgrau = 48 Stunden, dunkelgrau = 72 Stunden, schwarz = 96 Stunden

D.1.3 Stimulierung der Freisetzung von Cathepsinen durch physiologische Agentien

Bei weiteren Stimulationsversuchen sollten nun physiologische Agentien hinsichtlich einer möglichen Wirkung auf die Regulation von (Pro)Cathepsin X primär in THP-1-Zellen untersucht werden.

D.1.3.1 Wirkung von Zytokinen und EZM-Proteinen auf die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X

Die differentielle Expression von (Pro)Cathepsin X in Immunzellen (D.1.1) läßt auf eine Funktion im Immunsystem schließen, weshalb für uns Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine als mögliche Regulatoren von besonderem Interesse waren. Da auch EZM-Proteine die Expression und Sezernierung von Proteasen beeinflussen können, wurden diese ebenso als physiologisch relevante Stimulatoren in Betracht gezogen. Der (Pro)Cathepsin-X-Gehalt im Zellkulturüberstand von THP-1-Zellen, die nun mit verschiedenen Zytokinen und EZM-Proteinen behandelt worden waren, wurde wiederum mittels ELISA bestimmt und als Maß für einen Stimulationseffekt gewertet.

Die Wachstumsfaktoren TGF β („transforming growth factor β “) und EGF („epidermal growth factor“) wirken auf diverse Zelltypen sowohl wachstumsfördernd als auch wachstumshemmend, aber auch chemotaktische und proliferative Einflüsse sind bekannt. Wie in Abb.D.3 gezeigt, scheint TGF β jedoch auf die Sezernierung von (Pro)Cathepsin X keinen Effekt zu haben. Konzentrationen von 5, 1, 0,1 und 0,001 ng/ml bewirkten keine Veränderung in der Menge an sezerniertem (Pro)Cathepsin X in THP-1-Zellkulturüberstand nach 24 Stunden Inkubationszeit. Auch EGF (100 ng/ml) zeigte keinen Stimulationseffekt.

Das proinflammatorische Zytokin TNF α („Tumornekrosefaktor α “) spielt im Immunsystem u.a. auch eine wichtige Rolle bei der Zytolyse von Tumorzellen. Jedoch führt selbst eine Konzentration von 50 ng/ml bei THP-1-Zellen zu keiner Veränderung der (Pro)Cathepsin-X-Konzentration im Medium.

Interleukine, wie das proinflammatorisch wirksame IL-1 β erfüllen ebenfalls wichtige Aufgaben bei der Modulation der Immunantwort, während die Chemokine MCP-1 und RANTES als starke Chemoattraktoren für Zellen des Immunsystems bekannt sind (Reale et al. 2001). Die Menge an (Pro)Cathepsin X blieb nach Inkubation von THP-1-Zellen mit IL-1 β („*Interleukin 1 β* “) (500 U/ml), MCP-1 („*monocyte chemoattractant protein-1*“) und RANTES („*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*“) (je 100 ng/ml) allerdings ebenfalls unverändert.

Auch die extrazellulären Matrixproteine Laminin, Fibronectin und Kollagen IV hatten in einer Konzentration von 10 μ g/ml keinen Effekt auf die Sezernierung von (Pro)Cathepsin X (Abb.D.3). Lediglich mit Vitronectin wurde ein Anstieg des (Pro)Cathepsin X auf die zweifache Menge beobachtet. Da die anderen Matrixproteine in der gleichen Konzentration (10 μ g/ml) keine Veränderung verursachten, läßt dies auf einen spezifischen Vitronectin-Effekt schließen. Deshalb wurde der zugrundeliegende Wirkmechanismus im Folgenden näher untersucht.

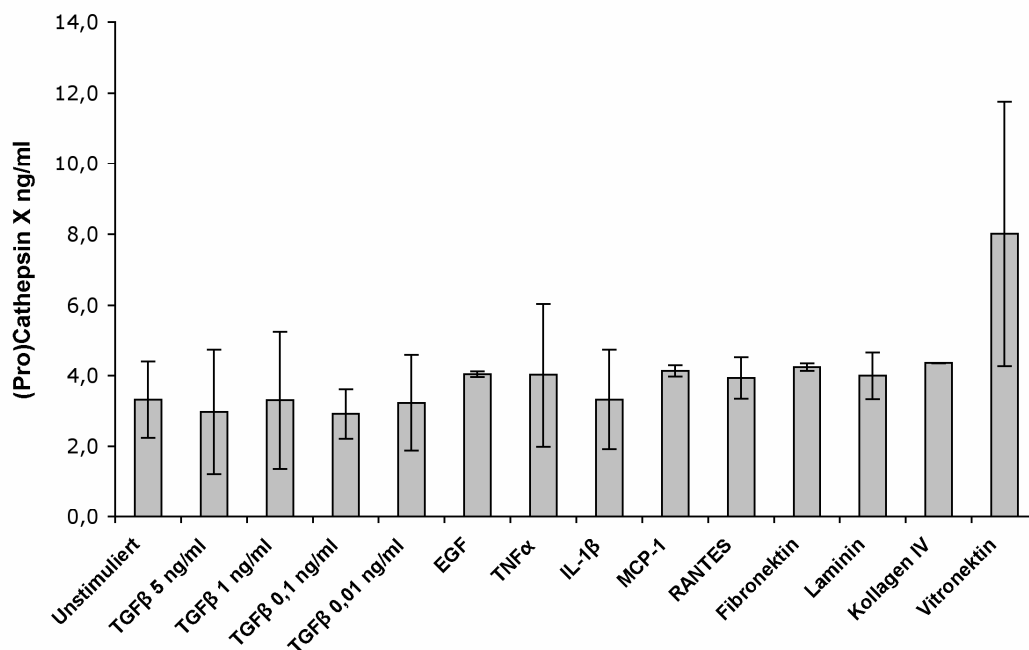


Abb.D.3: Stimulation von THP-1-Zellen mit Zytokinen und EZM-Proteinen. In zwei voneinander unabhängigen Versuchen wurden THP-1-Zellen mit TGF β (5; 1; 0,1; 0,001 ng/ml), EGF (100 ng/ml), TNF α (50 ng/ml), IL-1 β (500 U/ml), MCP-1 (100 ng/ml), RANTES (100 ng/ml), Fibronectin (10 μ g/ml), Laminin (10 μ g/ml) Kollagen IV (10 μ g/ml) und Vitronectin (10 μ g/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte die Messung von (Pro)Cathepsin X im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Nur Vitronectin bewirkte einen Anstieg von (Pro)Cathepsin X im Medium.

Es stellte sich nun die Frage, ob Vitronektin nur in Lösung oder auch immobilisiert an Zellkulturplatten in der Lage ist, die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X zu stimulieren, da es auch physiologisch in beiden Formen (d.h. in der Zirkulation bzw. als EZM-Bestandteil) vorkommen kann. Zudem sollte überprüft werden, ob die in löslicher Form nicht effektiven EZM-Proteine als Festphase eine Freisetzung von (Pro)Cathepsin X aus THP-1-Zellen induzieren. Deshalb wurden die Kavitäten der Zellkulturplatten mit jeweils 1 µg/ml der einzelnen EZM-Proteine beschichtet und die THP-1-Zellen in diesen Kavitäten ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde der Zellkulturüberstand im ELISA getestet. Abb.D.4 verdeutlicht, dass immobilisiertes Vitronektin im Gegensatz zur löslichen Form keinen Einfluss auf die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X bei THP-1 ausübte. Ebenso wenig wirkte sich Beschichtung mit Laminin, Fibronektin, Kollagen IV oder BSA auf diesen Prozess aus.

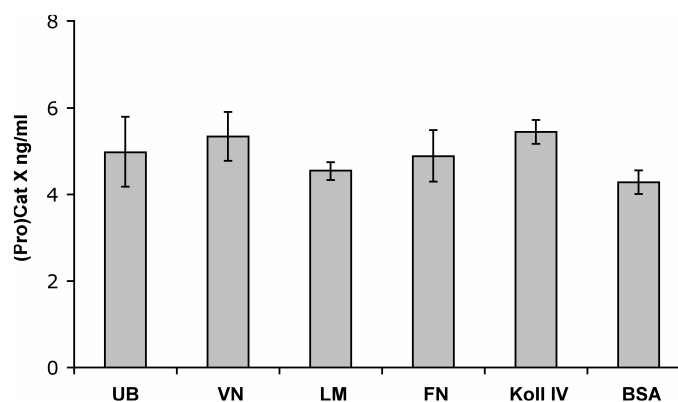


Abb.D.4: Stimulation von Zellen mittels EZM-Proteinbeschichtung. Zellkulturplatten wurden über Nacht mit Vitronektin (VN), Laminin (LM), Fibronektin (FN), Kollagen IV (Koll IV) oder BSA (Kontrolle) beschichtet; als weitere Kontrolle dienten unbeschichtete Kavitäten (UB). THP-1-Zellen wurden ausgesät und der (Pro)Cathepsin-X-Gehalt im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden mittels ELISA gemessen. Die EZM-Beschichtung führte zu keiner verstärkten Freisetzung von (Pro)Cathepsin X.

D.1.3.2 Wirkung von Vitronektin auf die Freisetzung von Cathepsin B und Cathepsin L

Um zu untersuchen, ob neben (Pro)Cathepsin X auch noch andere Cysteinproteasen nach Vitronektin-Stimulation vermehrt sezerniert werden, wurden THP-1-Zellkulturüberstände auf die Freisetzung der Cathepsine B und L hin untersucht. Für Cathepsin B stand ein ELISA zur Verfügung, während Cathepsin L mittels eines spezifischen Antikörpers im Western Blot untersucht wurde.

Wie in Abb.D.5 dargestellt, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Cathepsine ebenfalls nach Vitronektin-Stimulation (10 µg/ml) vermehrt ausgeschüttet werden. Ähnlich wie bei (Pro)Cathepsin X verdoppelte sich die Konzentration an Cathepsin B im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.D.5A). Eine deutliche Erhöhung der Konzentration an sezerniertem Cathepsin L nach Stimulation mit Vitronektin wurde auch im Western Blot sichtbar (Abb.D.5B). Die Bande entspricht in ihrer Laufhöhe (ca. 43 kDa) der Proform von Cathepsin L (Reilly et al., 1990).

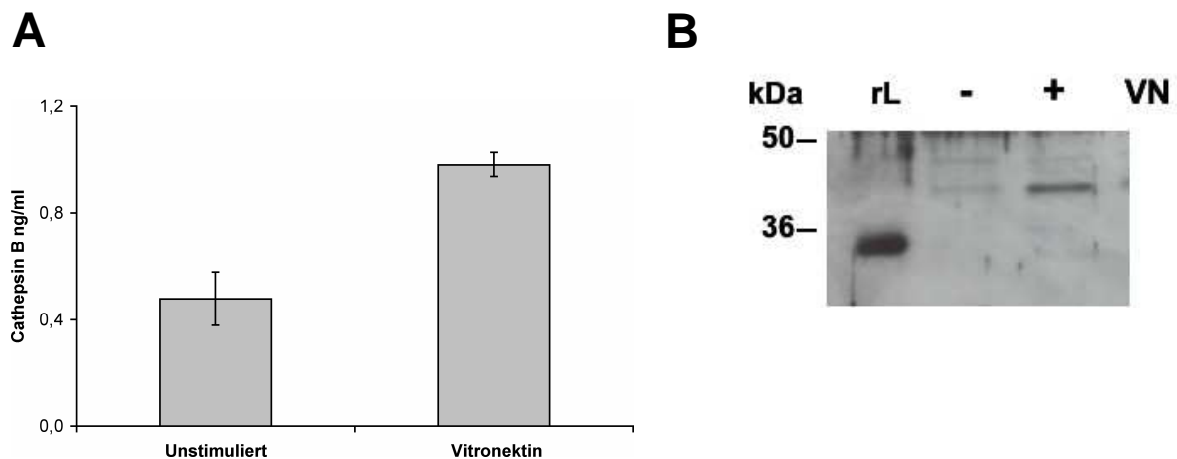


Abb.D.5: Stimulation von THP-1-Zellen mit Vitronectin. THP-1-Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Vitronectin für 24 Stunden stimuliert **A** Der (Pro)Cathepsin-B-Gehalt im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. VN führt zu einer Erhöhung der (Pro)Cathepsin-B-Konzentration. **B** Western Blot von THP-1-Zellkulturüberständen. VN führt zu einer Erhöhung der (Pro)Cathepsin-L-Konzentration. Anti-Cathepsin-L-Antikörper 1:2000; rL = rekombinantes Cathepsin L

D.1.3.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Vitronectin

Um die Bedingungen für eine optimale Stimulation der THP-1-Zellen zur Freisetzung von (Pro)Cathepsin X zu finden, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Vitronectin getestet und die verstärkte Sekretion von (Pro)Cathepsin X im ELISA gemessen. Ebenso sollte auch der Zeitverlauf der Stimulation verfolgt werden, um den am besten geeigneten Zeitpunkt für die Messung zu bestimmen.

Bereits nach 4 Stunden Inkubationszeit konnte man einen Effekt durch Vitronectin beobachten, der sich jedoch nach 6, 8 und 10 Stunden nicht weiter verstärkte (Abb.D.6A). Erst nach 24 Stunden kann man eine zweifache Erhöhung von (Pro)Cathepsin X im Medium beobachten. Nach 31 Stunden nahmen die Konzentration von (Pro)Cathepsin X im Zellkulturüberstand bereits wieder ab. Auch im Western Blot bei einem Zeitverlauf über vier Tage kann man einen Vitronectineffekt beobachten (Abb.D.6B). Da sich hier ebenso zeigte, dass nach 24 h die Stimulation durch Vitronectin am deutlichsten ausgeprägt war, wurden weitere Messungen immer zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

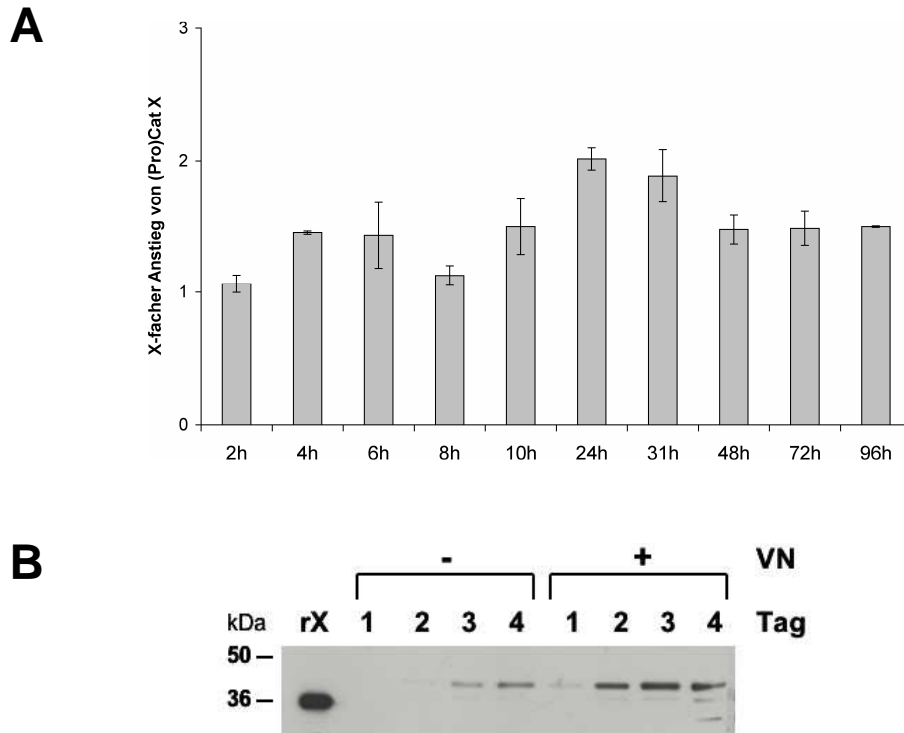


Abb.D.6: Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Vitronectin.

A THP-1-Zellen wurden mit 10 µg/ml VN stimuliert und die (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung zu verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA gemessen.

B Western Blot gegen (Pro)Cathepsin X in THP-1-Zellkulturüberständen mit und ohne Vitronectin-Stimulation nach 1, 2, 3 und 4 Tagen; rX = rekombinantes Cathepsin X. Mit beiden Methoden zeigt sich der deutlichste Effekt der Vitronectin-Stimulation nach 24 h.

Das Austesten verschiedener Vitronectinkonzentrationen zeigte, dass mit 1-2 µg/ml Vitronectin noch keine vermehrte Sekretion von (Pro)Cathepsin X beobachtbar ist (Abb.D.7). Erst ab 5 µg/ml war ein Effekt erkennbar, wobei die maximale Sekretion mit 10 µg/ml Vitronectin erreicht werden konnte. Da höhere Konzentrationen keinen stärkeren Anstieg erzielten, wurde bei weiteren Untersuchungen die Stimulation mit 10 µg/ml Vitronectin beibehalten.

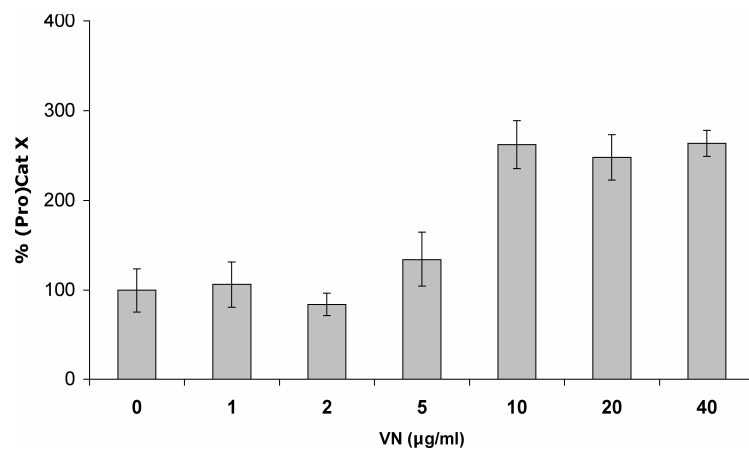


Abb.D.7: Stimulation von THP-1-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Vitronectin. THP-1-Zellen wurden mit unterschiedlichen VN-Konzentrationen stimuliert. Die Sezernierung von (Pro)Cathepsin X wurde nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Erst ab 5 µg/ml ist ein Effekt beobachtbar. Konzentrationen von 20 und 40 µg/ml bewirken keine Verstärkung der Freisetzung im Vergleich zu 10 µg/ml.

D.1.3.4 Verstärkte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X aus verschiedenen Zelltypen nach Vitronektin-Stimulation

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X nach Vitronektin-Stimulation auf THP-1-Zellen beschränkt ist, sollten auch andere Zelltypen (Tab.D1) untersucht werden. Wie sich herausstellte, konnten neben THP-1-Zellen auch HeLa, PNT1A, HEK293 und HUVEC zur (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung stimuliert werden (Tab.D.1). LNCaP und DU145 konnten dagegen nicht zu einer vermehrten Sezernierung angeregt werden, obwohl sie, wie PNT1A, aus Prostatagewebe stammen. Diese Ergebnisse machen somit deutlich, dass die Stimulierung der Zellen unterschiedlicher Herkunft durch Vitronektin nicht auf monozytäre Zellen beschränkt ist und die Wirkung auf die (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung eher vom einzelnen Zelltyp abhängt.

Zelllinie/ primäre Zellen	Morphologie	Herkunft	Verstärkte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X
THP-1	monozytär	Akute monozytäre Leukämie	+
HeLa	epithelial	Zervixkarzinom	+
DU145	epithelial	Prostatakarzinom	-
PNT1A	epithelial	Prostata, immortalisiert	+
LNCaP	fibroblastoid	Prostatakarzinom	-
HEK293	fibroblastoid	Embryonale Niere	+
HUVEC	endothelial	Humane Nabelschnur	+

Tab.D.1: Stimulation von unterschiedlichen Zelltypen mit Vitronektin. Alle Zellen wurden mit 10 µg/ml Vitronektin stimuliert und der Zellkulturüberstand nach 24 Stunden geerntet. Die (Pro)Cathepsin-X-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt.

D.1.3.5 Integrin $\alpha_v\beta_3$ als Bindungspartner der RGD-abhängigen Freisetzung von (Pro)Cathepsin X durch Vitronektin

Der am besten charakterisierte Rezeptor von Vitronektin ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$, auch Vitronektinrezeptor genannt (Pytela et al., 1985a). Vitronektin bindet an $\alpha_v\beta_3$ über ein RGD-Motiv. Um zu überprüfen, ob die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X auf eine Interaktion von Vitronektin über das RGD-Motiv mit einem Membranrezeptor zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit einem zyklischen RGD-Peptid in einer Endkonzentration von 100 µM für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dieses Peptid ist in der Lage, an RGD-abhängige Integrine zu binden und so die Interaktion mit anderen RGD-enthaltenden Liganden zu blockieren, wenn es in einem molaren Überschuss zugegeben wird. Nach der halbstündigen Präinkubation wurde Vitronektin (10 µg/ml) beigefügt und der Zellkulturüberstand nach 24 Stunden geerntet.

Durch die Präinkubation von THP-1-Zellen mit dem RGD-Peptid konnte die vermehrte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X nach Vitronektin-Stimulation deutlich reduziert werden (Abb.D.8A). Das RGD-Peptid selbst hatte keinen Einfluss. Dieses Ergebnis zeigt die RGD-Abhängigkeit der Interaktion von löslichem Vitronektin mit der Zelle.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob eine Interaktion von Vitronektin mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ für die Freisetzung von (Pro)Cathepsin X nötig ist. Dazu wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der spezifisch an $\alpha_v\beta_3$ bindet und Interaktionen mit Liganden blockieren kann (Cheresh, 1987). Wie sich herausstellte, konnte die Behandlung von THP-1-Zellen mit LM609 (10 $\mu\text{g/ml}$; 30 Minuten Präinkubation) eine Stimulation der Sekretion von (Pro)Cathepsin X durch Vitronektin signifikant verringern (Abb.D.8B). Interessanterweise bewirkte der Antikörper selbst bereits eine leichte Erniedrigung der Menge an (Pro)Cathepsin X im Zellüberstand. Dies lässt darauf schließen, dass im Medium oder in den Zusätzen (Nutridoma) Faktoren vorhanden sind, die über $\alpha_v\beta_3$ die Freisetzung von Cathepsinen stimulieren.

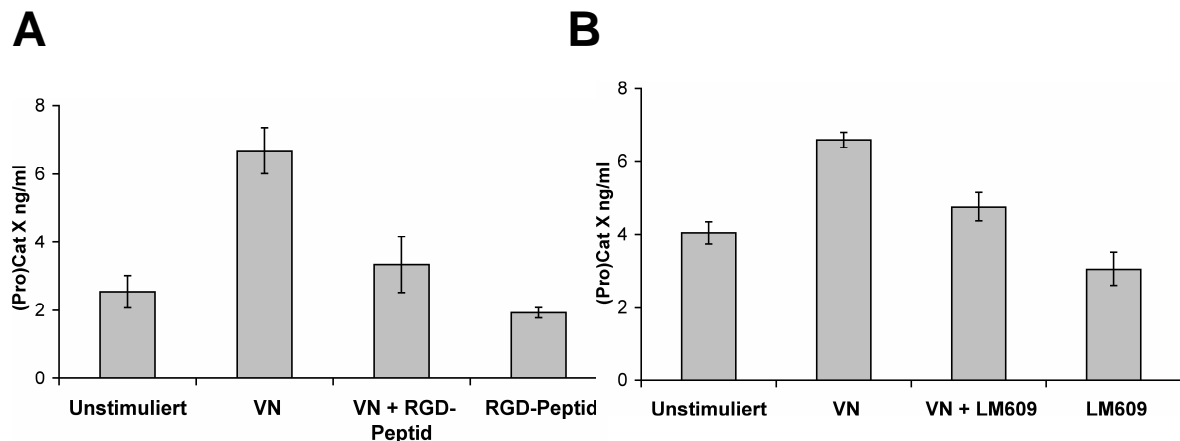


Abb. D.8: Blockierung der Vitronektin-Stimulation. THP-1-Zellen wurden mit einem RGD-Peptid (100 μM) (A) oder mit dem blockierenden Antikörper LM609 (B) für 30 Minuten im CO_2 -Inkubator präinkubiert und anschließend mit 10 $\mu\text{g/ml}$ VN stimuliert. Die Messung der (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung erfolgte nach 24 Stunden mittels ELISA. Sowohl durch das RGD-Peptid als auch durch LM609 wird die VN-induzierte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X gehemmt.

D.1.3.6 Einfluss von Tunicamycin, Brefeldin A und Cycloheximid auf die Vitronektin-induzierte (Pro)Cathepsin-X-Freisetzung

Der Freisetzung von (Pro)Cathepsin X können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. So sollte untersucht werden, ob Vitronektin die Proteinsynthese von Procathepsin X verstärkt und dadurch mehr von der Protease ins Medium gelangt oder ob der sekretorische Weg beeinflusst wird, so dass mehr (Pro)Cathepsin-X-haltige Vesikel ausgeschüttet werden.

Wie Abb.D.9 zeigt, resultierte die vermehrte Sezernierung von (Pro)Cathepsin X nach Vitronektin-Stimulation intrazellulär in einer leichten Verringerung der Konzentration. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass nur der Vesikeltransport gesteigert wird, nicht jedoch die Translation von Cathepsin X.

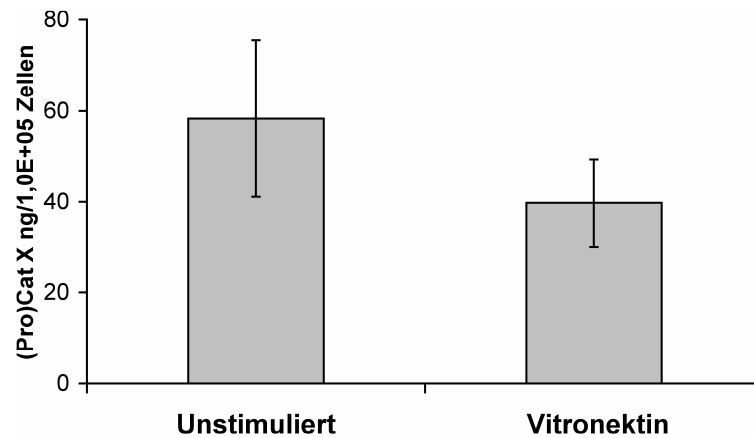


Abb.D.9: Stimulation von THP-1-Zellen mit Vitronectin. THP-1-Zellen wurden mit 10 µg/ml VN stimuliert und nach 24 Stunden die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der intrazelluläre (Pro)Cathepsin-X-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Nach VN-Stimulation kann eine Verringerung der (Pro)Cathepsin-X-Konzentration in Lysaten beobachtet werden.

Um genauer zu untersuchen, ob sich die Stimulation von THP-1-Zellen mit Vitronectin auf die Proteintranslation und/oder den Proteintransport auswirkt, wurden die Zellen mit jeweils 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml Brefeldin A, Cycloheximid oder Tunicamycin für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 10 µg/ml Vitronectin behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch überprüft.

Brefeldin A, ein Lacton-Antibiotikum, inhibiert eine Proteinfamilie, die für den Transport von Membranen essentiell ist (Zeghouf et al., 2005). Dadurch wird der Vesikeltransport in der Zelle unterbunden. Tunicamycin blockiert die N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum (Kuo & Lampen, 1974). Da die Zuckerseitenketten von Proteinen für deren Transport und Lokalisierung in zellulären Organellen entscheidend sind, wird auf diese Weise auch der Proteintransport verhindert. Cycloheximid hemmt die Peptidyltransfer-Aktivität der 60S-ribosomalen Untereinheit, und somit die Proteintranslation (Siegel & Sisler, 1963).

Die Messung nach 24 Stunden zeigte, dass im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle nur nach Vorinkubation mit Cycloheximid noch eine verstärkte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X möglich war, während mit Brefeldin A und Tunicamycin bereits bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml die Zellen auf Vitronectin nicht mehr reagieren konnten (Abb.D.10). Dies deutet darauf hin, dass zumindest in einem Zeitraum von 24 Stunden unter Vitronectin-Stimulation lediglich Cathepsin X freigesetzt wird, welches bereits fertig synthetisiert ist.

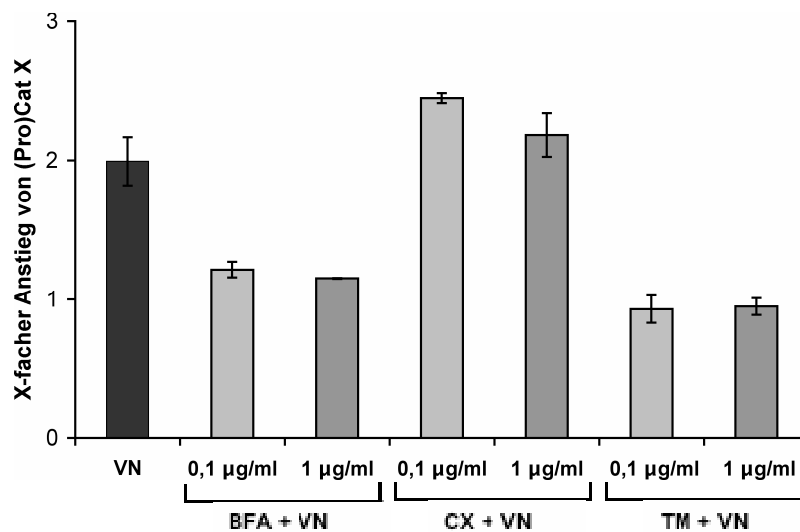


Abb.D.10: Inkubation von THP-1-Zellen mit Brefeldin A (BFA), Cycloheximid (CX) und Tunicamycin (TM) bei gleichzeitiger Stimulation mit Vitronektin (VN). THP-1-Zellen wurden mit jeweils 0,1 bzw. 1 µg/ml BFA, CX oder TM für 1 Stunde präinkubiert und anschließend mit 10 µg/ml VN für 24 Stunden inkubiert. Mittels ELISA wurde die Menge an (Pro)Cathepsin X im Zellkulturüberstand bestimmt. Das Diagramm zeigt die x-fache Freisetzung von (Pro)Cathepsin X nach VN-Stimulation im Vergleich zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle. BFA und TM hemmen die Freisetzung, während sie mit CX noch stattfinden kann.

D.2 Niederregulation von (Pro)Cathepsin X zur Funktionsanalyse

Die Bedeutung von Cystein-abhängigen Cathepsinen bei der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren wird in einem aktuellen Übersichtsartikel von Mohamed und Sloane dargestellt (Mohamed & Sloane, 2006). Es wird deutlich, dass die Sekretion von manchen Cathepsinen einen großen Einfluss auf die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration ausübt. Da in den vorhergehenden Versuchen eine Induzierbarkeit der (Pro)Cathepsin X-Freisetzung durch Vitronektin gezeigt wurde, sollte in einer weiteren Versuchsreihe eine mögliche Rolle der Protease bei der Migration/Invasion von Zellen durch EZM (=Transmigration/Invasion) untersucht werden.

Um die zelluläre Funktion eines Proteins näher zu charakterisieren, benötigt man Testsysteme, die die Beteiligung des betreffenden Proteins an bestimmten Prozessen wie etwa der Migration messbar machen. So besteht z.B. durch Verringerung oder Verstärkung der Expression des Proteins die Möglichkeit, Hinweise auf seine natürliche Funktion zu erhalten. In unserem Ansatz haben wir uns für die Expressionserniedrigung von (Pro)Cathepsin X mittels Transfektion von entsprechenden siRNAs entschieden.

D.2.1 Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mittels siRNA in HUVEC

Da THP-1-Zellen bei Transfektionen nur sehr schlechte Effizienzen aufweisen, wurden die weit besser transfizierbaren HUVEC für die Einschleusung von siRNA und die Transmigrationsversuche verwendet.

D.2.1.1 Überprüfung der siRNA-Effizienz auf RNA-Ebene

In einem Vorversuch wurden fluoreszierende siRNAs eingesetzt, um die optimalen Konzentrationen an siRNA und Transfektionsreagenz zu finden. Getestet wurden 10, 20, 30, 40 und 50 nM siRNA in Kombination mit 1,5, 3, 4,5 und 6 µl Transfektionsreagenz pro Vertiefung einer 24-well Platte. Als Transfektionsreagenzien wurden Lipofectamin 2000 und HiPerFect verwendet. Beste Transfektionseffizienzen wurden für HiPerFect bei 50 nM siRNA mit 4 µl Transfektionsreagenz pro Vertiefung bestimmt. Für Lipofectamin 2000 lag die beste Effizienz bei 40 nM siRNA mit 1 µl Transfektionsreagenz pro Vertiefung. Diese Mengenverhältnisse wurden für die folgenden Transfektionsversuche eingesetzt.

Für die Messung der Niederregulation der Cathepsin-X-RNA wurden HUVEC mit verschiedenen siRNAs transfiziert und die Effizienz mittels LightCycler™ nach 1, 2, 3 und 4 Tagen gemessen. Verwendet wurden dabei eine Kontroll-siRNA, die keine Sequenzübereinstimmung mit bekannten mRNA-Sequenzen zeigt („*nonsilencing*“) und eine Cathepsin-X-spezifische siRNA, die nach den Kriterien von Reynolds et al. (2004) ausgewählt wurde (CatX304). Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Derivat von CatX304 eingesetzt („*mismatch*“). Bei dieser siRNA sind willkürlich zwei Basen ausgetauscht worden. Für Effizienzbestimmungen wurden Transfektionsreagenzien Lipofectamin 2000 und HiPerFect miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass die Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mit beiden Transfektionsreagenzien bereits am ersten Tag sehr stark ausgeprägt war und nahezu über die gesamte Zeitspanne von vier Tagen anhielt, wobei Lipofectamin 2000 einen noch deutlicheren Effekt als HiPerFect aufwies (Abb.D.11). An Tag 1 und 2 nach der Transfektion konnte für Lipofectamin 2000 eine Verringerung der Cathepsin-X-RNA um mehr als 90 % beobachtet werden, an Tag 3 und 4 um ca. 80 %. HiPerFect hatte den stärksten Effekt an Tag 1 (ca. 80 %), während an Tag 2 und 3 nur noch ungefähr 50-70 % der RNA niederreguliert waren. Am Tag 4 wurde bereits wieder 60 % der Cathepsin-X-RNA exprimiert. Überraschenderweise zeigte die „*mismatch*“-Kontrolle ebenfalls Veränderungen in der mRNA-Expression. Für Lipofectamin 2000 konnte eine Verringerung der Cathepsin-X-RNA-Menge an Tag 1 und 2 gemessen werden, an den Tagen 3 und 4 schien sich die RNA-Menge jedoch zu erhöhen. Bei HiPerFect-transfizierten Zellen wurde eine leichte Verstärkung der RNA-Bildung an den ersten beiden Tagen und eine deutlicherer Erhöhung an den Tagen 3 und 4 beobachtet.

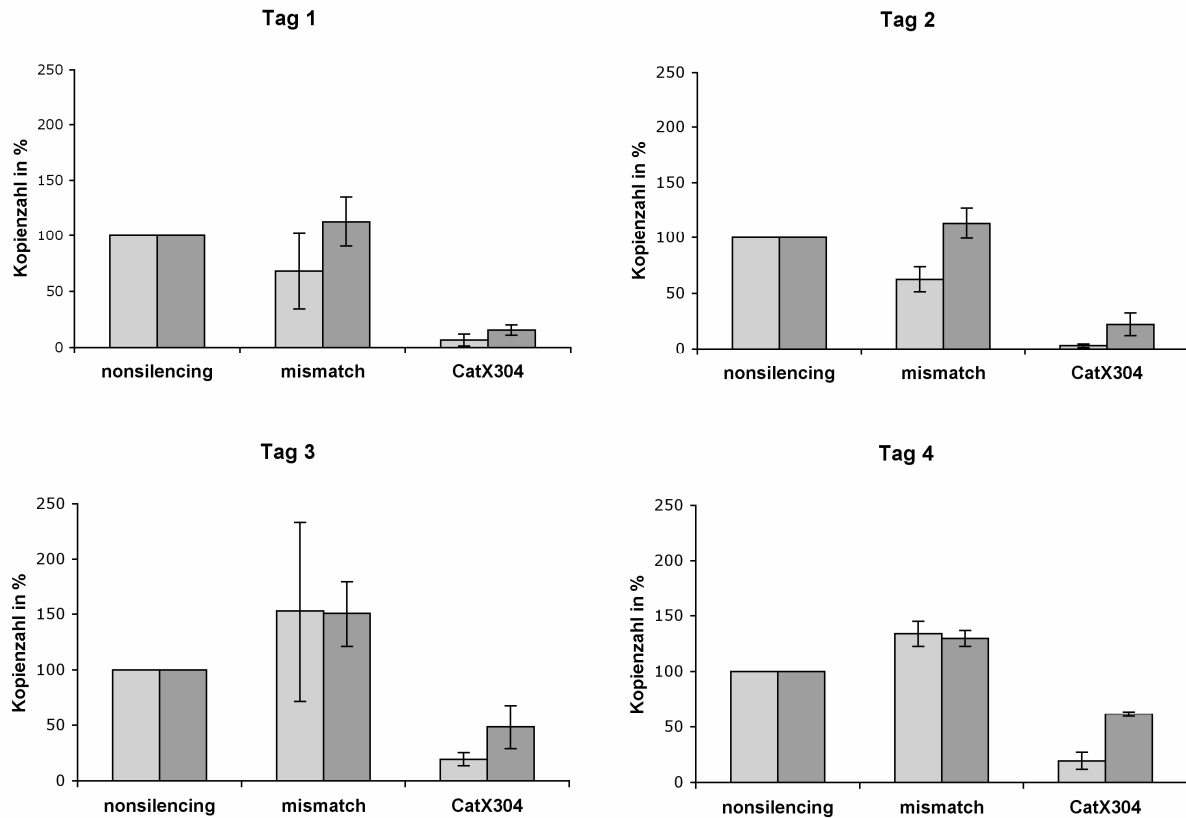


Abb.D.11: Niederregulierung der Cathepsin-X-RNA im Verlauf von 4 Tagen. HUVEC wurden mit je 50 nM (HiPerFect, dunkelgraue Balken) oder 40 nM (Lipofectamin 2000, hellgraue Balken) siRNA transfiziert. Dazu verwendet wurden eine unspezifische siRNA („nonsilencing“), eine Cathepsin-X-spezifische siRNA (CatX304) und ein Derivat von CatX304, welches zwei Mutationen aufweist („mismatch“). Nach 1, 2, 3 und 4 Tagen wurden die Gesamt-RNA isoliert und der Gehalt an Cathepsin-X-mRNA mittels LightCycler™ gemessen. Es wurden gleiche RNA-Konzentrationen eingesetzt. Graphisch dargestellt ist die Anzahl an Cathepsin-X-mRNA Kopien in % zur „nonsilencing“-Kontrolle. Die spezifische siRNA CatX304 zeigt an allen vier Tagen mit beiden Transfektionsreagenzien eine deutliche Niederregulierung.

D.2.1.2 Überprüfung der siRNA-Effizienz auf Proteinebene

Für die Überprüfung der Niederregulierung von (Pro)Cathepsin X auf Proteinebene wurden HUVEC unter den in D.2.1.1 dargestellten Bedingungen transfiziert, nach 1, 2, 3 und 4 Tagen lysiert und die Konzentrationen an (Pro)Cathepsin X mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Für beide Transfektionsreagenzien konnte bereits nach einem Tag eine extreme Niederregulierung der Proteinbildung von (Pro)Cathepsin X auf ca. 20 % (Lipofectamin 2000) bzw. ca. 10 % (HiPerFect) gemessen werden (Abb.D.12). Ein deutlicher Rückgang der Protein-Expressionsreduktion war erst am Tag 4 zu beobachten, insbesondere bei Verwendung des HiPerFect-Reagens.

Ähnlich wie auf RNA-Ebene traten auch auf Protein-Ebene Veränderungen im (Pro)Cathepsin-X-Gehalt mit der „mismatch“-siRNA auf. Dies äußerte sich bei mit HiPerFect-transfizierten Zellen in einer Verringerung der (Pro)Cathepsin X Menge im Lysat an Tag 1, gefolgt von einem Anstieg an Tag 2 und 3. An Tag 4 konnte man erneut eine leichte

Verringerung in der (Pro)Cathepsin-X-Konzentration messen. Bei Lipofectamin 2000-transfizierten Zellen war an den Tagen 1 und 3 eine Erhöhung der (Pro)Cathepsin-X-Menge und an den Tagen 2 und 4 eine Verringerung zu beobachten. Obwohl die Schwankungen innerhalb der Triplet-Werten bei beiden Transfektionsreagenzien zum Teil relativ hoch waren, wurde jedoch deutlich, dass auch die „*mismatch*“-siRNA die Proteinexpression von (Pro)Cathepsin X beeinflusste.

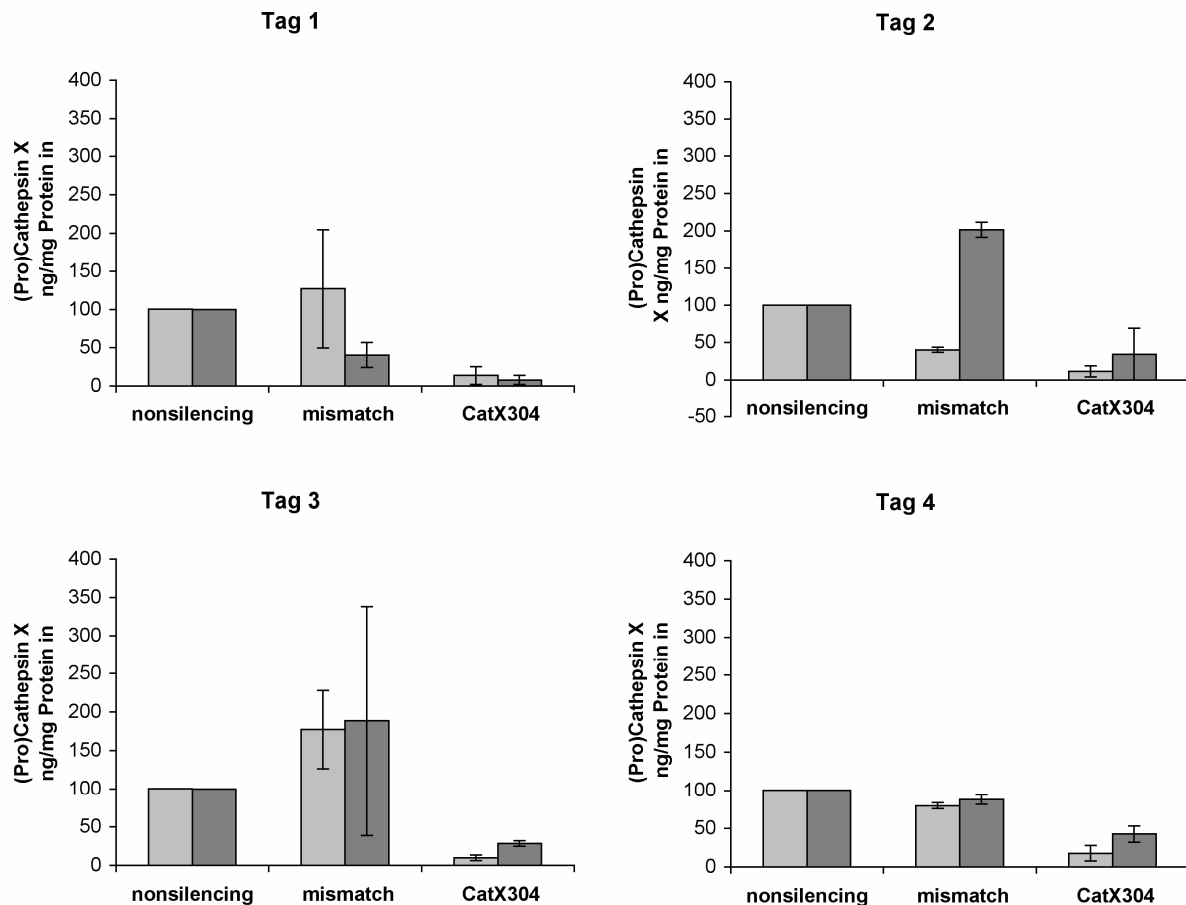


Abb. D.12: Niederregulierung von (Pro)Cathepsin X im Verlauf von 4 Tagen. HUVEC wurden mit je 50 nM (HiPerFect dunkelgraue Balken) oder 40 nM (Lipofectamin 2000, hellgraue Balken) siRNA transfiziert. Dazu verwendet wurden eine unspezifische siRNA („*nonsilencing*“), eine Cathepsin-X-spezifische siRNA (CatX304) und ein Derivat von CatX304, welches zwei Mutationen aufweist („*mismatch*“). Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000 (hellgrau) und HiPerFect (dunkelgrau). Nach 1, 2, 3 und 4 Tagen wurden Lysate hergestellt und der Gehalt an (Pro)Cathepsin X mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die Konzentration an (Pro)Cathepsin X pro mg zelluläres Gesamtprotein in % zur „*nonsilencing*“-Kontrolle. Die Cathepsin-X-spezifische siRNA CatX304 führt mit beiden Transfektionsreagenzien zu einem deutlichen Rückgang der Proteinbildung.

D.2.2 Evaluierung von (Pro)Cathepsin X bei der Invasionsfähigkeit von HUVEC

Zur Funktionsanalyse von (Pro)Cathepsin X im Rahmen der Transmigrationsfähigkeit (Invasion) von HUVEC bedienen wir uns eines Transwell-Assays (Boyden-Kammer). Hierbei wurde die zu durchwandernde humane EZM auf eine poröse Membran aufgebracht, die die beiden Kammern des Transwell-Systems trennt. Da die Niederregulierung von (Pro)Cathepsin X mittels siRNA über drei Tage nach der Transfektion vorhält (siehe

Abb.D.12), sollte der Invasionsversuch am Tag 3 nach der Transfektion durchgeführt werden, um den Zellen Gelegenheit zu geben, sich von der Transfektion zu erholen. Zudem war es für den Invasionsversuch wichtig, die Zellen am Vortag zu splitten, da dies ihre Fähigkeit zu invadieren verbessert (eigene Beobachtung). Dies bewirkte jedoch eine starke Proliferation der Zellen, was vermutlich zu einem Ausdünnen der siRNA, und somit zu einem schnellen Rückgang der Niederregulation führte. Somit waren die Zellen am Tag des Invasionsversuchs nicht mehr ausreichend niederreguliert, weshalb sie am Tag vor dem Invasionsversuch ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen transfiziert und anschließend gesplittet wurden. Hierfür wurden wie oben beschrieben eine unspezifische siRNA („*nonsilencing*“), eine mutierte siRNA („*mismatch*“) oder eine Cathepsin-X-spezifischen siRNA (CatX304) in HUVEC eingebracht. Zusätzlich wurde eine zweite Cathepsin-X-spezifische siRNA eingesetzt (CatX913), die jedoch an einer anderen Stelle der mRNA als CatX304 bindet. Für die Transfektion wurde HiPerFect verwendet, da es im Vergleich zu Lipofectamin 2000 ähnlich gute Transfektionseffizienzen aufweist (siehe auch D.2.1) und zudem schonender für HUVEC ist.

Im Invasionsassay konnten mit beiden spezifischen siRNAs gegen Cathepsin X deutlich weniger invadierte HUVEC gezählt werden (Abb.D.13), wobei für CatX304 die Invasivität um ca. 70 % und für CatX913 um ca. 50 % verringert war. Auch in diesem Versuch zeigte die „*mismatch*“-siRNA einen Effekt in Richtung einer leicht erhöhten Invasionsrate. Dieses Ergebnis konnte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen beobachtet werden.

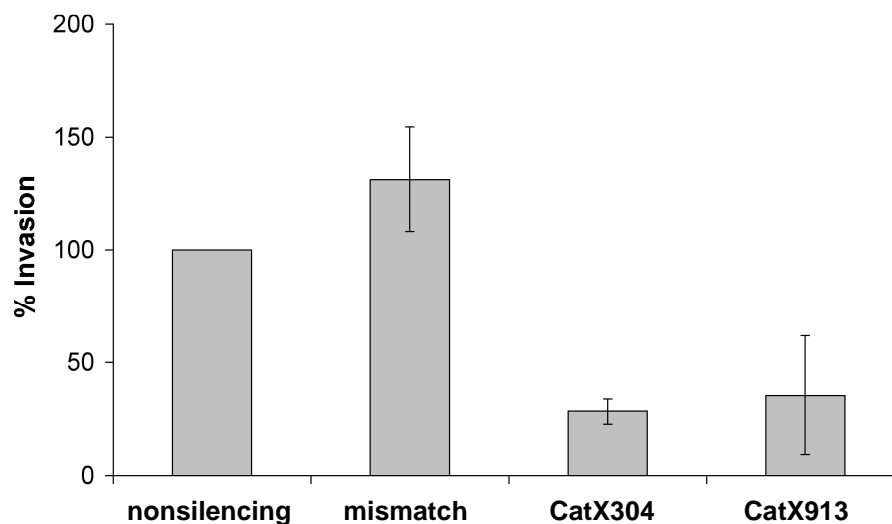


Abb.D.13: Transmigrationsversuch mit (Pro)Cathepsin-X-niederregulierten HUVEC. HUVEC wurden unter Verwendung von HiPerFect mit je 50 nM einer unspezifischen siRNA („*nonsilencing*“), zweier Cathepsin-X-spezifischen siRNAs (CatX304 und CatX913) und einem Derivat von CatX304 („*mismatch*“) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen transfiziert. Die Zellen wurden gesplittet und am nächsten Tag in eine Boyden-Kammer ausgesät. Die Membranen wurden zuvor mit humaner EZM beschichtet, die Porengröße betrug 8 μm . HUVEC, die mit CatX304 oder CatX913 transfiziert sind, zeigen eine verringerte Invasivität. Die „*mismatch*“-siRNA verursacht eine leichte Steigerung der Invasivität. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche, wobei die Ansätze jeweils als Triplett-Werte gemessen wurden.

Von den im Invasionsversuch eingesetzten Zellen wurde ein Teil zurückbehalten und für die Kontrolle der Niederregulation lysiert. Zusätzlich wurden auch Proben der Zellkulturüberstände vor dem Ablösen der Zellen entnommen. Lysate und Überstände wurden qualitativ im Western Blot und quantitativ im ELISA untersucht (Abb.D.14).

Der Western Blot zeigte für CatX304 eine deutlich schwächere Bande verglichen mit den Kontrollen „*nonsilencing*“ und „*mismatch*“ (Abb.D.14A). CatX913 scheint weniger effektiv zu sein, aber eine Niederregulation kann trotzdem bestätigt werden. Auch in den Zellkulturüberstand wurde bei CatX304- und CatX913-niederregulierten Zellen weniger (Pro)Cathepsin X sezerniert. Mittels ELISA wurde deutlich, dass bei CatX304 eine Niederregulation von (Pro)Cathepsin X um ca. 80 % erreicht werden konnte (Abb.D.14). CatX913 war etwas weniger effektiv, es konnte jedoch trotzdem noch eine Verringerung um ca. 70 % gemessen werden. Hier zeigte sich wieder, dass auch die „*mismatch*“-siRNA einen Effekt auf die Translation von (Pro)Cathepsin X hat, da die Konzentration um ca. 20 % vermindert war. Diese Ergebnisse konnten sowohl in den Lysaten (Abb.D.14B), als auch in den Zellkulturüberständen (Abb.D.14C) beobachtet werden.

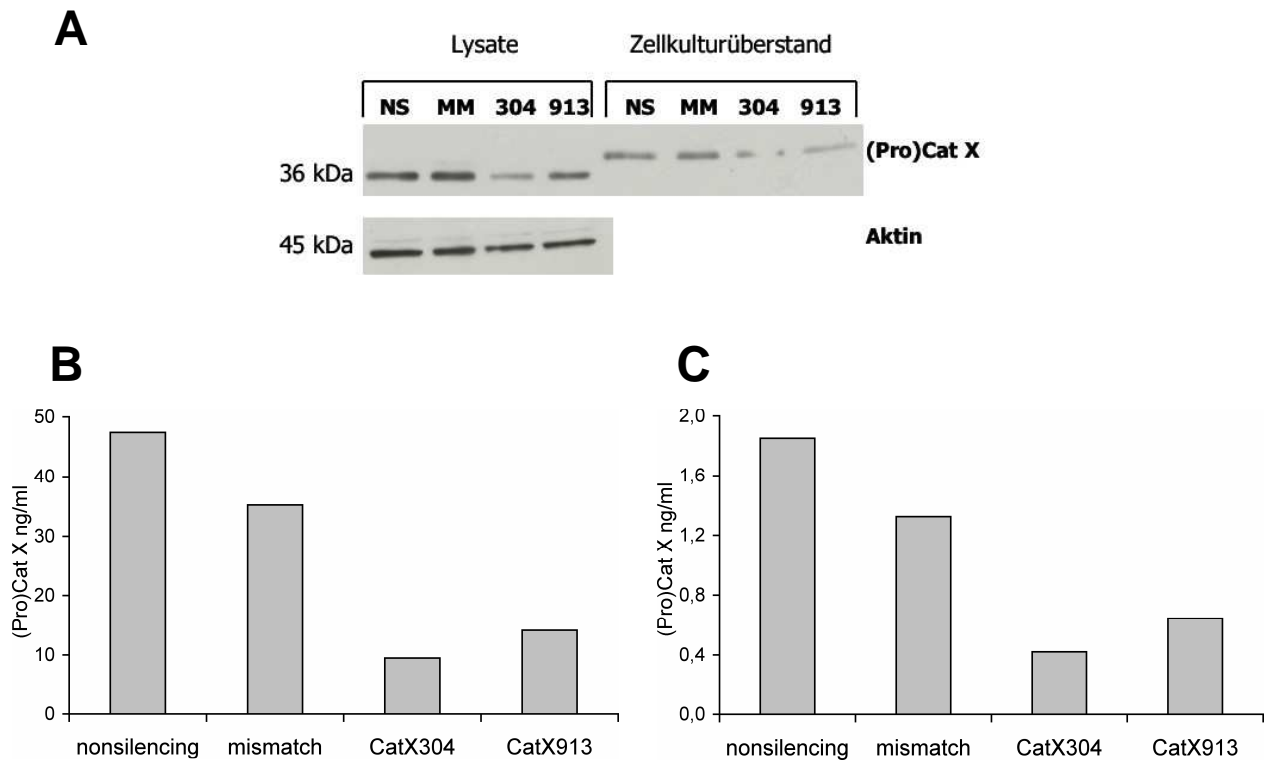


Abb.D.14: Niederregulation von (Pro)Cathepsin X in Lysaten und Zellkulturüberstand von HUVEC. Mittels Western Blot (A) und ELISA (B Lysate, C Zellkulturüberstand) wurde der Gehalt an (Pro)Cathepsin X in Zellkulturüberständen und Lysaten (1×10^7 Zellen/ml) von HUVEC, die im Invasionsversuch eingesetzt wurden, gemessen. Mit den beiden spezifischen siRNAs CatX304 und CatX913 kann im Vergleich zur unspezifischen siRNA-Kontrolle eine deutliche Niederregulation gemessen werden. Die „*mismatch*“-siRNA führt ebenfalls zu einer Verringerung von (Pro)Cathepsin X.

Die Ergebnisse der Transmigrationsversuche zeigen somit deutlich, dass (Pro)Cathepsin X direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Invasion von Zellen ausübt. In den folgenden Versuchen sollte nun ein möglicher Wirkmechanismus aufgeklärt werden.

D.3 Procathepsin X als Bindungspartner von RGD-abhängigen Integrinen

Procathepsin X hat einige Eigenschaften, die dieser Protease eine Sonderstellung unter den Cathepsinen einräumt. Ein Beispiel dafür ist die Aminosäuresequenz RGD im Propeptid, die eine Bindung an RGD-erkennende Integrine ermöglichen könnte, welche ihrerseits eine wesentliche Rolle bei der Migration von Zellen spielen. Im Folgenden werden Versuchsergebnisse gezeigt, die auf Procathepsin X als Bindungspartner für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ schließen lassen.

D.3.1 Herstellung und Expression von Procathepsin-X-Mutanten

Da eine mögliche Interaktion von Procathepsin X mit RGD-abhängigen Integrinen untersucht werden sollte, wurden zwei mutierte Formen der Protease hergestellt, die in verschiedenen Versuchen als Kontrollproteine dienen sollten. Bei den Mutanten wurde das in der Proregion enthaltene RGD-Motiv entweder zu AAA oder zu RAD verändert. Diese Mutationen wurden über gerichtete Mutagenese in einer PCR-Reaktion eingeführt. Die Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass zusätzlich zur Mutation der Aminosäuren RGD noch eine Restriktionsstelle für NheI eingeführt wurde, die die anschließende Suche nach passenden Klonen erleichterte. Die NheI-Schnittstelle wirkt sich lediglich in einer stillen Mutation aus. Zusätzlich wurde durch die Mutation zu AAA eine Restriktionsschnittstelle für PstI generiert, die ebenfalls für die Detektion mutierter Plasmide verwendet werden konnte. Die Mutagenese wurde in dem Vektor pGEM-11Zf(+) durchgeführt, um ungewünschte Mutationen im Rückgrat des Hefe-Expressionsvektors zu vermeiden. Deshalb musste das mutierte Gen anschließend aus dem pGEM-Vektor isoliert und in den Hefe-Expressionsvektor pPIC9 eingebracht werden. Zuvor wurden die jeweiligen Klone sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen.

Die Konstrukte wurden über Elektroporation in den *Pichia pastoris* Stamm GS115 eingebracht und die Hefen anschließend selektioniert. Von den selektionierten Klonen wurden Testkulturen angeimpft und der Hefekulturüberstand auf das Vorhandensein der jeweiligen Proteasen-Variante untersucht (Abb.D.15). Klone mit der stärksten Expression wurden für die Aufreinigung ausgewählt. Rekombinantes Wildtyp-Protein war bereits im Labor als Pro- und auch als gereifte Form vorhanden und musste deshalb nicht neu aufgereinigt werden. Um das Vorhandensein der jeweiligen Proregionen zu überprüfen, wurde zum Vergleich gereiftes Cathepsin X auf das Gel aufgetragen. Die Laufhöhe von den mutierten Procathepsin-X-Formen unterschied sich bei allen Klonen deutlich zum gereiften Protein, was auf das Vorhandensein der Proregion hinweist.

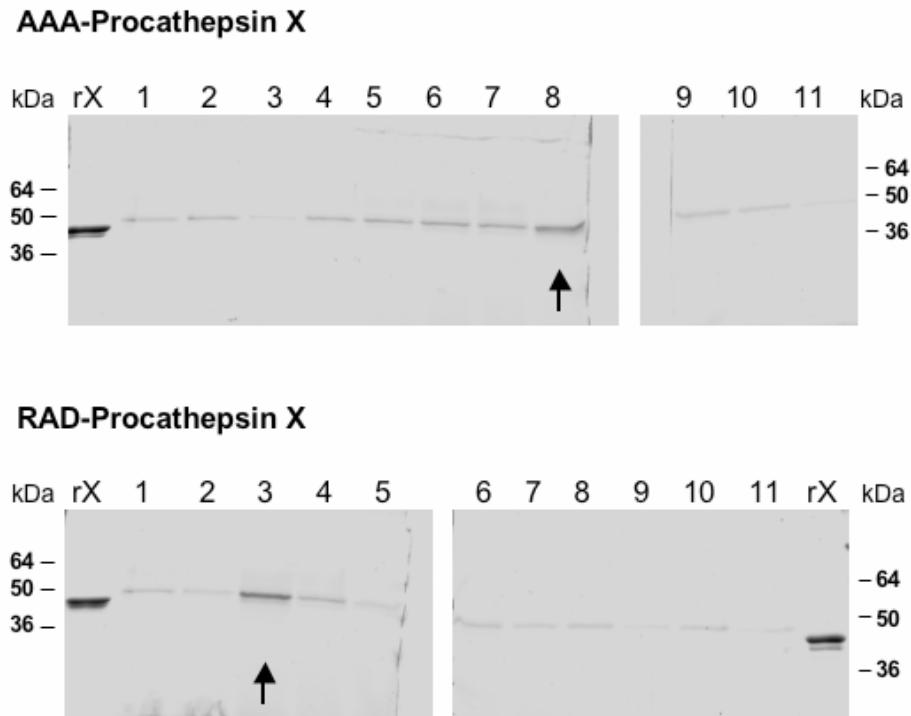
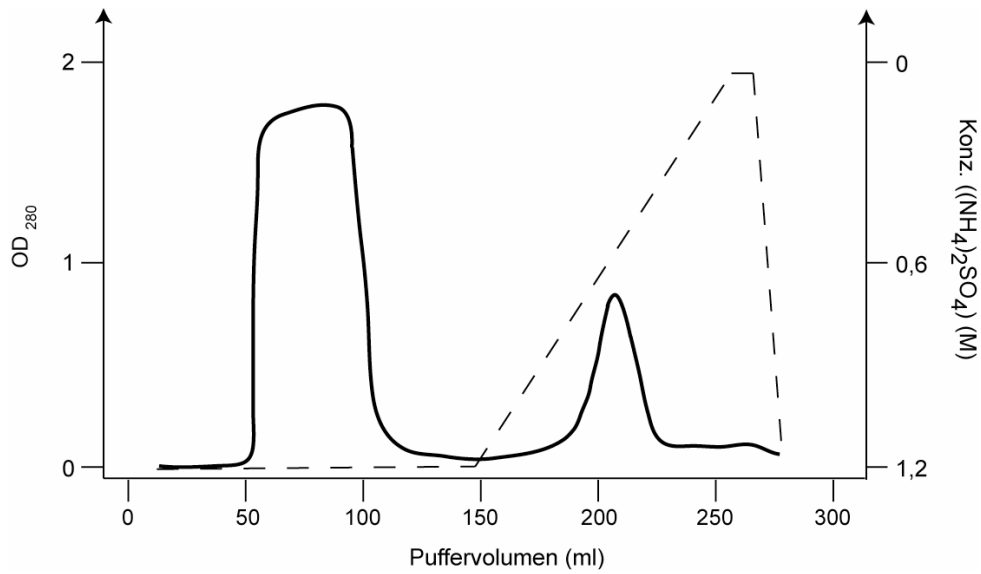
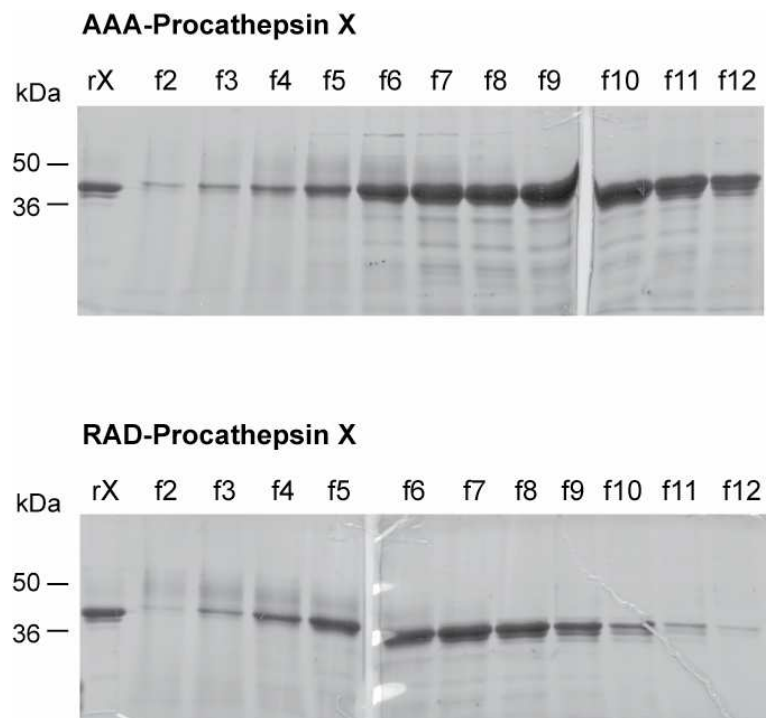


Abb.D.15: SDS-PAGE von Hefe-Testkulturen. Die Hefen wurden mit Expressionskonstrukten transformiert, die die Gene für mutierte Procathepsin-X-Proteine enthalten. Der Kulturüberstand von Hefeklonen wurde in einer SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die Klone zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Expressionsstärke. Klone mit der stärksten Expression (Pfeile) wurden für die Großkultur ausgewählt. M=Marker, rX= rekombinantes Cathepsin X, 1-11 = Klone

Nach der Anzucht der Großkultur und der Induktion der Genexpression mittels Methanol wurde der Kulturüberstand auf 50 ml ankonzentriert und das jeweilige rekombinante Enzym mittels Butyl-Sepharose chromatographisch aufgereinigt. In Abb.D.16A ist exemplarisch das Elutionsprofil für die Aufreinigung von RAD-Procathepsin X dargestellt. Die rekombinanten Proteine eluieren beide bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von ca. 0,5 M. Die eluierten Enzyme wurde in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit und Konzentration überprüft (Abb.D.16B). Die dominanten Banden entsprechen den Procathepsin-X-Mutanten. Zusätzliche Banden sind nur schwach ausgeprägt. Je vier Fraktionen wurden vereinigt und deren Konzentrationen mittels Absorptionsmessung bestimmt. Es konnten aus jeweils 250 ml Hefekulturüberstand 9,5 mg RAD-Procathepsin X und 22 mg AAA-Procathepsin X gewonnen werden.

A**B****Abb.D.16: Aufreinigung zweier Procathepsin-X-Mutanten.**

A Elutionsprofil der chromatographischen Aufreinigung von RAD-Procathepsin X. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der Salzkonzentration ((NH₄)₂SO₄), die durchgezogene Linie die Proteinkonzentration (OD₂₈₀). Zunächst wurde der Hefe-Kulturüberstand bei 1,2 M (NH₄)₂SO₄ auf die Säule geladen und anschließend gewaschen. Das gebundene Protein eluiert ungefähr bei 0,5 M (NH₄)₂SO₄ und wurde in Fraktionen gesammelt.

B Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Es zeigte sich, dass der Großteil des eluierten Proteins aus der jeweiligen Mutante besteht. rX = rekombinantes Cathepsin X; f2-f12 = Fraktionen.

Um sicher zu stellen, dass die Proregion vollständig enthalten ist, wurden AAA-Procathepsin X und RAD-Procathepsin X auf eine PVDF-Membran geblottet und N-terminal sequenziert (R. Mentele, AG Lottspeich, Max-Planck Institut, Martinsried). Für beide Mutanten wurde die N-terminale Sequenz AQQGLYF bestimmt und somit die Vollständigkeit der Proregion bestätigt.

Da *P. pastoris* starke Glykosylierungen an rekombinanten Proteinen durchführt, wurden die verwendeten Mutanten von Procathepsin X und auch (Pro)Cathepsin X selbst mittels EndoH deglykosyliert, um sterische Behinderungen durch die Zuckerketten bei den folgenden Interaktionsversuchen zu vermeiden.

D.3.2 Adhäsion von HUVEC über Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Procathepsin X

Da Procathepsin X in seiner Proregion ein RGD-Motiv besitzt, wurde in einem Adhäsionsversuch überprüft, ob HUVEC in der Lage sind, über RGD-abhängige Integrine an Procathepsin X zu binden. Für die in Abb.D.17 gezeigten Ergebnisse wurden Mikrotiterplatten mit Procathepsin X beschichtet. Danach wurden HUVEC in die Vertiefungen ausgesät und für 90 Minuten im Brutschrank belassen, um ihnen eine Anheftung zu ermöglichen. In zwei Ansätzen wurden den Zellen je 0,5 μM zyklisches RGD- oder RAD-Peptid zugegeben, um die RGD-Abhängigkeit der Bindung zu prüfen. Während das RGD-Peptid als Kompetitor dienen sollte, wurde das RAD-Peptid als unspezifische Kontrolle verwendet, da der Austausch von Glyzin durch Alanin eine Erkennung des Motives durch Integrine verhindert. Der Versuch machte deutlich, dass HUVEC an beschichtetes Procathepsin X binden können, und dass die Interaktion durch das zyklische RGD-Peptid unterbunden werden kann. Das RAD-Peptid hingegen hat keine Auswirkung auf die Adhäsion der Zellen.

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe zweier blockierenden Antikörpern (LM609; JBS5) das für die Interaktion verwendete Integrin näher definiert werden. Der $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Antikörper LM609 blockiert die Interaktion von Liganden an das Integrin und ist in der Lage, die Adhäsion von HUVEC an beschichtetes Vitronektin zu verhindern (Cheresh, 1987). JBS5 kann als spezifischer Antikörper für den Fibronektin-Rezeptor (Integrin $\alpha_5\beta_1$) die Anheftung von Liganden an dieses Integrin vermutlich durch sterische Wechselwirkungen verhindern. In einem eigenen Kontrollversuch konnte der Antikörper das Anheften von HUVEC an beschichtetes Fibronektin um 50 % verringern. Während nur der Antikörper LM609 die Bindung von HUVEC an Procathepsin X deutlich blockierte, wurde die Adhäsion durch den Antikörper JBS5 in keiner Weise verringert (Abb.D.17). Diese Ergebnisse lassen somit auf das Integrin $\alpha_v\beta_3$ als Rezeptor für Procathepsin X schließen.

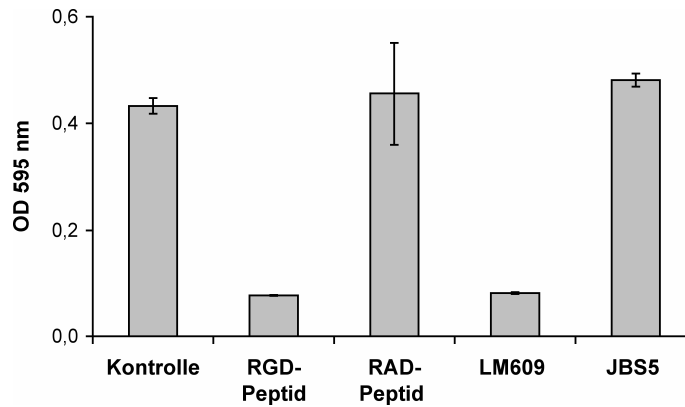


Abb. D.17: $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Adhäsion von Endothelzellen an Procathepsin X. HUVEC wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit zyklischen RGD- und RAD-Peptiden (0,5 μ M), LM609 oder JBS5 (5 μ g/ml) präinkubiert und anschließend auf 96-well Platten ausgesät, die mit Procathepsin X (5 μ g/Vertiefung) beschichtet waren. Nach einer Anheftungszeit von 90 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt und adhärenente Zellen gefärbt. Die Adhäsion an Procathepsin X konnte durch Präinkubation mit zyklischem RGD-Peptid und LM609 verhindert werden.

In einem weiteren Adhäsionsversuch wurde die Anheftung von HUVEC an verschiedene (Pro)Cathepsin-X-Varianten überprüft (Abb.D.18). Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zusätzlich zu Procathepsin X mit zwei Mutanten der Protease beschichtet, bei denen das RGD-Motiv zu RAD bzw. AAA worden war. Mit diesen Mutanten sollte nochmals die RGD-Abhängigkeit der Interaktion bestätigt werden. Gereiftes Cathepsin X, das keine Proregion und somit kein RGD-Motiv besitzt, wurde ebenfalls eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden mit BSA beschichtete Vertiefungen mitgeführt, da HUVEC keinen Oberflächenrezeptor besitzen, der es ihnen ermöglicht, an BSA zu binden. Abb.D.18A zeigt deutlich, dass HUVEC nur an Procathepsin X adhärenieren können. Diese Unterschiede sind auch unter dem Mikroskop klar erkennbar (Abb.D.18B,C). Während sich HUVEC an beschichtetes Procathepsin X anheften und ausbreiten konnten, sind in der Vertiefung mit AAA-Procathepsin X nur vereinzelte Zellen vorhanden.

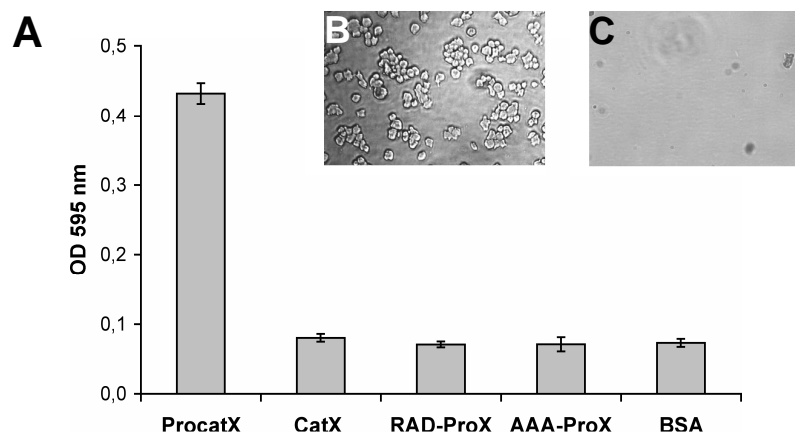


Abb. D.18: $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Adhäsion von Endothelzellen an Procathepsin X

A HUVEC wurden in Vertiefungen ausgesät, die mit unterschiedlichen Procathepsin-X-Varianten und Cathepsin X beschichtet waren (5 μ g/Vertiefung). Eine Adhäsion ist nur möglich, wenn ein intaktes RGD-Motiv vorhanden ist. Zellen in mit Procathepsin-X-beschichteten Vertiefungen (**C**) und in mit AAA-Procathepsin-X-beschichteten Vertiefungen (**D**) wurden mit einem invertierten Lichtmikroskop vor der Färbung fotografiert.

D.3.3 Bindung von löslichem Procathepsin X an HUVEC über $\alpha_v\beta_3$

Da Procathepsin X in humanem Plasma in löslicher Form vorliegt, sollte auch die Möglichkeit der Interaktion von löslichem Procathepsin X mit HUVEC überprüft werden. Dazu wurden HUVEC in Suspension mit Medium inkubiert, welches 10 % humanes Serum und 450 ng/ml rekombinantes Procathepsin X enthält. Die Zellen wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch Zentrifugation entfernt. Um die $\alpha_v\beta_3$ -Abhängigkeit der Interaktion zu überprüfen, wurde der blockierende Antikörper LM609 eingesetzt. Die Zugabe von HUVEC bewirkte tatsächlich eine deutliche Reduktion von Procathepsin X im Medium (Abb.D.19). Dieser Effekt konnte durch den $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Antikörper LM609 unterbunden werden, was darauf schließen lässt, dass lösliches Procathepsin X über $\alpha_v\beta_3$ an HUVEC bindet.

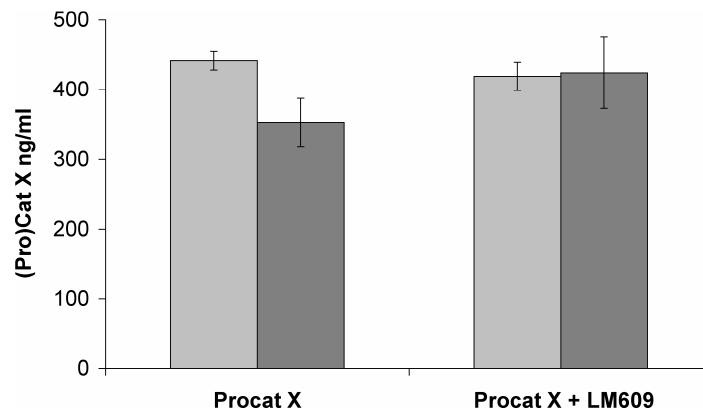


Abb.D.19: $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Bindung von Procathepsin X an die Oberfläche von Endothelzellen. HUVEC in Suspension ($1,5 \times 10^5$ Zellen) wurden für 30 Minuten bei RT in Medium inkubiert, welches Procathepsin X in (patho-)physiologischer Konzentration (450 ng/ml) enthielt. (hellgrau = Kontrollmedium ohne Zellen, dunkelgrau = Medium mit Zellen. Durch LM609 verändert sich die Procathepsin-X-Menge nach der Inkubation nicht, während sie ohne Antikörper verringert ist. Die Procathepsin-X-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt.

D.3.4 Mikroskopischer Nachweis der Kollokalisierung von (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$

Um weitere Hinweise für eine Interaktion von zellulärem (Pro)Cathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu erhalten, wurden (Pro)Cathepsin-X-exprimierende HUVEC immunologisch mittels Epifluoreszenzmikroskopie, konfokaler Mikroskopie und Elektronenmikroskopie analysiert.

Unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Abb.D20A,B) konnte anhand von spezifischen Antikörpern der Großteil an (Pro)Cathepsin X intrazellulär in Vesikeln beobachtet werden, da sich die Protease vorwiegend in Lysosomen befindet. An der Zelloberfläche wurde sie ebenfalls angefärbt, wobei man eine partielle Kollokalisierung mit $\alpha_v\beta_3$ beobachten konnte. Die Kofärbung betraf vorwiegend die Lamellipodien der HUVEC. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist, wie (Pro)Cathepsin X, auch intrazellulär detektierbar, da die verwendete Fixierungsmethode die Zellen permeabilisiert hat. Eine eindeutige intrazelluläre Kollokalisierung wurde jedoch nicht

gesehen. Da mittels Epifluoreszenzmikroskopie keine sichere Aussage über eine Kolokalisation gemacht werden kann, wurden zusätzlich in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Zahler (Department für Pharmazie, LMU München, Leitung Prof. Dr. Angelika Vollmar) und PD Dr. Mechthild Stöckelhuber (Anatomische Anstalt, LMU München, Leitung Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch) konfokale Mikroskopie und Elektronenmikroskopie durchgeführt. Auch unter dem konfokalen Mikroskop konnte die immunologische Oberflächenfärbung von HUVEC mit Antikörpern gegen (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ beobachtet werden (Abb.D.20B). Um eine intrazelluläre Färbung zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Fixierung mit den primären Antikörpern inkubiert, wodurch ein Eindringen der Antikörper ins Zellinnere verhindert werden konnte. Abb.D.20Bc zeigt die Färbung von (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Zelloberfläche. Bei dieser Methode wurden jedoch nur Integrine am Zellsaum angefärbt. Erst nach Permeabilisierung der Zellen mit Triton-X-100 war eine Kolokalisation von (Pro)Cathepsin X mit $\alpha_v\beta_3$ zu beobachten, wiederum vorwiegend an den Lamellipodien. Intrazellulär wurden auch (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Vesikeln angefärbt, in denen jedoch keine Kolokalisation nachweisbar war. Erst direkt an der Membran wurde eine Kolokalisation sichtbar (Abb.D.20Bd,e). Die Kernfärbung in D.20.Bd beruht auf einer unspezifischen Reaktion des zweiten Antikörpers.

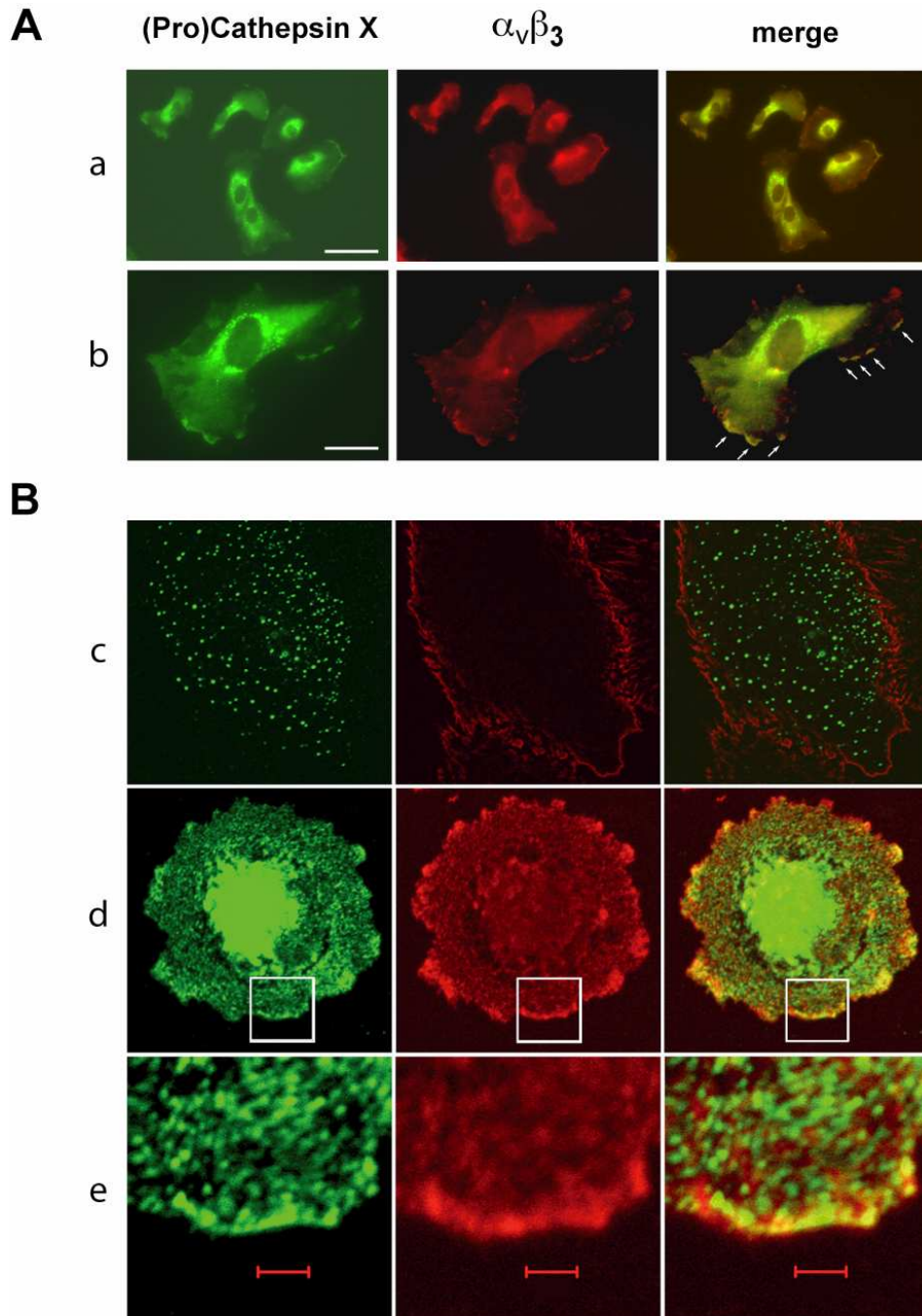


Abb.D.20: Immunologische Detektion von (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ mittels Fluoreszenzmikroskopie.

A Epifluoreszenzmikroskopie: Subkonfluente HUVEC wurden in mit Poly-L-Lysin beschichteten Kammern ausgesät und über Nacht im CO_2 -Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach Fixierung wurde eine Doppelfärbung durchgeführt mit Antikörpern gegen (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ (LM609). Die Mikroskopie erfolgte mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus) mit einem 20x Objektiv (Reihe a, Balken entspricht $60\ \mu\text{m}$) oder mit einem 60x Öljektiv (Reihe b, Balken entspricht $20\ \mu\text{m}$). Eine Kofärbung kann hauptsächlich an Lamellipodien beobachtet werden (Pfeile).

B Konfokale Mikroskopie: Detektion von (Pro)Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit unterschiedlichen Färbemethoden. HUVEC wurden vor der Fixierung mit Paraformaldehyd mit den primären Antikörpern inkubiert (Reihe c). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen fixiert und mit 0,2% Triton X-100 vor der Färbung permeabilisiert (Reihen d und e). Die Übereinanderlagerung (merge) in Reihe d zeigt eine partielle Kolokalisation an Lamellipodien. Die Vergrößerung der hervorgehobenen Bereiche verdeutlicht die vesikuläre, membranassoziierte Färbung von (Pro)Cathepsin X (Reihe e). Eine Kolokalisation scheint auf membranständige Bereiche beschränkt zu sein. Balken entsprechen $2\ \mu\text{m}$.

Eine mögliche Kollokalisierung von β_3 -Integrinen mit (Pro)Cathepsin X auf der Zelloberfläche wurde auch mit einer Immunogoldfärbung untersucht (Abb.D.21). Dabei sind die jeweiligen zweiten Antikörper mit Goldpartikeln einer definierten Größe konjugiert. Diese können in der Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm entsprechen Anti-(Pro)Cathepsin-X-Antikörpern, während eine Partikelgröße von 6 nm anti-Integrin- β_3 -Antikörper anzeigen. Um eine intrazelluläre Detektion zu verhindern, wurden HUVEC vor der Antikörperinkubation nicht permeabilisiert. Somit werden nur extrazelluläre Proteine detektiert. An verschiedenen Stellen auf der Zelloberfläche konnten 6 nm Goldpartikel zusammen mit 10 nm Goldpartikeln nachgewiesen werden, was für eine Zelloberflächen-assoziierte Kollokalisierung der beiden Proteine spricht.

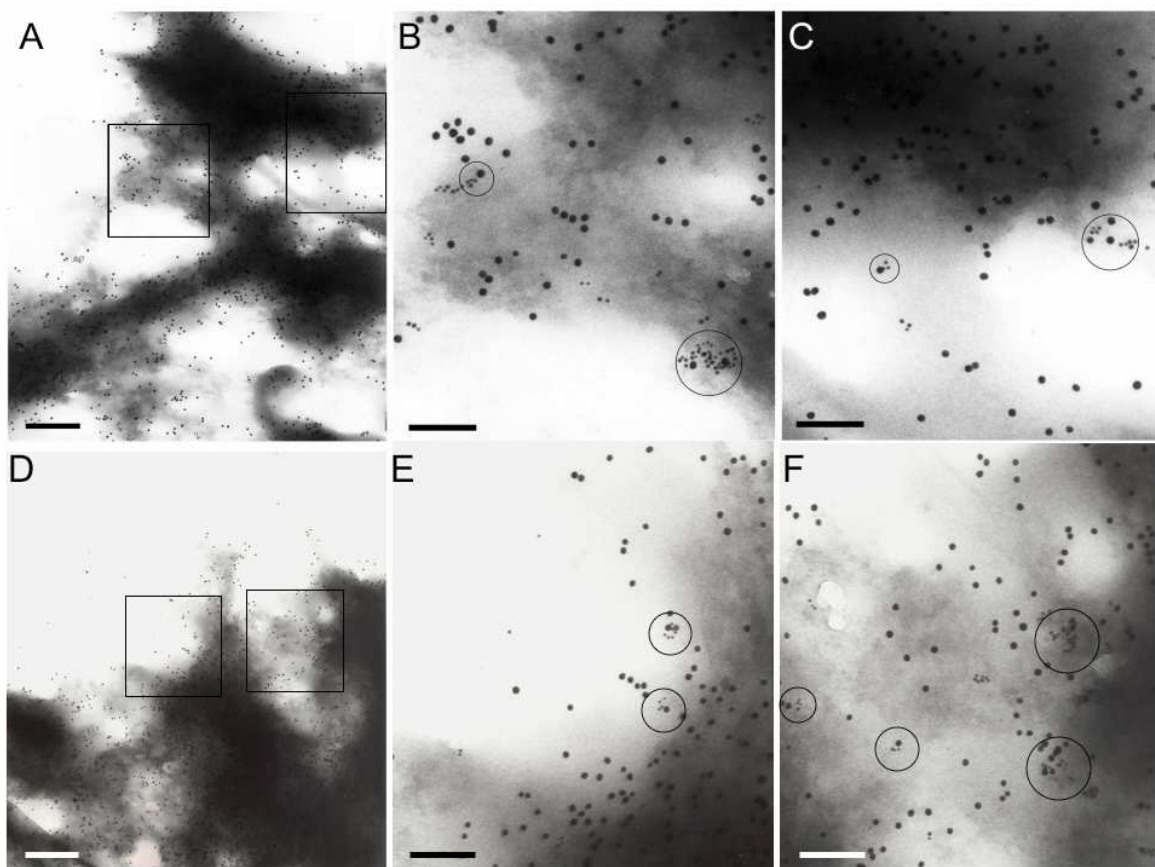


Abb.D.21: Immunologische Detektion von (Pro)Cathepsin X und der β_3 -Integrinuntereinheit auf der Oberfläche von HUVEC mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Adhärente HUVEC wurden einer Doppelfärbung mit Immunogold-Antikörpern unterzogen. Dabei entsprechen große Goldkugelchen (\varnothing 10 nm) der Anwesenheit von (Pro)Cathepsin X, während kleine Goldkugelchen (\varnothing 6 nm) die Präsenz der β_3 -Untereinheit von Integrinen anzeigen. Die Kreise verdeutlichen die partielle Kollokalisierung der beiden Antigene. Die Bilder A und D zeigen die Übersicht von denen in B und C bzw. E und F vergrößerten Bildern. Balken in A und D entsprechen 300 nm, in B, C, E und F 100 nm.

D.3.5 Koimmunpräzipitation von Procathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$

Um eine direkte Assoziation von nativem Procathepsin X mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu zeigen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt (Abb.D.22 A). Dazu wurde ein HUVEC-Lysat mit dem $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Antikörper LM609 inkubiert und so das endogene Integrin $\alpha_v\beta_3$ immunpräzipitiert. Die Elutionsfraktion wurde im Western Blot auf die Präsenz von (Pro)Cathepsin X untersucht. Im Lysat entsprach die prominente Bande dem gereiften Cathepsin X, während die Proform lediglich einen kleinen Teil ausmachte. Die Detektion einer Bande in Höhe von ca. 39 kDa in der Elutionsfraktion betraf jedoch Procathepsin X, was erneut die Annahme unterstützt, dass nur die Proform der Protease an Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet. Der Erfolg der Immunpräzipitation wurde zusätzlich durch die Detektion der β_3 -Untereinheit im Western Blot bestätigt. Banden bei 115 kDa im Lysat, Waschfraktion 1 und im Eluat entsprachen dem erwarteten Molekulargewicht.

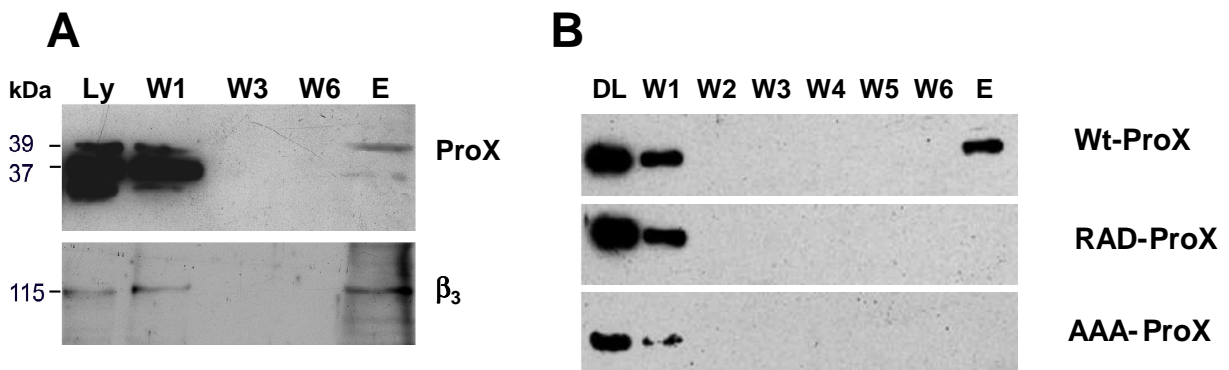


Abb.D.22: Koimmunpräzipitation von (Pro)Cathepsin X und $\alpha_v\beta_3$.

A Ein HUVEC-Lysat wurde mit einem Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ (LM609) inkubiert und anschließend eine Koimmunpräzipitation (KoIP) durchgeführt. Die Detektion von (Pro)Cathepsin X erfolgte mittels Western Blot. Ly = Lysat vor der KoIP; W1, W3, W6 = Waschfraktionen; E = Eluat. Das Lysat und W1 zeigen zwei Banden, wobei eine der gereiften Form des Cathepsin X entspricht (ca. 37 kDa) und die andere die Größe der Proform besitzt (ca. 39 kDa). In W3 und W6 wird kein (Pro)Cathepsin X detektiert, im Eluat hingegen ist eine Hauptbande in Höhe von Procathepsin X zu sehen und eine schwächere in Höhe von Cathepsin X. Zur Kontrolle wurde die β_3 -Untereinheit des Integrins detektiert (untere Abbildung). Der Erfolg der Immunpräzipitation wird durch die Detektion von β_3 bei ca. 115 kDa im Eluat gezeigt.

B Rekombinante Formen von Procathepsin X wurden mit gereinigtem Integrin $\alpha_v\beta_3$ inkubiert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. DL = Durchlauf, W1-W6 = Waschfraktionen, E = Eluat. Lediglich Wildtyp-Procathepsin X (Wt-ProX) kann im Eluat detektiert werden und ist somit in der Lage, an $\alpha_v\beta_3$ zu binden.

Auf dieselbe Weise konnte auch rekombinantes Procathepsin X mit gereinigtem Integrin $\alpha_v\beta_3$ koimmunpräzipitiert werden (Abb.D.22B). Neben dem Wildtyp wurden auch die RGD-Mutanten in der Koimmunpräzipitation getestet. Der Western Blot zeigt eindeutig, dass nur Wildtyp-Procathepsin X in der Lage ist, an Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu binden. Eine Detektion der mutierten Proteine, denen das Integrin-bindende Motiv RGD fehlt, war im Eluat nicht möglich.

D.3.6 Analyse der Bindung von Procathepsin X an Integrine mittels Oberflächenplasmonresonanz

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR, „*surface plasmon resonance*“) kann man die Interaktion zweier Proteine direkt messen. Diese Methode wurde zur näheren Analyse der Bindung von Procathepsin X an Integrine herangezogen. Dazu wurden neben dem Wildtyp-Procathepsin X auch die Mutante AAA-Procathepsin X sowie Vitronektin und BSA auf einem Sensorchip der BIACORE-Apparatur immobilisiert. Für den in Abbildung D.23 gezeigten Versuch wurde der Chip mit unterschiedlichen Konzentrationen an $\alpha_v\beta_3$ beschickt. BSA diente als Negativkontrolle; Werte für diese Spur wurden von den jeweiligen der anderen Spuren als Hintergrund abgezogen. Sowohl für Vitronektin als auch für Procathepsin X konnte eine Bindung an $\alpha_v\beta_3$ beobachtet werden. Die Dissoziationskonstanten betragen für Vitronektin 64 nM und für Procathepsin X 144 nM. Die Daten wurden nach dem 1:1 Langmuir-Modell erhoben, welches zur Berechnung der Bindungskonstanten eines immobilisierten Moleküls an ein bewegliches Molekül verwendet wird. Für AAA-Procathepsin X war die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ so schwach, dass sie als unspezifisch gewertet werden kann muß und somit auch keine Dissoziationskonstante berechnet werden konnte. Dies deutet wiederum auf die RGD-spezifische Bindung von Procathepsin X an $\alpha_v\beta_3$ hin.

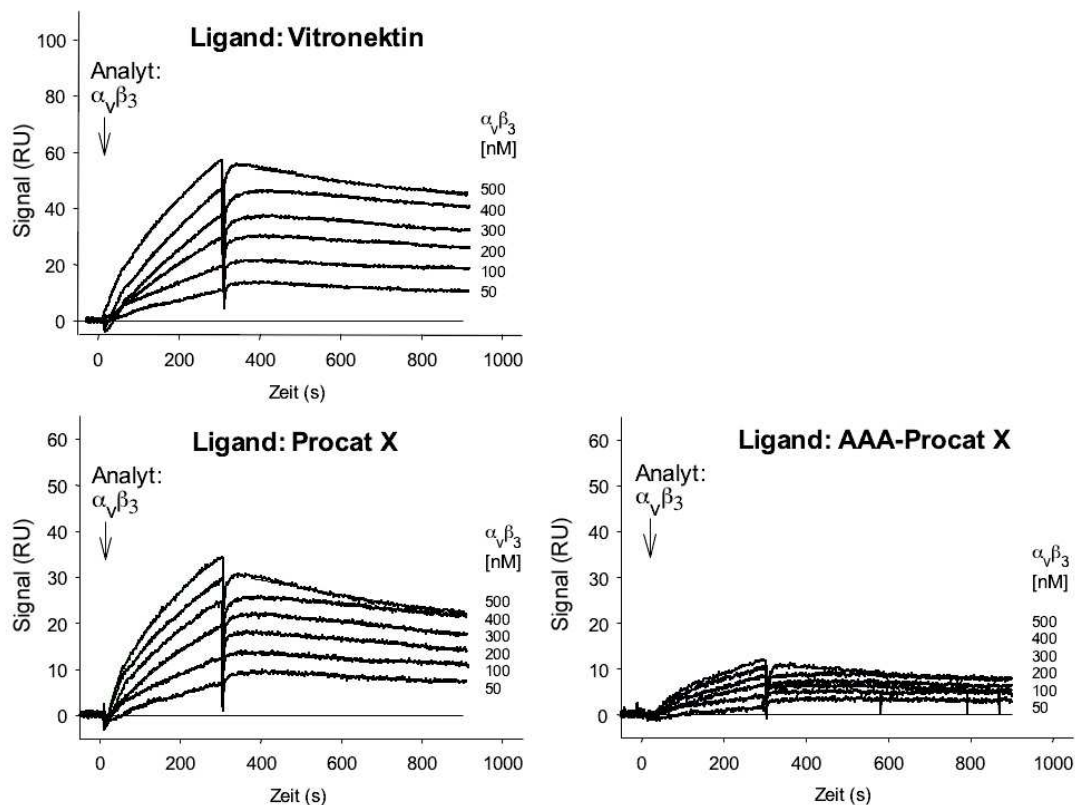


Abb.D.23: Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ an Vitronektin, Procathepsin X und AAA-Procathepsin X. Ein Sensorchip wurde mit den Liganden Vitronektin, Procathepsin X, AAA-Procathepsin X und BSA gekoppelt und mit $\alpha_v\beta_3$ in den Konzentrationen 50, 100, 200, 300, 400 und 500 nM beschickt. Die Assoziation wurde über 5 Minuten gemessen, die Dissoziation über 10 Minuten bei einer Mn^{2+} -Konzentration von 0,5 mM. Die Dissoziationskonstanten wurden über das BIAevaluation Programm Version 4.1 berechnet und ergaben 64 nM für Vitronektin und 144 nM für Procathepsin X. Für AAA-Procathepsin X konnte keine Dissoziationskonstante berechnet werden.

In einem weiteren Versuch sollte die RGD-Abhängigkeit der Bindung von Procathepsin X an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ noch detaillierter evaluiert werden. Dazu wurde das blockierende zyklische RGD-Peptid eingesetzt. Vor der Injektion wurde das Integrin $\alpha_v\beta_3$ zusammen mit dem RGD-Peptid für 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit sollten die freien RGD-Bindungsstellen des Integrins durch das Peptid besetzt und somit blockiert werden. Anschließend wurde der Ansatz aus $\alpha_v\beta_3$ und RGD-Peptid auf den Sensorchip injiziert. Wie in Abb.D.24 deutlich wird, bewirkte die Präinkubation mit dem RGD-Peptid eine Reduktion der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ an Procathepsin X und an Vitronektin bis auf das Niveau der Hintergrund-Bindung, welches der AAA-Procathepsin-X-Mutante entspricht. Die Messung der Bindung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Vitronektin und Procathepsin X ohne RGD-Peptid hingegen zeigt einen deutlichen Anstieg der Kurven, was für eine Assoziation des Integrins an die beiden Proteine spricht. Die AAA-Procathepsin-X-Mutante war in diesem Zyklus unverändert zu dem Ansatz mit RGD-Peptid. In einer Kontroll-Injektion, bei der nur das RGD-Peptid auf den immobilisierten Proteinen Vitronektin, Procathepsin X und AAA-Procathepsin X getestet wurde, konnte keine Bindung gemessen werden. Dieser Versuch zeigt nochmals deutlich die RGD-Abhängigkeit der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ an Vitronektin und Procathepsin X.

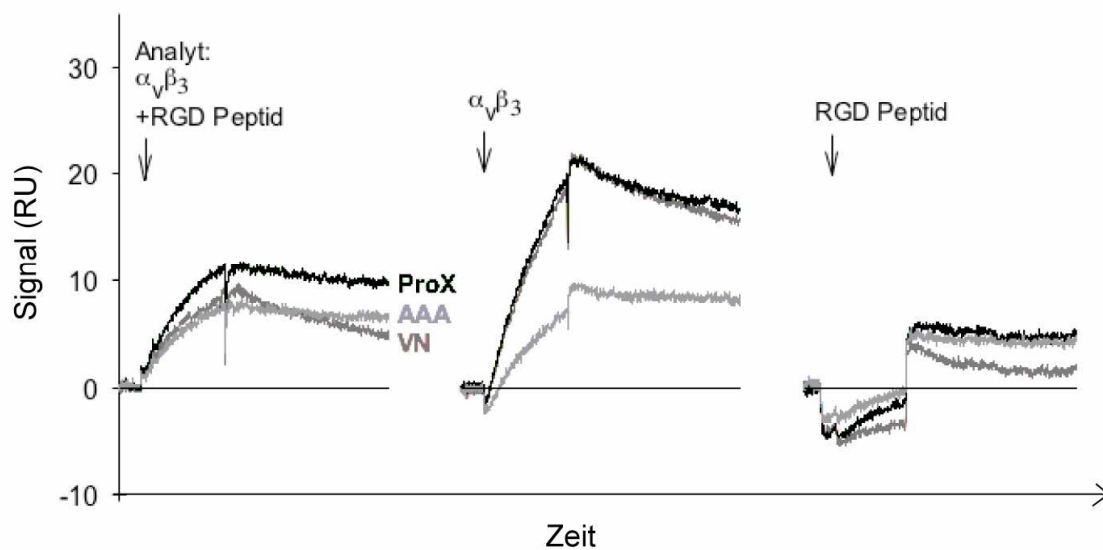


Abb.D.24: Inhibition der Bindung von Procathepsin X an $\alpha_v\beta_3$ durch das RGD-Peptid. Die RGD-Abhängigkeit der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ an Procathepsin X wurde mittels SPR untersucht. Die Pfeile kennzeichnen den Start der Injektion eines Analyten. Auf dem Chip gekoppelte Liganden waren Procathepsin X (ProX, schwarz), Vitronektin (VN, dunkelgrau) AAA-Procathepsin X (AAA, hellgrau) und BSA. BSA diente als Referenz um die Hintergrundbindung abzuziehen (Basislinie). Integrin $\alpha_v\beta_3$ (100 nM) wurde mit RGD-Peptid (1 μ M) präinkubiert und anschließend injiziert. Dies bewirkt eine deutliche Reduktion der Bindung von $\alpha_v\beta_3$ an Procathepsin X und Vitronektin im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid. Die Injektion von RGD-Peptid alleine hat keinen Effekt. Die Assoziation wurde über 5 Minuten gemessen, die anschließende Dissoziation über 10 Minuten.

Schließlich wurde über SPR auch eine mögliche Bindung von anderen Integrinen an Procathepsin X untersucht (Abb.D.25). Zusätzlich zu Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurden daher die Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ analysiert. $\alpha_{IIb}\beta_3$ gehört ebenfalls zu den RGD-abhängigen Integrinen und wird vorwiegend auf Thrombozyten exprimiert. Es ist neben $\alpha_v\beta_3$ ebenfalls ein

wichtiger Ligand für Vitronektin. $\alpha_5\beta_1$ ist als ein natürlicher Rezeptor für Fibronektin bekannt und interagiert mit Fibronektin ebenfalls in RGD-abhängiger Weise (Argaves et al., 1987; Pytela, Pierschbacher & Ruoslahti, 1985b). Für Procathepsin X und Vitronektin konnte neben $\alpha_v\beta_3$ auch eine Bindung an $\alpha_{IIb}\beta_3$ beobachtet werden. Die AAA-Procathepsin-X-Mutante konnte weder an $\alpha_v\beta_3$ noch an $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden, was wiederum für eine RGD-abhängige Interaktion spricht. Für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ konnte interessanterweise für keines der untersuchten Proteine eine signifikante Bindung gemessen werden, was auf eine zusätzliche Bedeutung der β_3 -Untereinheit bei der Assoziation zwischen dem Integrin und dem Procathepsin X bzw. Vitronektin schließen lässt.

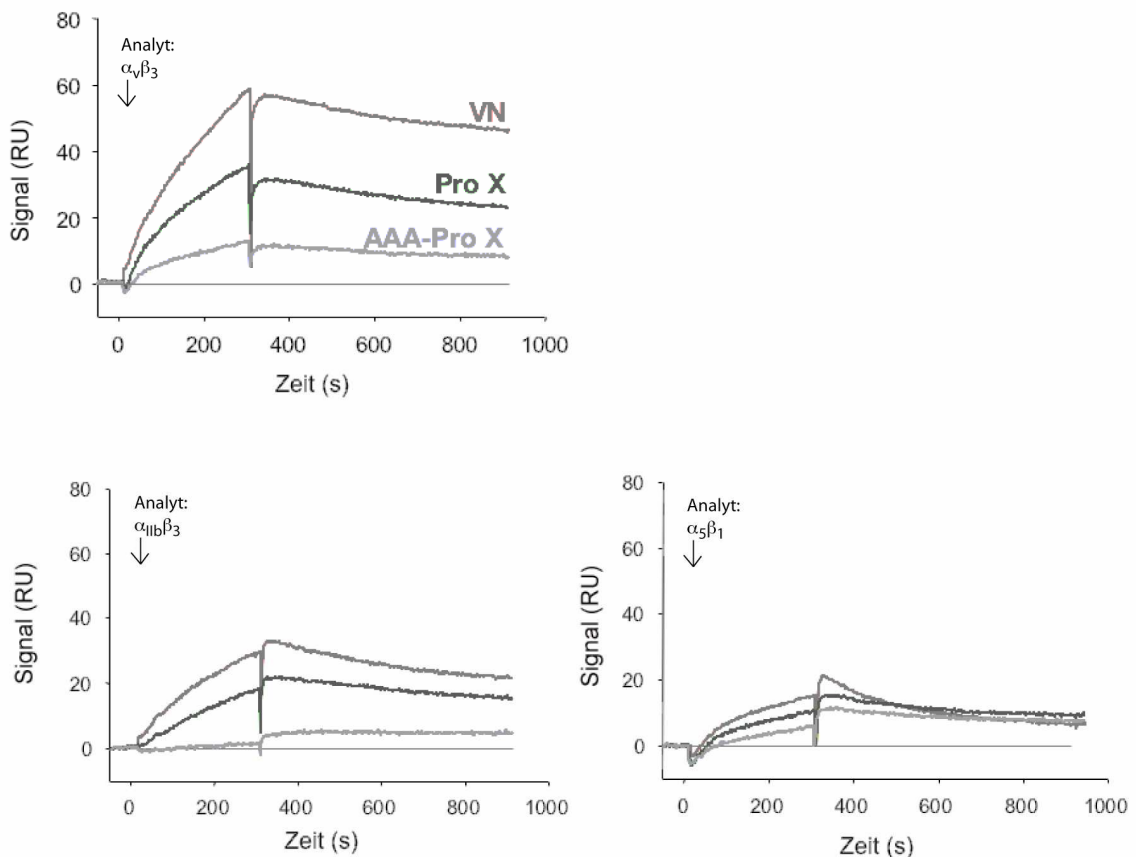


Abb. D.25: Interaktion von Procathepsin X, AAA-Procathepsin X und Vitronektin mit verschiedenen Integrinen. Mittels SPR wurde die Bindungskapazität der Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ (je 500 nM) an unterschiedliche Liganden untersucht. Liganden waren Procathepsin X (Pro X, schwarz), Vitronektin (VN, dunkelgrau) und AAA-Procathepsin X (AAA-Pro X, hellgrau). BSA diente als Referenz, um die Hintergrundbindung abzuziehen (Basislinie). Die Assoziation wurde über 5 Minuten gemessen, mit einer anschließenden Dissoziation von 10 Minuten.

Nachdem nun eindeutig gezeigt werden konnte, dass Procathepsin X über die RGD-Sequenz mit Integrinen interagieren kann, wurden in dieser Arbeit noch zusätzliche Ansätze durchgeführt, um weitere mögliche Liganden oder auch Substrate für (Pro)Cathepsin X zu finden. Dies wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

D.4 Suche nach physiologischen Liganden von (Pro)Cathepsin X mittels affinitätschromatographischer Methoden

D.4.1 Koimmunpräzipitation mit einem Kit der Firma Pierce

Prinzip

Bei einer Koimmunpräzipitation mit dem „Seize[®] X Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Pierce) werden Antikörper gegen das Zielprotein an eine Protein-G-gekoppelte Matrix gebunden und anschließend mit einem Reagenz für die Kreuzvernetzung kovalent verknüpft. Diese Matrix wird mit Zellysat oder anderen proteinhaltigen Lösungen inkubiert. Durch Abzentrifugieren kann die Matrix von der Lösung wieder abgetrennt und mehrmals gewaschen werden. Das Zielprotein wird von dem gekoppelten Antikörper gebunden. Liganden des Zielproteins werden mit diesem koimmunpräzipitiert und bleiben, wenn die Interaktion stark genug ist, während der folgenden Waschschriffe gebunden. Durch einen stark sauren Puffer wird das Antigen von der Antikörpermatrix gelöst und mit ihm die potentiellen Liganden. Die so gewonnenen Fraktionen werden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Unbekannte Banden im Eluat können z.B. mittels N-terminaler Proteinsequenzierung analysiert werden.

Ergebnis

In unserem Versuchsansatz wurde die Matrix mit einem polyklonalem Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X gekoppelt. Dieser Antikörper wurde in Kaninchen generiert und in unserem Labor isoliert (Nägler et al., 2006). Es konnten ca. 500 µg Antikörper an 400 µl der Matrix (50 % Suspension) gebunden werden. Als Probe wurde ein THP-1-Zellysat verwendet, da diese Zelllinie Cathepsin X stark exprimiert. Im Eluat konnte eine Bande bei ca. 10 kDa detektiert werden (siehe Abb.D.26). Das Eluat wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und für die N-terminale Proteinsequenzierung zu R. Mentele (AG Prof. Lottspeich, Max-Planck Institut, Martinsried) gegeben. Dort konnte die Sequenz PMFIVNT identifiziert werden. Die Aminosäureabfolge und das Molekulargewicht entsprechen dem Protein MIF („*macrophage migration inhibitory factor*“). Da noch unklar war, ob es sich bei dieser Interaktion um eine spezifische Bindung an (Pro)Cathepsin X handelt, oder MIF unspezifisch an das Zielprotein, den Antikörper oder die Matrix bindet, wurden Koimmunpräzipitationen mit einer weiteren Methode (D.4.2) durchgeführt.

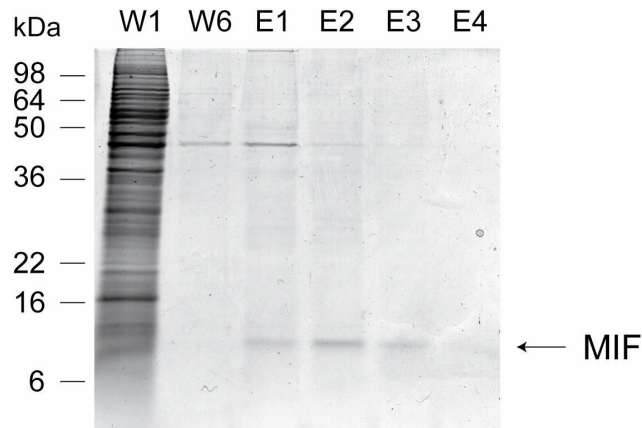


Abb. D.26: Koimmunpräzipitation mit dem „Seize[®] X Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Pierce) unter Einsatz eines Antikörpers gegen (Pro)Cathepsin X. Untersucht wurde das Lysat von $1,3 \times 10^7$ THP-1-Zellen. In einer SDS-PAGE (12 %) wurden die erste und die letzte Waschfraktion (W) und die Elutionsfraktionen (E) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Eine Bande bei ca. 10 kDa konnte später als MIF identifiziert werden.

Der „Seize[®] X Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Pierce) ist so konzipiert, dass in den Elutionsfraktionen sowohl das Zielprotein, als auch weitere Proteinbanden, die möglichen Liganden entsprechen würden, in einem Coomassie-Gel sichtbar sein sollten. Da es bei den bisherigen Versuchen der Koimmunpräzipitation mit diesem Kit nicht möglich war, eine sichtbare (Pro)Cathepsin X Bande in einem Coomassie-Gel zu detektieren, sollte überprüft werden, ob mit diesem Kit und dem verwendeten Antikörper eine ausreichende Menge an (Pro)Cathepsin X gebunden und eluiert werden kann. Dazu wurde ein THP-1-Lysat mit $10 \mu\text{g}$ einer rekombinanten inaktiven Mutante von Cathepsin X versetzt (Cathepsin-X-C31A; siehe D.4.4) und anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt. Abbildung D.28 zeigt in den drei Elutionsfraktionen deutliche Banden auf der Höhe der Cathepsin-X-C31A Kontrollspur. Vergleicht man die Banden in den Elutionsfraktionen mit der Proteinbande in der Kontrollspur ($1 \mu\text{g}$), so kann man als ungefähre Menge $3 \mu\text{g}$ Cathepsin-X-C31A in den Elutionsfraktionen schätzen. Da insgesamt $300 \mu\text{l}$ Eluat gewonnen und davon $120 \mu\text{l}$ auf das Gel aufgetragen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass ca. $7,5 \mu\text{g}$ Protein wiedergefunden werden konnte. Die Kapazität von ca. $500 \mu\text{g}$ gekoppelten Antikörpers (siehe Kapitel D.4.1) wäre jedoch für die gesamte Menge von $10 \mu\text{g}$ eingesetztem Cathepsin X ausreichend gewesen. Offensichtlich ist die Konzentration an (Pro)Cathepsin X in den hier verwendeten Zelllysaten zu gering und somit auch die Konzentration von möglichen Liganden. Da jedoch für diese Anwendung nur ein begrenztes Volumen und eine begrenzte Zellmenge verwendet werden können, die sich limitierend auf die (Pro)Cathepsin-X-Menge auswirken, wurde auf eine alternative Methode der Ligandensuche zurückgegriffen, die im folgenden Kapitel beschrieben ist.



Abb.D.28: Wiederfindungsversuch von rekombinantem Cathepsin X aus einem THP-1-Zelllysate. Um zu überprüfen, ob und welche Menge an (Pro)Cathepsin X mit dem „Seize[®] X Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Pierce) aus einem Zelllysate isoliert werden kann, wurde ein THP-1-Lysate (2×10^7 Zellen) mit $10 \mu\text{g}$ Cathepsin-X-C31A versetzt und eine Immunpräzipitation nach Kitanleitung durchgeführt. Kontrolle, Waschfraktionen und Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel (12 %) anschließend mit Coomassie gefärbt. rX = $1 \mu\text{g}$ CatX-C31A; W1-W8 = Waschfraktionen; E1-E3 = Elutionsfraktionen. In den Elutionsfraktionen sind deutliche Banden in Höhe der Kontrollbande sichtbar, was für eine spezifische Wiederfindung von Cathepsin X aus dem Zelllysate spricht.

D.4.2 Koimmunpräzipitation mit einem Kit der Firma Miltenyi

Prinzip

Auch bei dem „ $\mu\text{MACS Protein G MicroBeads}$ “-Kit der Firma Miltenyi werden Antikörper für die selektive Isolierung eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch verwendet. Hier sind die Antikörper jedoch nicht kovalent an die Matrix gekoppelt, sondern werden im letzten Schritt zusammen mit dem Zielprotein und möglichen Liganden eluiert. Der Antikörper wird direkt in die Proteinlösung gegeben, wo er an sein Antigen bindet. Anschließend werden magnetische Kügelchen, an denen Protein G gebunden ist, in die Lösung gegeben. Über Protein G wird der Antikörper mit dem Zielprotein und möglichen Liganden an die Kügelchen gebunden. Diese werden an eine magnetisierte Matrix fixiert und können so gewaschen und eluiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur wenig Antikörper benötigt wird (ca. $1\text{-}2 \mu\text{g}$), da die Antikörpermenge besonders bei kommerziell erhältlichen Antikörpern wie anti-MIF ein limitierender Faktor sein kann.

Ergebnis

Um zu überprüfen, ob MIF ein Ligand für (Pro)Cathepsin X ist, wurde ein THP-1-Zelllysate mit Antikörper gegen MIF inkubiert und anschließend die Immunpräzipitation durchgeführt. Abb.D.27B zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation von MIF. In einer Kontrollspur, die ein THP-1-Zelllysate enthält, kreuzreagierte der Antikörper zwar mit anderen Proteinen, wobei jedoch im Eluat eine MIF-spezifische Bande detektiert werden konnte. Die Immunpräzipitation von MIF aus dem Lysate war also erfolgreich. Allerdings ließ sich kein (Pro)Cathepsin X in demselben Eluat nachweisen (Abb.D.27A), was eine unspezifische Interaktion von MIF mit der Pierce-Protein-G-Matrix wahrscheinlich macht.

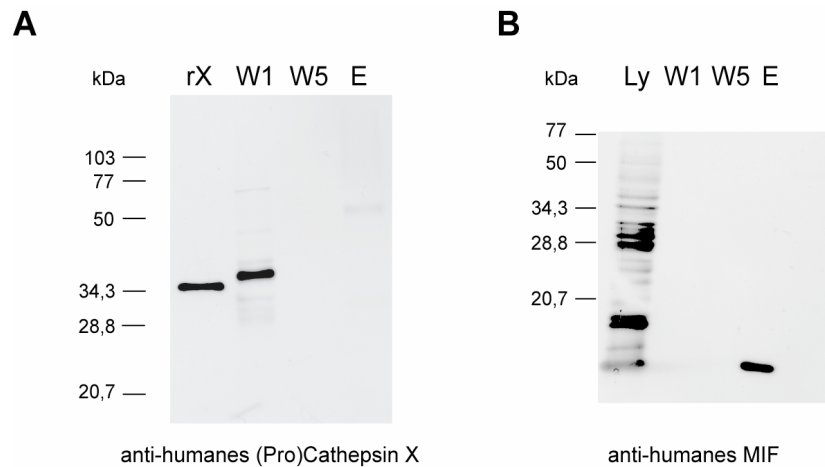


Abb.D.27: Koimmunpräzipitation mit dem „ μ MACS Protein G MicroBeads“-Kit (Miltenyi) unter Einsatz eines Antikörpers gegen MIF. Mit diesem Kit wurde getestet, ob (Pro)Cathepsin X im Eluat eines Lysats von THP-1-Zellen detektiert werden kann und somit an MIF bindet. Die Proben wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen humanes (Pro)Cathepsin X bzw. MIF untersucht. rX: rekombinantes, deglykosyliertes Cathepsin X; Ly = THP-1-Zelllysat; W1 = Waschfraktion 1; W5 = Waschfraktion 5; E = Eluat; Marker: „low range“ (BIO-RAD).

A (Pro)Cathepsin X kann zwar in W1 detektiert werden, aber nicht im Eluat.

B Der MIF-Antikörper bindet im Lysat unspezifisch an andere Proteine, es kann jedoch im Eluat eine einzige Bande in Höhe von 10 kDa detektiert werden, was dem Molekulargewicht von MIF entspricht.

D.4.3 Affinitätschromatographie mit einer inaktiven Cathepsin-X-Mutante

Da Substrate von Cathepsin X Aufschluss über die biologische Funktion des Enzyms geben, war ihre Identifizierung für diese Arbeit von großem Interesse. Deshalb wurde eine inaktive Mutante von Cathepsin X generiert, bei der das Cystein des aktiven Zentrums durch Alanin ersetzt wurde. Diese Mutante sollte Substrate zwar noch binden, aber nicht mehr spalten können, wodurch eine Isolierung von Substraten mittels Affinitätschromatographie möglich wird.

D.4.3.1 Herstellung und Isolierung einer inaktiven Cathepsin-X-Mutante

Die inaktive Mutante wurde mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt. Das dafür verwendete Oligonukleotid fügt neben dem Austausch des Cys31 durch Ala auch eine Schnittstelle für BamHI ein, was die Identifizierung von passenden Klonen erleichtert. Die eingefügte Restriktionsstelle bewirkt nur eine stille Mutation und somit keine zusätzliche Veränderung in der Aminosäuresequenz. In dem weiteren Ablauf der Klonierung und Expression in *P. pastoris* wurde wie bei der Generierung der RAD- und AAA-Procathepsin-X-Mutanten vorgegangen (siehe D.3.1). Die chromatographische Isolierung wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie in zwei Schritten entsprechend dem Protokoll für die Procathepsin-X-Isolierung durchgeführt (Nägler et al., 1999). Die nach der ersten Aufreinigung erhaltenen Fraktionen mit den höchsten Procathepsin-X-C31A-Konzentrationen wurden vereinigt und ankonzentriert. Anschließend wurde die Proregion durch enzymatischen Verdau mit Cathepsin L abgespalten. Die zweite Chromatographie wurde bei einem neutralen pH durchgeführt. Da Cathepsin L bei neutralem pH sehr instabil ist, wurde auf diese Weise eine

Inaktivierung der Protease sichergestellt. Durch N-terminale Proteinsequenzierung (durchgeführt von R. Mentele, Max-Planck Institut, Martinsried) konnte die Abspaltung der Proregion bestätigt werden. Es konnten für zwei Banden mit nahezu identischem Molekulargewicht die Sequenzen SPADL und SPA identifiziert werden. Dies ist die Spaltstelle, die auch bei der Prozessierung des Wildtyps durch Cathepsin L beschrieben wurde (Nägler et al., 1999). Somit handelt es sich bei den Doppelbanden, die nach rekombinanter Expression von (Pro)Cathepsin X auftreten, sehr wahrscheinlich um unterschiedliche Glykosylierungsvarianten des Enzyms. Das so erhaltene prozessierte Enzym wurde zunächst biochemisch analysiert.

D.4.3.2 Charakterisierung der inaktiven Mutante

Um sicherzustellen, dass die eingefügte Mutation tatsächlich zu einer Inaktivierung des Enzyms führt, ohne dass die Sekundärstruktur beeinträchtigt ist, wurden eine Sekundärstrukturanalyse mittels CD und eine Aktivitätsmessung durchgeführt.

D.4.3.2.1 Analyse der Sekundärstruktur durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Für die Messung wurden Cathepsin X und Cathepsin-X-C31A gegen PBS dialysiert und die Proteinkonzentration auf 10 μ M eingestellt. Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde von Elisabeth Weyher-Stingel (Max-Planck Institut, Martinsried) durchgeführt. In Abb.D.29 sind die Ergebnisse von Cathepsin X im Vergleich zu Cathepsin-X-C31A dargestellt. Da die beiden Kurven nahezu identisch sind, kann man davon ausgehen, dass der Austausch von Cys31 gegen Ala zu keinen deutlichen strukturellen Veränderungen führte.

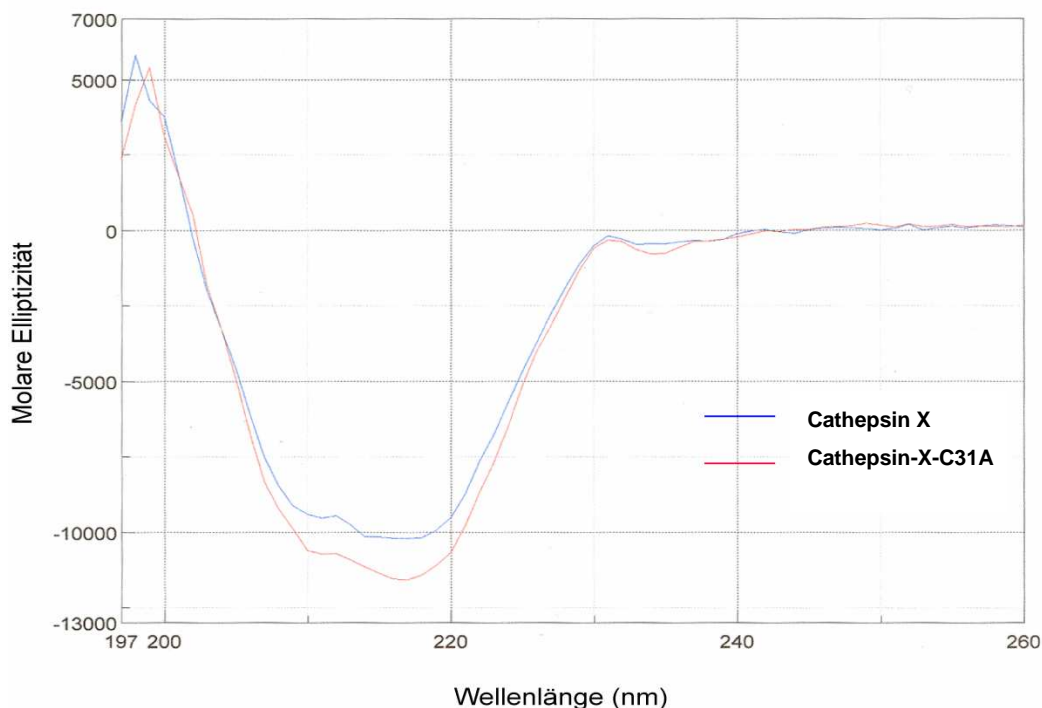


Abb.D.29: CD-Spektren von Cathepsin-X-C31A im Vergleich zu Wildtyp-Cathepsin X. Die CD-Spektren von Cathepsin X (blau) und Cathepsin-X-C31A (rot) zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf, was größere strukturelle Veränderungen durch das Einfügen der Mutation bei Cathepsin-X-C31A ausschließt.

D.4.3.2.2 Messung der Aktivität

Um festzustellen, ob der Austausch von Cystein durch Alanin tatsächlich vorhanden war, wurde eine Aktivitätsmessung der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Enzym durchgeführt. Dazu wurde das Substrat Abz-Phe-Arg-Tyr(3-NO₂)-OH verwendet, welches von PD Dr. Norbert Schaschke (Universität Bielefeld) synthetisiert wurde. Es handelt sich dabei um eine Verbindung, die durch Monocarboxypeptidasen gespalten werden kann und stellt somit ein geeignetes Substrat für Cathepsin X dar. Abbildung D.30 zeigt eindeutig, dass das Substrat vom Wildtyp-Enzym umgesetzt werden kann, während Cathepsin-X-C31A dazu nicht in der Lage ist. Somit ist der Austausch des Cysteins im aktiven Zentrum durch Alanin gelungen, was zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms führte.

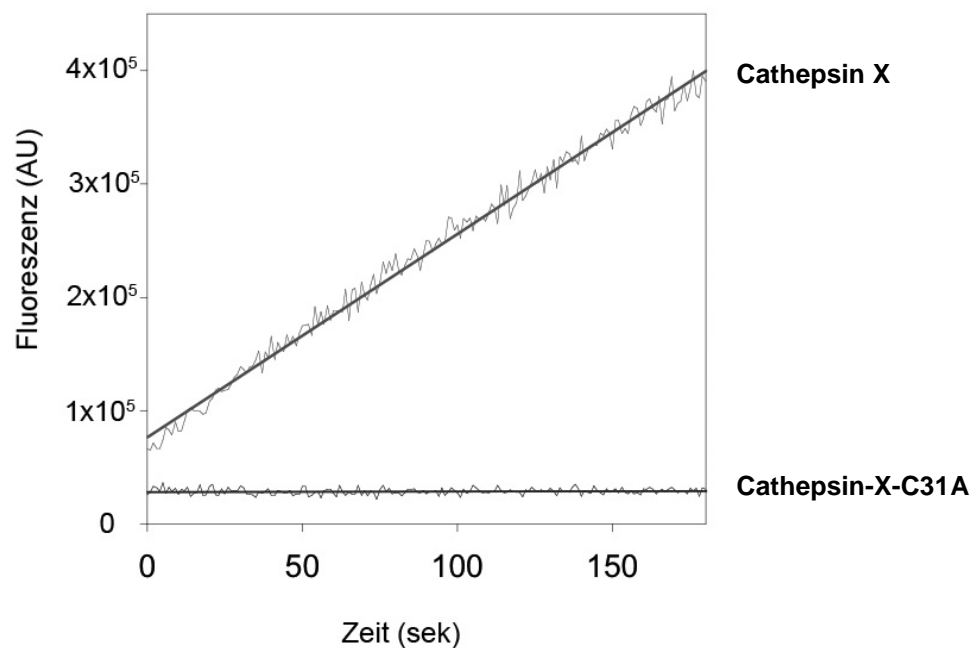


Abb.D.30: Aktivitätsmessung von Cathepsin-X-C31A im Vergleich zum Wildtyp. Für die Aktivitätsmessung wurde das Substrat Abz-Phe-Arg-Tyr(3-NO₂)-OH (5 μM) bei pH 5.0 verwendet. Wildtyp-Cathepsin X kann das Substrat spalten, wodurch es zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität kommt. Die Mutante Cathepsin-X-C31A kann das Substrat dagegen nicht umsetzen. Die Messung der Aktivität wurde am Gerät „FluoroMax“ bei einer Exzitation von 320 und einer Emission von 420 nm durchgeführt, AU = „arbitrary units“.

D.4.3.3 Affinitätschromatographie mit der katalytisch inaktiven Mutante Cathepsin-X-C31A

In einem ersten Versuch sollte die Affinitätschromatographie mit Cathepsin-X-C31A getestet werden:

Für die Herstellung der Säule wurde die inaktive Cathepsin-X-Mutante zunächst chemisch an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. An 0,8 g der Sepharose konnte von 7,6 mg eingesetztem Protein 92% gebunden werden. Nach der Kopplung wurde die Sepharose in ein Säulchen überführt und für die Affinitätschromatographie verwendet. Als Probenmaterial wurde ein THP-1-Zelllysate eingesetzt, da sich diese Zelllinie für die Anzucht in größerer Menge eignet und zudem Cathepsin X stark exprimiert, was eine hohe Expression von Cathepsin-X-Liganden bedeuten könnte. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.D.31).

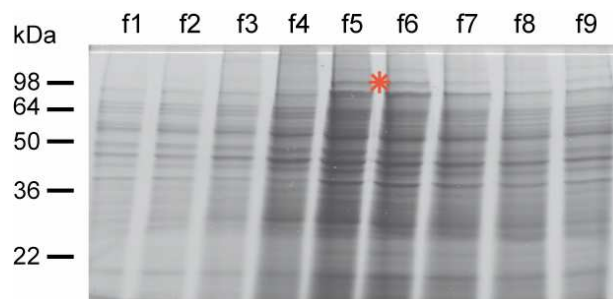


Abb.D.31: Affinitätschromatographie mit einer inaktiven Cathepsin-X-Mutante. Die bei der Affinitätschromatographie erhaltenen Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Fraktionen = f1-f9) und das Gel (12 %) anschließend mit Coomassie gefärbt. Eine Bande bei ca. 98 kDa (roter Stern), die nur in zwei Fraktionen (f5 und f6) auftritt, konnte identifiziert werden.

Für die Identifizierung von spezifischen Banden wurden die Fraktionen auf eine PVDF-Membran geblottet oder auf ein SDS-Gel aufgetragen und für die N-terminale Proteinsequenzierung bzw. massenspektroskopische Analyse an R. Mentele, Max-Planck Institut (Martinsried) gegeben. Die N-terminale Proteinsequenzierung war nicht durchführbar, da die Banden nicht rein genug waren. Es konnte jedoch über Massenspektroskopie ein Protein identifiziert werden, das auf dem SDS-Gel ein Molekulargewicht von ca. 98 kDa aufwies. Dabei handelt es sich um p97, auch VCP („*valosin containing protein*“) genannt. Ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um einen Liganden von Cathepsin X handelt, wurde in dieser Arbeit nicht mehr weiterverfolgt. In nachfolgenden Arbeitsschritten müsste der Nachweis der Bindung mittels verschiedener Methoden erbracht werden, wie z.B. Oberflächenplasmonresonanz-Analysen, Koimmunpräzipitationen oder -färbungen.

Fasst man die Ergebnisse der Liganden- oder Substratsuche von (Pro)Cathepsin X zusammen, so zeigt sich, dass die angewendeten Methoden noch besser evaluiert werden müssen, um unspezifische Wechselwirkung zu minimieren und somit spezifische Liganden zu isolieren. Dies würde auch eine eindeutige Identifizierung erleichtern.

E Diskussion

Als mit der detaillierten Forschung an lysosomalen Cysteinproteasen (Cathepsine) begonnen wurde, war man der Ansicht, dass diese Enzyme ausschließlich für den unspezifischen Abbau von vielen unterschiedlichen Proteinen in Lysosomen verantwortlich wären. Es stellte sich jedoch mehr und mehr heraus, dass Cathepsine auch für spezifische zellphysiologische Vorgänge nötig sind und darüber hinaus bei pathologischen Prozessen wie z.B. Krebs und Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen können. Dabei wurde deutlich, dass ihre Funktionen nicht auf das lysosomale Kompartiment beschränkt sind, sondern dass Cathepsine auch im Extrazellulärraum wirken.

E.1 Differenzielle Expression von (Pro)Cathepsin X

In den letzten Jahren wurde eine Reihe neuartiger Cysteinproteasen entdeckt, darunter auch Cathepsin X (Nägler & Menard, 1998; Santamaria et al., 1998). Untersuchungen auf mRNA-Ebene zeigten, dass die Transkription des humanem Cathepsin-X-Genes ubiquitär in den Geweben erfolgt, jedoch Unterschiede in der Stärke der Transkription vorhanden sind (Nägler & Menard, 1998).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine starke Protein-Expression von (Pro)Cathepsin X in Monozyten und eine weniger ausgeprägte in neutrophilen Granulozyten festgestellt. In Lymphozyten war die Protease fast nicht nachweisbar. Deshalb wäre es möglich, dass Cathepsin X eine spezifische Funktion im Immunsystem und damit auch bei inflammatorischen Prozessen ausübt, da Makrophagen und neutrophile Granulozyten wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems sind. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine Aktivierung dieser primären Entzündungszellen auch die Ursache für den Anstieg von Serum-(Pro)Cathepsin X bei Traumapatienten zu sein scheint (Nägler et al., 2006). Zudem gibt es Befunde, die auf eine mögliche pathologische Funktion von (Pro)Cathepsin X bei inflammatorischen Prozessen und der Entstehung von Tumoren schließen lassen. So wurde gezeigt, dass EZM-unabhängiges Wachstum von malignen Melanomzellen mit einer Transkripterhöhung von Cathepsin X einhergeht (Rumpler et al., 2003). Ebenso wurde eine verstärkte Expression von Cathepsin-X-mRNA in *H. pylori*-infizierten Magenkarzinom-Zellen gemessen sowie in THP-1-Zellen, die mit dem Zellkulturüberstand dieser Zellen stimuliert wurden (Krueger et al., 2005). In dieser Veröffentlichung wurde auch eine Überexpression von Cathepsin X auf Proteinebene beim Magenkarzinom belegt, die sowohl aus einer erhöhten Expression in Tumorzellen als auch aus infiltrierenden Makrophagen resultierte. Auch beim Prostatakarzinom und dessen Vorläuferzellen wurde eine erhöhte Expression von Cathepsin X auf Proteinebene beobachtet (Nägler et al., 2004).

Diese Beispiele legten eine mögliche pathologische Rolle von (Pro)Cathepsin X nahe, weshalb zunächst durch zellexperimentelle Untersuchungen nähere Einblicke in die

Regulation der Expression von Cathepsin X in Leukozyten gewonnen werden sollten. Da mit der monozytären Tumorzelllinie THP-1 Differenzierungsstudien durchgeführt werden können und eine hohe Expression von Cathepsin X in Monozyten vorliegt, schien diese Zelllinie für die Untersuchung der Regulation der Expression von Cathepsin X geeignet zu sein. Durch die Zugabe von PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) oder ATRA (all-trans Retinsäure) nehmen die THP-1-Zellen makrophagenähnliche Eigenschaften an (Auwerx, 1991; Drach et al., 1993). Diese Agenzien wirken jedoch auf unterschiedliche Weise, und auch die einzelnen Effekte sind durchaus verschieden. So erfolgt die Differenzierung von THP-1-Zellen durch PMA über eine Aktivierung der Proteinkinase C (Auwerx, 1991), während ATRA, ein Vitamin-A-Derivat, an Retinsäurerezeptoren bindet, welche zur Familie der Steroidrezeptoren gehören (Chambon, 1996). Die Stimulierung von THP-1-Zellen mit PMA geht mit einer starken Veränderung des Phänotyps einher, die Zellen werden adhärent und gleichen in ihrem Aussehen Makrophagen. Durch ATRA erlangen die Zellen zwar auch einen Makrophagenähnlichen Phänotyp, zeigen jedoch nur eine schwache Adhärenz (Matikainen & Hurme, 1994; Mehta & Lopez-Berestein, 1986).

Bezüglich der Expression und Sekretion von (Pro)Cathepsin X ergaben sich interessanterweise ebenfalls starke Unterschiede nach Stimulation von THP-1-Zellen mit PMA oder ATRA. Bei der Differenzierung von THP-1-Zellen mit ATRA konnten wir im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Verminderung in der (Pro)Cathepsin-X-Menge sowohl extrazellulär als auch intrazellulär messen. Während der Differenzierung mit PMA hingegen war intrazellulär eine extreme Verstärkung der (Pro)Cathepsin-X-Expression und darüber hinaus auch eine verstärkte Sezernierung der Protease zu beobachten. Die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen durch PMA und ATRA induzierte somit offensichtlich ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Expression von (Pro)Cathepsin X. Ein Vergleich der bereits beschriebenen Effekte von PMA und ATRA auf THP-1-Zellen zeigt, dass durch PMA die Expression der Gene für die Transkriptionsfaktoren c-myc und c-myb abnimmt, während ATRA nur auf c-myc herabregulierend wirkt. Auch unterscheiden sich die Promotorbindestellen der beiden Differenzierungsagenzien, da ATRA im Gegensatz zu PMA nicht über AP-1-Motive („*activating protein-1*“) agiert, sondern anscheinend über andere Promotorelemente eine Differenzierung auslöst (Matikainen & Hurme, 1994). Unterschiede in der Stimulation durch PMA und ATRA sind also bekannt, die Auswirkungen auf die (Pro)Cathepsin-X-Expression können durch diese Erkenntnisse jedoch noch nicht endgültig geklärt werden, da die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulierung dieser Protease noch unklar ist. Eine vergleichende Untersuchung der Promotoreigenschaften von humanem und murinem Cathepsin X läßt zwar auf eine „*housekeeping*“-Funktion für beide Orthologe schließen, Bindestellen für AP-1 sind in den jeweiligen Promotoren allerdings nicht vorhanden (Deussing, von & Peters, 2000). Daher wäre es möglich, dass die unterschiedlichen Effekte von PMA und ATRA über noch nicht identifizierte „*enhancer*“-Elemente des Promoters ausgeübt werden, oder dass die Regulation der Expression auf posttranskriptioneller oder auch posttranslationaler Ebene erfolgt. Da die Auswirkungen der beiden Agenzien sehr komplex und vielfältig sind, müssen auch indirekte Effekte in Betracht gezogen werden. Eine intensivere Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion

anhand des THP-1-Modelles könnte sicherlich weitere wertvolle Erkenntnisse über die Regulation der Expression von Cathepsin X ermöglichen.

E.2 Vermehrte Freisetzung von Cathepsinen nach Vitronektin-Stimulation

Zu Beginn der Dissertationsarbeit war zwar bekannt, dass (Pro)Cathepsin X unter bestimmten pathologischen Bedingungen vermehrt exprimiert und gegebenenfalls auch freigesetzt wird, durch welche (patho)physiologischen Stimulatoren die Sezernierung reguliert werden kann war jedoch noch weitgehend unklar. Um nähere Einblicke in diese Fragestellung zu gewinnen, wurden Zellkulturüberstände von THP-1-Zellen untersucht, die mit unterschiedlichen proinflammatorischen Zytokinen und extrazellulären Matrixproteinen stimuliert wurden. Überraschenderweise konnte nur eine deutliche Reaktion der Zellen auf lösliches Vitronektin festgestellt werden. Wie sich auch in weiteren Versuchen zeigte, bewirkt Vitronektin eine Verstärkung der normalerweise konstitutiven Freisetzung von (Pro)Cathepsin X, während insbesondere andere extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen IV keinen vergleichbaren Effekt aufwiesen. Dies läßt auf eine spezifische Wirkung von Vitronektin schließen.

Vitronectin besitzt mehrere Bindestellen für die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen. Eine Möglichkeit, mit zellulären Rezeptoren zu interagieren, bietet ein im N-terminalen Bereich lokalisiertes RGD-Motiv. Durch die Bindung von Vitronectin an RGD-erkennende Integrine kann zum einen eine Signaltransduktion ins Zellinnere ausgelöst, und zum anderen die Adhärenz und Migration der Zelle ermöglicht werden (Schvartz et al., 1999). Wie wir zum ersten Mal zeigen konnten, beruht auch die verstärkte Freisetzung von (Pro)Cathepsin X auf einer RGD-abhängigen Interaktion von Vitronectin mit den Zellen, da durch die Zugabe eines RGD-enthaltenden, zyklischen Peptids der Effekt blockiert werden kann.

Der am besten beschriebene Rezeptor für Vitronectin ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$, das auch Vitronectin-Rezeptor genannt wird (Pytela et al., 1985a). Ein wichtiges Hilfsmittel für die Erforschung von Wechselwirkungen diverser Proteine mit $\alpha_v\beta_3$ ist der spezifische Antikörper LM609, der die Interaktion von Vitronectin und anderen RGD-enthaltenen Liganden mit $\alpha_v\beta_3$ blockieren kann (Nip et al., 1992). Durch diesen Antikörper konnten wir ebenfalls die verstärkte Sezernierung von (Pro)Cathepsin X nach Vitronectin-Stimulation hemmen, was den Schluss nahelegt, dass Vitronectin in RGD-abhängiger Weise über den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ zur vermehrten Freisetzung von (Pro)Cathepsin X führt.

Es stellt sich nun die Frage, welche molekularen Mechanismen der erhöhten Vitronectin-vermittelten (Pro)Cathepsin-X-Sezernierung zugrunde liegen. So besteht die Möglichkeit, dass auf transkriptioneller Ebene eine verstärkte Expression des Cathepsin-X-Gens induziert wird. Auch könnte eine gesteigerte Translation von bereits vorhandener mRNA stattfinden. Wie die Zeitkinetik zeigte, kann die erhöhte Sekretion schon nach vier Stunden gemessen

werden. Diese kurze Zeitspanne läßt daher vermuten, dass der Effekt nicht auf eine gesteigerte Transkription des Gens für Cathepsin X zurückzuführen ist. Zudem ließ die Erniedrigung des intrazellulären (Pro)Cathepsin-X-Gehaltes erkennen, dass die Protease vermehrt ins Medium ausgeschüttet wird, ohne dass (zunächst) das Protein nachproduziert wird. Da eine verstärkte Ausschüttung auch dann noch erfolgte, wenn die Translation durch Cycloheximid gehemmt wurde, kann eine Beeinflussung auf translationaler Ebene ebenfalls ausgeschlossen werden. Somit wäre noch eine Mobilisierung von gespeichertem (Pro)Cathepsin X denkbar. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass sich durch Brefeldin A und Tunicamycin die verstärkte Sekretion komplett unterbinden ließ. Brefeldin A inhibiert den Vesikeltransport der Zelle, und dadurch auch den vesikulären Proteintransport über den sekretorischen Weg (Zeghouf et al., 2005). Tunicamycin dagegen hemmt die N-Glykosylierung, weshalb nicht-glykosilierte Proteine nicht mehr an das Transportprotein ERGIC-53 binden können und dadurch auch ihre Sekretion nicht mehr möglich ist (Appenzeller et al., 1999). Da jedoch nach Behandlung der THP-1-Zellen mit Tunicamycin die Vitronektin-induzierte Sekretion von (Pro)Cathepsin X nicht mehr möglich war, handelt es sich bei den freigesetzten (Pro)Cathepsin-X-Molekülen nach Vitronektin-Stimulation möglicherweise um einen Proteinpool, der bereits fertig synthetisiert aber noch nicht glykosiliert war. Möglicherweise existiert aber auch ein Schutzmechanismus der Zelle, der eine verstärkte Sekretion von Proteinen verhindert, wenn der allgemeine Transport gestört ist.

Es scheint, dass zumindest während der ersten 24 Stunden der Stimulation lediglich die Sekretion von bereits vorhandenem Protein verändert wird. Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass nach längerer Einwirkung von Vitronektin die Transkription und/oder Translation hochreguliert werden, um den erniedrigten intrazellulären (Pro)Cathepsin-X-Gehalt wieder auszugleichen. Darüber könnte eine Messung der Cathepsin-X-mRNA-Menge über mehrere Tage mittels quantitativer RT-PCR Aufschluss geben. Da bekannt ist, dass Zellen Cathepsin X aus dem Medium aufnehmen können (Nascimento et al., 2005), muss auch die Möglichkeit erörtert werden, dass es sich bei der Erhöhung von (Pro)Cathepsin X im Zellkulturmedium nach Vitronektin-Stimulation nicht um eine verstärkte Sekretion, sondern um eine Verhinderung der Wiederaufnahme von (Pro)Cathepsin X in die Zelle handelt. In diesem Fall könnte man nach Vitronektin-Stimulation ebenfalls einen Anstieg von (Pro)Cathepsin X im Medium messen, der jedoch dadurch begründet wäre, dass ein konstitutiv stattfindender Transport von extrazellulärem (Pro)Cathepsin X in die Zellen verhindert wäre. In diesem Fall wäre jedoch zu erwarten, dass eine Behandlung mit Tunicamycin die Stimulation durch Vitronektin nicht beeinflusst, da dieses Molekül nur die Glykosylierung von intrazellulärem Protein hemmt und (Pro)Cathepsin X, das bereits sezerniert wurde und sich deshalb im extrazellulären Medium befindet, glykosiliert vorliegt. Es zeigte sich jedoch, dass bei Behandlung von THP-1-Zellen mit Tunicamycin die Konzentration von (Pro)Cathepsin X im Medium nach Vitronektin-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle ohne Tunicamycin nicht ansteigt. Daher kann es sich nicht um eine verminderte Wiederaufnahme handeln, da Tunicamycin den Transport von (Pro)Cathepsin X in die Zelle nicht beeinflussen sollte. Auch spricht die Tatsache, dass die Menge an intrazellulärem

(Pro)Cathepsin X nach Vitronektin-Stimulation abnimmt, ebenfalls gegen eine Beeinflussung der Aufnahme von sezerniertem (Pro)Cathepsin X.

Wie sich herausstellte, werden neben (Pro)Cathepsin X auch (Pro)Cathepsin B und (Pro)Cathepsin L vermehrt freigesetzt. Daher scheint durch Vitronektin in der Zelle eine allgemeine Veränderung im Sekretionsverhalten ausgelöst zu werden, die mehrere Proteine betrifft. Dies zeigte sich auch bei humanen lymphoiden Tumorzellen, die nach Vitronektin-Stimulation verstärkt MMP-2 und MMP-9 ausschütten (Vacca et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist die vermehrte Freisetzung von MMP-2 und TIMP-2 nach Vitronektin-Stimulation von Melanomzellen (Bafetti et al., 1998). Bei diesen Zellmodellen wurde zwar nachgewiesen, dass Vitronektin über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf die Zellen wirkt, der genaue molekulare Mechanismus konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Bei Studien, die sich mit der Sezernierung von Cathepsinen beschäftigen, ist eine wichtige Fragestellung, ob eine Freisetzung als Proenzym oder gereifte Form (aktive Protease) erfolgt. Dadurch können Rückschlüsse auf eine mögliche enzymatische Aktivität oder auf Interaktionsmöglichkeiten mit Oberflächenrezeptoren gezogen werden. Da der in dieser Arbeit mitetablierte und verwendete Sandwich-ELISA sowohl die Proform, als auch das aktive Cathepsin X detektiert, war eine Unterscheidung der beiden Formen nur durch Western Blot möglich. Wie sich herausstellte, entspricht die Laufhöhe der in den Zellkulturüberständen detektierten Banden der Proform von Cathepsin X. Dies steht im Einklang mit Hinweisen in der Literatur, dass Zellen primär Procathepsin X, und nicht Cathepsin X freisetzen. So konnten Journet et al. über N-terminale Proteinsequenzierung das von humanen, monozytären U937-Zellen sezernierte Cathepsin X als Proform definieren (Journet et al., 2000). Zudem wurde kürzlich auch in unserer Arbeitsgruppe Procathepsin X aus dem Zellkulturüberstand der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 isoliert und N-terminal als Proform identifiziert (Fruth, 2007).

Im Rahmen der durch Vitronektin stimulierbaren und durch Brefeldin A hemmbaren Freisetzung ist auch von Interesse, in welchen sekretorischen Vesikeln Procathepsin X transportiert wird. Bei Melanozyten und Zellen aus der hämatopoetischen Linie sind sogenannte sekretorische Lysosomen bekannt, die funktionell eine Zwischenstellung aus sekretorischen Granula und Lysosomen innehaben. Diese Organellen besitzen einen sauren pH von 5,1-5,4, enthalten lysosomale Proteine und unterliegen einer regulierten Sekretion (Blott & Griffiths, 2002; Clark & Griffiths, 2003). Es sprechen jedoch verschiedene Fakten dagegen, dass es sich bei der Erhöhung der Konzentration von extrazellulären Cathepsinen nach Vitronektin-Stimulation um eine Freisetzung von sekretorischen Lysosomen handelt. So muss man in Betracht ziehen, dass bei einem sauren pH, wie er in Lysosomen besteht, die vorhandenen Hydrolasen in der prozessierten Form vorliegen. Da z.B. für Cathepsin L eine autokatalytische Prozessierung schon bei einem pH von 6,5 bekannt ist (Smith & Gottesman, 1989) und durch Cathepsin L auch Procathepsin X in die aktive Form überführt wird (Nägler et al., 1999), müsste in den von uns untersuchten Zellkulturüberständen vermehrt aktives Cathepsin X nachgewiesen werden können, falls es aus sekretorischen Lysosomen stammen

würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Interessanterweise kann Cathepsin X nicht nur in Lysosomen detektiert werden, sondern auch in Vesikeln, die keine Lysosomen-Charakteristika zeigen. Zudem findet man auch lysosomale Vesikel ohne Cathepsin X (Nascimento et al., 2005). Deshalb wird möglicherweise (Pro)Cathepsin X nach der Translation in unterschiedliche Vesikel transportiert, wobei ein Teil in Lysosomen gelangt, während ein anderer Teil in speziellen Granula den sekretorischen Weg einschlägt, der die überwiegende Freisetzung der Proform erlaubt.

Da Vitronektin sowohl löslich im Plasma als auch in gebundener Form in der extrazellulären Matrix (EZM) vorkommt, stand zudem zur Diskussion, ob nur die lösliche oder auch die solide Form eine verstärkte Sezernierung von (Pro)Cathepsin X auslösen kann. Interessanterweise zeigte Vitronektin in immobilisierter Form keinen stimulatorischen Effekt auf THP-1-Zellen. Ebenso wenig führten an Zellkulturplatten gebundenes Laminin, Fibronektin oder Kollagen IV zu einer vermehrten Sekretion von (Pro)Cathepsin X. Um auszuschließen, dass die Ursache ein fehlender Zell-Matrix-Kontakt zwischen den nicht adhären den THP-1-Zellen und der EZM-Protein-Festphase ist, wurde auch die adhären te Zelllinie HEK293 getestet, die durch lösliches Vitronektin gut stimulierbar ist. Auch bei dieser Zelllinie konnte durch Vitronektin, Fibronektin oder Kollagen IV als Beschichtungsmaterial keine Stimulation der Sekretion erreicht werden. Der Beobachtung, dass tatsächlich nur lösliches Vitronektin zu einer vermehrten Freisetzung von (Pro)Cathepsin X führt, könnte folgende Ursache zugrunde liegen. So wurde gezeigt, dass nur dann eine Phosphorylierung von Signalproteinen nach Vitronektin-Stimulation stattfindet, wenn es durch den Liganden zu einer Kreuzvernetzung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen kommt (Bhattacharya et al., 1995). Diese Kreuzvernetzung erfolgt durch eine Multimerisierung von Vitronektin. Verhindert man die Multimerisierung durch Verdau von Vitronektin mit Plasmin, dann kann auch keine verstärkte Freisetzung von MMP-2 mehr ausgelöst werden (Bafetti et al., 1998). Als Beschichtungsmaterial ist Vitronektin unter Umständen nicht in der Lage, Multimere zu bilden oder nicht flexibel genug, um eine Kreuzvernetzung von Integrinen mit nachfolgender Signaltransduktion zu gewährleisten. Ausgeschlossen werden kann dagegen, dass durch die Beschichtung das RGD-Motiv nicht mehr zugänglich ist, da durch das zyklische RGD-Peptid die Anheftung von Zellen an eine Vitronektinbeschichtung inhibiert werden kann (Gurrath et al., 1992). Dadurch wird deutlich, dass das Zellen das RGD-Motiv für die Adhäsion verwenden. Es wäre jedoch nicht gerechtfertigt, auf Grund dieser Ergebnisse zu behaupten, dass nur Plasmavitronektin und nicht das in der EZM gebundene Vitronektin eine Stimulierung auslösen kann, da die extrazelluläre Matrix in ihrem komplexen Aufbau keinesfalls mit einer *in vitro*-Vitronektinbeschichtung vergleichbar ist.

Die optimale Konzentration an löslichem Vitronektin zur Stimulation der verstärkten Freisetzung von (Pro)Cathepsin X betrug 10 $\mu\text{g/ml}$. Eine höhere Konzentration bewirkte keine weitere Steigerung. Obwohl im Plasma eine Vitronektinkonzentration von 200-400 $\mu\text{g/ml}$ vorliegt (Schvartz et al., 1999), ist es jedoch unwahrscheinlich, dass *in situ* luminale $\alpha_v\beta_3$ -Integrine ständig mit Vitronektin interagieren, da der beobachtete Stimulationseffekt auch zeitlich begrenzt war: Nach mehrtägiger Inkubation näherten sich nämlich die

(Pro)Cathepsin-X-Werte mit und ohne Vitronektin wieder an. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass im Blutplasma ein sehr viel komplexeres Zusammenspiel zwischen diversen Proteinen herrscht als in einem Zellkulturansatz. So kann Vitronektin mit verschiedenen Plasmaproteinen, wie z.B. PAI-1 interagieren, was die Wechselwirkung mit Integrinen verhindert (Zhou et al., 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass Vitronektin nur in multimerer Form an luminale $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf Endothelzellen binden kann (Zanetti et al., 1994), wodurch ein Teil von Plasmavitronektin für eine Rezeptorinteraktion nicht verfügbar ist. Daher ist die Konzentration von Vitronektin, welche einen stimulierenden Effekt auf Zellen ausüben kann, sicherlich geringer als die tatsächliche Plasmakonzentration. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob bei einer deutlichen Erhöhung der Vitronektinkonzentration im Plasma, wie sie z.B. bei einer koronaren Arteriosklerose vorliegt (Ekmekci et al., 2002), auch die (Pro)Cathepsin-X-Konzentration im Plasma ansteigt. Darüber hinaus bedarf es zukünftig zweifellos noch intensiver *in vivo*-Untersuchungen, um zu zeigen, dass die im Zellkulturmodell beobachteten Mechanismen in der Tat auch eine physiologische Bedeutung haben.

E.3 Spezifische Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mittels siRNA

Im Hinblick auf die Aufklärung einer Hochregulation von (Pro)Cathepsin X bei verschiedenen Tumorarten, die möglicherweise eine Metastasierung der Tumorzellen fördert, sollte nun in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob die Migration von Zellen durch Niederregulation von (Pro)Cathepsin X gehemmt werden kann.

Mit der Entdeckung, dass kurze doppelsträngige RNA-Moleküle zu einer Niederregulierung von spezifischen Genen führen (Fire et al., 1998), eröffneten sich eine Vielzahl neuer Möglichkeiten, die Funktionen und Wechselwirkungen von Proteinen zu erforschen, weshalb auch wir uns dieser Methode zur Ausschaltung von (Pro)Cathepsin X bedienen. Mittlerweile sind Protokolle für die Niederregulation mittels siRNA relativ gut etabliert, wobei jedoch immer noch diskutiert wird, welche Kontrollen nötig sind, um die erzielten Ergebnisse abzusichern. Zu der im Horizon-Symposium in Maine (Anfang Mai 2003) erstellten Auflistung nötiger Kontrollen (Editorial, 2003) zählt z.B. die sog. „*mismatch*“-Kontrolle, die auch wir bei der Etablierung der Niederregulation von (Pro)Cathepsin X mitgetestet haben. Dabei handelt es sich um ein Derivat einer Cathepsin-X-spezifischen siRNA, die zwei Mutationen aufweist. Durch die eingefügten Mutationen sollte diese siRNA nicht mehr in der Lage sein, eine Niederregulation zu bewirken. Wie gewünscht, führte die funktionelle siRNA („CatX304“) sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene mit zwei unterschiedlichen Transfektionsreagenzien zu einer deutlichen Niederregulation von (Pro)Cathepsin X, so dass teilweise bis zu 80 % weniger (Pro)Cathepsin-X-RNA und -Protein messbar waren. Die „*mismatch*“-siRNA hingegen, die als Negativkontrolle dienen sollte, scheint jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die mRNA- und Proteinmenge zu besitzen. Während auf RNA-Ebene besonders mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect eine teilweise Erhöhung der mRNA-

Menge zu verzeichnen war, wurde gleichzeitig auf Proteinebene eine partielle Verringerung der (Pro)Cathepsin-X-Konzentration messbar. Eine vorstellbare Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass die „*mismatch*“-siRNA ähnlich wie eine miRNA („*microRNA*“) wirkt, da auch die natürlich vorkommenden miRNA-Moleküle nicht vollkommen komplementär zu ihrer Zielsequenz sind. Im Gegensatz zur siRNA-induzierten Niederregulation, die durch Degradation der betreffenden mRNA erfolgt, führt die Bindung einer miRNA an ihre Zielsequenz zu einer translationalen Repression und auf diese Weise zu einem Rückgang der Expression des Proteins (Saxena, Jonsson & Dutta, 2003). Auch in unserem Ansatz scheint eine ähnliche Wirkweise vorzuliegen, da vermutlich eine Assoziation der „*mismatch*“-siRNA an die Cathepsin-X-mRNA stattfinden kann. Dies könnte eine Stabilisierung der Cathepsin-X-Transkripte und somit einen Anstieg in der messbaren mRNA-Menge bewirken, obwohl gleichzeitig die Proteinmenge sinkt, da keine Translation mehr erfolgen kann. Darüber hinaus scheint die „*mismatch*“-siRNA noch andere miRNA-ähnliche Effekte zu verursachen, weshalb in Frage gestellt werden muss, ob es sinnvoll ist, eine „*mismatch*“-siRNA überhaupt als Kontrolle einzusetzen. Als Negativkontrolle geeigneter wäre vielmehr eine siRNA, die erwiesenermaßen eine biologische Aktivität besitzt und somit den RISC-Komplex binden kann, die jedoch in dem untersuchten Zellmodell keine Zielsequenz besitzt, wie z.B. eine siRNA gegen Luziferase oder GFP („*green fluorescent protein*“) (Hannon & Rossi, 2004).

E.4 Verringerte Invasion von HUVEC nach siRNA-vermittelter Niederregulation von (Pro)Cathepsin X

Lysosomale Cathepsine stehen in engem Zusammenhang mit der Migration von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese und der Invasivität von Tumorzellen, insbesondere bei der Tumormetastasierung, wobei sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen bei diesen Prozessen eine Rolle zu spielen scheinen. Für die Cathepsine B, L, S und K konnte die Fähigkeit zur direkten Degradation der extrazellulären Matrix als Voraussetzung für die Invasion nachgewiesen werden (Reddy, Zhang & Weiss, 1995; Serveau-Avesque et al., 2006). Darüber hinaus sind auch indirekte Effekte bekannt, durch die Cathepsine zum Abbau der EZM beitragen können, z.B. über die Aktivierung von uPA durch Cathepsin B und L oder durch die Aktivierung von ProMMPs durch Cathepsin B (Eeckhout & Vaes, 1977; Goretzki et al., 1992; Kobayashi et al., 1991). Durch uPA generiertes Plasmin und MMPs zählen zu den effektivsten EZM-degradierenden Proteasen.

Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein von (Pro)Cathepsin X die Fähigkeit von Zellen zur Invasion beeinflusst, wurde unter Verwendung von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) ein Invasionsassay im Transwell-System durchgeführt. Mittels siRNA-induzierter Niederregulation wurde zunächst die Konzentration von (Pro)Cathepsin X in HUVEC verringert. Die Effizienz der siRNAs wurde im Western Blot und im Sandwich-ELISA überprüft. Mit den Cathepsin-X-spezifischen siRNAs CatX304 und CatX913 konnte eine deutliche Reduktion der Invasivität von HUVEC gemessen werden. Diese Beobachtung korreliert gut mit einem Versuch, bei dem der Einsatz von Cathepsin-X-spezifischen Oligo-

nukleotiden zu einer Verringerung der Invasivität einer Magenkarzinomzelllinie führte (Krueger et al., 2005).

Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise die Invasion der Zellen durch (Pro)Cathepsin X beeinflusst wird. So wurde unlängst gezeigt, dass in Cathepsin-B-defizienten murinen Tumorzellen die Invasion durch neutralisierende Antikörper gegen Cathepsin X deutlich reduziert werden kann (Vasiljeva et al., 2006). Dieses Ergebnis lässt einerseits auf eine redundante Funktion von Cathepsin B und X bei der Invasion schließen und andererseits die Annahme zu, dass für die Invasion eine enzymatische Aktivität von (Pro)Cathepsin X nötig ist. Da Cathepsin X aber nur Monocarboxypeptidaseaktivität besitzt (Devanathan et al., 2005) ist es jedoch ziemlich unwahrscheinlich, dass diese Protease eine Rolle beim direkten Abbau der EZM spielt. Allerdings binden neutralisierende Antikörper zelloberflächenassoziiertes (Pro)Cathepsin X, weshalb auf jeden Fall eine extrazelluläre Funktion der Protease bei der Invasion vorzuliegen scheint. Da Cathepsin X als Proform sezerniert wird und zudem in seiner Proregion ein Bindemotiv (RGD) für eine Integrin-Subklasse besitzt, lag daher für uns die Vermutung nahe, dass diese Protease ein Ligand für Integrine sein könnte und auf diese Weise die Invasivität von Zellen reguliert. Integrine stellen nämlich wichtige Mediatoren bei der Adhäsion und Invasion von Zellen dar und spielen auch bei der Metastasierung von Tumorzellen eine herausragende Rolle (Hood & Chersesh, 2002).

E.5 RGD-abhängige Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$

Da Cathepsin X – wie von uns und anderen Forschern gezeigt – von unterschiedlichen Zellen als Proform sezerniert wird, sollte nun untersucht werden, ob diese Protease in der Lage ist, mit RGD-abhängigen Integrinen zu interagieren. In einem ersten theoretischen Ansatz konnte bereits durch die Überlagerung des zyklischen RGD-Peptides mit dem RGD-Motiv in der Proregion von Cathepsin X gezeigt werden, dass die Aminosäureseitenketten ähnlich ausgerichtet sind und somit ein analoges Bindungsverhalten denkbar ist (Abb.E.1). Ebenso wird aus der Tertiärstruktur von Procathepsin X ersichtlich, dass das RGD-Motiv an einer exponierten Stelle im Molekül zu finden ist (Sivaraman et al., 2000; siehe auch Abb.B.2).

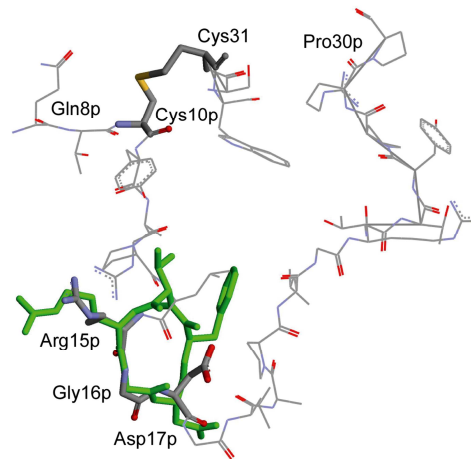


Abb.E.1: Überlagerung der RGD-Bindestelle von Procathepsin X mit einem zyklischen RGD-Peptid. In grau dargestellt ist die Proregion von Procathepsin X (PDB-Kode 1DEU). Die Disulfidbrücke mit dem Cystein des aktiven Zentrums ist dunkelgrau hervorgehoben. Das zyklische RGD-Peptid (grün) wurde im Komplex mit dem extrazellulären Teil von Integrin $\alpha_v\beta_3$ strukturell gelöst (Xiong et al., 2002) und für die Überlagerung mit Procathepsin X unter Anwendung der Software DeepView übernommen (PDB-Kode 1L5G). Der hier gezeigte Ausschnitt wurde freundlicherweise von Prof. Werner Machleidt (Adolf-Butenand-Institut für Physiologische Chemie, LMU München) mit der Software ViewerLite erstellt.

In weiteren experimentellen Untersuchungen ließ sich nun mit verschiedenen Methoden belegen, dass Procathepsin X in RGD-abhängiger Weise an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden kann (Lechner et al., 2006). Hierbei erwiesen sich HUVEC als sehr geeignetes Zellmodell, da sie neben Procathepsin X auch eine Vielzahl von Integrinen, insbesondere Integrin $\alpha_v\beta_3$, exprimieren.

Als wesentliche Voraussetzung zur gezielten Klärung wurden zunächst zwei Procathepsin-X-Mutanten hergestellt, die in verschiedenen Versuchen als Kontrolle eingesetzt wurden. Die eingeführten Mutationen (RGD \rightarrow RAD oder AAA) sollten beide eine Interaktion mit RGD-erkennenden Integrinen nicht mehr ermöglichen (Cherny, Honan & Thiagarajan, 1993). In einem Adhäsionsversuch, bei dem Procathepsin X und seine Mutanten sowie aktives Cathepsin X als Beschichtungsmaterial verwendet wurden, konnte dann gezeigt werden, dass

HUVEC weder an die RGD-Mutanten noch an prozessiertes Cathepsin X ohne Propeptid binden können. Lediglich die Bindung an Procathepsin X mit einem intakten RGD-Motiv war möglich. Die RGD-Abhängigkeit der Interaktion konnte in einem zweiten Versuchsansatz auch durch die Verwendung von zyklischen RGD-Peptiden demonstriert werden, da durch die gleichzeitige Inkubation von HUVEC mit dem blockierenden RGD-Peptid die Anheftung an Procathepsin X verhindert wurde, während ein zyklisches RAD-Peptid keinen Einfluss auf die Bindung ausübte. Zudem ließ sich mit dem blockierenden anti- $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper LM609 die Adhäsion von HUVEC an Procathepsin X blockieren, während der anti- $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper JBS5 die Bindung erlaubte. Daraus kann man eindeutig folgern, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Interaktion von HUVEC mit Procathepsin X vermittelt.

Auch die Epifluoreszenzmikroskopie ermöglichte darüber hinaus den Nachweis der räumlichen Nähe von Integrin $\alpha_v\beta_3$ und (Pro)Cathepsin X bereits innerhalb der Zelle, und zwar an Lamellipodien von HUVEC. Die Analyse mit einem konfokalen Mikroskop zeigte zusätzlich eine Kolokalisation am HUVEC-Zellsaum, wenn die Zellen vorher mit einem Detergens leicht permeabilisiert wurden. Die Permeabilisierung war notwendig, um eine optimale Zugänglichkeit der Antikörper zu gewährleisten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass eine Komplexierung von Cathepsinen mit Zelloberflächenrezeptoren möglicherweise in sogenannten Mikrodomänen, z.B. in Caveolae, stattfindet (Mohamed & Sloane, 2006). Ebenso muss aber auch eine Kolokalisation innerhalb der Zelle nahe an der Plasmamembran in Betracht gezogen werden. Interessanterweise scheinen jedoch $\alpha_v\beta_3$ und (Pro)Cathepsin X nahe dem Zellkern nicht in denselben Vesikeln vorzuliegen, was darauf hindeutet, dass die beiden Proteine unterschiedliche Transportwege durchlaufen. Mit der Methode der Transmissionselektronenmikroskopie konnte ebenfalls eine Kolokalisation von β_3 -Integrinen auf der Oberfläche von HUVEC nachgewiesen werden. Dabei wurde deutlich, dass Integrin $\alpha_v\beta_3$ nicht der alleinige Oberflächenrezeptor für (Pro)Cathepsin X ist, da nur eine teilweise Kolokalisation beobachtbar war. Dies kann mit den Ergebnissen zweier Arbeitsgruppen erklärt werden, die zeigen, dass (Pro)Cathepsin X an Zelloberflächenproteoglykane und auch an β_2 -Integrine bindet (Nascimento et al., 2005; Obermajer et al., 2006). Schließlich konnte aus einem HUVEC-Zelllysat Procathepsin X mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ koimmunpräzipitiert werden. Dazu wurde der $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Antikörper LM609 mit dem Lysat inkubiert und anschließend isoliert. Die darauffolgende Analyse der gebundenen Antigene zeigte, dass sowohl das Integrin als auch Procathepsin X detektierbar waren, was wiederum für eine Interaktion zwischen $\alpha_v\beta_3$ und Procathepsin X spricht. Dabei war besonders interessant, dass im Eluat vorwiegend die Proform der Protease zu finden ist, obwohl die gereifte Form im Lysat den weitaus größeren Anteil ausmacht. Letzteres kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Protease überwiegend in aktiver Form innerhalb von Lysosomen deponiert wird. Eine weitere Bestätigung der RGD-Abhängigkeit der Bindung wurde durch eine zweite Koimmunpräzipitation erbracht, bei der rekombinantes Procathepsin X eingesetzt wurde. Hierbei wurde gereinigtes Integrin $\alpha_v\beta_3$ zusammen mit Procathepsin X und dessen Mutanten in drei verschiedenen Ansätzen inkubiert. Darauf folgte eine Koimmunpräzipitation, bei der wiederum der $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Antikörper LM609

eingesetzt wurde. Lediglich Wildtyp-Procathepsin X mit einem intakten RGD-Motiv war in der Lage, an $\alpha_v\beta_3$ zu binden und somit koimmunpräzipitiert zu werden.

Letztendlich konnte mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) am BIACORE-Gerät eine konzentrationsabhängige Bindung von $\alpha_v\beta_3$ sowohl an Vitronektin als auch an Procathepsin X gemessen werden. Die RGD-Abhängigkeit der Reaktion wurde durch einen weiteren Versuch untermauert, bei dem durch die gleichzeitige Injektion des kompetitiv wirkende RGD-Peptides eine Interaktion sowohl von Vitronektin als auch von Procathepsin X mit $\alpha_v\beta_3$ verhindert wurde. Die geringfügige Interaktion mit der AAA-Procathepsin-X-Mutante ließ sich nicht zur Berechnung einer Dissoziationskonstante heranziehen und dürfte daher nur auf schwachen und unspezifischen Wechselwirkungen beruhen. Dies verdeutlicht erneut die RGD-Abhängigkeit der Interaktion. Die berechnete Dissoziationskonstante für die Bindung von Procathepsin X an $\alpha_v\beta_3$ liegt im Bereich von 100 nM. Da die pathophysiologische Serum-Konzentration von Procathepsin X ca. 1-10 nM beträgt (Nägler et al., 2006), kann die Größenordnung der Dissoziationskonstante durchaus eine physiologische Relevanz haben. Zudem können lokale Procathepsin-X-Konzentrationen z.B. bei inflammatorischen Prozessen noch deutlich höher sein als systemische Konzentrationen (Nägler, unveröffentlichte Ergebnisse).

Interessanterweise war die Integrin-Ligandeninteraktion stark abhängig von der Konzentration an Mn^{2+} -Ionen. Mn^{2+} induziert eine „aktivierte“ Konformation von Integrinen, die eine erhöhte Affinität zu ihren Bindungspartnern ermöglicht (Legler et al., 2001). Diese Konformationsänderung scheint offensichtlich auch für die Interaktion mit Procathepsin X notwendig zu sein.

Mittels SPR wurden noch zwei weitere RGD-abhängige Integrine als mögliche Liganden von Procathepsin X untersucht, nämlich der Fibronektin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ und das Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Mit $\alpha_5\beta_1$ wurde weder für Vitronektin noch für Procathepsin X eine deutliche Bindung verzeichnet. Während für Vitronektin an sich auch keine Bindung erwartet wurde, da es kein Ligand von $\alpha_5\beta_1$ ist (Pytela et al., 1985a), bestätigte das negative Ergebnis für Procathepsin X die Resultate der Adhäsionsversuche, bei denen der blockierende anti- $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper JBS5 die Bindung von HUVEC an Procathepsin X nicht verhindern konnte. Mit dem Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, das wie $\alpha_v\beta_3$ ein Rezeptor für Vitronektin ist, konnte im Vergleich zu $\alpha_v\beta_3$ mit Procathepsin X ebenfalls eine wenn auch etwas schwächere Interaktion gemessen werden. Dies könnte bedeuten, dass auch $\alpha_{IIb}\beta_3$ ein natürlicher Ligand für Procathepsin X ist und insbesondere die β_3 -Untereinheit der Integrine eine wesentliche Rolle für die Assoziation spielt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Procathepsin X *in vitro* an $\alpha_v\beta_3$ binden kann, und dass diese Wechselwirkung auch im Zellkulturmodell stattfindet. Welche physiologische Bedeutung dieser Interaktion zukommt, muss allerdings noch näher untersucht werden.

E.6 Integrine, Proteasen und Zellmigration

Integrine vermitteln der Zelle die Fähigkeit, auf verschiedenen Matrizes zu adhären oder zu migrieren. Auch dienen sie als Sensoren für die Beschaffenheit der Zellumgebung, die von der Zelle verändert werden kann. Aus diesen Gründen ist das Proteasensystem eng mit dem Integrinsystem gekoppelt. Über verschiedene Mechanismen regulieren Proteasen zusammen mit Integrinen den invasiven Phänotyp von Zellen. Gerät dieses Zusammenspiel aus dem Gleichgewicht, kann es zu pathologischen Prozessen kommen, wie z.B. zum Tumorwachstum und zur Metastasierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch die Proform der Protease Cathepsin X mit Integrinen in enger Wechselwirkung steht. Im Vergleich mit Cathepsin B finden sich einige interessante Auffälligkeiten. So wird die Sekretion von Cathepsin B in humanen Brustfibroblastenzellen über Kollagen-bindende Integrine induziert. Interessanterweise wird auch hier die Proform verstärkt sezerniert, was ähnlich wie für Procathepsin X darauf hindeutet, dass die Freisetzung nicht über den endosomalen Sezernierungsweg erfolgt (Koblinski et al., 2002). Procathepsin B ist auf der Oberfläche von humanen Brustkarzinomzellen mit dem Annexin-II-Tetramer kolokalisiert (Mai et al., 2000). Durch diese Interaktion erfolgt eine Lokalisierung der Proteaseaktivität in Caveolae der Zellen (Cavallo-Medved et al., 2003). Caveolae scheinen Orte für die Koordination und Regulation von Proteolyse und Signaltransduktion zu sein, da auch uPAR und dessen Ligand β_1 -Integrin dort lokalisiert sind (Mohamed & Sloane, 2006). Dadurch ist Cathepsin B nach seiner Aktivierung durch andere Proteasen (z.B. Elastase, Cathepsin D) in der Lage, auf verschiedene Weisen selbst proteolytisch zu wirken: Entweder durch den direkten Verdau von extrazellulären Matrixproteinen oder durch Aktivierung von Pro-uPA oder ProMMPs (Buck et al., 1992; Eeckhout & Vaes, 1977; Kobayashi et al., 1991). Dieses Proteasennetzwerk trägt sicherlich zur Redundanz von extrazellulären proteolytischen Systemen bei. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang eine Veröffentlichung von Vasiljeva et al. (2006), die zeigt, dass Cathepsin X offensichtlich partiell die Wirkung von Cathepsin B kompensieren kann. In dem verwendeten MMTV-PyMT („*mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen*“)-Mausmodell für Mammakarzinom führte der Cathepsin B „*knock-out*“ zwar zu einer signifikanten Verzögerung im Tumorwachstum und auch zu einer verringerten Tumorgroße, überraschenderweise konnte jedoch auf der Oberfläche der Maustumorzellen statt Cathepsin B aktives Cathepsin X detektiert werden. Zudem konnte die Behandlung der Zellen mit einem neutralisierenden Antikörper gegen Cathepsin X die Matrigel-Invasion der PyMT-CatB^{-/-}-Zellen signifikant reduzieren, nicht aber bei PyMT-CatB^{+/-}- oder ^{+/+}-Zellen (Vasiljeva et al., 2006). Dies läßt darauf schließen, dass Cathepsin X kompensatorisch für Cathepsin B auf der Zelloberfläche wirkt, und dass Cathepsin B und X eine Funktion bei der Zellinvasion ausüben. Diese Beobachtung stimmt auch mit dem Ergebnis unseres Invasionsversuches überein, der erkennen ließ, dass die Niederregulation von (Pro)Cathepsin X zu einer verringerten Invasion von HUVEC führt. Aufgrund der strikten Carboxypeptidaseaktivität von Cathepsin X kann allerdings eine Degradation der EZM ausgeschlossen werden. Zudem ist es recht unwahrscheinlich, dass Procathepsin X im Komplex mit $\alpha_v\beta_3$ aktiviert wird, da

durch eine Disulfidbrücke die Proregion fest mit dem aktiven Zentrum verankert ist und somit inhibitorisch wirkt. Dennoch kann durch die Interaktion mit dem Integrin oder auch zusätzlichen Liganden eine Änderung in der Konformation nicht ausgeschlossen werden, was eine Aktivierung der Protease auslösen könnte. Möglicherweise spielen auch Glykosaminoglykane bei der Bindung von (Pro)Cathepsin X an Integrine eine Rolle, da bekannt ist, dass Integrine mit diesen Oberflächenmolekülen interagieren (Saoncella et al., 1999). Interessanterweise führt aber die Bindung von Cathepsin X an Heparin zu einer Erniedrigung der Aktivität der Protease (Nascimento et al., 2005), während sich eine Interaktion mit Cathepsin B stabilisierend auf die Aktivität auswirkt (Almeida et al., 2001). Da somit die Beteiligung der proteolytischen Aktivität von Cathepsin X an der Fähigkeit zur Invasion von Zellen eher unwahrscheinlich ist, bestünde eine andere Möglichkeit der Wirksamkeit dieser Cysteinprotease im Rahmen des Invasionsprozesses darin, dass die Bindung von Procathepsin X an Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine Signaltransduktion auslöst und so über indirekte Effekte eine verstärkte Migration von Zellen erfolgt. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass die Inkubation von HUVEC mit der Serinprotease Thrombin, die ebenfalls über ein RGD-Motiv an $\alpha_v\beta_3$ bindet, zu einer Phosphorylierung von FAK führte (Abedi & Zachary, 1997). Deshalb wäre es auch für (Pro)Cathepsin X vorstellbar, dass über eine „*outside-in*“-Signaltransduktion zelluläre Signalwege angeschaltet werden, die das Migrationsverhalten von Zellen beeinflussen.

E.7 Suche nach weiteren Liganden von (Pro)Cathepsin X über verschiedene Arten der Affinitätschromatographie

Die Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ konnte nur entdeckt werden, weil sowohl die Aminosäuresequenz von Procathepsin X als auch das RGD-Motiv als Integrinerkennungssequenz bekannt waren. Da nicht jede Proteininteraktion über die Struktur vorhergesagt werden kann, müssen für die Suche nach unbekanntem Liganden oder Substraten andere Methoden verwendet werden. Die meisten heute bekannten Proteininteraktionen wurden über verschiedene Arten der Affinitätschromatographie aufgeklärt. Auch in dieser Arbeit sollten über zwei verschiedene Ansätze neue Liganden für (Pro)Cathepsin X detektiert werden. Bei der ersten Methode wurde über spezifische Antikörper das gesuchte Protein aus einem Zelllysate von THP-1-Zellen immunpräzipitiert und anschließend versucht, koeluierte Banden zu identifizieren. Dabei konnte das Protein MIF („*macrophage migration inhibitory factor*“) im Eluat gefunden werden. MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin mit einem Molekulargewicht von 12,5 kDa, das vor allem von den Zellen des Immunsystems produziert und sezerniert wird. Da es in intrazellulären Vesikeln gespeichert ist, muss es für die Freisetzung nicht neu synthetisiert werden und liegt deshalb auch intrazellulär in größeren Mengen vor (Calandra & Roger, 2003). Aus diesem Grund konnte MIF in einem zytosolischen THP-1-Lysat detektiert werden. Wie sich jedoch durch zusätzliche Versuche herausstellte, scheint MIF nur unspezifisch an die Agarosematrix zu binden, da durch eine zweite Methode (Pro)Cathepsin X nicht mit einem anti-MIF-Antikörper koimmunpräzipitiert werden konnte. Die Tatsache, dass in den Eluaten mit MIF-Banden keine deutlichen

(Pro)Cathepsin-X-Banden zu sehen waren, spricht ebenfalls für eine unspezifische Wechselwirkung von MIF mit der Matrix. Zudem konnte in einem Kontrollexperiment gezeigt werden, dass (Pro)Cathepsin X als Antigen in zu geringer Konzentration vorliegt, um mittels der auf Antikörper basierenden Affinitätschromatographie im Zelllysate nachgewiesen werden zu können. Deshalb wurde auf eine zusätzliche Methode der Affinitätschromatographie zurückgegriffen. Dabei wurde eine inaktive Mutante von Cathepsin X verwendet, bei der das Cystein des aktiven Zentrums (Cys31) gegen Alanin ausgetauscht wurde (Cathepsin-X-C31A). Dadurch sollte es möglich sein, nicht nur Liganden, sondern auch Substrate von Cathepsin X zu isolieren, da hierbei Cathepsin-X-C31A als eine Art „Substratfalle“ wirken sollte. Die Verwendung von katalytisch inaktiven Mutanten in der Affinitätschromatographie kann eine größere Ausbeute des zu isolierenden Substrates und eine Erhöhung der Stabilität des verwendeten Enzyms bewirken (Katoh et al., 1996). Die von uns generierte Mutante Cathepsin-X-C31A ist, wie in einer Aktivitätsmessung gezeigt, katalytisch inaktiv. Da eine eingefügte Mutation große Auswirkungen auf die Faltung von Proteinen haben kann, wurde mittels Zirkulardichroismus auch die Sekundärstruktur der Mutante im Vergleich zum Wildtyp überprüft. In diesem Fall scheint jedoch die Mutation die Struktur der Protease nicht zu beeinträchtigen, da die entsprechenden CD-Spektren fast identisch waren.

Ein erster Versuch der Cathepsin-X-C31A-Affinitätschromatographie eines THP-1-Zelllysats erbrachte erste Hinweise auf p97 als möglichen Cathepsin-X-Liganden. p97 gehört zur AAA-Familie der ATPasen („*ATPase associated with different cellular activities*“). Inwieweit die Interaktion eine biologische Relevanz hat, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Um weitere, mögliche Bindungspartner von (Pro)Cathepsin X zu finden, müssen noch andere Bedingungen für die Herstellung von Lysaten (z.B. Fraktionierung, Einsatz unterschiedlicher Detergenzien und Salzkonzentrationen) und für die Durchführung der Koimmunpräzipitationen ausgetestet werden. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Bindungspartnern mit schwacher Affinität zu (Pro)Cathepsin X, besteht in der chemischen Kreuzvernetzung, wie es auch für die Bindung von Cathepsin X mit ERGIC-53 gezeigt wurde (Appenzeller et al., 1999). Die Bindung möglicher Liganden sollte durch molekularbiologische und biochemische Methode, z.B. durch Einsatz geeigneter Mutanten und durch Oberflächenplasmonresonanz-Messungen, charakterisiert werden. Für eine Klärung der funktionellen Interaktion zwischen (Pro)Cathepsin X und möglichen Liganden müssten anschließend zusätzlich mikroskopische und zellbiologische Versuche durchgeführt werden.

E.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit konnten nähere Einblicke in die Regulation der Expression und Sekretion sowie der möglichen Funktion von (Pro)Cathepsin X erzielt werden. Sie betreffen sowohl die differentielle Produktion der cysteinabhängigen Protease in Immunzellen als auch ihre Vitronektin-induzierbare Sekretion, die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-assoziierte Zelloberflächenlokalisation des Proenzym und die Beteiligung von (Pro)Cathepsin X bei der Migration von Zellen durch eine extrazelluläre Matrix (EZM). Zudem sollten weitere Interaktionspartner von (Pro)Cathepsin X, wie etwa natürliche Substrate, Rezeptoren oder Transportproteine detektiert werden, die Aufschluss über die patho/physiologische Funktion von Cathepsin X geben könnten. Die Ligandensuche über affinitätschromatographische Methoden erwies sich jedoch als äußerst schwierig, da vor allem unspezifische Interaktionen auf den verwendeten Matrices das Auffinden von Liganden erschwerten. Um diese unspezifischen Interaktionen zu vermeiden, muss daher das Protokoll für die Affinitätschromatographie von Zelllysaten noch verbessert werden. So könnten für einen spezifischeren Nachweis einer Bindung stringenter Waschbedingungen angewendet werden, indem man z.B. Waschpuffer mit höherer Salzkonzentration wählt, oder die Dauer der Waschzyklen verlängert. Auch wäre eine stufenweise Elution durch Puffer mit ansteigenden Salzkonzentrationen oder variierenden pH-Werten eventuell von Vorteil, um eine bessere Trennung der eluierten Proteine zu erreichen. Positiv könnte sich auch eine Vorfraktionierung des Lysats auswirken, indem man bereits vor der Affinitätschromatographie eine Trennung in Membran-, Zytosol- und Zellkernfraktion durchführt.

Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch offensichtlich bereits erkennen, dass auch (Pro)Cathepsin X wie andere Cathepsine nicht nur eine intrazelluläre Funktion in Lysosomen haben dürfte, sondern auch auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert ist und dort möglicherweise spezifische Aufgaben ausübt. Dies zeigt sich z.B. darin, dass die Niederregulation von (Pro)Cathepsin X in HUVEC zu einer verminderten Invasivität führte. Da jedoch Cathepsin X nur Carboxypeptidaseaktivität besitzt, muss eine Rolle in der Invasion von Zellen durch eine direkte Degradation der EZM ausgeschlossen werden und eine andere, eventuell indirekte Wirkweise in Betracht gezogen werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Interaktion mit Integrinen steht.

Bedenkt man die verstärkte (Pro)Cathepsin-X-Sekretion nach Vitronektin-Stimulation im Hinblick auf die Fähigkeit von Procathepsin X, an Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu binden, so könnten zwei verschiedene Reaktionsmechanismen postuliert werden. Zum einen könnte schon eine intrazelluläre Bindung stattfinden, wenn Procathepsin-X-enthaltende Vesikel mit $\alpha_v\beta_3$ -enthaltenden Vesikeln fusionieren und anschließend ein gemeinsamer Transport an die Zelloberfläche stattfindet. Vitronektin könnte zur Beschleunigung dieses Prozesses beitragen, indem es durch die Bindung an Integrine das Zytoskelett und somit den Transport der Vesikel beeinflusst. In diesem Kontext ist bereits beschrieben, dass das RGD-Motiv auch für den intrazellulären

Transport von Proteinen von Bedeutung ist (Lusson et al., 1997). Allerdings müsste die Verschmelzung der Vesikel knapp unter der Zelloberfläche stattfinden, da die konfokalen Aufnahmen im Bereich des Golgi-Apparates nahe des Zellkerns keine Kollokalisierung von (Pro)Cathepsin X mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ zeigen.

Eine andere Möglichkeit läge in der Assoziation von Procathepsin X aus dem Extrazellulärraum an das Integrin, wobei Proteoglykane auf diesen Vorgang regulierend wirken könnten. Auch hier könnte eine Stimulation der Procathepsin-X-Freisetzung durch Vitronektin zu einer erhöhten lokalen Konzentration und somit zu einer vermehrten Bindung der Protease an das Integrin führen. Dadurch dürfte sich die Fähigkeit der Zellen zur Migration verändern, denn es wurde bereits gezeigt, dass Vitronektin zu einer erhöhten Invasivität führt (Bafetti et al., 1998). Nicht auszuschließen ist dabei ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der darin bestehen könnte, dass Procathepsin X in erhöhter, lokaler Konzentration in der Lage ist, Vitronektin von seinem Rezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu verdrängen und dadurch eine längerfristige Anheftung der Zellen an die EZM zu verhindern, was ebenfalls die Invasivität der Zellen erhöhen würde.

Um herauszufinden, ob eines dieser Modelle tatsächlich zutrifft, müssen daher noch weitere Versuche durchgeführt werden, die die Charakterisierung des intrazellulären Transportes von Procathepsin X nach Vitronektin-Stimulation und die Funktionsaufklärung der Bindung von Procathepsin X an Integrine zum Ziel haben. Entsprechende Erkenntnisse könnten besonders im Hinblick auf eine therapeutische Inhibition von Angiogenese und Metastasierung durch Integrinantagonisten von großem Nutzen sein (Kumar et al., 2001; Ruegg, Dormond & Mariotti, 2004).

F Literaturverzeichnis

- ABEDI, H. & ZACHARY, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 15442-51.
- ALMEIDA, P. C., NANTES, I. L., CHAGAS, J. R., RIZZI, C. C., FALJONI-ALARIO, A., CARMONA, E., JULIANO, L., NADER, H. B. & TERSARIOL, I. L. (2001). Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* **276**, 944-51.
- ALMEIDA, P. C., NANTES, I. L., RIZZI, C. C., JUDICE, W. A., CHAGAS, J. R., JULIANO, L., NADER, H. B. & TERSARIOL, I. L. (1999). Cysteine proteinase activity regulation. A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **274**, 30433-8.
- APPENZELLER, C., ANDERSSON, H., KAPPELER, F. & HAURI, H. P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* **1**, 330.
- ARGRAVES, W. S., SUZUKI, S., ARAI, H., THOMPSON, K., PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. (1987). Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* **105**, 1183-90.
- AUWERX, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22-31.
- BAFETTI, L. M., YOUNG, T. N., ITOH, Y. & STACK, M. S. (1998). Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem* **273**, 143-9.
- BARRETT, A. J., FRITZ, H., GRUBB, A., ISEMURA, S., JARVINEN, M., KATUNUMA, N., MACHLEIDT, W., MULLER-ESTERL, W., SASAKI, M. & TURK, V. (1986). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* **236**, 312.
- BARRETT, A. J., RAWLINGS, N. D. & O'BRIEN, E. A. (2001). The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* **134**, 95-102.
- BARRETT, A. J., RAWLINGS, N. D. & WOESSNER, J. F. (2003). *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edition, Amsterdam.
- BHATTACHARYA, S., FU, C., BHATTACHARYA, J. & GREENBERG, S. (1995). Soluble ligands of the alpha v beta 3 integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 16781-7.
- BIACORE. (1998). *BIAapplications Handbook*, Uppsala, Schweden.
- BLOTT, E. J. & GRIFFITHS, G. M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 122-31.
- BODE, W., TURK, D. & KARSHIKOV, A. (1992). The refined 1.9-A X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci* **1**, 426-71.
- BROMME, D., OKAMOTO, K., WANG, B. B. & BIROC, S. (1996). Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* **271**, 2126-32.
- BROOKS, P. C., SILLETTI, S., VON SCHALSCHA, T. L., FRIEDLANDER, M. & CHERESH, D. A. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **92**, 391-400.

- BROOKS, P. C., STROMBLAD, S., SANDERS, L. C., VON SCHALSCHA, T. L., AIMES, R. T., STETLER-STEVENSON, W. G., QUIGLEY, J. P. & CHERESH, D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85**, 683.
- BUCK, M. R., KARUSTIS, D. G., DAY, N. A., HONN, K. V. & SLOANE, B. F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* **282** (Pt 1), 273-8.
- CALANDRA, T. & ROGER, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800.
- CAVALLO-MEDVED, D., DOSESCU, J., LINEBAUGH, B. E., SAMENI, M., RUDY, D. & SLOANE, B. F. (2003). Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* **5**, 507-19.
- CELIS, J. E. (1994). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, Toronto.
- CHAMBON, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* **10**, 940-54.
- CHANDRAN, K., SULLIVAN, N. J., FELBOR, U., WHELAN, S. P. & CUNNINGHAM, J. M. (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-5.
- CHENG, X. W., KUZUYA, M., NAKAMURA, K., DI, Q., LIU, Z., SASAKI, T., KANDA, S., JIN, H., SHI, G. P., MUROHARA, T., YOKOTA, M. & IGUCHI, A. (2006). Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin alphanubeta3. *Am J Pathol* **168**, 685-94.
- CHERESH, D. A. (1987). Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6471-5.
- CHERNY, R. C., HONAN, M. A. & THIAGARAJAN, P. (1993). Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid in vitronectin abolishes cell adhesion. *J Biol Chem* **268**, 9725-9.
- CLARK, R. & GRIFFITHS, G. M. (2003). Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol* **15**, 516-21.
- COULOMBE, R., GROCHULSKI, P., SIVARAMAN, J., MENARD, R., MORT, J. S. & CYGLER, M. (1996). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *Embo J* **15**, 5492-503.
- CUNNINGHAM, E. L., JASWAL, S. S., SOHL, J. L. & AGARD, D. A. (1999). Kinetic stability as a mechanism for protease longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11008-14.
- CYGLER, M., SIVARAMAN, J., GROCHULSKI, P., COULOMBE, R., STORER, A. C. & MORT, J. S. (1996). Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* **4**, 405-16.
- DE BOER, H. C., DE GROOT, P. G., BOUMA, B. N. & PREISSNER, K. T. (1993). Ternary vitronectin-thrombin-antithrombin III complexes in human plasma. Detection and mode of association. *J Biol Chem* **268**, 1279-83.
- DEATON, D. N. & KUMAR, S. (2004). 6. Cathepsin K inhibitors: their potential as anti-osteoporosis agents. *Prog Med Chem* **42**, 245-375.
- DERYUGINA, E. I., RATNIKOV, B. I., POSTNOVA, T. I., ROZANOV, D. V. & STRONGIN, A. Y. (2002). Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **277**, 9749-56.
- DEUSSING, J., VON, O. I. & PETERS, C. (2000). Murine and human cathepsin Z: cDNA-cloning, characterization of the genes and chromosomal localization. *Biochim.Biophys.Acta* **1491**, 93.

- DEVANATHAN, G., TURNBULL, J. L., ZIOMEK, E., PURISIMA, E. O., MENARD, R. & SULEA, T. (2005). Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 445-52.
- DIAMOND, M. S. & SPRINGER, T. A. (1994). The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* **4**, 506-17.
- DOLENC, I., TURK, B., PUNGERCIC, G., RITONJA, A. & TURK, V. (1995). Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *J Biol Chem* **270**, 21626-31.
- DRACH, J., LOPEZ-BERESTEIN, G., MCQUEEN, T., ANDREEFF, M. & MEHTA, K. (1993). Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res* **53**, 2100-4.
- DRANSFIELD, I., CABANAS, C., CRAIG, A. & HOGG, N. (1992). Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol* **116**, 219-26.
- EDITORIAL. (2003). Whither RNAi? *Nat Cell Biol* **5**, 489-90.
- EECKHOUT, Y. & VAES, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* **166**, 21-31.
- EKMEKCI, H., SONMEZ, H., EKMEKCI, O. B., OZTURK, Z., DOMANIC, N. & KOKOGLU, E. (2002). Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J.Thromb.Thrombolysis*. **14**, 221.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- FRUTH, M. (2007). Arbeitstitel: Expression und Regulation von Cathepsin X in Prostatakarzinomzellen: Promotionsarbeit an der Medizinischen Fakultät der LMU München
- GAY, N. J. & WALKER, J. E. (1985). Molecular cloning of a bovine cathepsin. *Biochem J* **225**, 707-12.
- GELB, B. D., SHI, G. P., CHAPMAN, H. A. & DESNICK, R. J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**, 1236-8.
- GOCHEVA, V. & JOYCE, J. A. (2007). Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. *Cell Cycle* **6**.
- GONSCHEROWSKI, V., BECKER, B. F., MORODER, L., MOTRESCU, E., GIL-PARRADO, S., GLOE, T., KELLER, M. & ZAHLER, S. (2006). Calpains: a physiological regulator of the endothelial barrier? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H2035-42.
- GORETZKI, L., SCHMITT, M., MANN, K., CALVETE, J., CHUCHOLOWSKI, N., KRAMER, M., GUNZLER, W. A., JANICKE, F. & GRAEFF, H. (1992). Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* **297**, 112-8.
- GROVES, M. R., COULOMBE, R., JENKINS, J. & CYGLER, M. (1998). Structural basis for specificity of papain-like cysteine protease proregions toward their cognate enzymes. *Proteins* **32**, 504-14.
- GUNCAR, G., KLEMENCIC, I., TURK, B., TURK, V., KARAOGLANOVIC-CARMONA, A., JULIANO, L. & TURK, D. (2000). Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* **8**, 305-13.
- GURRATH, M., MULLER, G., KESSLER, H., AUMAILLEY, M. & TIMPL, R. (1992). Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem* **210**, 911-21.
- GUTHEIL, J. C., CAMPBELL, T. N., PIERCE, P. R., WATKINS, J. D., HUSE, W. D., BODKIN, D. J. & CHERESH, D. A. (2000). Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha v \beta 3$. *Clin Cancer Res* **6**, 3056-61.

- HANNON, G. J. & ROSSI, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371-8.
- HAPKE, S., KESSLER, H., ARROYO, D. P., BENGE, A., SCHMITT, M., LENGYEL, E. & REUNING, U. (2001). Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J.Biol.Chem.* **276**, 26340.
- HART, T. C., HART, P. S., MICHALEC, M. D., ZHANG, Y., FIRATLI, E., VAN DYKE, T. E., STABHOLZ, A., ZLOTOGORSKI, A., SHAPIRA, L. & SOSKOLNE, W. A. (2000). Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *J Med Genet* **37**, 88-94.
- HAYMAN, E. G., PIERSCHBACHER, M. D., OHGREN, Y. & RUOSLAHTI, E. (1983). Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4003-7.
- HOOD, J. D. & CHERESH, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* **2**, 91-100.
- HORTON, M. A. (1997). The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 721-5.
- HUANG, T. F. (1998). What have snakes taught us about integrins? *Cell Mol Life Sci* **54**, 527-40.
- HYNES, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- ILL, C. R. & RUOSLAHTI, E. (1985). Association of thrombin-antithrombin III complex with vitronectin in serum. *J Biol Chem* **260**, 15610-5.
- INAOKA, T., BILBE, G., ISHIBASHI, O., TEZUKA, K., KUMEGAWA, M. & KOKUBO, T. (1995). Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 89-96.
- IRIGOYEN, J. P., MUNOZ-CANOVES, P., MONTERO, L., KOZICZAK, M. & NAGAMINE, Y. (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* **56**, 104-32.
- JEDESZKO, C. & SLOANE, B. F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**, 1017-27.
- JOHANSSON, S. (1996). *Non-Collagenous Matrix Proteins*. Harwood Academic Publishers GmbH, Netherlands.
- JOHNSON, G. D., DAVIDSON, R. S., MCNAMEE, K. C., RUSSELL, G., GOODWIN, D. & HOLBOROW, E. J. (1982). Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J Immunol Methods* **55**, 231-42.
- JOURNET, A., CHAPEL, A., KIEFFER, S., LOUWAGIE, M., LUCHE, S. & GARIN, J. (2000). Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* **21**, 3411.
- KARRER, K. M., PEIFFER, S. L. & DITOMAS, M. E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3063-7.
- KATOH, T., KIKUCHI, N., NAGATA, K. & YOSHIDA, N. (1996). A mutant trypsin-like enzyme from *Streptomyces fradiae*, created by site-directed mutagenesis, improves affinity chromatography for protein trypsin inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**, 15-21.
- KLEMENCIC, I., CARMONA, A. K., CEZARI, M. H., JULIANO, M. A., JULIANO, L., GUNCAR, G., TURK, D., KRIZAJ, I., TURK, V. & TURK, B. (2000). Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* **267**, 5404-12.
- KOBAYASHI, H., SCHMITT, M., GORETZKI, L., CHUCHOLOWSKI, N., CALVETE, J., KRAMER, M., GUNZLER, W. A., JANICKE, F. & GRAEFF, H. (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem* **266**, 5147-52.

- KOBLINSKI, J. E., DODESCU, J., SAMENI, M., MOIN, K., CLARK, K. & SLOANE, B. F. (2002). Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J.Biol.Chem.* **277**, 32220.
- KRUEGER, S., KALINSKI, T., HUNDERTMARK, T., WEX, T., KUSTER, D., PEITZ, U., EBERT, M., NÄGLER, D. K., KELLNER, U., MALFERTHEINER, P., NAUMANN, M., ROCKEN, C. & ROESSNER, A. (2005). Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol* **207**, 32-42.
- KUMAR, C. C., MALKOWSKI, M., YIN, Z., TANGHETTI, E., YAREMKO, B., NECHUTA, T., VARNER, J., LIU, M., SMITH, E. M., NEUSTADT, B., PRESTA, M. & ARMSTRONG, L. (2001). Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin receptor antagonist. *Cancer Res.* **61**, 2232.
- KUO, S. C. & LAMPEN, J. O. (1974). Tunicamycin--an inhibitor of yeast glycoprotein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **58**, 287-95.
- KUPHAL, S., BAUER, R. & BOSSERHOFF, A. K. (2005). Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 195-222.
- LECHNER, A. M., ASSFALG-MACHLEIDT, I., ZÄHLER, S., STOECKELHUBER, M., MACHLEIDT, W., JOCHUM, M. & NÄGLER, D. K. (2006). RGD-dependent Binding of Procathepsin X to Integrin {alpha}vbeta3 Mediates Cell-adhesive Properties. *J Biol Chem* **281**, 39588-39597.
- LEE, J. O., BANKSTON, L. A., ARNAOUT, M. A. & LIDDINGTON, R. C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **3**, 1333-40.
- LEGLER, D. F., WIEDLE, G., ROSS, F. P. & IMHOF, B. A. (2001). Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations. *J Cell Sci* **114**, 1545-53.
- LI, Z., YASUDA, Y., LI, W., BOGYO, M., KATZ, N., GORDON, R. E., FIELDS, G. B. & BROMME, D. (2004). Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J.Biol.Chem.* **279**, 5470.
- LUSSON, J., BENJANNET, S., HAMELIN, J., SAVARIA, D., CHRETIEN, M. & SEIDAH, N. G. (1997). The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem.J.* **326**, 737.
- MACH, L., MORT, J. S. & GLOSSL, J. (1994). Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. *J Biol Chem* **269**, 13036-40.
- MAI, J., FINLEY, R. L., JR., WAISMAN, D. M. & SLOANE, B. F. (2000). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem* **275**, 12806-12.
- MATIKAINEN, S. & HURME, M. (1994). Comparison of retinoic acid and phorbol myristate acetate as inducers of monocytic differentiation. *Int J Cancer* **57**, 98-103.
- MEHTA, K. & LOPEZ-BERESTEIN, G. (1986). Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer Res* **46**, 1388-94.
- MOCHIZUKI, S. & OKADA, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* **98**, 621-8.
- MOHAMED, M. M. & SLOANE, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 764-75.
- MUSIL, D., ZUCIC, D., TURK, D., ENGH, R. A., MAYR, I., HUBER, R., POPOVIC, T., TURK, V., TOWATARI, T., KATUNUMA, N. & ET AL. (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *Embo J* **10**, 2321-30.

- NAKAGAWA, T., ROTH, W., WONG, P., NELSON, A., FARR, A., DEUSSING, J., VILLADANGOS, J. A., PLOEGH, H., PETERS, C. & RUDENSKY, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in *Ii* degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-3.
- NAKAGAWA, T. Y., BRISSETTE, W. H., LIRA, P. D., GRIFFITHS, R. J., PETRUSHOVA, N., STOCK, J., MCNEISH, J. D., EASTMAN, S. E., HOWARD, E. D., CLARKE, S. R., ROSLONIEC, E. F., ELLIOTT, E. A. & RUDENSKY, A. Y. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**, 207-17.
- NASCIMENTO, F. D., RIZZI, C. C., NANTES, I. L., STEFE, I., TURK, B., CARMONA, A. K., NADER, H. B., JULIANO, L. & TERSARIOL, I. L. (2005). Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys* **436**, 323-32.
- NIP, J., SHIBATA, H., LOSKUTOFF, D. J., CHERESH, D. A. & BRODT, P. (1992). Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* **90**, 1406-13.
- NURDEN, A. T. (2006). Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* **1**, 10.
- NÄGLER, D. K., KRUEGER, S., KELLNER, A., ZIOMEK, E., MENARD, R., BUHTZ, P., KRAMS, M., ROESSNER, A. & KELLNER, U. (2004). Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* **60**, 109.
- NÄGLER, D. K., LECHNER, A. M., OETTL, A., KOZACZYNSKA, K., SCHEUBER, H. P., GIPPNER-STEPPERT, C., BOGNER, V., BIBERTHALER, P. & JOCHUM, M. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods* **308**, 241-50.
- NÄGLER, D. K. & MENARD, R. (1998). Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* **434**, 135.
- NÄGLER, D. K. & MENARD, R. (2003). Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol Chem* **384**, 837-43.
- NÄGLER, D. K., ZHANG, R., TAM, W., SULEA, T., PURISIMA, E. O. & MENARD, R. (1999). Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**, 12648.
- OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVASNIK BERGANT, T., TURK, B. & KOS, J. (2006). Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res* **312**, 2515-27.
- OLSEN, J. G., KADZIOLA, A., LAURITZEN, C., PEDERSEN, J., LARSEN, S. & DAHL, S. W. (2001). Tetrameric dipeptidyl peptidase I directs substrate specificity by use of the residual pro-part domain. *FEBS Lett* **506**, 201-6.
- PANETTI, T. S. & MCKEOWN-LONGO, P. J. (1993). Receptor-mediated endocytosis of vitronectin is regulated by its conformational state. *J Biol Chem* **268**, 11988-93.
- PAPACONSTANTINO, M. E., CARRELL, C. J., PINEDA, A. O., BOBOFCHAK, K. M., MATHEWS, F. S., FLORDELLIS, C. S., MARAGOUDAKIS, M. E., TSOPANOGLIOU, N. E. & DI CERA, E. (2005). Thrombin functions through its RGD sequence in a non-canonical conformation. *J Biol Chem* **280**, 29393-6.
- PHAM, C. T. & LEY, T. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8627-32.
- PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., LOFTUS, J. & SMITH, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-8.
- PUNGERCAR, J. & IVANOVSKI, G. (2000). Identification and molecular cloning of cathepsin P, a novel human putative cysteine protease of the papain family. *Pflugers Arch* **439**, R116-8.

- PUZER, L., COTRIN, S. S., CEZARI, M. H., HIRATA, I. Y., JULIANO, M. A., STEFE, I., TURK, D., TURK, B., JULIANO, L. & CARMONA, A. K. (2005). Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *Biol Chem* **386**, 1191-5.
- PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. (1985a). A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5766-70.
- PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. (1985b). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* **40**, 191-8.
- RATNIKOV, B. I., ROZANOV, D. V., POSTNOVA, T. I., BACIU, P. G., ZHANG, H., DISCIPIO, R. G., CHESTUKHINA, G. G., SMITH, J. W., DERYUGINA, E. I. & STRONGIN, A. Y. (2002). An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* **277**, 7377-85.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290 (Pt 1)**, 205-18.
- RAWLINGS, N. D., MORTON, F. R. & BARRETT, A. J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**, D270-2.
- REDDY, V. Y., ZHANG, Q. Y. & WEISS, S. J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3849.
- REHM, H. (2002). *Proteinbiochemie/Proteomics*, 4th edition. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- REILLY, J. J., JR., CHEN, P., SAILOR, L. Z., MASON, R. W. & CHAPMAN, H. A., JR. (1990). Uptake of extracellular enzyme by a novel pathway is a major determinant of cathepsin L levels in human macrophages. *J.Clin.Invest* **86**, 176.
- REISER, J., OH, J., SHIRATO, I., ASANUMA, K., HUG, A., MUNDEL, T. M., HONEY, K., ISHIDOH, K., KOMINAMI, E., KREIDBERG, J. A., TOMINO, Y. & MUNDEL, P. (2004). Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem* **279**, 34827-32.
- REYNOLDS, A., LEAKE, D., BOESE, Q., SCARINGE, S., MARSHALL, W. S. & KHVOROVA, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-30.
- RODRIGUEZ, J. & DEINHARDT, F. (1960). Preparation of a semipermanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology* **12**, 316-7.
- ROLLI, M., FRANSVEA, E., PILCH, J., SAVEN, A. & FELDING-HABERMANN, B. (2003). Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9482-7.
- RUEGG, C., DORMOND, O. & MARIOTTI, A. (2004). Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1654**, 51-67.
- RUMPLER, G., BECKER, B., HAFNER, C., MCCLELLAND, M., STOLZ, W., LANDTHALER, M., SCHMITT, R., BOSSERHOFF, A. & VOGT, T. (2003). Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp.Dermatol.* **12**, 761.
- SAFTIG, P., HUNZIKER, E., WEHMEYER, O., JONES, S., BOYDE, A., ROMMERSKIRCH, W., MORITZ, J. D., SCHU, P. & VON FIGURA, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13453-8.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANTAMARIA, I., VELASCO, G., PENDAS, A. M., FUEYO, A. & LOPEZ-OTIN, C. (1998). Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* **273**, 16816-23.
- SAONCELLA, S., ECHTERMAYER, F., DENHEZ, F., NOWLEN, J. K., MOSHER, D. F., ROBINSON, S. D., HYNES, R. O. & GOETINCK, P. F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2805-10.
- SAXENA, S., JONSSON, Z. O. & DUTTA, A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**, 44312-9.
- SCHECHTER, I. & BERGER, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-62.
- SCHVARTZ, I., SEGER, D. & SHALTIEL, S. (1999). Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 539-44.
- SEIFFERT, D. & LOSKUTOFF, D. J. (1991). Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem* **266**, 2824-30.
- SERVEAU-AVESQUE, C., MARTINO, M. F., HERVE-GREPINET, V., HAZOUARD, E., GAUTHIER, F., DIOT, E. & LALMANACH, G. (2006). Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell* **98**, 15-22.
- SHAW, E. & DEAN, R. T. (1980). The inhibition of macrophage protein turnover by a selective inhibitor of thiol proteinases. *Biochem J* **186**, 385-90.
- SHI, G. P., BRYANT, R. A., RIESE, R., VERHELST, S., DRIESSEN, C., LI, Z., BROMME, D., PLOEGH, H. L. & CHAPMAN, H. A. (2000). Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J.Exp.Med.* **191**, 1177.
- SHIMAOKA, M. & SPRINGER, T. A. (2003). Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 703-16.
- SIEGEL, M. R. & SISLER, H. D. (1963). Inhibition Of Protein Synthesis In Vitro By Cycloheximide. *Nature* **200**, 675-6.
- SIVARAMAN, J., NÄGLER, D. K., ZHANG, R., MENARD, R. & CYGLER, M. (2000). Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J.Mol.Biol.* **295**, 939.
- SMITH, J. W., PIOTROWICZ, R. S. & MATHIS, D. (1994). A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem* **269**, 960-7.
- SMITH, S. M. & GOTTESMAN, M. M. (1989). Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **264**, 20487-95.
- STEBBINS, C. E. & GALAN, J. E. (2001). Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**, 701-5.
- TAMKUN, J. W., DESIMONE, D. W., FONDA, D., PATEL, R. S., BUCK, C., HORWITZ, A. F. & HYNES, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271-82.
- TAO, K., STEARNS, N. A., DONG, J., WU, Q. L. & SAHAGIAN, G. G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* **311**, 19-27.
- TOLOSA, E., LI, W., YASUDA, Y., WIENHOLD, W., DENZIN, L. K., LAUTWEIN, A., DRIESSEN, C., SCHNORRER, P., WEBER, E., STEVANOVIC, S., KUREK, R., MELMS, A. & BROMME, D. (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin Invest* **112**, 517-26.

- TSCHOPP, J., MASSON, D., SCHAFER, S., PEITSCH, M. & PREISSNER, K. T. (1988). The heparin binding domain of S-protein/vitronectin binds to complement components C7, C8, and C9 and perforin from cytolytic T-cells and inhibits their lytic activities. *Biochemistry* **27**, 4103-9.
- TSOPANOGLIOU, N. E., ANDRIOPOULOU, P. & MARAGOUDAKIS, M. E. (2002). On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of alphavbeta3-integrin. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1501-10.
- TURK, B., TURK, D. & TURK, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 98-111.
- TURK, D., PODOBNIK, M., KUHELJ, R., DOLINAR, M. & TURK, V. (1996). Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett* **384**, 211-4.
- TURK, D., TURK, B. & TURK, V. (2003). Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem.Soc.Symp.*, 15.
- VACCA, A., RIA, R., PRESTA, M., RIBATTI, D., IURLARO, M., MERCHIONNE, F., TANGHETTI, E. & DAMMACCO, F. (2001). alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp.Hematol.* **29**, 993.
- VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.
- VASILJEVA, O., PAPAZOGLIOU, A., KRUGER, A., BRODOEFEL, H., KOROVIN, M., DEUSSING, J., AUGUSTIN, N., NIELSEN, B. S., ALMHOLT, K., BOGYO, M., PETERS, C. & REINHECKEL, T. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* **66**, 5242-50.
- VASILJEVA, O., REINHECKEL, T., PETERS, C., TURK, D., TURK, V. & TURK, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* **13**, 385-401.
- WANG, X., FERREIRA, A. M., SHAO, Q., LAIRD, D. W. & SANDIG, M. (2005). Beta3 integrins facilitate matrix interactions during transendothelial migration of PC3 prostate tumor cells. *Prostate* **63**, 65-80.
- WEX, T., LEVY, B., WEX, H. & BROMME, D. (1999). Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 401-7.
- WHATELEY, J. G. & KNOX, P. (1980). Isolation of a serum component that stimulates the spreading of cells in culture. *Biochem J* **185**, 349-54.
- WILLSTÄTTER, R. & BAMANN, E. (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **180**, 127-143.
- XIONG, J. P., STEHLE, T., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A., FRECH, M., GOODMAN, S. L. & ARNAOUT, M. A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaV beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**, 151.
- ZANETTI, A., CONFORTI, G., HESS, S., MARTIN-PADURA, I., GHIBAUDI, E., PREISSNER, K. T. & DEJANA, E. (1994). Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood* **84**, 1116-23.
- ZEGHOUF, M., GUIBERT, B., ZEEH, J. C. & CHERFILS, J. (2005). Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. *Biochem Soc Trans* **33**, 1265-8.
- ZHENG, X., SAUNDERS, T. L., CAMPER, S. A., SAMUELSON, L. C. & GINSBURG, D. (1995). Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12426-30.

ZHOU, A., HUNTINGTON, J. A., PANNU, N. S., CARRELL, R. W. & READ, R. J. (2003). How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* **10**, 541-4.

G Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Annette Maria Lechner
Geburtsdatum	8. Februar 1978
Geburtsort	Landshut
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1984 – 1988	Grundschule in Taufkirchen
1988 – 1997	Gymnasium Dorfen
Mai 1997	Abitur (1,6)
1997 – 2002	Biologie-Studium an der LMU München
Herbst 2001	Diplom-Biologen-Hauptprüfungen (1,3)
Januar bis Oktober 2002	Diplomarbeit mit dem Titel: „Mechanismen der differentiellen Expression von HLA-G und HLA-E auf Tumorzellen“ (1,3)
Seit April 2003	Promotion bei Prof. Dr. M. Jochum in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der LMU München
Seit 15.Juli 2007	Wissenschaftlerin bei der MorphoSys AG, Martinsried, Planegg

Stipendium

Promotionsstipendium der LMU München zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses

Lehrtätigkeit während der Promotion

- Mitbetreuung im Praktikum für Klinische Chemie und Hämatologie
- Durchführung von Wahlpflichtpraktika für Studenten der Pharmazie
- Betreuung von Praktikanten

Vorträge und Posterpräsentationen

21th Winterschool “Proteases and their Inhibitors”

Februar 2004, Tiers, Italien

Annette Lechner, Annemarie Oettl, Marianne Jochum and Dorit K. Nägler.

Cathepsin X distribution in human blood and leukemic cells. (Vortrag)

22th Winterschool “Proteases and their Inhibitors”

März 2005, Tiers, Italien

Annette Lechner, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt, Shirley Gil-Parrado, Marianne Jochum and Dorit K. Nägler.

Procathepsin X interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. (Vortrag)

4th General Meeting of the Proteolysis Society (IPS)

Oktober 2005, Québec City, Kanada

Annette Lechner, Dorit K. Nägler, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt, and Marianne Jochum.

Procathepsin X interaction with integrins. (Posterpräsentation)

23th Winterschool “Proteases and their Inhibitors”

März 2006, Tiers, Italien

Annette Lechner, Irmgard Assfalg-Machleidt, Werner Machleidt, Marianne Jochum and Dorit K. Nägler.

RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates cell-adhesive properties. (Vortrag)

Veröffentlichungen

1. **Lechner, A. M.**, Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., and Nägler, D. K. (2006). RGD-dependent Binding of Procathepsin X to integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* 281, 39588-39597.
2. Nägler, D. K., **Lechner, A. M.**, Oettl, A., Kozaczynska, K., Scheuber, H. P., Gippner-Steppert, C., Bogner, V., Biberthaler, P., and Jochum, M. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods* 308, 241-250.
3. Soukenik, M., Diehl, A., Leidert, M., Sievert, V., Bassow, K., Leitner, D., Labudde, D., Ball, L. J., **Lechner, A. M.**, Nägler, D. K., and Oschkinat, H. (2004). The SEP domain of p47(171-270) acts as a reversible competitive inhibitor of cathepsin L.

H Danksagung

Ohne die Unterstützung der nachfolgend genannten Personen wäre die Entstehung und das Gelingen dieser Arbeit nur schwerlich möglich gewesen:

Für die Vertretung meiner Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München möchte ich Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar (Lehrstuhlinhaberin im Bereich Pharmazeutische Biologie) ganz herzlich danken, ebenso für ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum (Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) danke ich sehr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und finanzielle Unterstützung. An die schöne Zeit an ihrem Institut werde ich mich immer gerne erinnern.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dorit Nägler für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sowie für die Möglichkeit, ein so interessantes Thema bearbeiten zu dürfen.

Frau Dr. Irmgard Assfalg-Machleidt und Herrn Prof. Dr. Werner Machleidt (Adolf-Butenand-Institut für Physiologische Chemie) möchte ich für die Einführung und Unterstützung am Biacore danken, sowie für die hilfreichen und anregenden Diskussionen, die entscheidend zum Entstehen der Publikation und dieser Arbeit beigetragen haben.

Durch die Kooperationsbereitschaft von Frau PD Dr. Mechthild Stöckelhuber und Herrn PD Dr. Stefan Zahler (Pharmazeutische Biologie) konnten für diese Arbeit und die Publikation wertvolle Ergebnisse gewonnen werden. Dafür sei ihnen herzlichst gedankt.

Herrn Reinhard Mentele (Max-Planck Institut, Martinsried) danke ich für die ausgezeichneten Proteinsequenzierungen, Frau Elisabeth Weiher-Stingel (Max-Planck Institut, Martinsried) für die Durchführung der CD-Analyse. PD Dr. Norbert Schaschke (Organische Chemie III, Universität Bielefeld) sei für die Bereitstellung des Substrates gedankt.

Den Mitgliedern der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie Prof. Dr. Hans Fritz (ehemaliger Abteilungsleiter), Prof. Dr. Christian Sommerhoff, Prof. Dr. Edwin Fink, PD Dr. Alexander Faussner, Dr. Christian Ries, Dr. Peter Neth, Dr. Cornelia Gippner-Steppert, Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger und Dr. Beatrice Bachmeier danke ich für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und für ihre beständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Dr. Peter Neth sei besonders für die Organisation und Leitung des Doktorandenseminars gedankt, das uns viele anregende Einblicke in die unterschiedlichsten Arbeitsgebiete ermöglicht hat.

Den Abteilungssekretärinnen, Frau Karola Rügamer-Biese und Frau Evelyn Themel danke ich für ihr stets offenes Ohr und tatkräftige Hilfe bei allen organisatorischen und verwaltungstechnischen Fragen.

Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, Caro Boltze, Monika Chichon, Max Fruth, Karolina Kozaczynska, Thea Gleitsmann, Karolina Burda, und Steffen Kraus möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit danken, und auch für ihre Hilfsbereitschaft und gute Laune.

Frau Annemarie Oettl und Frau Ruza Hell danke ich ganz herzlich für ihre exzellente technische Unterstützung.

Vielen weiteren ehemaligen und gegenwärtigen Abteilungskollegen und –kolleginnen, die ich ob ihrer Vielzahl im einzelnen nicht nennen kann, möchte ich ebenso danken

Meiner Tante Anna, Frau Anna Maria Weinzierl, möchte ich nicht nur für ihre wertvollen Ratschläge und anregenden Gespräche herzlichst danken, sondern auch für viele andere Dinge.

Oliver Popp danke ich für die wunderbare gemeinsame Zeit, die schönen Erlebnisse, fürs Mut-Machen und fürs Zuhören.

Mein ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich meinen Eltern - für das in mich gesetzte Vertrauen, ihren bedingungslosen Rückhalt und die großzügige Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.