



Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktorin: Prof. Dr. Marion B. Kiechle)

**„Interaktion der Serpine Plasminogen-Aktivator-  
Inhibitor Typ 1 und 2 mit  
Kallikrein-ähnlichen Peptidasen“**

Tina Miriam Denise Steil

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 04.12.2020 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.06.2021 angenommen.

**Für Iris**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Plasminogenaktivator (PA-) System .....	1
1.1.1	Physiologische Rolle .....	4
1.1.2	Tumorstadium, -invasion und -metastasierung .....	6
1.1.3	Prognostischer und prädiktiver Stellenwert des uPA-Systems bei Tumorerkrankungen.....	11
1.1.4	Das uPA-System als therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie.....	13
1.2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) 1 und 2 .....	13
1.3	Kallikrein-ähnliche Peptidasen .....	15
1.3.1	Proteasen .....	15
1.3.2	Kallikrein-ähnliche Peptidasen .....	16
1.3.3	Proteinstruktur.....	17
1.3.4	Katalytischer Wirkmechanismus.....	18
1.3.5	Rolle der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 2 (KLK2) und 4 (KLK4) in physiologischen Prozessen, sowie ausgewählten Krankheitsbildern und Tumorerkrankungen.....	20
1.3.6	Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen.....	24
1.4	Zielsetzung .....	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1	Material.....	28
2.1.1	Chemikalien .....	28
2.1.2	Bakterienstamm und Antibiotika .....	30
2.1.3	Chromogene Substrate .....	30
2.1.4	Enzyme.....	31
2.1.5	Antikörper .....	31
2.1.6	Puffer, Lösungen und Bakterienkulturmedien.....	32
2.2	Methoden .....	36
2.2.1	Expression von rekombinantem humanen PAI-1 und -2 in <i>E. coli</i> .....	36
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41

2.2.3	Messung der inhibitorischen Kapazität .....	41
2.2.4	Gelelektrophorese.....	43
2.2.5	Färbemethoden.....	45
2.2.6	Western Blot .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem PAI-1 .....	47
3.1.1	Expression von rekombinantem humanen PAI-1 in <i>E. coli</i> .....	47
3.1.2	Affinitätschromatographische Reinigung von humanem PAI-1 aus <i>E. coli</i> unter nativen Bedingungen .....	48
3.2	Expression, Reinigung und Rückfaltung von PAI-2 .....	51
3.2.1	Expression von rekombinantem humanen PAI-2 in <i>E. coli</i> .....	51
3.2.2	Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinantem humanen PAI-2.....	51
3.2.3	Rückfaltung von PAI-2 nach affinitätschromatographischer Reinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen .....	54
3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	55
3.3.1	PAI-1.....	55
3.3.2	PAI-2.....	57
3.4	Messung der inhibitorischen Kapazität von PAI-1 und PAI-2 gegenüber verschiedenen Serinproteasen .....	59
3.4.1	Die inhibitorische Kapazität von PAI-1 .....	59
3.4.2	Die inhibitorische Kapazität von PAI-2 .....	65
3.5	Visualisierung des kovalenten Komplexes aus PAI-1 und KLK4 .....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2xTY	<i>Yeast Extract Tryptone</i>
A2M	$\alpha_2$ -Makroglobulin
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest	zweifach destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
KLK	Kallikrein-ähnliche Peptidase
min	Minuten
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Plasminogenaktivator (PA-) System

Bei einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des menschlichen Organismus spielen Auf-, Um- und Abbauprozesse extrazellulärer Proteine durch Proteasen eine tragende Rolle (Petzinger 2010). Das Plasminogenaktivator-System (uPAS) ist ein bereits sehr gut erforschtes proteolytisches System. Es setzt sich zusammen aus dem gewebespezifischen (*tissue*-)Plasminogenaktivator (tPA), dem Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator (uPA), dessen spezifischem membrangebundenen Rezeptor (uPAR), sowie den Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 bis 4 (PAI-1 bis PAI-4). Ursprünglich wurde das PA-System in seiner Rolle als Aktivator des Zymogens Plasminogen zu seiner proteolytisch aktiven Form Plasmin beschrieben (Cammalleri et al. 2019). Plasminogen ist ein vorwiegend in der Leber synthetisiertes Plasmaprotein ( $\alpha$ 2-Plasmaprotein), welches enzymatisch inaktiv ist und erst durch Spaltung an einer bestimmten Peptidbindung durch uPA oder tPA proteolytisch aktiviert wird. tPA scheint jedoch hauptsächlich im Rahmen der Thrombolysse eine Rolle zu spielen, während uPA den Hauptaktivator von Plasminogen darstellt (Andreasen et al. 1997).

uPA ist eine trypsin-ähnliche Serinprotease mit hoher Substratspezifität. Es interagiert vor allem mit Plasminogen und wandelt dieses zu seiner proteolytisch aktiven Form Plasmin um. Plasmin hingegen ist eine potente Protease mit breitem Substratspektrum (Duffy et al. 2014). Durch die spezifische Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin durch uPA können verschiedene proteolytische Kaskaden angestoßen werden. Hierzu gehören der Abbau von Fibrin oder anderen Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Glycoproteine und Proteoglycane wie Fibronectin und Vitronectin), die Spaltung und Aktivierung anderer Proteasen (z.B. Matrixmetalloproteasen (*MMP*)), sowie die Aktivierung von Wachstumsfaktoren. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren werden Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung direkt begünstigt (Duffy et al. 2014).

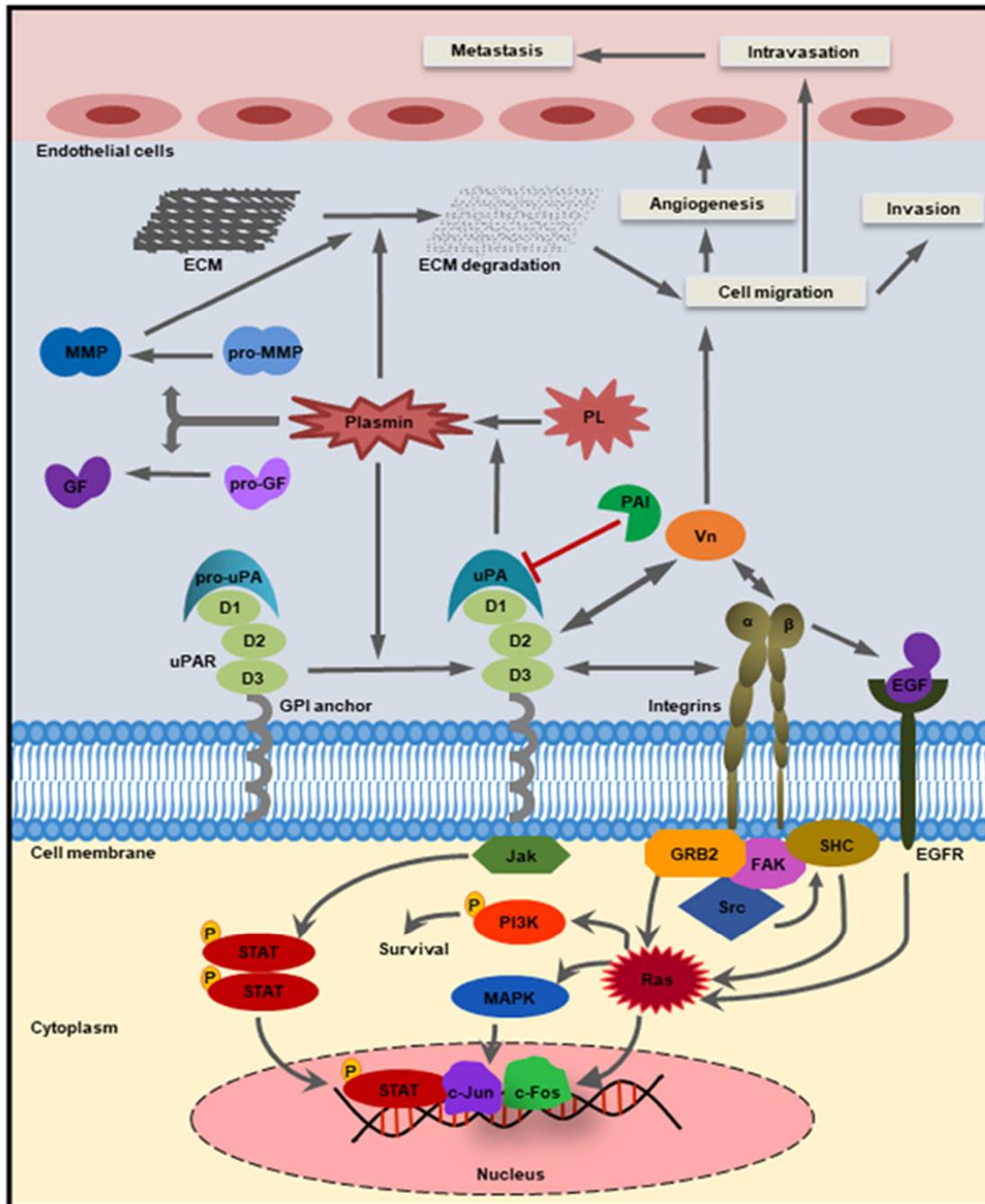
uPA wird als einkettiges, enzymatisch inaktives Proenzym (pro-uPA) exprimiert und erst durch proteolytische Spaltung zum zweikettigen, *high molecular weight*-uPA (HMW-uPA) aktiviert. Pro-uPA kann in Lösung oder gebunden an seinen Rezeptor uPAR aktiviert werden. Dieser ist mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) an der Zellmembran befestigt, eine Transmembrandomäne besitzt er nicht. So muss der Rezeptor zur Signalübertragung mit anderen Faktoren, wie *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-Rezeptor), *low-density lipoprotein receptor related proteins* (LDLR) oder spezifischen Integrinen interagieren. Die so ausgelösten Signale werden über die MAP-Kinase, JAK-STAT- und FAK-Kaskade transduziert (Duffy et al. 2014). uPA kann also Zellproliferation und -metastasierung sowohl direkt durch Bindung an seinen Rezeptor, als

auch indirekt durch Abbau der extrazellulären Matrix und Freisetzung von Wachstumsfaktoren beeinflussen (Duffy et al. 2014). **Abbildung 1** zeigt eine schematische Übersicht über das PA-System und die uPAR-vermittelte Signaltransduktion.

Der gewebspezifische Plasminogenaktivator tPA wird größtenteils von Endothelzellen gebildet und spielt hauptsächlich im Rahmen der Fibrinolyse eine wesentliche Rolle, indem er Fibrin bindet und darauffolgend durch Konversion von Plasminogen zu Plasmin die proteolytische Degradation des Blutclots initiiert (Lee and Huang 2005). Dies macht tPA zum Hauptinitiator der Fibrinolyse. Im Gegensatz zu uPA bindet tPA nicht an auf Tumorzelloberflächen lokalisierte Rezeptoren und spielt so in Tumorzellproliferation und -metastasierung keine Rolle (Arroyo De Prada et al. 2002).

In unzähligen physiologischen Prozessen wie Hämostase, Fibrinolyse, Immunantwort, Hautzellerneuerung, Verflüssigung der Samenflüssigkeit und Wundheilung sowie pathologischen Vorgängen wie Tumorwachstum, -invasion und –metastasierung ist das System und dessen Regulierung von zentraler Bedeutung (Arroyo De Prada et al. 2002; Stefanini et al. 2015). Die Genexpression der Komponenten des PA-Systems wird durch ein komplexes parakrines Signalnetzwerk an Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert (Andreasen et al. 1997).

Die Plasminogenaktivierung wird durch die endogenen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) 1 und 2, als auch durch  $\alpha$ 2-Antiplasmin und  $\alpha$ 2-Makroglobulin reguliert (Mahmood et al. 2018).



**Abbildung 1. Schematische Übersicht über das PA-System und die uPAR-vermittelte Signaltransduktion.** uPA als auch das Zymogen pro-uPA können an den aus 3 Domänen (D1-D3) bestehenden uPA-Rezeptor binden. Dieser ist über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert. Rezeptorgebundenes uPA kann dann proteolytisch inaktives Plasminogen in Plasmin umwandeln. Plasmin spaltet und aktiviert damit Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Bestandteile der extrazellulären Matrix. Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor hemmt sowohl uPA als auch Plasmin. Der uPA-Rezeptor bindet neben uPA auch Integrine, wodurch intrazelluläre Kaskaden (z.B. JAK-STAT, FAK) aktiviert werden und Zellmigration, -invasion und -metastasierung vermittelt werden (Mahmood et al. 2018). Die Abbildung wurde aus **Mahmood et al. 2018** entnommen.

## 1.1.1 Physiologische Rolle

### 1.1.1.1 Wundheilung

Das uPA-System spielt im Rahmen der Wundheilung eine entscheidende Rolle. Der Prozess der Wundheilung setzt ein komplexes Zusammenspiel aus Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und Hormonen voraus und lässt sich in vier sich zeitlich und räumlich überlappende Phasen untergliedern: Hämostase, Entzündungsreaktion, Zellproliferation/-reparatur und Zellremodelling (Schultz and Mast 1999). Unmittelbar nach Eintritt einer Gewebsverletzung tritt zunächst die Hämostase in Kraft. Nach der Verletzung eines Blutgefäßes kommt es zunächst zur lokalen Vasokonstriktion, der Blutfluss wird so reduziert, die Thrombozyten aktiviert und eine Reihe an Mediatoren freigesetzt. Dies führt dazu, dass die Blutplättchen an Kollagenfasern der Wundränder adhären und dadurch weitere Thrombozyten aktiviert werden, was unter Mitwirkung von diversen Mediatoren zur irreversiblen Aggregation führt und somit letztlich in der Ausbildung eines Thrombozytenpfropfs mündet (Fahlke et al. 2008). So ist die Gefäßverletzung nach wenigen Minuten bereits provisorisch verschlossen. Dauerhaft abgedichtet wird diese im Rahmen der sekundären Hämostase, wobei durch Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, welche als Proenzyme aus der Leber synthetisiert werden, Fibrinpolymere einen stabilen Thrombus bilden (Fahlke et al. 2008). Die Schlüsselreaktion der plasmatischen Gerinnung ist die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, das sich zu einem Netz zusammenlagert, in dem sich Blutzellen fangen (roter Thrombus) und so die Blutungsquelle abdichten (Huppelsberg and Walter 2013). Die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin geschieht durch enzymatische Proteolyse durch die Protease Thrombin (Gekle 2015). Die während der Ausbildung des Wundpfropfes aus Thrombozyten ausgeschütteten Wachstumsfaktoren (*platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor-I* (ILGF-I), *epidermal growth factor* (EGF) und *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ )) und Zytokine haben chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen und setzen Reparaturprozesse der Haut in Gang (Schultz and Mast 1999). So kommt es zur Invasion von Neutrophilen und Makrophagen, welche hochpotente Proteasen (uPA, Matrixmetalloproteasen (neutrophile Elastase, neutrophile Kollagenase (MMP-8)), u.a.) freisetzen, die dem Abbau beschädigter extrazellulärer Matrix dienen und somit den Aufbau neuer ECM möglich machen. Eine Reihe an *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass Plasmin im Rahmen der Wundheilung Zellmigration durch direkte Proteolyse der extrazellulären Matrix, als auch indirekt durch Aktivierung anderer matrixdegradierender Signalwege, z.B. Metalloproteasen, erleichtert (Chan et al. 2001). Als weitere Aufgabe kommt den Neutrophilen die Abwehr eindringender Mikroorganismen durch Phagozytose und Bildung von Sauerstoffradikalen zu (Smola et al. 2001). Monozyten nehmen als aktivierte Wundmakrophagen Einfluss auf Angiogenese und Fibroblastenproliferation (Smola et al. 2001). So schütten Neutrophile, Makrophagen, Fibroblasten und epidermale Zellen ihrerseits

weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, was durch Stimulierung der Bildung von Kollagen, Proteinen der ECM, sowie Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen zur Ausbildung der initialen Narbe im Sinne eines provisorischen Ersatzgewebes führt. Diese dritte Phase der Wundheilung, die Proliferationsphase, kann bis zu einigen Wochen dauern. In der letzten Phase wird das bisher gebildete zellreiche, matrixarme Granulationsgewebe in zellarmes, matrixreiches Narbengewebe umgebaut (Remodellingphase) (Smola et al. 2001) und die Wunde reepithelialisiert, bis schließlich Gewebsauf- und -abbauprozesse ein Gleichgewicht erreichen und die Wundheilung dann abgeschlossen ist (Schultz and Mast 1999). Zur Einstellung eines Gleichgewichtes werden Inhibitoren proteolytisch agierender Enzyme gebildet. Dysbalancen in Auf- und Abbauprozessen, während der Wundheilung und des Zellmodellings können zu Wundheilungsstörungen im Sinne von chronisch ulzerierenden Wunden auf der einen und überschießender Narbenbildung auf der anderen Seite führen.

PAI-1 spielt durch Regulation der fibrinolytischen Kaskade eine große Rolle im Rahmen der Wundheilung. So ist bekannt, dass bei Patienten, welche unter Diabetes und einer damit verbundenen beeinträchtigten Wundheilung leiden, erhöhte PAI-1-Werte im Blutplasma gemessen werden können (Rebalka et al. 2015). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Expression des Gens, welches für PAI-1 codiert, unter vielen anderen Faktoren auch vom Glucose- und Insulinspiegel reguliert wird (Lee and Huang 2005). Es wurde jedoch festgestellt, dass die erhöhte Expression unabhängig von der Blutzuckereinstellung ist (Rebalka et al. 2015). Denn neben dem Blutzucker- und Insulinhaushalt werden im Rahmen von Diabetes mellitus zahlreiche andere endokrine Faktoren dysreguliert. Bis heute ist bekannt, dass letztlich über 100 verschiedene physiologische Faktoren eine Rolle bei der beeinträchtigten Wundheilung von Patienten mit Diabetes spielen. Vor allem die Entzündungs- und Proliferationsphase im Rahmen der Wundheilung verlaufen defizitär. Durch längere Präsenz von Neutrophilen und Makrophagen und somit verlängerter Phase des Abbaus extrazellulärer Matrix, beeinträchtigte Angiogenese und Fibroblastenproliferation, verminderte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kommt es verspätet zu einer qualitativ verminderten Ausbildung eines Granulations- und schließlich Narbengewebes (Rebalka et al. 2015).

Chan et al. (2001) zeigten, dass Keratinozyten, welche im Normalfall kein PAI-1 exprimieren, kurz nach Gewebeverletzungen PAI-1 exprimieren. In dieser Studie wurden PAI-1 defiziente Mäuse mit Wildtypmäusen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass bei PAI-1 *Knockout*-Mäusen die Wundheilung signifikant schneller ablief als bei den zu vergleichenden Wildtypmäusen (Chan et al. 2001). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie hypothesierten Rebalka et al. (2015), dass durch pharmakologische Hemmung von PAI-1 eine Verbesserung der Wundheilung diabetischer Patienten erzielt werden könnte und somit potenzielle Folgeprobleme wie Hospitalisierung und Extremitätenamputation vermieden

werden könnten. Es wurden Mäuse, welchen Diabetes mellitus induziert wurde, mit nicht-diabetischen Mäusen bezüglich des Wundheilungsverhaltens mit oder ohne Gabe eines medikamentösen PAI-1-Inhibitors untereinander verglichen. Die Induktion von Diabetes mellitus erfolgte durch Gabe von Streptozotocin, welches spezifisch toxisch für die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas ist. Es konnte gezeigt werden, dass zum einen die Wunden bei nicht-diabetischen Mäusen schneller heilten, zum anderen die Wundreepithelialisierung und Zellmigration epidermaler Zellen bei PAI-1-Inhibition signifikant verbessert werden konnte. Die medikamentöse Hemmung von PAI-1 stellt somit eine therapeutisch nützliche neue Strategie dar, um die Wundheilungssituation bei Patienten mit Diabetes mellitus zu verbessern (Rebalka et al. 2015).

Doch nicht nur in physiologischen Prozessen, sondern auch in einer Vielzahl von pathophysiologischen Vorgängen spielt das PA-System eine bedeutende Rolle.

### **1.1.2 Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung**

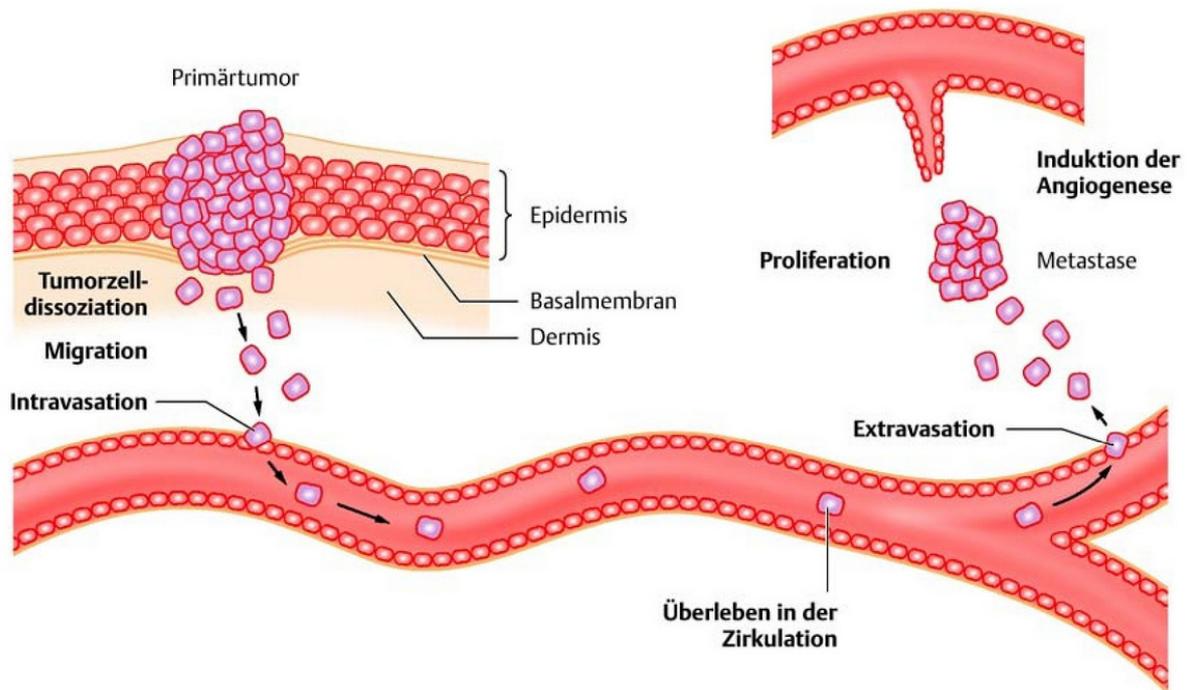
"Die überwiegende Zahl der Todesfälle durch Krebserkrankungen ist nicht auf die vom Primärtumor ausgehende Schädigung des Gewebes und dessen Funktion, sondern auf die Effekte der Metastasen zurückzuführen" (Szeimies 2010). Der entscheidende Unterschied zwischen benigner und maligner Neoplasie besteht in der Fähigkeit einer neoplastischen Zelle Zellgrenzen zu überschreiten und zu metastasieren. Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen geschieht durch mehrere voneinander abhängige komplexe Prozesse. Der Weg einer einzelnen neoplastischen Zelle zur Metastase verläuft vereinfacht dargestellt in folgenden Schritten:

- **Dissoziation:** Die Tumorzellen müssen sich zunächst durch Änderung der Zell-Zell-Adhäsion, sowie Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) vom Zellverband des Primärtumors lösen (Andreasen et al. 1997; Szeimies 2010).
- **Migration:** Der Dissoziation der Tumorzelle vom Primärtumor folgt deren aktive Ortsänderung (Migration). Die Tumorzellmigration ist ein sich zyklisch wiederholender Vorgang aus zunächst Elongation der Zelle in Migrationsrichtung unter Ausbildung eines sogenannten Pseudopods, gefolgt von integrinvermittelter Anheftung an die ECM, myosinmediierter Zellkontraktion und Rückzug des Zellendes in Migrationsrichtung. Es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht aus Bildung und Auflösung von Zell-ECM-Kontakten ein. Das setzt die Fähigkeit der Tumorzelle der Degradation der ECM durch Expression, Sekretion und Aktivierung tumorassoziierter proteolytischer Systeme voraus. Diese werden zum einen von der Tumorzelle selbst produziert, zum anderen ist die neoplastische Zelle in der Lage umgebende stromale

Zellen zu aktivieren und eine erhöhte proteolytische Aktivität zu induzieren (Szeimies 2010).

- **Intravasation:** Durch Migration und ECM-Degradation kann die neoplastische Zelle nicht nur interstitielles Bindegewebe, sondern auch durch Proteolyse der impermeablen Basalmembran das Lumen von Blut- und Lymphgefäßen invadieren (Szeimies 2010).
- **Unterdrückung der Apoptose und Vermeidung der Elimination durch das Immunsystem:** Nach der Intravasation in Blut- und Lymphsystem ändert sich das Umgebungsmilieu der Tumorzelle wesentlich. Sie ist nun nicht länger von extrazellulärer Matrix umgeben und damit dem Immunsystems ausgesetzt. Im Gegensatz zu Zellen des Blutes, wie zum Beispiel Monozyten und Lymphozyten, sind die meisten anderen Zelltypen, wie auch Tumorzellen, ohne Kontakt zu extrazellulärer Matrix nicht überlebensfähig, da diese über Adhäsionsmoleküle fortwährend Überlebenssignale übermittelt. Bleiben diese aus, wird die Apoptose induziert. Durch (epi-)genetische Veränderungen, welche eine Signaltransduktion auch ohne ECM möglich machen, gelingt es einem Bruchteil der Tumorzellen dennoch der Apoptose zu entgehen (Szeimies 2010).
- **Extravasation am Zielorgan/-gewebe, Adhäsion und Adaptation:** Nach Migration durch das Blut- oder Lymphsystem und Umgehung der Apoptose und des Immunsystems muss die Zelle dann am Zielorgan/-gewebe das Gefäßsystem über Adhäsion am Endothel, Proteolyse der Gefäßwand und Migration in das Zielgewebe wieder verlassen. Ist die Tumorzelle in der Lage sich an die Umgebung des befallenen Gewebes (ECM, Wachstumsfaktorspiegel) anzupassen oder autokrin aktiv, kann sie proliferieren und damit Metastasen ausbilden (Szeimies 2010).
- **Induktion der Angiogenese:** Um die eigene Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherzustellen, induzieren die neoplastischen Zellen schließlich Angiogenese. Dieser komplexe Vorgang der Tumorprogression bezieht ebenso verschiedene proteolytische Vorgänge ein (Szeimies 2010).

Der Prozess der Tumormetastasierung ist in **Abbildung 2** am Beispiel eines malignen Melanoms dargestellt.



**Abbildung 2. Tumormetastasierung am Beispiel eines malignen Melanoms.** Abbildung aus Szeimies 2010 übernommen.

Zu den oben genannten proteolytischen Systemen zur Degradation der extrazellulären Matrix, sowie der Basalmembran gehören das uPA-System, Cathepsine und Matrixmetalloproteasen, wobei dem uPA-System eine Schlüsselrolle zukommt (Mahmood et al. 2018). Entscheidend ist hierbei die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch Bindung von uPA an seinen Rezeptor (uPAR) (Mahmood et al. 2018). Plasmin ist in der Lage einen Großteil extrazellulärer Proteine zu degradieren. Das breite Substratspektrum von Plasmin umfasst unter anderem auch Zymogene von spezifischen Matrixmetalloproteasen (MMP), welche in ihrer aktivierten Form wiederum diverse Proteine der ECM zu degradieren vermögen (Duffy et al. 2014). Bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen können erhöhte Expressionslevel von uPA, uPAR und PAI-1 beobachtet werden und stehen mit einer ungünstigen Prognose des Patienten bezüglich voraussichtlichem rezidivfreiem Intervall, beziehungsweise voraussichtlichem Gesamtüberleben, in Verbindung (Andreasen et al. 1997). Die Überexpression der Gene, die für diese Enzymsysteme kodieren, charakterisiert den invasiven Phänotyp von malignen Zellen und kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Zu diesen Faktoren zählen Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine, welche im Rahmen der Degradation der extrazellulären Matrix durch Plasmin vermehrt freigesetzt werden, wodurch es zu einer positiven Rückkopplung kommt (Mahmood et al. 2018).

Neben des Abbaus der extrazellulären Matrix sind die Komponenten des uPA-Systems zudem in der Lage durch proteolytische Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *endothelial growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor 2*

(FGF-2) und *tissue growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ )) und Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel Integrine, die Tumorzellproliferation steigern (Mahmood et al. 2018).

Der Anheftungs- und Ablösungszyklus im Rahmen der Migration wird durch die Bindung von uPA an seinen Rezeptor katalysiert. Die Adhäsionsvorgänge werden unter anderem durch die Bindung von uPAR an Vitronectin und Interaktion zwischen uPAR und Integrinen vermittelt. So nimmt insbesondere der uPA-Rezeptor im Zuge der Migration einen wichtigen Stellenwert ein. Studien konnten darlegen, dass die Expression von uPA, Plasminogen, uPAR und PAI-1 während der Tumorzellmigration hochreguliert wird und die Zellmigration durch Einsatz von Antikörpern gegen uPA gehemmt werden kann (Andreasen et al. 1997). In einer Studie von Shapiro et al. (1996) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in uPA-*Knockout*-Mäusen die Tumorprogression signifikant gesenkt werden konnte (Shapiro et al. 1996). Erhöhte uPA- und uPAR-Level stehen in Korrelation mit einer schlechten Prognose des Patienten bezüglich rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben (Andreasen et al. 1997). PAI-1 wiederum hat durch Regulation der Interaktion zwischen verschiedenen Adhäsionsmolekülen, insbesondere durch Blockierung der Bindung von Integrinen an Vitronectin, einen negativen Einfluss auf die Tumorzellmigration (Mahmood et al. 2018; Vousden et al. 2019). Es konkurriert einerseits mit uPAR um die Bindung an Vitronectin und kann andererseits die Interaktion zwischen Integrinen und Vitronectin behindern (Magdolen et al. 2000).

PAI-1 scheint in der Regulation der Apoptose von Tumorzellen eine ambivalente Rolle zu spielen, beziehungsweise, je nach Tumorentität, die Apoptose sowohl zu triggern als auch zu inhibieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das uPA-System in der Lage ist, die Apoptose von Tumorzellen zu inhibieren. So legte eine Studie von Subramanian et al. (2006) dar, dass durch Inhibition von uPA und uPAR durch spezifische Antikörper die Apoptose in Brustkrebs- und Ovarialkarzinomzellen getriggert werden konnte (Kenny et al. 2011; Subramanian et al. 2006). In *in vivo* Studien konnte durch Einsatz spezifischer, polyklonaler, gegen uPA und uPAR gerichteter Antikörper das Wachstum und die Metastasierungsrate von Brustkrebszellen gemindert werden (Mahmood et al. 2018). In Prostatakarzinomzellen hingegen wurde gezeigt, dass eine erhöhte PAI-1 Expression mit einem gesteigerten programmierten Zelltod einhergeht (Chen et al. 2008). Andere Studien zeigten wiederum, dass aktives PAI-1 durch Inhibition von Caspasen, welche eine Schlüsselrolle im programmierten Zelltod spielen, die Apoptose vermindern kann (Chen et al. 2004). Im Gegensatz zur Interaktion mit Serinproteasen bildet PAI-1 mit Caspasen jedoch weder einen SDS-stabilen Komplex, noch fungiert es als Substrat (Chen et al. 2004).

Durch Induktion der Freisetzung von proangiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2 hat uPA ebenso einen positiven Einfluss auf die Angiogenese im Rahmen der Tumormetastasierung (Mahmood et al. 2018). Studien hierzu belegen, dass durch Inhibition

von uPA beziehungsweise dessen Rezeptors die Angiogenese in Tumorzellen gehemmt werden kann.

Nun liegt die Vermutung nahe, dass erhöhte Level von PAI-1, als Inhibitor des uPA-Systems, mit einer guten Prognose für Patienten mit malignen Erkrankungen einhergehen. Verblüffenderweise ist jedoch genau das Gegenteil der Fall: Erhöhte Expressionslevel von PAI-1 begünstigen das Tumorwachstum und sind so mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Lee and Huang 2005). Dieses Phänomen wird auch „PAI-1 Paradoxon“ genannt (Beaulieu et al. 2007). Masuda et al. (2013) zeigten, dass durch spezifische Inhibition von PAI-1 im Tiermodell die Tumorprogression und Angiogenese im Rahmen der Metastasierung gesenkt werden konnte (Masuda et al. 2013). PAI-1 geht neben uPA noch weitere Interaktionen ein, welche sich fördernd auf Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung auswirken (Mahmood et al. 2018). PAI-1 kann die Freisetzung gerinnungsfördernder Partikel aus Endothelzellen begünstigen. Diese Partikel fördern die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin und in der Folge die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Wird Fibrin in der Tumorzellumgebung freigesetzt, kann es die Tumorzelle ummanteln und diese damit vor Erkennung und Abbau durch die Zellen des Immunsystems schützen (Im et al. 2004).

Im Gegensatz dazu ist die definitive Rolle von PAI-2 im Rahmen der Tumorgenese und somit dessen prognostischer Stellenwert für Tumorpatienten bis dato noch nicht einheitlich geklärt. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass erhöhte Expressionslevel von PAI-2 mit vermindertem Tumorwachstum und Metastasierungspotenz in Verbindung stehen (Mahmood et al. 2018). *In vitro* Studien konnten einen hemmenden Einfluss auf die Tumorzellinvasion nachweisen (Andreasen et al. 1997). Zudem liegen beispielsweise für Brust- und Ovarialkarzinom Daten vor, welche belegen, dass Patientinnen mit erhöhtem immunhistochemisch darstellbaren prätherapeutischem Expressionsstatus von PAI-2 insgesamt eine bessere Prognose bezüglich ihrer Gesamtüberlebenszeit zeigen als Patientinnen mit niedrigem Expressionsmuster (Su et al. 2015). Andererseits sind erhöhte immunhistochemisch darstellbare Expressionsraten von PAI-2 bei Patienten mit Endometrium- oder kolorektalem Karzinom mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Su et al. 2015).

Zusammenfassend scheint die Balance der Proteasen und derer Inhibitoren ausschlaggebend für optimales Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung zu sein (Lee and Huang 2005).

### **1.1.3 Prognostischer und prädiktiver Stellenwert des uPA-Systems bei Tumorerkrankungen**

In 1.1.2 wurde die Rolle des uPA-Systems im Rahmen des Tumorwachstums, -invasion und -metastasierung beschrieben. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Komponenten des uPA-Systems in malignen Tumoren höher exprimiert sind als in benignen Tumoren oder gesundem Gewebe (Andreasen et al. 1997). Die Expression des Gens, das für den uPA-Rezeptor codiert (PLAUR), zeigt sich zwar in Tumorzellen erhöht, nicht jedoch im umliegenden Gewebe, was ihn zu einem besonders attraktiven therapeutischen Ziel der Krebstherapie macht (Mahmood et al. 2018). Auch konnten Zusammenhänge zwischen den Genexpressionsleveln von PAI-1 und der Prognose bezüglich rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben gefunden werden (Duffy et al. 2014). Hohe PAI-1-Level in Tumorgewebe stehen bei vielen Tumorarten in Verbindung mit kürzerem rezidivfreien und Gesamtüberleben (Arroyo De Prada et al. 2002; Jankova et al. 2001).

So stellen die Komponenten des uPA-Systems in zahlreichen Tumorentitäten mögliche Therapieziele dar und dienen hier auch als prognostische Faktoren als Biomarker. Als Biomarker eignen sich endogene Moleküle, welche sich in Körperflüssigkeiten oder -geweben kosteneffektiv messen lassen können und nachweislich mit einer bestimmten Tumorentität in Verbindung stehen. Sie können der Diagnosestellung und Prognoseabschätzung dienlich sein und bei der Einordnung des Therapieerfolges helfen (Borgoño and Diamandis 2004).

#### **1.1.3.1 Mamma-Karzinom**

Die uPA-Aktivität ist in malignen Mamma-Tumoren im Vergleich zu benignen Tumoren deutlich erhöht. Auch steht die Aktivität von uPA, sowie die Expressionsrate von uPAR in Zusammenhang mit der Tumorgröße und Metastasierungsfähigkeit und folglich schlechterer Prognose (Mahmood et al. 2018). Mehrere retrospektive und prospektive Studien der letzten 3 Jahrzehnte haben gezeigt, dass erhöhte Genexpressionslevel von uPA, uPAR und PAI-1 in Brustkrebsgewebe aussagekräftige prognostische Faktoren für ein schlechteres Patienten-Outcome, insbesondere auch bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus sind (Duffy et al. 2014). Sie können für prognostische Aussagen bezüglich des rezidivfreien Überlebens, als auch der Gesamtüberlebensrate herangezogen werden (Mahmood et al. 2018). uPA gilt als einer der aussagekräftigsten prognostischen Faktoren für Brustkrebserkrankungen (Andreasen et al. 1997).

Jänicke et al. zeigten (1993), dass, in Kombination betrachtet, Patientinnen mit niedrigen uPA-, also auch PAI-1-Antigenwerten in Tumorgewebsextrakten ein deutlich erniedrigtes Rezidivrisiko aufwiesen verglichen mit Patientinnen, bei denen beide Level erhöht waren. Darüber hinaus konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass Brustkrebspatientinnen in frühen Tumorstadien mit hohen uPA- und PAI-1-Leveln gut auf adjuvante Chemotherapie

ansprechen (Duffy et al. 2014). So eignen sich uPA- und PAI-1-Level bei Patienten mit negativem Lymphknoten- und HER-2-Status zur Identifizierung derer Patientinnen, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden. Für uPAR konnte gezeigt werden, dass erhöhte uPAR-Level sowohl mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall als auch kürzerem Gesamtüberleben einhergingen (Andreasen et al. 1997). Erhöhte PAI-2 Level scheinen in Verbindung mit einem positiven Outcome bei Brustkrebspatientinnen zu stehen. Eine Studie von Bouchet et al. (1994) konnte zeigen, dass erniedrigte PAI-2-Level in Brustkrebspatienten, unabhängig vom Lymphknotenstatus, mit einem kürzeren metastasenfrem Überleben einhergingen.

### **1.1.3.2 Ovarial-Karzinom**

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte präoperative Level der löslichen Form des uPAR (suPAR) im Serum mit einem schlechteren Gesamtüberleben verknüpft sind und als prognostischer Faktor für die zu erwartende Effektivität einer möglichen Chemotherapie herangezogen werden können (Mahmood et al. 2018). Bezüglich der prognostischen Signifikanz von uPA und PAI-1 in Bezug auf das Gesamtüberleben ist die Studienlage noch uneinheitlich. Es liegen zum einen Daten vor, welche uPA und PAI-1 einen hohen prädiktiven Wert zuschreiben, andere Studien wiederum zeigten, dass erhöhte Level von uPA und PAI-1 keine prognostische Signifikanz aufwiesen.

### **1.1.3.3 Cervix- und Endometrium-Karzinom**

Studien konnten in Hinsicht auf Cervix- und Endometrium-Karzinome erhöhte Level von uPA, PAI-1 und PAI-2 in Gewebeproben invasiv wachsender Cervix-Karzinome als auch erhöhte uPA-Plasmalevel belegen. Plasmalevel von tPA und PAI-1 zeigten keine Zusammenhänge (Mahmood et al. 2018). Endometrium-Karzinom-Patienten zeigen erhöhte Level des suPAR im Plasma als auch in chirurgisch gewonnenen Gewebeproben.

Neben den obengenannten Tumorentitäten konnte für weitere Malignitäten wie Sarkome, Melanome, gastrointestinale und kolorektale Tumorerkrankungen, Lungen-, Pankreas-, Ösophagus-, Leber-, Blasen-, Nieren-, sowie Kopf- und Hals-Tumore eine prädiktive und prognostische Relevanz von uPA und PAI-1 gezeigt werden (Andreasen et al. 1997; Mahmood et al. 2018). Erhöhte PAI-2-Expression scheint zum aktuellen Forschungsstand in einigen Tumorentitäten eher mit einer guten Prognose verbunden zu sein. Ausnahme hierbei bilden kolorektale Tumoren. Hier konnten Ganesh et al. (1994) zeigen, dass höhere PAI-2-Level Indikator für aggressives Tumorwachstum sind. Insgesamt konzentriert sich die aktuelle Studienlage jedoch vor allem auf PAI-1. Die prognostische und prädiktive Rolle von PAI-2 in diversen Tumorentitäten gilt es in weiten Teilen noch zu klären.

#### 1.1.4 Das uPA-System als therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie

Eine Reihe an Tiermodell-Studien konnte zeigen, wie vielversprechend das uPA-System als therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie ist. Zur Unterbindung der proteolytischen Aktivität von uPA wurden bisher im Wesentlichen zwei Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurde uPA direkt durch selektive synthetische *low-molecular-weight* Inhibitoren gehemmt, zum anderen wurde die Bindung von uPA an uPAR durch antagonistisch agierende Peptide oder Antikörper unterbunden (Duffy et al. 2014). In zahlreichen klinischen Studien konnten hier erfolgversprechende Ergebnisse erzielt werden.

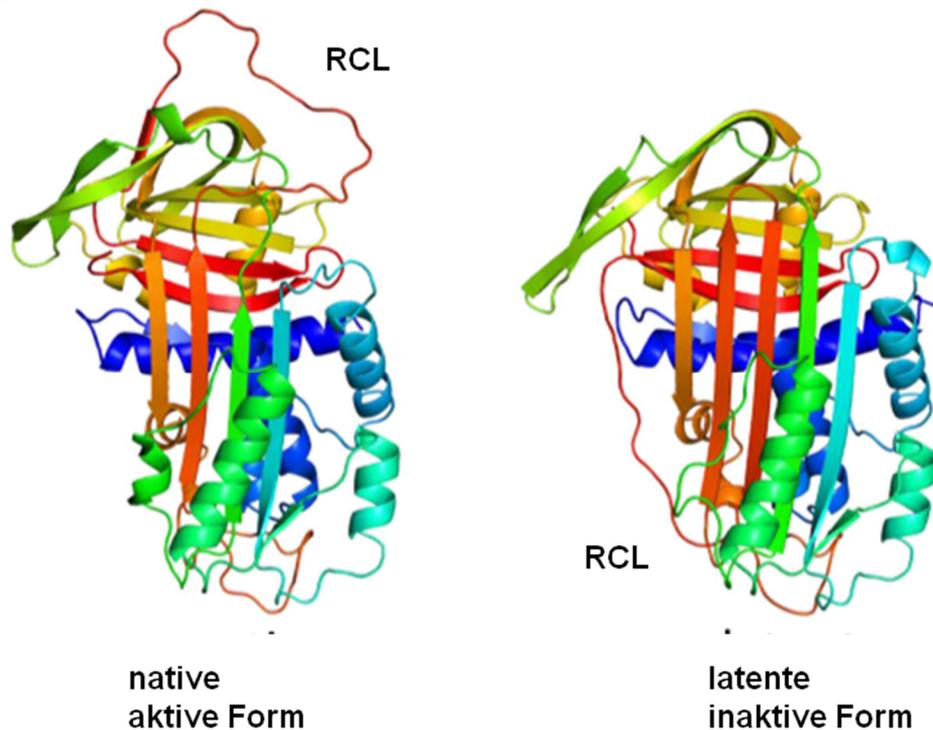
In seiner proteolytischen Funktion wird uPA durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren gehemmt. Insgesamt 4 Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1 bis -4) sind derzeit bekannt, worunter PAI-1 und -2 den größten Stellenwert einnehmen. PAI-1 wiederum wird von einer Reihe an hochkomplexen Mechanismen reguliert, welche in weiten Bereichen noch unerforscht sind (Goettig et al. 2010).

### 1.2 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) 1 und 2

Die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren sind Glycoproteine und gehören zu der Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Serpine wie PAI,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Antithrombin III und  $\alpha$ 2-Antiplasmin zeigen strukturelle Ähnlichkeiten (Lindahl et al. 1990). Sie bestehen alle aus rund 400 Aminosäuren und haben, abhängig vom Grad der Glykosylierung, ein Molekulargewicht von 38-70 kDa. Sie zeichnen sich durch eine ähnliche, komplexe Tertiärstruktur aus drei  $\beta$ -Faltblättern (A, B und C), neun  $\alpha$ -Helices und einer exponierten Schleife (*reactive center loop*), aus (Lee and Huang 2005). Das RCL stellt die Targetsequenz für den proteolytischen Angriff durch das katalytische Zentrum der Protease dar. Die inhibitorische Aktivität der Serinproteasen setzt daher die Exposition des RCL voraus (Vousden et al. 2019). Im menschlichen Blutplasma machen sie etwa 10% des Gesamteiweißes aus. PAI-1 ist das bis dato am intensivsten beforschte Serpin und der effektivste Inhibitor von tPA und uPA (Gressner and Arndt 2018).

PAI-1 ist ein einkettiges Glykoprotein, hat ein Molekulargewicht von ~45 kDa (nicht glykosyliert) bzw. ~50 kDa (glykosyliert) und besteht aus 379 Aminosäuren. "Das Fehlen von Cysteinresten und damit das Fehlen von Disulfidbrücken bedingen die relative Instabilität des Proteins" (Gressner and Arndt 2018). Aktives PAI-1, welches sich durch die Zugänglichkeit zum *reactive center loop* auszeichnet, konvertiert mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Stunden bei 37° *in vitro* in eine inaktive, latente Form (Vousden et al. 2019). Die Halbwertszeit *in vivo* ist geringfügig länger. Beim Übergang zur latenten Form kommt es zur Insertion seines *reactive center loops* als zusätzliches  $\beta$ -Faltblatt in die zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur, wodurch PAI-1 inhibitionsunfähig wird. **Abbildung 3** zeigt die Proteinstruktur von PAI-1 in nativer und

latenter Form. Durch Denaturierung und Rückfaltung, unter Verwendung denaturierender Reagenzien, wie zum Beispiel Guanidin Hydrochlorid und Natriumdodecylsulfat (SDS), kann es allerdings in seine aktive Form rückgeführt werden (Preissner et al. 1990). In seiner aktiven Form stabilisiert wird der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor durch Interaktion mit Vitronectin (Andreasen et al. 1997; Lee and Huang 2005), wodurch seine Halbwertszeit um den Faktor 3-4 verlängert wird (Preissner et al. 1990).



**Abbildung 3. Proteinstruktur PAI-1 in nativer und latenter Form.** Bei Konversion der nativen aktiven Form in die inaktive latente Form kommt es zur Insertion des *reactive center loops* als zusätzliches  $\beta$ -Faltblatt in die zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur. Modifiziert nach **Vousden et al. 2019**.

*In vitro* zeigt PAI-1 bis zu 100-fach schnellere Inhibitionsgeschwindigkeiten als PAI-2 (Duffy et al. 2014). Bei 37°C reagiert PAI-1 mit uPA in etwa 5 Minuten vollständig, während PAI-2 unter gleichen Bedingungen etwa 30 Minuten zur Inhibition benötigt (Gressner and Arndt 2018). PAI-1 kann überwiegend extrazellulär nachgewiesen werden (Mahmood et al. 2018) und wird von einer Vielzahl an Zellen exprimiert, hierunter Fibroblasten, glatte Muskelzellen, endotheliale Zellen, Hepatozyten, Zellen des Immunsystems und Thrombozyten (Lee and Huang 2005).

PAI-2 wird, anders als PAI-1, vorwiegend im Zytoplasma vorgefunden und hat in nicht-glykosylierter intrazellulärer Form ein Molekulargewicht von ~47 kDa, in glykosylierter nach extrazellulär exportierter Form von ~60 kDa und besteht aus 415 Aminosäuren (Magdolen et al. 2000; Marín-García et al. 2007). Unter normalen Bedingungen, ausgenommen während der Schwangerschaft, ist es im Plasma nicht nachweisbar (Ganten and Ruckpaul 2013). Der

Grund für die unterschiedliche Verteilung beider Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren ist zum aktuellen Kenntnisstand noch ungeklärt (Mahmood et al. 2018). Die Expression der Gene, welche für PAI-1 (*SERPINE1*) und PAI-2 (*SERPINE2*) kodieren, wird, wie die Expression aller Komponenten des PA-Systems, über Wachstumsfaktoren (wie TGF- $\beta$ ), Hormone (wie TNF- $\alpha$ ) und Zytokine reguliert.

Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren vermögen ihre Zielenzyme spezifisch und irreversibel durch einen einzigartigen Mechanismus zu hemmen (für Details siehe Diskussion).

## 1.3 Kallikrein-ähnliche Peptidasen

### 1.3.1 Proteasen

Die von der *International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)* eingeführte *EC-Klassifikation* teilt die Enzyme nach der Art der Reaktion, die sie katalysieren, ein. Unterteilt werden 6 Hauptgruppen mit Untergruppen. Jedem Enzym wird eine 4-stellige, durch Punkte getrennte, Zahlenfolge zugeordnet, die das Enzym vollständig charakterisiert. Die Proteasen gehören zur Hauptgruppe 3 (Hydrolasen), bilden hier die Untergruppe 3.4, welche wiederum in 14 Unter-Unter-Klassen unterteilt wird.

Ausgehend vom Angriffsort werden Peptidasen in Exopeptidasen, welche Aminosäuren nur vom Ende der Peptidkette abspalten von Endopeptidasen, welche innerhalb einer Peptidkette gelegene Peptidbindungen spalten, unterschieden (<https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/proteasen/5092>). Exopeptidasen wiederum werden, je nachdem an welchem freien Ende der Polypeptidkette sie angreifen, in Amino- und Carboxypeptidasen eingeteilt. Aminopeptidasen spalten vom freien N-Terminus, Carboxypeptidasen vom freien Carboxyende. Endopeptidasen können, durch Spaltung der Polypeptidkette in Fragmente, Amino- und Carboxyenden für den darauffolgenden Abbau durch Exopeptidasen freilegen. Durch Modifikation von Proteinen durch limitierte Proteolyse können Endopeptidasen inaktive Enzymvorstufen (Prozyme, Zymogene) aktivieren und Signalpeptide aus sezernierten Proteinen (Präproteine) durch Signalpeptidasen abspalten (Bisswanger 2015).

Die *EC-Klassifikation* berücksichtigt jedoch nicht die gemeinsame Abstammung oder ähnliche Reaktionsmechanismen der einzelnen Enzyme, sodass auch strukturell unähnliche Enzyme in einer EC-Klasse klassifiziert sein können (Spring 2006). Das 1993 von Neil D. Rawlings und Alan J. Barrett etablierte Klassifikationsschema *MEROPS* berücksichtigt sowohl Aspekte struktureller Ähnlichkeit, als auch evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen der Enzyme (*MEROPS - the Peptidase Database* 2018). So werden Peptidasen in der *MEROPS-*

*Datenbank* anhand der biochemischen Eigenschaften ihres aktiven Zentrums und der damit verbundenen Katalysemechanismen klassifiziert (**Tabelle 1**).

Name	Reaktive Gruppe im aktiven Zentrum	Beispiel
Aspartatproteasen	Aspartat	Pepsin Cathepsine D, E
Cysteinproteasen	Cystein	Cathepsine B, H, L Caspasen Calpaine
Metalloproteasen	Zweiwertiges Metallion ( $Zn^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Mn^{2+}$ )	Elastasen Gelatinasen Kollagenasen Matrixmetalloproteasen (MMP)
Serinproteasen	Serin	uPA Kallikrein-ähnliche Peptidasen Plasmin Thrombin Trypsin Chymotrypsin
Threoninproteasen	Threonin	Proteasom

**Tabelle 1. Einteilung der Peptidasen nach Art des aktiven Zentrums.** (Bisswanger 2015; MEROPS - the Peptidase Database 2018; Bisswanger 2015; Szeimies et al. 2010)

### 1.3.2 Kallikrein-ähnliche Peptidasen

Kallikreine und Kallikrein-ähnliche Peptidasen, wie uPA und Plasmin, gehören der Gruppe der Serinproteasen an. Im Menschen gibt es zwei Kallikreine, Plasma-Kallikrein (KLKB1) und Gewebe-Kallikrein (KLK1). Die beiden Kallikreine sind nicht miteinander verwandt, haben aber die gleiche Funktion, nämlich die Spaltung des Substrates Kininogen, welches zur Freisetzung von hormonähnlichen Peptiden, den Kininen führt. Während KLKB1 hauptsächlich in der Leber produziert wird und im Blutkreislauf zirkuliert, wird KLK1 in verschiedenen Geweben, darunter

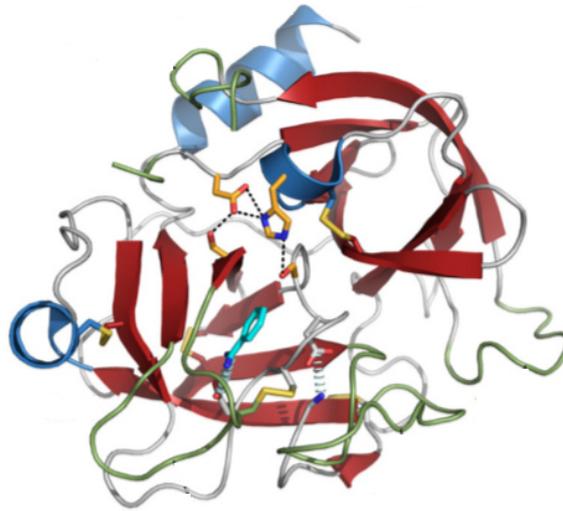
Tumorgewebe, exprimiert. Das KLK1-Gen ist Bestandteil eines aus 15 Mitgliedern bestehenden Genclusters (KLK1-15). Diese Gene kodieren alle für (chymo-) trypsinartige extrazelluläre Serinproteasen. KLK2-15 sind zwar eng mit KLK1 verwandt, zeigen aber keine Kallikrein-Funktion im Sinne der Spaltung von Kininogen und werden daher als Kallikrein-ähnliche Peptidasen bezeichnet. Sie sind Endoproteasen, welche zum Teil eine ausgeprägte Präferenz für die Spaltung bestimmter Peptidbindungen nach bestimmten Aminosäuren aufweisen. Diese Spezifität ist nicht absolut, d.h. andere Peptidbindungen können ebenso gespalten werden, jedoch mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit als die Bevorzugte (Hutterer 2010). Ursächlich für die Spezifität der Proteasen ist die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums der jeweiligen Serinprotease, sowie die das aktive Zentrum umgebenden Substratbindungstaschen. Form und elektrischer Ladungszustand derselben haben Einfluss auf die Spezifität der Serinprotease. So kann beispielsweise die Serinprotease Trypsin, welche in der sogenannten S1- Bindungstasche einen negativ geladenen Aspartatrest aufweist, ideal in Wechselwirkung mit positiv geladenen, basischen Aminosäureresten wie Lysin und Arginin treten und spaltet damit das Substrat nach einem Lysin/Arginin-Rest (Bruice 2011). Andere Serinproteasen, wie die meisten KLKs sowie uPA und Plasmin, welche ebenso bevorzugt die Peptidbindung nach einer positivgeladenen Aminosäure spalten, werden daher auch trypsin-ähnliche Proteasen genannt.

### 1.3.3 Proteinstruktur

Serinproteasen besitzen ein weitgehend übereinstimmendes strukturelles Gerüst, zeigen aber Abweichungen hinsichtlich der Substratspezifität (Bisswanger 2015). Durch Röntgenkristallstrukturanalyse wurde das Verdauungsenzym Chymotrypsin 1976 erstmals an der *Cambridge University England* in seiner dreidimensionalen Struktur dargestellt. Es folgte die Aufklärung der 3D-Struktur von Thrombin im Jahre 1989 durch Martin Bode am *Max-Planck-Institut für Biochemie* in Martinsried. Ebenso konnten die Kristallstrukturen der KLKs 1-8 und 10 bereits bestimmt werden.

KLKs werden intrazellulär als einsträngige Prä-Pro-Proteine mit einem Signalpeptid synthetisiert. Dieses wird während der posttranslationalen Modifikation abgespaltet. Das so entstandene inaktive Zymogen (*pro-KLK*) wird durch extrazelluläre Abspaltung des Propeptids in seine aktive Form übergeführt (Goettig et al. 2010). Diese proteolytische Aktivierung des Zymogens geschieht entweder durch autokatalytische Aktivität des KLKs, andere Endopeptidasen, oder ein anderes KLK. Für die Aktivierung von KLK-Zymogenen durch andere KLKs wurde der Begriff „*KLK Activome*“ eingeführt (Sotiropoulou et al. 2009).

Serinproteasen bestehen aus 2 Hälften mit jeweils 6 antiparallelen  $\beta$ -Strängen. Im aktiven Zentrum der Serinproteasen findet sich eine sogenannte „katalytische Triade“ aus den drei Aminosäuren Serin, welches namensgebend für diese Proteinfamilie ist, Histidin und Aspartat.



**Abbildung 4. Tertiärstruktur KLK2 in Komplexbindung mit Benzamidin in Standardorientierung.** Die 6 antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter sind rot dargestellt,  $\alpha$ -Helices in blau, die Substratbindungstasche in grau, die katalytische Triade in orange, Benzamidin in türkis. Modifiziert aus Skala et al. 2014.

### 1.3.4 Katalytischer Wirkmechanismus

Serinproteasen ist ein gleicher Katalysemechanismus gemeinsam. Dieser unterscheidet sie von anderen Proteaseklassen wie Aspartyl-, Cystein- oder Metalloproteasen (Dullweber 2000). Der Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen von Serinproteasen (**Abbildung 5**) wurde durch vielzählige Strukturstudien aufgeklärt und verläuft in folgenden vier aufeinanderfolgenden Schritten ab:

#### 1. Bildung des ersten tetraedrigen Übergangszustandes

Im ersten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff des Serinrestes (-OH) der katalytischen Triade der Serinprotease an die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung. Im Zuge dessen wird ein Proton des Serins auf den Imidazolring des benachbarten Histidins der katalytischen Triade übertragen. Histidin fungiert damit als Base, die negativ geladene Seitenkette des Aspartats stabilisiert hier das protonierte Histidin. So entsteht ein kurzlebiger tetraedrischer Übergangszustand (Klumpers 2017; Zhou and Zhang 2011).

#### 2. Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates

Durch Deprotonierung des Histidins, welches so als Säure fungiert, zerfällt der tetraedrische Übergangszustand zu einem Acyl-Enzym-Intermediat. Die Peptidbindung wird gespalten und das zu spaltende Protein zerfällt. Das Peptid, das

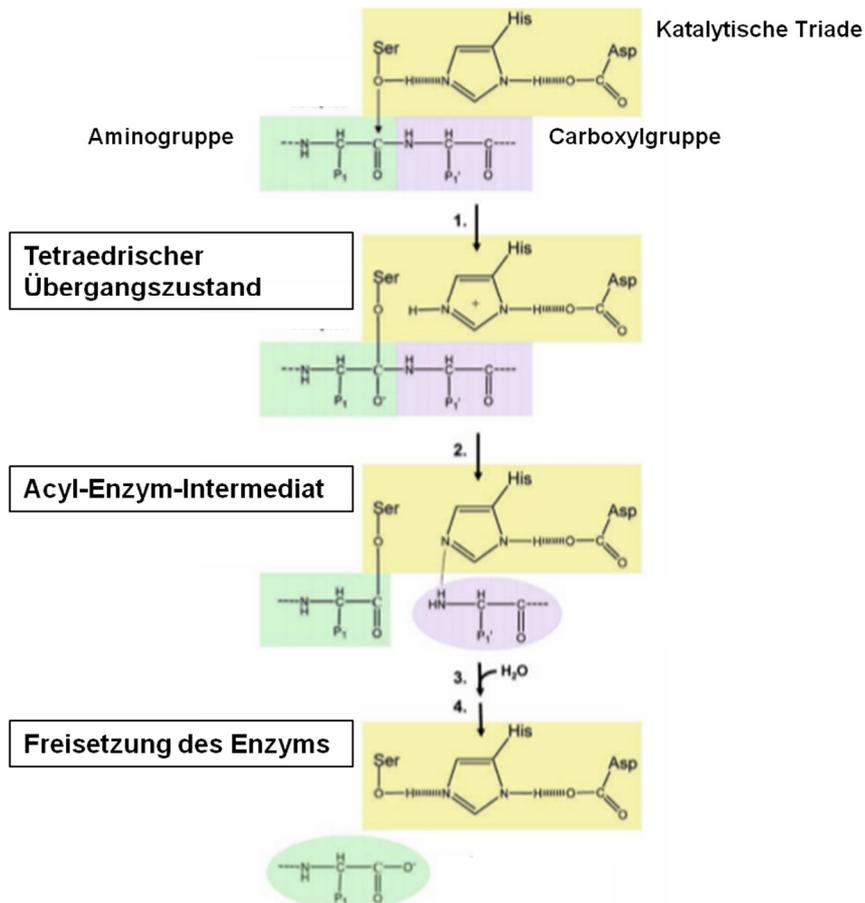
den neuen N-Terminus bildet, löst sich vom Enzym und wird durch ein Wassermolekül aus dem umgebenden Wasser ersetzt (Klumpers 2017; Zhou and Zhang 2011).

### **3. Bildung des zweiten tetraedrischen Übergangszustandes**

Auf die die Carbonylgruppe der anderen Hälfte des Peptids, welche den neuen C-Terminus bildet, erfolgt ein nukleophiler Angriff des Wassermoleküls. Histidin fungiert erneut als Base und nimmt ein Proton des Wassers auf, was erneut zu Ausbildung eines ebenso kurzlebigen tetraedrischen Übergangszustandes führt (Klumpers 2017; Zhou and Zhang 2011).

### **4. Freisetzung des aktiven Enzymes**

Unter Zerfall des zweiten tetraedrischen Übergangszustandes erfolgt die Freisetzung des Enzyms, das nun aktiv wieder zur Verfügung steht (Klumpers 2017; Zhou and Zhang 2011).



**Abbildung 5. Katalytischer Wirkmechanismus von Serinproteasen.** Die Reaktion startet mit dem nukleophilen Angriff des Serinrestes der katalytischen Triade (gelb) an der Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung. Histidin nimmt hierbei ein Proton vom Serin des aktiven Zentrums auf. Unter Deprotonierung des Histidins zerfällt der tetraedrische Übergangszustand und geht in das Acyl-Enzym-Intermediat über. Es kommt zur Spaltung der Peptidkette. Eine Hälfte des Peptids (violett) löst sich von der Serinprotease und wird durch ein Wassermolekül aus der Umgebung ersetzt. Auf die Carbonylgruppe der anderen Peptidhälfte (grün) erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff von einem Wassermolekül der Umgebung. Histidin nimmt erneut ein Proton auf, was zur Ausbildung eines weiteren tetraedrischen Übergangszustandes führt, welcher zerfällt und schließlich das aktive Enzym wieder freisetzt. Modifiziert aus **Schaller 2004**.

### 1.3.5 Rolle der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 2 (KLK2) und 4 (KLK4) in physiologischen Prozessen, sowie ausgewählten Krankheitsbildern und Tumorerkrankungen

Wie erwähnt umfasst die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen insgesamt 15 Serinproteasen. Die wohl bekannteste hierunter ist KLK3, das prostataspezifische Antigen (PSA). Sie werden von Haut-, Brustdrüsen-, Prostata- und Pankreaszellen gebildet und in Folge in Schweiß, Muttermilch, Seminalplasma und Pankreassaft sezerniert (Wagener and Müller 2009). Die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen werden in 2 Gruppen eingeteilt. Die „klassischen“ KLKs (KLK1-KLK3), welche bereits um 1920 (KLK1) beziehungsweise in den

späten 1980er Jahren (KLK2,3) entdeckt wurden, besitzen in der 3D-Struktur oberhalb des aktiven Zentrums eine lange Loopstruktur, den sogenannten Kallikrein-Loop. Dieser Loop limitiert wahrscheinlich die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum und ist daher für die Spezifität der Enzyme mitverantwortlich. Die zweite Gruppe, die „neuen“ KLKs (KLK4-15), wurden erst später, in den 1990er Jahren entdeckt (Goettig et al. 2010).

#### **1.3.5.1 KLK2**

KLK2 ist eine trypsin-ähnliche Serinprotease mit selektiver Aktivität für die Spaltung von Peptidbindungen nach positiv geladenen, basischen Aminosäuren, insbesondere Arginin (Mikolajczyk et al. 1999). Es besitzt die Fähigkeit sein eigenes Zymogen (pro-KLK2) im Sinne einer Autoaktivierung zu aktivieren und unterscheidet sich hierdurch von den anderen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (Mikolajczyk et al. 1999). KLK2 wird überwiegend in der Prostata exprimiert und zeigt in Prostata-Karzinom-Gewebe eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe (Mikolajczyk et al. 1999). KLK3 hingegen wird in Prostata-Karzinom-Gewebe weniger exprimiert als in gesundem Gewebe. Des Weiteren zeigt sich, dass KLK2, in diesem Fall ähnlich wie KLK3 (PSA), im Serum von Prostata-Karzinom-Patienten erhöht ist, wobei aber die Verteilungsprofile von KLK2 und 3 nicht deckungsgleich sind, was KLK2 zu einem möglichen unabhängigen prognostischen Faktor machen könnte. KLK2 vermag pro-KLK3 zu KLK3 zu aktivieren und zeigt eine achtzigprozentige Homologie zu KLK3, dem prostataspezifischen Antigen (Mikolajczyk et al. 1999).

KLK3 kann pro-MMP2, eine Matrixmetalloprotease, die im Abbau der ECM im Rahmen der Tumorprogression und -metastasierung eine wichtige Rolle spielt aktivieren (Pampalakis and Sotiropoulou 2007). Studien der vergangenen Jahre weisen darauf hin, dass KLK2 und KLK3 auch durch Regulation des *insulin-like growth factor* (IGF) Einfluss auf die Tumorgenese des Prostata-Karzinoms nehmen. IGF spielt in der Tumorzellproliferation, -differenzierung und -transformation eine wesentliche Rolle (Borgoño and Diamandis 2004). IGF muss, um agieren zu können, an den IGF-Rezeptor (IGF1R) binden und von *IGF-binding proteins* (IGFBP) befreit werden. Diese Bindeproteine antagonisieren die Bindung von IGF an seinen Rezeptor und vermindern somit die über die Rezeptorbindung vermittelte Signaltransduktion. IGFBP3 induziert beispielsweise den programmierten Zelltod und inhibiert das Wachstum von Prostata-Karzinomzellen. KLK2 und KLK3 sind in der Lage über Proteolyse der IGFBPs deren tumorsuppressive Wirkung aufzuheben und infolgedessen auch die Bioverfügbarkeit von IGFs zu erhöhen (Borgoño and Diamandis 2004).

Das samenbläschenspezifische Antigen Seminogelin, welches in die Untergruppen I und II geteilt werden kann, trägt als Teil des Ejakulates über Ausbildung von Disulfidbrücken zur Koagulation desselben bei. KLK2 ist, wie KLK3 auch, in der Lage Seminogelin I und II zu spalten und somit die Samenflüssigkeit zu verflüssigen (Mikolajczyk et al. 1999).

Im Rahmen von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass KLK2 und 4 in der Lage sind pro-uPA zu uPA zu aktivieren (Beaufort et al. 2010). uPA nimmt, wie bereits ausführlich erörtert, durch Aktivierung der proteolytischen Kaskade des PA-Systems auf unzählige physiologische Prozessen Einfluss. Mikolajczyk et al. (1999) zeigten in einer Studie, dass KLK2 zudem in der Lage ist mit PAI-1 zu komplexieren und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor als Suizid-Inhibitor somit zu inaktivieren. So scheint der Einfluss, den KLK2 auf das PA-System hat, mehrschichtig zu sein: Zum einen durch Regulation der uPA-Aktivität durch Aktivierung von pro-uPA zu uPA, zum anderen durch Inaktivierung des uPA-Hauptinhibitors PAI-1 (Mikolajczyk et al. 1999).

Bisher findet nur KLK3 (PSA) als Biomarker für Prostata-Karzinome klinische Anwendung, weist jedoch keine hohe Spezifität auf, da es auch bei Erkrankungen wie benigner Prostatahyperplasie oder Prostatitis erhöht ist. So könnte KLK2 einen interessanten additiven Biomarker darstellen.

#### **1.3.5.2 KLK4**

KLK4 wird vor allem während der Zahnentwicklung exprimiert, beim adulten Menschen auch in Prostata- und Brustgewebe sowie den Ovarien. In der Entwicklung des Zahnschmelzes spielt KLK4 eine wichtige Rolle. Der reife Zahnschmelz besteht zu 95% Mineralien, Wasser und nur einem sehr geringen Anteil (<1%) aus Proteinen. Diesem hohen Mineralienanteil verdankt er seine sehr harte Struktur. Während der Zahnschmelzentwicklung beträgt der Protein-Anteil über 30%, die Proteine werden während der Zahnschmelzentwicklung durch die Proteasen MMP-20 und KLK4 abgebaut. Mutationen im KLK4-Gen können zu Amelogenesis imperfecta, also einer angeborenen Zahnschmelzhypoplasie führen. Diese ist mit bräunlicher Verfärbung der Zähne, Schmerzempfindlichkeit und erhöhtem Kariesrisiko verbunden (Lu et al. 2008).

KLK4 zeigt in Brust-, Endometrium- und Prostata-Karzinomzellen eine erhöhte Expression (Riley et al. 2016). Bei der Entstehung von Knochenmetastasen bei Prostata-Karzinomen spielt die Interaktion zwischen Tumorzellen und Osteoblasten eine entscheidende Rolle. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass KLK4 sowohl pro-KLK3 zu KLK3 (PSA), als auch pro-uPA zu uPA zu aktivieren vermag und somit bei der Degradation der extrazellulären Matrix von Prostatazellen maßgeblich zur Tumormetastasierung beisteuert (Sotiropoulou et al. 2009). Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass ein *knockout* von KLK4 in einer verminderten Adhäsion von Prostata-Karzinomzellen im Knochenmark führt, was die Ausbildung von Knochenmetastasen behindert (Pampalakis and Sotiropoulou 2007). Zudem ist KLK4 fähig die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 (PAR-1 und -2) zu aktivieren. Diese Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche durch proteolytische Spaltung aktiviert werden und über Signaltransduktion die Zellmigration und -proliferation steigern

können. PAR-1 und -2 werden in einer Vielzahl an Tumorerkrankungen, darunter auch das Prostata-Karzinom, überexprimiert (Swedberg et al. 2009).

<b>Kallikrein-ähnliche Peptidase</b>	<b>Substrat</b>	<b>Rolle in physiologischen Prozessen und Tumorprogression</b>
<b>KLK2</b>	Seminogelin I und II	Verflüssigung Samenflüssigkeit
	Pro-KLK3	– Aktivierung von KLK3 – Verflüssigung Samenflüssigkeit
	Pro-uPA	Aktivierung von pro-uPA → Plasmin-Aktivierung → ECM-Degradation → Invasion, Metastasierung
	Fibronektin	– ECM-Degradation – Invasion, Metastasierung
	IGF	Freisetzung von IGFs → Tumorzellproliferation → Osteoblastenproliferation → Förderung ossärer Metastasen bei Prostata-Karzinom
<b>KLK4</b>	Amelogenin	Zahnschmelzentwicklung
	Pro-KLK3	– Aktivierung von KLK3 – Verflüssigung Samenflüssigkeit
	Pro-uPA	Aktivierung von pro-uPA → Plasmin-Aktivierung → ECM-Degradation → Invasion, Metastasierung
	PAR	Stimulation von Tumorzellproliferation und -migration

**Tabelle 2. KLK2- und KLK4-Substrate und deren Rolle in physiologischen Prozessen, sowie der Tumorgenese.** Modifiziert aus Pampalakis et al. (2007).

### 1.3.6 Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen

Reife, aktivierte KLKs können durch autokatalytische Inaktivierung, natürliche Inhibitoren wie Zink ( $Zn^{2+}$ ), Proteine, sowie durch andere KLKs in ihrer Aktivität reguliert werden (Sotiropoulou et al. 2009). Der Großteil endogener Inhibitoren sind Proteine (Krowarsch et al. 2003).

#### Zink-Ionen

Zink spielt in den unterschiedlichsten Prozessen des menschlichen Körpers eine Rolle. In der Regulation der Aktivität von Serinproteasen scheint es eine ambivalente Rolle zu spielen: Zum einen ist es in der Lage beispielsweise Gerinnungsfaktor XII zu aktivieren, während es Faktor VIIa, uPA, KLK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 und 14 in der Aktivität zu hemmen vermag (Goettig et al. 2010; Mavridis et al. 2014). Die Inhibition kann kompetitiv und nicht-kompetitiv verlaufen. Im Falle einer kompetitiven Hemmung konkurriert das Zink-Ion mit dem eigentlichen Substrat der Kallikrein-ähnlichen Peptidase um die Bindung an das aktive Zentrum (Horton 2008). Durch Bindung von  $Zn^{2+}$  am aktiven Zentrum der Protease im Rahmen der kompetitiven Hemmung kommt es zur Zerstörung der katalytischen Triade und somit verminderter oder aufgehobener katalytischen Aktivität (Goettig et al. 2010). Von einer nicht-kompetitiven Hemmung spricht man, wenn  $Zn^{2+}$  außerhalb des aktiven Zentrums der Zielprotease bindet, somit zu Konformationsänderungen im aktiven Zentrum der Protease führt und sie dadurch in ihrer Aktivität hemmt. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass KLK4 nach nicht-kompetitiver Inhibition durch Zink noch eine Restaktivität von etwa 25% aufwies.

Im physiologischen Prostatasekret können hohe Konzentrationen an Zink nachgewiesen werden, wodurch die im Prostatasekret enthaltenen KLKs in ihrer Aktivität reguliert werden (Goettig et al. 2010; Mavridis et al. 2014). Das Prostata-Sekret wird während der Ejakulation in die Harnröhre abgegeben und vermischt sich dabei mit den Spermien. Die Spermien werden initial durch die Proteine Seminogelin I und II immobilisiert. Die Seminogeline enthalten eine Vielzahl an Zink-Bindungsstellen, was zur Komplexierung des Großteils der im Prostatasekret enthaltenen Zink-Ionen führt. So können diese nicht mehr hemmend auf die im Prostata-Sekret enthaltenen KLKs wirken, wodurch diese die Seminogeline spalten und es zur Verflüssigung der Samenflüssigkeit kommt (Mavridis et al. 2014).

Im Prostatagewebe und -sekret von an Prostatakrebs erkrankten Patienten ist die Zink-Konzentration um bis zu 20-fach niedriger als beim Gesunden. Man geht davon aus, dass die Herunter-Regulierung des *Zink-Transporter-Proteins* hierfür ursächlich beteiligt ist und einen der ersten pathologischen Ereignisse in der Entwicklung des Prostata-Karzinoms darstellt (Pampalakis and Sotiropoulou 2007). Durch die erniedrigte Zink-Konzentration werden die im Prostatasekret enthaltenen KLKs weniger inhibiert, was zur ECM-Degradation und Förderung des Tumorwachstums und -metastasierung führt (Pampalakis and Sotiropoulou 2007). So liegt nahe, dass die Wiederherstellung physiologischer Zink-Konzentrationen als möglicher Therapieansatz in der Therapie des Prostata-Karzinoms gesehen werden kann. Da eine

systemisch hohe Zinkkonzentration jedoch auf eine Vielzahl von Zellen und Geweben eine toxische Wirkung haben kann, wäre die lokale intratumorale Applikation von Zink eine denkbare Alternative. Diese Hypothese wurde bereits in Studien am Tiermodell (Maus) untersucht: es konnte ein vermindertes Tumorwachstum bei längerer Überlebensdauer gezeigt werden (Mavridis et al. 2014).

## **Proteine**

Zu den proteogenen Inhibitoren von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen gehören  $\alpha_2$ -Makroglobulin, nicht-kanonische Inhibitoren, kanonische Inhibitoren und Serpine, wobei über die inhibitorische Wirkung von Serpinen gegenüber KLKs bislang noch wenig bekannt ist (Goettig et al. 2010; Krowarsch et al. 2003).

### **$\alpha_2$ -Makroglobulin**

Studien konnten zeigen, dass  $\alpha_2$ -Makroglobulin (A2M) aufgrund seiner Struktur in der Lage ist nahezu alle Kallikrein-ähnlichen Peptidasen zu inhibieren, weswegen es auch „Panproteinasen Inhibitor“ genannt wird (Goettig et al. 2010). Durch den proteolytischen Angriff der Protease an A2M kommt es zu Konformationsänderungen, wodurch sich eine „käfigartige“-Konformation bildet, in welcher A2M die Protease reversibel gefangen hält (Goettig et al. 2010; Yang et al. 2017). Im Serum von Prostata-Karzinom-Patienten können Komplexe aus A2M und KLK2 gefunden werden (Goettig et al. 2010).

### **Kanonische Inhibitoren**

Der Großteil der Protein-Inhibitoren wird von den kanonischen Inhibitoren gebildet, welche mit den eigentlichen Substraten um die Bindung an das aktive Zentrum der Protease konkurrieren (Mavridis et al. 2014). Sie sind meist kleinere Proteine und binden über eine konvexe, zum konkaven aktiven Zentrum des Enzyms komplementären, Bindungsschleife an das zu hemmende Enzym (Krowarsch et al. 2003). Durch das Herausragen der Bindungsschleife aus dem Protein-Gerüst macht es diese leicht zugänglich. Im Gegensatz zu den Serpinen bleibt die Substrat-Bindungsschleife in einer geordneten Konformation, es wird kein Übergangskomplex gebildet, die Bindung ist reversibel (Krowarsch et al. 2003; Yang et al. 2017). Die Gruppe der kanonischen Inhibitoren kann in etwa 20 Untergruppen eingeteilt werden, hierunter die Kazal-Typ Inhibitoren, Kunitz-Typ Inhibitoren und Bowman-Birk-Typ Inhibitoren.

**Kazal-Typ Inhibitoren** spielen vor allem in Zusammenhang mit Kallikrein-ähnlichen Peptidasen der Haut eine große Rolle. Der normale Prozess der stetigen Hautzellerneuerung setzt ein Gleichgewicht aus Zellproliferation und Hautzellabschilferung von Keratinozyten der Haut voraus. Zur Abschilferung einer Hautzelle muss deren Zell-Zell-Kontakt zu den benachbarten Hautzellen, welcher durch Membranproteine (*Desmogleine*) vermittelt wird, aufgehoben werden (Fortugno et al. 2011). Dies geschieht durch die vornehmlich in der Haut

exprimierten Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 5 und 7. Reguliert werden diese durch den lymphoepithelialen Kazal-Typ-Inhibitor *LEKTI*. Mutationen im für den Inhibitor kodierenden Gen (*SPINK5*) führen zu einer Dysbalance dieses Gleichgewichts mit der klinischen Ausbildung des Netherton-Syndroms (Furio et al. 2015). Es kommt zu einer abnormen Abschilferung der Keratinozyten. Dadurch ist die schützende Barriere der Haut aufgebrochen, die Haut anfällig für Entzündungen und Allergien, was stetigen Juckreiz und schwere Dehydration zur Folge hat (Fortugno et al. 2011).

Der Serin-Protease-Inhibitor Kazal-Typ 1 (*SPINK1*), welcher im Rahmen der Prostata-Karzinogenese eine Rolle spielt, zeigt inhibitorische Aktivität gegenüber *KLK2* (Mavridis et al. 2014).

Der **Kunitz-Typ Inhibitor**, über den bisher am meisten bekannt ist, ist Aprotinin. Aprotinin kann *KLK2*, 4, 5, 12 und 14 in ihrer Aktivität hemmen (Mavridis et al. 2014). Der Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, ebenso ein Kunitz-Typ Inhibitor, inhibiert *KLK4-6* und *KLK 14* (Mavridis et al. 2014). Die **Bowman-Birk-Typ Inhibitoren (BBI)** wurden ursprünglich in Pflanzensamen gefunden und sind kleine Proteine, die untereinander einen hohen Grad an Homologie aufweisen. Typischerweise zeigen die BBI eine „doppelköpfige“ Struktur, wobei jeder Kopf ein eigene kanonische Proteinbindungsstelle besitzt (Wu et al. 2017). So ist ein BBI in der Lage einen 1:1:1 stöchiometrischen Komplex mit zwei unterschiedlichen Proteasen zu bilden. Der potenteste natürlich vorkommende BBI ist der Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (*SFTI-1*) (Marx et al. 2003). Der Name leitet sich von seiner Entdeckung in Sonnenblumenkernen ab (Swedberg et al. 2009). Das verhältnismäßig kleine Protein hat eine hohe inhibitorische Aktivität und eignet sich hervorragend als Grundgerüst zu *drug design* spezifischer Inhibitoren (Swedberg et al. 2009).

### **Nicht-kanonische Inhibitoren**

Nicht-kanonische Inhibitoren sind seltener im Vorkommen als kanonische Inhibitoren oder Serpine (Krowarsch et al. 2003). Sie agieren über ihren N-Terminus. Dieser bindet an das aktive Zentrum der zu inhibierenden Protease. Neben der eigentlichen Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum treten die nicht-kanonischen Inhibitoren an weiteren Positionen mit der Protease in Wechselwirkung. Das erhöht die Substratspezifität, Bindungsstärke und Reaktionsgeschwindigkeit (Krowarsch et al. 2003). Zum Beispiel handelt es sich bei der Inhibition der Serinprotease Thrombin durch das Polypeptid Hirudin um eine nicht-kanonische Inhibition (Grütter et al. 1990).

Eine weitere Gruppe endogener Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen sind die Serpine, wobei über deren Einfluss und Wirkweise weitaus weniger bekannt ist als über die oben beschriebenen. (Für Details siehe Diskussion).

## 1.4 Zielsetzung

Das Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-System und die Serinproteasen-Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen spielen in einer Reihe an physiologischen und pathologischen Prozessen eine tragende Rolle. Erhöhte Expressionslevel der einzelnen Systemkomponenten werden im Rahmen von zahlreichen Tumorleiden als negative prognostische als auch prädiktive Faktoren (höheres Metastasierungsrisiko, schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie, kürzeres Gesamtüberleben) gesehen, weswegen sowohl die Komponenten des uPA-Systems als auch die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen als vielversprechende Biomarker und Ziele der Therapie dieser Erkrankungen gesehen werden. Das Wissen über die Struktur und den katalytischen Wirkmechanismus Kallikrein-ähnlicher Peptidasen wird laufend zur Entwicklung synthetischer, spezifischer Hemmstoffe genutzt. Bis heute sind eine Reihe an endogenen Inhibitoren der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen bekannt. Die Hauptinhibitoren der trypsin-ähnlichen Serinprotease uPA sind PAI-1 und PAI-2.

Die folgende Arbeit hat zum Ziel, mögliche Wechselwirkung zwischen diesen beiden verwobenen katalytischen Systemen, insbesondere den trypsin-ähnlichen Serinproteasen der KLK-Familie, KLK2 und KLK4, mit den Serin-Protease-Inhibitoren PAI-1 und -2 zu untersuchen. Dazu wurden zunächst die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, die wichtige regulative Rollen im uPA-System spielen, in *E. coli* exprimiert und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt. Anschließend wurde deren inhibitorische Kapazität gegenüber KLK2 und KLK4 getestet, wobei uPA als Hauptsubstrat der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren als Positivkontrolle verwendet wurde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 40%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Coomassie-Brilliantblue	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
EDTA-freier Proteaseinhibitor	Roche diagnostics GmbH, Mannheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Farmer's Reducer	$K_3[Fe(CN)_6] + Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
Formaldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Imidazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
IPTG	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Magermilchpulver	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Proteingewichtsmarker stained #26616	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Proteingewichtsmarker unstained # SM 0431	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris base	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween 80	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Yeast-Extrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

### 2.1.2 Bakterienstamm und Antibiotika

Bakterienstamm	Quelle
M15 [pREP4]	Qiagen, Hilden
Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### 2.1.3 Chromogene Substrate

Substrat	Hersteller
I-1120	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
I-1595	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
I-1295	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz

#### 2.1.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller
KLK 2	Eigene Herstellung, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik TU München
KLK 4	Eigene Herstellung, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik TU München
uPA	Actosolv®, Fa. Eumedica

#### 2.1.5 Antikörper

Erstantikörper	Hersteller	Produktnummer
Anti-HMW-uPA	<i>in house</i>	
$\alpha$ -KLK-2 (rab)	Novus Biologicals	NBP 1-32288
$\alpha$ -KLK-2 (mouse)	<i>in house</i>	5E4
$\alpha$ -KLK-4	Novus Biologicals	NBP 200-134
$\alpha$ -KLK-4	<i>in house</i>	587
$\alpha$ -KLK-4	<i>in house</i>	617C
$\alpha$ -KLK-6	Novus Biologicals	NBP 1-54713
$\alpha$ -KLK-8	Abnova	H00011202-D01P
$\alpha$ -KLK-13	Novus Biologicals	NB 200-139
$\alpha$ -PAI-1	Qiagen, Hilden	ID: 34660

Zweitantikörper	Hersteller	Produktnummer
anti-rabbit-POD	DIANOVA GmbH, Hamburg	
anti-mouse-POD	DIANOVA GmbH, Hamburg	
$\alpha$ -ch-POD	DIANOVA GmbH, Hamburg	

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Bakterienkulturmedien

Puffer	Zusammensetzung
Äquilibrierungspuffer PAI-1	20 mM NaAc 1M NaCl 0,1% Tween 80 pH 7,4
Äquilibrierungspuffer PAI-2	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M NaCl 0,1% Tween 80 pH 7,4
Blottingbuffer	<b><u>5 % EtOH</u></b> 25 ml EtOH 100 % 100 ml 0,25 M Borsäure 375 ml H <sub>2</sub> O  <b><u>20 % EtOH</u></b> 100 ml EtOH 100 % 100 ml 0,25 M Borsäure 300 ml H <sub>2</sub> O
Crackingbuffer	8M Urea 1% SDS 1% Mercaptoethanol

Dialysepuffer PAI-1 nativ	20 mM NaAc 1M NaCl 0,01 % (v/v) Tween 80 pH 5,6
Dialysepuffer PAI-2 denaturierend	1x PBS (100-fache Menge des Dialysates) 1 mM DTT
Dialysepuffer PAI-2 nativ	1x PBS pH 7,4
Elutionspuffer PAI-1	20 mM NaAc 1 M NaCl 200 mM Imidazol 0,1 % Tween 80 pH 5,6
Elutionspuffer PAI-2	20 mM NaAc 1 M NaCl 200 mM Imidazol 0,1 % Tween 80 pH 6,0
Laufpuffer 10x	144 g Glycin 30 g Tris base 10 g SDS ad 1 l
Lysepuffer PAI-1	20 mM NaAc 1 M NaCl 0,1% Tween 80 pH 7,4
Lysepuffer PAI-2	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaCl 0,1% Tween 80 pH 7,4

Puffer A	6 M Guanidin Hydrochlorid 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M Tris base pH 8
Puffer Z	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M Tris base
Storage buffer	0,1 M NaCl 0,01 M Tris 0,05 % Tween ultra pH 8,3
Waschpuffer PAI-1	20 mM NaAc 1 M NaCl 20 mM Imidazol pH 5,6
Waschpuffer PAI-2	20 mM NaAc 1 M NaCl 20 mM Imidazol pH 6,5
<b>Allgemeine Lösungen</b>	
10 x Phosphate-buffered saline (PBS)	51,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 11,75 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 20 g NaCl ad 500 ml H <sub>2</sub> O pH 7,3
Blockierlösung (Western Blot)	5g Magermilchpulver 100 ml PBS
Entfärbelösung (Coomassie)	10 % HAc
Entwicklerlösung (Silber)	40 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,5%) 40 µl Formaldehyd

Färbelösung (Coomassie)	10 % HAc 0,1 % Coomassie
Farmer's reducer	1 Spatelspitze einer Mischung aus 16 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 10 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 20 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.
Fixierlösung (Coomassie)	40 % vergälltes Ethanol 10 % HAc 50% $\text{H}_2\text{O}$
Fixierlösung (Silber)	45 % vergälltes Ethanol 10 % HAc 45% $\text{H}_2\text{O}$
Trockenlösung (Coomassie)	25 % technisches Ethanol 5 % Glycerin
<b>Medium</b>	
LB	10 g Trypton 5 g Yeast-Extrakt 10 g NaCl ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$
2xTY	16 g Trypton 10 g Yeast-Extrakt 5 g NaCl ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Expression von rekombinantem humanen PAI-1 und -2 in *E. coli*

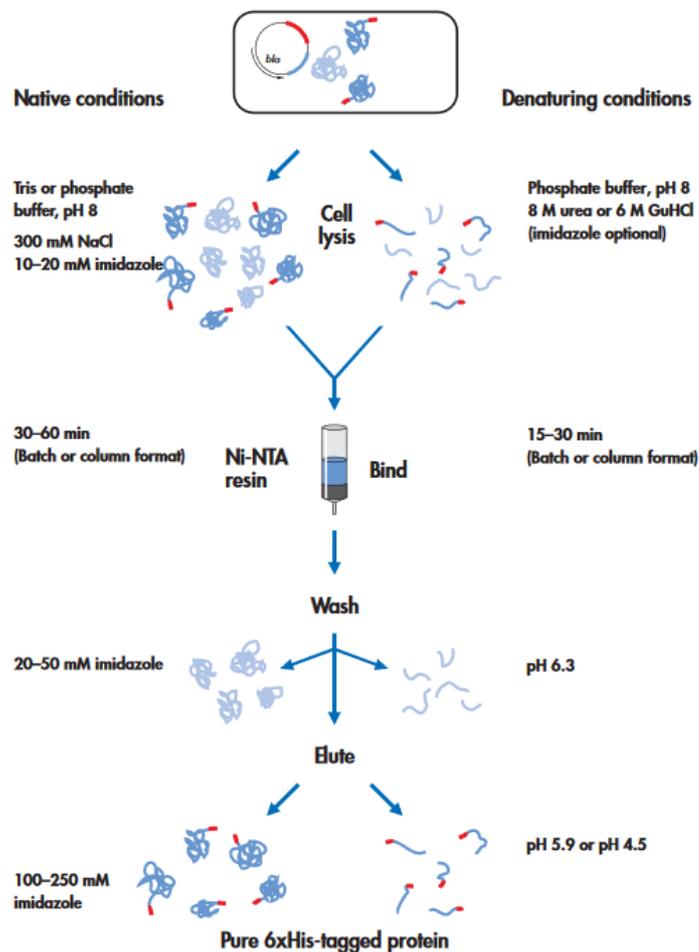
Für die rekombinante Herstellung von PAI-1 und PAI-2 wurde das *QIAexpressionist*-System verwendet. *E. coli* gehört zu der Gruppe der gramnegativen Enterobakterien und ist aufgrund seiner gut untersuchten Genetik und Physiologie, einfachen Handhabung und kurzer Generationszeit ein sehr beliebter Organismus zur heterologen Expression rekombinanter Proteine. Eine Vielzahl optimierter *E. coli*-Stämme ist heutzutage kommerziell erhältlich. In der vorliegenden Arbeit wurden *E. coli* M15 [pREP4] Zellen verwendet. In diese wurden im Vorfeld dieser Arbeit die rekombinanten Plasmide transformiert. Die Plasmide enthalten neben der Gensequenz für das zu exprimierende Protein weitere Genabschnitte zur Regulation der Transkription und Translation dieses Gens. Im *QIAexpressionist*-System wird das *pQE*-Plasmid als Vektor verwendet. Die Expression der rekombinanten Proteine PAI-1 und PAI-2 wird auf Transkriptionsebene durch Elemente des *lac-Operons* reguliert. Im *lac-Operon* fungiert der T5-Promotor als Erkennungssignal für die *E. coli*-RNA-Polymerase und legt somit die Startstelle für die Transkription fest. Der T5-Promotor ist eine der wichtigsten Stellen des Expressionsvektors und enthält die Operator-Sequenz des *lac-Operons*. Dieser dient als Bindungsstelle für den *lac-Repressor*. Der Repressor verhindert die Transkription des Operons und kann nur durch Zugabe eines Induktors von der Operator-Bindungsstelle gelöst werden und die Transkription somit starten. Im Falle des *Lac-Operons* bindet Galaktose (oder im Falle der Proteinexpression dessen synthetisches Pendant IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid)) an den Repressor und ermöglicht so die Expression des rekombinanten Proteins.

10  $\mu$ l der Stammbakteriensuspension wurden mit 5 ml 2xTY-Medium, 5  $\mu$ l Ampicillin, sowie 5  $\mu$ l Kanamycin versetzt und über Nacht bei 37° C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Bakteriensuspension mit 250 ml 2xTY-Medium 1:50 verdünnt, 250  $\mu$ l Ampicillin und 250  $\mu$ l Kanamycin zugegeben und in einem Erlenmeyerkolben für weitere 2 h bei 37° C bebrütet. Das Bakterienwachstum wurde durch Messen der optischen Dichte der Suspension bei 600 nm stündlich überprüft. Bei Erreichen der optimalen optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 für PAI-1, bzw. 1,0 für PAI-2 erfolgte die Induktion der Expression der rekombinanten Proteine durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid). Das Bakterienwachstum wurde durch stündliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm dokumentiert. Neben der Messung der optischen Dichte bei 600 nm wurden Aliquots der Bakteriensuspension entnommen, um die Qualität und Quantität der enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE-Gel und Silber- und Coomassiefärbung zu überprüfen. Hierzu wurden zweimal 40 ml der Bakteriensuspension abpipettiert, danach 5 min bei 22° C und 10 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

### 2.2.1.1 Affinitätschromatographische Reinigung von humanem PAI-1 und PAI-2 aus *E. coli*

Zur Vorbereitung der Bakterienpellets auf die darauffolgende Isolierung der Proteine aus dem Bakterieninneren und der anschließenden Reinigung der exprimierten Proteinmischung wurde das Pellet in einem Lysepuffer spezifisch für PAI-1 und PAI-2 unter Kühlung auf Eis resuspendiert. Hierzu wurde EDTA-freier Proteaseinhibitor mit Lysepuffer auf 2 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung wurde mit dem jeweiligen Lysepuffer für PAI-1 bzw. PAI-2 auf 25 ml aufgefüllt und 10 ml dieser Verdünnung zum Bakterienpellet hinzugegeben. Zum besseren Aufschluss der Proteine und Zerstörung der Mureinschicht wurde das Bakterienzellysate auf Eis gepulst Ultraschall ausgesetzt (SONOPULS HD 2070, Fa. Bandelin, 6 x 3 min, Amplitudeneinstellung 10%). Anschließend wurde das Bakterienzellysate bei 7° C für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut bei 7°C für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung des Überstandes erfolgte bei -80° C. Die so gewonnene Proteinmischung wurde daraufhin, nach vorherigem Auftauen, mittels Säulenchromatographie basierend auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie gereinigt (**Abbildung 6**). Um eine PAI-1 und -2 spezifische Aufreinigung der Bakterienzellysate mittels Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurden die DNA-Sequenzen von PAI-1 und PAI-2 am N-Terminus durch DNA-Sequenzen für ein Hexapeptid der Aminosäure Histidin (*His-Tag*) erweitert. Dieser *Tag* bindet, im Gegensatz zu den *E. coli*-spezifischen endogenen Proteinen, mit hoher Affinität an das im Säulenmaterial enthaltene zweiwertige Nickel. Die Nickelionen bilden mit Wasser und dem Säulenmaterial einen stabilen oktaedrischen Komplex. Jeweils zwei Histidin-Reste des *His-Tags* des rekombinanten Proteins können die Wassermoleküle aus ihrer Bindung verdrängen und mit den Nickel-Ionen einen stabilen Chelatkomplex bilden. So bleibt aus der ursprünglichen Proteinmischung nur das mit *His-Tag* versehene PAI-1 bzw. PAI-2 an die Chromatographiesäule gebunden, wohingegen die endogenen *E. coli*-Proteine ausgewaschen werden. Das Abtrennen der in Chelat-Komplex gebundenen Proteine von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose der Chromatographiesäule (Elution) kann durch Zugabe eines kompetitiven Liganden, wie z.B. Imidazol und/oder Absenkung des pH-Wertes erfolgen. Dies ist grundsätzlich entweder unter nativen oder durch Zugabe eines denaturierenden Agens (z.B. Harnstoff) und eines Reduktionsmittels (z.B. Mercaptoethanol) unter denaturierenden Bedingungen möglich. Da PAI-1 in *E. coli* in löslicher Form exprimiert wird, erfolgte die Reinigung dieses Proteins unter nativen Bedingungen. Überexprimierte Proteine, insbesondere solche mit größeren hydrophoben Regionen und komplexen Disulfidbrücken, führen in *E. coli* häufig zur Bildung sogenannter *inclusion bodies*. Hierbei handelt es sich um Proteinaggregate, welche zu unlöslichen Einschlusskörperchen akkumulieren und sich im Zytoplasma der Bakterienzellen ablagern. Diese unlöslichen Proteinaggregate müssen in weiteren Schritten solubilisiert, denaturiert und rückgefaltet werden, worunter häufig die

Funktionalität der rekombinanten Proteine leidet. Von PAI-2 ist bekannt, dass es dazu tendiert diese unlöslichen Aggregate zu bilden, weswegen im Falle von PAI-2 sowohl die Reinigung unter nativen, aber auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde und diese beiden Methoden anschließend bezüglich gewonnener Proteinmenge und deren inhibitorischer Aktivität verglichen wurden. Die Elution unter nativen Bedingungen erfolgt durch die Zugabe von Imidazol, welches in der Lage ist, das *His-Tag* kompetitiv aus dem gebildeten Chelat-Komplex zu verdrängen. Auch durch Herabsetzen des pH-Wertes kann die Elution erfolgen, was jedoch zur Denaturierung des Proteins führen kann.



**Abbildung 6. Prinzip der affinitätschromatographischen Proteinreinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen.** Zur Vorbereitung der Chromatographiesäule wird diese mit Agarose und dem jeweiligen Äquilibrierungspuffer für Reinigung unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen befüllt. Nach Ablassen des jeweiligen Puffers erfolgt ein Waschschrift mit EDTA-freiem Proteaseinhibitor in Äquilibrierungspuffer, bevor die Säule mit dem Lysat befüllt wird. Die Elution der 6xHis-tagged Proteine aus der Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA erfolgt unter nativen Bedingungen durch Herabsenken des pH-Wertes und Zugabe von Imidazol, unter denaturierenden Bedingungen unter Herabsetzen des pH-Wertes. Abbildung übernommen aus **The QIAexpressionist - A Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (2003).**

Zur Reinigung unter nativen Bedingungen wurde die Chromatographie-Säule mit 2,5 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (50%ige Suspension) befüllt. Nachdem sich die Agarose aus der 50%igen Suspension abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgelassen. Zum Entfernen von Konservierungsmitteln (z.B. Ethanol) wurde die Agarose dann mit Aqua bidest. gewaschen. Sobald sich die Agarose wieder abgesetzt und sich ein waagrechtter Agarose-Pegel eingestellt hat, wurde die Säule mit dem jeweiligen Äquilibriumspuffer (pH 7,4) für PAI-1 bzw. PAI-2 gespült, um den pH-Wert der Chromatographie-Säule dem des Bakterienlysates anzugleichen. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Äquilibriumspuffer mit EDTA-freiem Proteaseinhibitor gespült. Schließlich erfolgte die Zugabe des Lysates. Nach jeweils 5 ml Durchlauf wurden je 30 µl in ein Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Säule wurde daraufhin mit Äquilibriumspuffer mit EDTA-freiem Proteaseinhibitor, anschließend Äquilibriumspuffer ohne Proteaseinhibitor und schließlich mit dem jeweiligen Waschpuffer für PAI-1 (pH 5,6) bzw. PAI-2 (pH 6,5) gewaschen. Dies erfolgte so lange, bis die gemessene Extinktion bei 280 nm Werte < 0,05 erreichte und somit von einer ausreichenden Entfernung der unspezifischen Proteine ausgegangen werden konnte.

Zur Lösung der 6xHis-tagged Proteine aus der Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA, der sogenannten Elution, erfolgte ein finaler Waschvorgang mit Elutionspuffer. Für PAI-1 wurde bei gleichbleibendem pH (5,6) die Imidazolkonzentration von 20 mM auf 200 mM erhöht. Für die Elution von PAI-2 wurde der pH durch den Elutionspuffer von 6,5 auf 6 gesenkt und die Imidazolkonzentration ebenso von 20 mM auf 200 mM erhöht. Der Durchlauf wurde in 3 ml-Portionen fraktioniert und jeweils die Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 280 nm bestimmt. 30 µl Aliquots einer jeden Fraktion wurden bei -80° C gelagert, um diese später mittels SDS-PAGE zur Proteinqualifizierung und -quantifizierung überprüfen zu können.

Die Aufreinigung von PAI-2 erfolgte mittels der Batch-Methode unter denaturierenden Bedingungen nach folgendem Protokoll: Das Bakterien-Pellet wurde mit Lysepuffer A, versetzt mit β-Mercaptoethanol, für 1-1,5 h im Rotator gelöst. (5 ml Lysepuffer pro 1 Gramm Bakterienpellet, 0,53 µl Mercaptoethanol pro ml Puffer). Das gewonnene Lysat wurde anschließend bei 23° C und 10.000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand in eine neue Röhre überführt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Für eine später vorgesehene Gelelektrophorese wurden 30 µl des Lysates asserviert. Dann wurde das Lysat zu 6 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gegeben und für etwa 20 min auf dem Rotator inkubiert, damit das His-Tag-Protein an das Säulenmaterial bindet. Die leere Chromatographiesäule wurde anschließend mit der Lysat-Agarose-Mischung befüllt und nach Absetzen der Agarose die Säule geöffnet und der Durchlauf aufgefangen. Pro 5 ml Durchlauf wurden 30 µl Aliquots abgefangen und für eine Gelelektrophorese verwahrt.

Das Auswaschen der unspezifischen Proteine erfolgte zunächst unter Verwendung von 15 ml Puffer A (pH 8,0 und 7,95 µl Mercaptoethanol), gefolgt von einem zweiten Waschschrift mit Puffer Z. Dieser Basispuffer wurde auf einen pH von 8 eingestellt und nennt sich dann Puffer B. Die Säule wurde zunächst mit 15 ml Puffer B (pH 8,0 und 7,95 µl Mercaptoethanol) gespült. Anschließend wurde der pH-Wert des Puffers auf 7 abgesenkt und mit weiteren 30 ml dieses neu eingestellten Puffers unter Zugabe von 15,9 µl Mercaptoethanol gewaschen. Der Waschvorgang wurde mit einem letzten Waschschrift mit 30 ml Puffer B (pH 6,3 mit 15,9 µl Mercaptoethanol) abgeschlossen. Pro 5 ml Durchlauf wurde die optische Dichte (Einstellung: „OD-Protein“) gemessen.

Die Elution der *6xHis-tagged* Proteine erfolgte durch weiteres schrittweises Absenken des pH-Wertes in 3 Waschschriften: 15 ml Puffer B (pH 5,9, 7,95 µl Mercaptoethanol), 15 ml Puffer B (pH 5,0, 7,95 µl Mercaptoethanol), 6 ml Puffer B (pH 4,5, 3,18 µl Mercaptoethanol). Der Durchlauf wurde in 10 Fraktionen à 3,6 ml Aliquots aufgeteilt. Ebenfalls wurde die optische Dichte der einzelnen Fraktionen bestimmt und schließlich die Fraktionen 1-8 mit dem aliquotierten Durchlauf auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Coomassiefärbung auf deren Proteinmenge, sowie deren Reinheit analysiert.

### **2.2.1.2 Denaturierung und Rückfaltung von PAI-1 und PAI-2**

Unter den Serpinen ist PAI-1 dafür bekannt, dass es spontan aus seiner instabilen aktiven Form in eine stabilere inaktive (latente) Form übergehen kann. Verantwortlich hierfür wird das sehr mobile *reactive-center-loop* (RCL) gesehen. Die inaktive Form kann durch denaturierende Agenzien wie z.B. Harnstoff, Guanidin Hydrochlorid oder SDS in vitro aufgefaltet und anschließend durch Entfernung der Agenzien im Rahmen der Dialyse zumindest teilweise wieder in die aktive Form übergeführt werden. Es wird davon ausgegangen, dass es auch physiologische Kaskaden zur Rückverwandlung der inaktiven in die aktive Form gibt, darüber ist jedoch noch wenig bekannt (Ganten and Ruckpaul 2013).

Im Rahmen der Dialyse muss die Konzentration der Denaturierungsmittel langsam gesenkt werden, um eine Rückfaltung ermöglichen zu können, ohne dabei die erneute Aggregation der Proteine zu erlauben. Das im denaturierenden Puffer gelöste Protein wird gegen eine größere Menge eines Puffers ohne reduzierendes Agens dialysiert. Dem Gesetz der Diffusion folgend, kommt es langsam zum Ausgleich der Denaturierungsmittel-Konzentration, dem Protein wird die Möglichkeit gegeben sich rückzufalten, ohne dabei wieder zu aggregieren. Es kommt zur Verschiebung des Faltungsgleichgewichtes vom denaturierten zum nativen, gefalteten, funktionstüchtigen Zustand.

Zur Erzielung der maximalen inhibitorischen Kapazität wurde so nach der affinitätschromatographischen Reinigung unter nativen Bedingungen eine Denaturierung und Rückfaltung, in diesem Fall mit Guanidin Hydrochlorid, durchgeführt, um PAI-1 aus der

(partiell) latenten Form in die aktive rückzuführen. Hierzu wurden die Fraktionen, die in der Gelelektrophorese den größten Proteingehalt und die beste Reinheit zeigten, vereinigt und für 4 h unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur 4 M Guanidin Hydrochlorid (pH 5,6) ausgesetzt. Die Rückfaltung der Proteine erfolgte durch Dialysieren für 2 h bei 4° C in einem Dialysepuffer. Der Dialysepuffer wurde nach 2 h erneuert, die Dialyse über Nacht fortgesetzt und die Proteine schließlich in einem Centricon-Zentrifugalfiltersystem konzentriert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80° C.

Unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes PAI-2 wurde nach folgendem Protokoll dialysiert und rückgefaltet: Die mittels Gelelektrophorese ermittelten Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt und in einem Dialyseschlauch für 3 h bei 4° C unter Lichtabschluss *PBS* und 1 mM *DTT* ausgesetzt. Nach 3 h wurde der Dialysepuffer auf reines *PBS* ohne *DTT* gewechselt und die Dialyse bei pH 7,4 und 4° C über Nacht fortgeführt. Das Dialysat wurde schließlich mittels Zentrifuge eingengt, aliquotiert und bei -80° C gelagert.

### **2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Konzentration sowie der Reinheit der gewonnenen Proteine wurden sowohl während der Reinigung als auch von den gereinigten, denaturierten und gefalteten Proteinen Proben zurückbehalten, auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Silber- und Coomassie-Färbung angefärbt. Die bei -80° C gelagerten Aliquots der einzelnen Fraktionen nach der Proteinreinigung wurden wie folgt zur Gelelektrophorese vorbereitet: Pro 30 µl Aliquot wurden im Heizblock unter dem Abzug je 10 µl Laemmli-Puffer zugegeben und für 5 min auf 95° C erhitzt. Die Lösung wurde dann für 2 min bei 22° C bei 10.000 rpm zentrifugiert und schließlich auf ein Gel aufgetragen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch optisches Abschätzen, wobei die Färbintensität der Proteinbanden mit der des Markers bekannter Konzentration verglichen wurde.

### **2.2.3 Messung der inhibitorischen Kapazität**

In den folgenden Versuchsreihen sollte schließlich die inhibitorische Kapazität der beiden Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren gegenüber verschiedenen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen bestimmt werden. Zum Vergleich erfolgte in einem Vorversuch jedoch zunächst die Testung gegenüber uPA.

Die Messungen folgten nach dem Grundprinzip, dass einer Protease ein synthetisches Substrat einer möglichst ähnlichen Selektivität wie der des natürlichen Substrates zugesetzt wird. Durch die Interaktion von Substrat und Protease wird dem Substrat seine chromogene Gruppe abgespalten. Dieser Substratumsatz erfolgt direkt proportional zur Enzymaktivität,

kann photometrisch bestimmt werden und bietet somit eine sehr gute Methode, um die Enzymaktivität sichtbar zu machen. Nach Zugabe des dem jeweiligen Enzym zugehörigen Inhibitors ist zu erwarten, dass die Aktivitätskurve weniger stark steigt, bzw. je nach inhibitorischer Stärke, keine Steigung zu vermerken ist.

Jede Messung der inhibitorischen Aktivität wurde durch eine Positivkontrolle, welche keinen Inhibitor im Ansatz enthielt, sowie eine Negativkontrolle, welche lediglich aus Substrat und Puffer bestand, komplettiert.

### **2.2.3.1 PAI-1**

#### 2.2.3.1.1 gegenüber uPA

Eine 96-well-Microtiter-Platte wurde mit jeweils 5 µg uPA pro Well und steigenden Mengen PAI-1 (0 µg - 1,5 µg - 3 µg - 6 µg - 15 µg) versetzt und mit *storage buffer* auf ein Volumen von insgesamt 200 µl pro Well aufgefüllt. Das Pipettieren der einzelnen Komponenten erfolgte auf Eis, anschließend 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden 0,1 mM des chromogenen Substrates I-1595 zugegeben und der Substratumsatz bei 405 nm im Photometer gemessen.

#### 2.2.3.1.2 gegenüber KLK2

Die Testung der Interaktion von PAI-1 gegenüber KLK2 wurde ebenfalls in einem 96-well-Mikrotiter-Well-Assay nach folgendem Protokoll durchgeführt: 100 ng KLK2 wurden auf Eis mit steigenden Mengen PAI-1 (0 µg - 0,3 µg - 0,6 µg - 1,2 µg - 1,8 µg - 2,4 µg - 3 µg - 6 µg - 9 µg - 12 µg - 15 µg) versetzt. Der Ansatz wurde mit *storage buffer* auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 0,1 mM des Substrates I-1295 wurde zugegeben und der Substratumsatz bei 405 nm im Photometer gemessen.

#### 2.2.3.1.3 gegenüber KLK4

Für KLK4 wurden 11 Wells auf Eis mit jeweils 5 ng KLK4 und PAI-1 von 0 µg - 15 µg pipettiert, mit *storage buffer* auf 200 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. 0,1 mM des für KLK4 optimalen Substrates I-1120 wurde zugegeben und der Substratumsatz bei 405 nm im Photometer gemessen.

### **2.2.3.2 PAI-2**

Auch die hemmende Wirkung von PAI-2 gegenüber uPA, KLK2 und KLK4 wurde nach demselben Prinzip untersucht. Hierbei erfolgte der Vergleich zwischen PAI-2, welches unter nativen Bedingungen gereinigt wurde, sowie jenem, welches bei der Reinigung denaturierenden Bedingungen ausgesetzt war zunächst gegenüber uPA. Da denaturierend gereinigtes PAI-2 in diesem Versuch keinerlei inhibitorische Wirkung auf sein physiologisches Substrat uPA zeigte, erfolgten die Tests gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen allein mit unter nativen Bedingungen gereinigtem PAI-2.

#### 2.2.3.2.1 gegenüber uPA

In 5 Wells der 96-Well-Microtiter-Platte wurden, unter Kühlung auf Eis, jeweils 5 µg uPA pipettiert und mit 0 µg - 1,5 µg - 3 µg - 6 µg und 15 µg PAI-2 (nativ gereinigt) vermischt, mit *storage buffer* auf je 200 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. 0,1 mM des chromogenen Substrates I-1595 wurde zugegeben und der Substratumsatz bei 405 nm im Photometer gemessen.

Die Austestung des denaturierend gereinigten PAI-2 erfolgte nach demselben Protokoll.

#### 2.2.3.2.2 gegenüber KLK2

5 Wells der Mikrotiter-Platte wurden im Rahmen der Testreihe von PAI-2 gegenüber KLK2, unter Kühlung auf Eis, mit je 300 ng KLK2 befüllt, danach PAI-2 in steigenden Mengen von 0 µg, 0,15 µg, 0,3 µg, 0,6 µg und 1,5 µg hinzugegeben und mit *storage buffer* auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Starten der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 0,1 mM des Substrates I-1295 und Messung des Substratumsatzes bei 405 nm im Photometer.

#### 2.2.3.2.3 gegenüber KLK4

Die Testung von PAI-2 gegenüber KLK4 erfolgte nach dem gleichen Protokoll, wie bei der Versuchsreihe mit KLK2, lediglich das chromogene Substrat wurde durch 0,1 mM I-1120 ersetzt, die Menge an KLK4 betrug 2,5 ng pro Well.

### 2.2.4 Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine elektrokinetische Methode, mit Hilfe derer geladene Teilchen (z.B. Protein- oder Nukleinsäuregemische) in ihrer denaturierten Form, unter Anlage eines elektrischen Feldes, nach Masse und Ladung getrennt werden können und durch anschließende Färbung des Gels sichtbar gemacht werden können. Die Denaturierung wird durch vorherige Inkubation des aufzutrennenden Proteins mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht. Durch Zugabe von Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken in der Quartär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine reduziert, wodurch diese Strukturen aufbrechen. An die dadurch gestreckten Peptidketten können sich so SDS-Moleküle anlagern, welche den Proteinen dadurch eine insgesamt negative Ladung verleihen. Durch eine zum Molekulargewicht proportionale Anlagerung von SDS an das Protein wird eine Wanderung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld erreicht. Negativ geladene Proteine wandern zur Anode, die Laufgeschwindigkeit verhält sich indirekt proportional zur Größe des Proteins.

Zum Abschätzen der Molekülmasse wurde mit jeder Gelelektrophorese ein Marker mit bekannter Molekülmasse aufgetragen.

#### 2.2.4.1 Gießen eines Polyacrylamidgels

Für die Gelelektrophoresen dieser Arbeit wurden sowohl 10%ige, als auch 12%ige Polyacrylamid-Trenngele (PAA-Gele) benötigt.

2 10%ige Gele einer Dicke von 1 mm wurden aus folgenden Komponenten gegossen: 4,81 ml H<sub>2</sub>O bidest, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8, 2,5 ml 40%ige Polyacrylamid-Stammlösung und 100 µl SDS 10%. 2 ml dieser Lösung wurden abpipettiert und unter dem Abzug mit 2 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED), sowie 18 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) zur Polymerisation angeregt und anschließend zwischen die vorgesehenen 2 Glasplatten gegossen. Die restliche Lösung wurde daraufhin ebenfalls unter dem Abzug mit 7 µl TEMED und 18 µl APS versetzt und auf die bereits ausgehärteten 2 ml pipettiert.

Die Vorgehensweise für 12%ige PAA-Gele unterschied sich lediglich in der eingesetzten Menge der einzelnen Gelkomponenten. So wurden 4,31 ml H<sub>2</sub>O bidest, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8 und 3,0 ml 40%ige PAA-Stammlösung verwendet.

Nach Polymerisation der Gele wurden diese bis zur Verwendung in feuchtes Papier eingeschlagen, in eine Plastikfolie verpackt und im Kühlschrank aufbewahrt. Das 5%ige Sammelgel wurde vor der jeweiligen Gelelektrophorese frisch auf das Trenngel gegossen. Hierzu wurden 11,95 ml H<sub>2</sub>O bidest, 5 ml Tris-Cl pH 6,8, 2,5 ml 40%iges PAA und 200 µl SDS 10 % gemischt und zur besseren Kontrastierung mit einer Pipettenspitze Bromphenolblau eingefärbt, 2 ml davon abpipettiert, mit 2 µl TEMED, sowie 20 µl APS versetzt und auf das Trenngel gegeben. In das noch nicht polymerisierte Sammelgel wurde dann ein Kamm mit der gewünschten Kammerzahl eingeschoben und die Aushärtung abgewartet.

Zur Gelelektrophorese wurde dann ein geeigneter Marker im Verhältnis 1:1 mit PBS, sowie Laemmli-Puffer verdünnt. Für Protein-Gele wurde ein *unstained marker* (# SM 0431 [Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte]), für Western Blot-Gele ein *prestained marker* (# 26616 [Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte]) verwendet.

Die zu trennenden Proteinproben wurden im Falle einer reinen Gelelektrophorese mit reduzierendem Laemmli-Puffer, im Falle eines Gels, welches für einen Western Blot vorgesehen war mit nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer verdünnt. Das Pipettieren desselben erfolgte unter dem Abzug, unter Erhitzung der Proben auf 95° C für 5 min, danach Zentrifugieren der Proben bei 22 °C und 10.000 rpm für 2 min, Auffüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer, anschließend Pipettieren der Proben in die mit Sammelgel geformten Proben-Kammern und schließlich Anlegen einer Spannung von 120 V für ca. 1 h.

Sobald das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Spannung abgeschaltet und das Gel weiter behandelt. Für reine Proteingele schloss sich an die

Gelelektrophorese ein Färbeprozess entweder mit Coomassie oder mit Silber an, von anderen Gelen wurde im Anschluss ein Western Blot angefertigt.

## **2.2.5 Färbemethoden**

### **2.2.5.1 Coomassie-Färbung**

Zur Coomassie-Färbung eines PAA-Gels wurde dieses zunächst für 30 min in eine Fixierlösung gelegt. Diese Fixierlösung wurde anschließend durch ein Bad in H<sub>2</sub>O bidest. abgewaschen. Es schloss sich das ca. 90-minütige Färbebad in einer Mischung aus 10%iger Essigsäure mit 0,1 % Coomassie an, gefolgt von einem Waschgang in 10%iger Essigsäure für ca. 2 h zum Entfärben des Hintergrundes. Schließlich wurde das gefärbte Gel in einer Trockenlösung aus 25 % Ethanol, 5 % Glycerin und 70 % H<sub>2</sub>O bidest. gebadet, zwischen 2 Cellophan-Folien eingebracht und unter Heißluft getrocknet. Während der einzelnen Bäder wurde das Gel in den jeweiligen Lösungen durch Lagerung auf einem Schüttler kontinuierlich geschwenkt.

### **2.2.5.2 Silber-Färbung**

Um selbst geringste Proteinmengen visuell sichtbar machen zu können, wurden einzelne Proteingele der Silberfärbemethode unterzogen. Hierzu erfolgte zunächst, vergleichbar der Coomassie-Färbung, ein fixierender Schritt für ca. 20 min. Diese Fixierlösung wurde ebenso anschließend durch Schwenken in H<sub>2</sub>O bidest. für 2 x 5 min abgewaschen. Es folgte ein Bad in *Farmer's reducer*, welcher wiederum durch 5 Waschgänge à 10 min mit Aqua bidest. abgewaschen wurde. Bei jedem Waschschrift wurde das Wasser erneuert. Anschließend wurden die Proteine in einer 0,1 % AgNO<sub>3</sub> Lösung für 30 min bei Raumtemperatur angefärbt, gefolgt von einem kurzen Waschschrift durch Schwenken in Wasser für 10 Sekunden und schließlich Tauchen des Gels in die Entwicklerlösung, bis die gewünschte Färbeintensität der anzufärbenden Banden erreicht ist. Die Färbung wurde mittels 10%iger Essigsäure für ca. 1 min gestoppt und danach das Silber-gefärbte Gel zwischen zwei Cellophan-Folien im Heißlufttrockner getrocknet

## **2.2.6 Western Blot**

Zur Anfertigung eines *semi-dry* Western Blots wurde das 12%ige Polyacrylamidgel nach durchlaufener Gelelektrophorese zunächst in Blotpuffer mit 5 % Ethanol gelegt. Filterpapier und eine PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. 3 Filterpapiere wurden in Blotpuffer, der 5 % Ethanol enthält gelegt, 3 weitere Papiere in Blotpuffer, der 20% Ethanol enthält. Die PVDF-Membran wurde zuerst kurz mit 100 % Ethanol beträufelt, dann in Blotpuffer mit 20 % Ethanol gelegt. Die Bodenplatte der Western Blot-Maschine wurde mit Blotpuffer mit 20 % Ethanol benetzt, dann zunächst die Filterpapiere, die in Blotpuffer mit

20 % Alkohol getränkt wurden, darauf gestapelt. Durch vorsichtiges Rollen einer Glaspipette über den Filterpapierstapel wurden etwaige Luftblasen beseitigt und schließlich wurde die PVDF-Membran dem Filterpapierstapel aufgelegt. Das Proteingel, das zunächst einige min in Blotpuffer mit 5 % Ethanol lag, und 3 Filterpapiere, die in Blotpuffer mit 5 % Ethanol getränkt wurden, wurden auf die PVDF-Membran gelegt und schließlich die Deckplatte des Western Blot Gerätes, dessen Schieferplatte mit Blotpuffer mit 5%igem Ethanol benetzt wurde, aufgesetzt. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde durch Anlegen einer elektrischen Stromstärke von ca. 100 mA für 2,5 h erreicht.

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran zunächst 10 min in PBS gewaschen. Das Blockieren der freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran erfolgte durch ein einstündiges Bad in 30 ml der Blockierlösung. Die restlichen 70 ml der 5%igen Milchpulver-Blockierlösung wurden durch Auffüllen mit 280 ml PBS auf 1 % verdünnt und die Membran darin für 1 Minute gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit den Primäantikörpern inkubiert. Als Primäantikörper zur Detektion von uPA wurde ein Anti-HMW-uPA Antikörper [Fa. Novus Biologicals]. Für KLK2 wurden sowohl ein Anti-KLK2 (rab) [Fa. Novus Biologicals, Produktnummer: NBP 1-32288], als auch ein Anti-KLK2 (mouse) [Fa. Novus Biologicals, Produktnummer: 5E4] ausgetestet. Für KLK4 wurden drei Antikörper der Firma Novus Biologicals ausgetestet [Produktnummern: NBP 200-134, rab 587, 617C]. Für PAI-1 wurde ein gegen das *His-Tag* von PAI-1 gerichteter Antikörper verwendet [Fa. Qiagen, ID: 34660]. Die Antikörper wurden mit der 1%igen Milchpulverlösung verdünnt (Anti-HMW-uPA 1:4000, Anti-KLK2 (rab) NBP 1-32288 1:600, Anti-KLK2 (mouse) 5E4 1:500, Anti-KLK4 NBP 200-134 1:500, Anti-KLK4 rab 587 1:500, Anti-PAI-1 1:1000), auf die Membran gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten zunächst drei Waschschriffe à 10 min mit 1%iger Milchpulverlösung, bevor der Zweitantikörper für weitere 45 min zugegeben wurde. Für Primäantikörper aus dem Kaninchen wurde  $\alpha$ -rab-POD, für Primäantikörper aus der Maus  $\alpha$ -mouse-POD in einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet. Der Sekundäantikörper wurde anschließend in drei weiteren Waschschriffen à 5 min mit 1%iger Milchpulverlösung heruntergewaschen. Zur Detektion wurden je 600  $\mu$ l der zwei Komponenten der Western Blot-Entwicklerlösung (Pierce ECL Western Blotting Substrat [Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte]) zusammenpipettiert und auf die in der Fotokassette befindliche Membran gegeben. Nach etwa einer Minute wurde die überschüssige Substratlösung mit einem Stück Papier abgesaugt und die Membran mit Frischhaltefolie bedeckt, bevor der Röntgenfilm aufgelegt wurde. Schließlich erfolgte die Belichtung des Röntgenfilms und dessen Entwicklung in der Dunkelkammer.

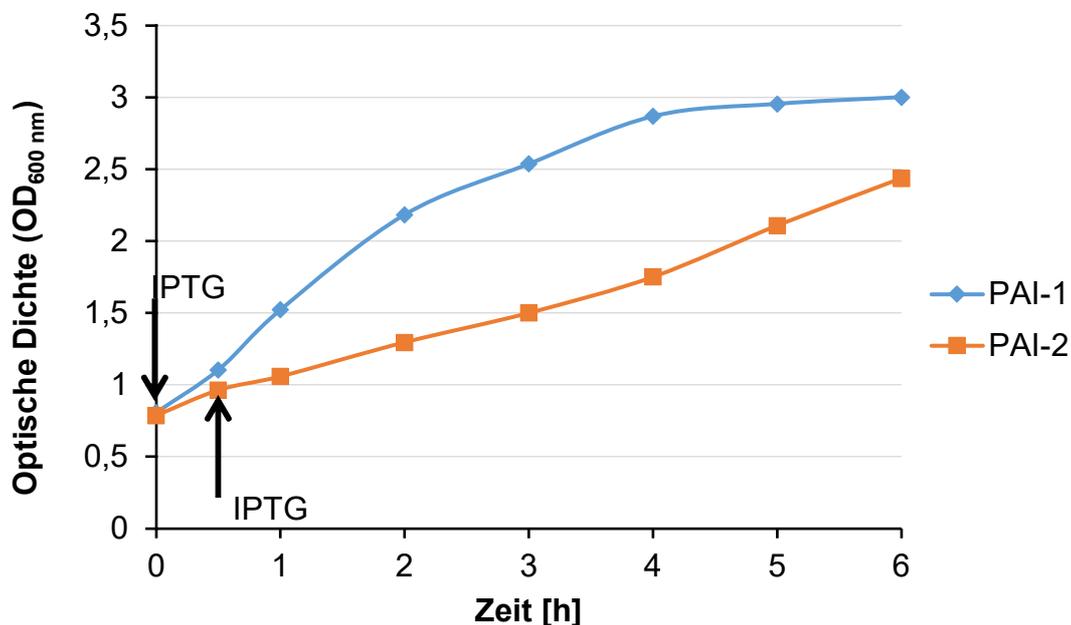
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem PAI-1

#### 3.1.1 Expression von rekombinantem humanen PAI-1 in *E. coli*

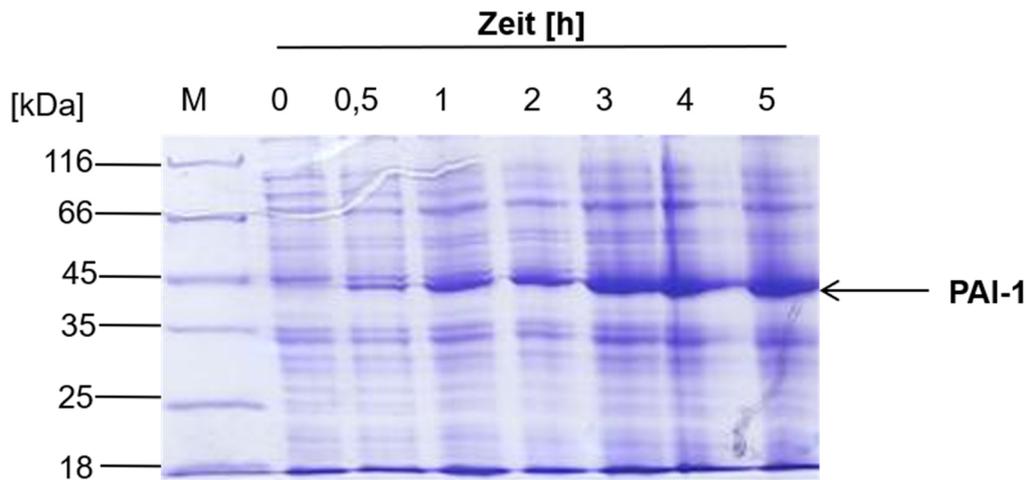
Der PAI-1 Expressionsvektor wurde, wie im Methodenteil beschrieben, in *E. coli M15 [pREP4]*-Zellen transformiert und das humane Protein exprimiert. Die Bakterienzellen wurden über Nacht in antibiotikahaltigem 2xTY-Medium geschüttelt, am Folgetag verdünnt, nochmals für weitere 2 h inkubiert und schließlich die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG induziert. Durch Bestimmung der optischen Dichte aus stündlich gewonnenen Aliquots dieser Lösung wurden indirekt Schlüsse auf das Wachstumsverhalten der Bakterienzellen gezogen.

Die *E. coli M15*-Bakterienzellen, welche mit dem für PAI-1 kodierenden Expressionsvektor transformiert waren, zeigten nach kurzer Anlaufphase (*lag*-Phase) ein exponentielles Wachstum und gingen schließlich nach etwa 4 h in die stationäre Phase über. In analoger Weise wurde auch humanes PAI-2 exprimiert. Die Bakterienzellen, welche das Expressionsplasmid für PAI-2 enthielten, zeigten ein langsames Wachstum, blieben während der gesamten Versuchszeit von 6 h im nahezu exponentiellen Wachstum und erreichten die stationäre Phase während des Versuchs nicht (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7. Zeitkinetik des Zellwachstums von PAI-1- und PAI-2- überexprimierenden *E. coli*-Bakterien.** Die Zellen, die mit Expressionsplasmiden für PAI-1 (blau) und PAI-2 (orange) transformiert sind, wurden gesondert mit 2xTY-Medium, Kanamycin und Ampicillin über Nacht vorinkubiert. Am Folgetag wurde die Übernachtskultur mit 2xTY-Medium 1:50 verdünnt, und nach erneuter Antibiotikazugabe für weitere 2 h inkubiert. Bestimmung der OD<sub>600nm</sub>, bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6-0,7 (PAI-1), bzw. 1,0 (PAI-2), dann erfolgte die Induktion der Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine durch Zugabe von IPTG (Pfeile). Das Zellwachstum wurde weiterhin durch stündliche Messung der OD<sub>600nm</sub> verfolgt.

Neben der Bestimmung der optischen Dichte wurden aus den stündlich gewonnenen Aliquots mittels *Cracking*-Aufschluss Gesamtprotein präpariert und einer Gelelektrophorese unterzogen. **Abbildung 8** zeigt die Ergebnisse der Zeitkinetik für PAI-1.



**Abbildung 8. Zeitkinetik der Proteinexpression von PAI-1.** SDS-Polyacrylamidgel in Coomassie-Färbung: Die linke Spur (M) zeigt den *prestained* Marker (aufgetragene Menge 1 µg pro Bande). Daneben wurden stündlich gewonnene Proben der Zeitkinetik des Zellwachstums von PAI-1-überexprimierenden *E. coli*-Bakterien aufgetragen. Nach 30 min wurde bei Erreichen der OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 IPTG zugegeben und somit die Expression des rekombinanten Proteins gestartet. Bereits 30 min nach Induktion wurde Protein mit erwarteter Größe von PAI-1 (~48 kDa) im unteren Bereich der Doppelbande sichtbar. 3 h nach Induktion war das Maximum an Proteinexpression erreicht.

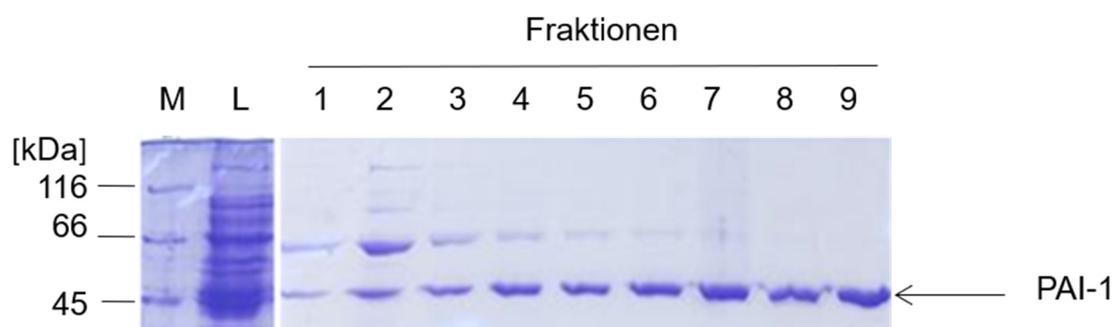
Die Gelelektrophorese des Gesamtproteins nach Zellysat trennt neben endogenen *E. coli*-Proteinen auch das rekombinante humane Protein (PAI-1, ~48 kDa, unterer Teil der Doppelbande) auf. Die Überexpression war ab 30 min nach Induktion durch IPTG zu beobachten und erreichte nach etwa 3 h ihr Maximum. Aus diesen Zellextrakten galt es in den folgenden Reinigungsschritten rekombinantes humanes PAI-1 und in ähnlicher Weise auch PAI-2 zu reinigen.

### 3.1.2 Affinitätschromatographische Reinigung von humanem PAI-1 aus *E. coli* unter nativen Bedingungen

Nach der Expression wurde aus den Bakteriensuspensionen zunächst der zelluläre Anteil vom Medium durch wiederholtes Abzentrifugieren getrennt. Die gewonnenen Bakterienpellets wurden resuspendiert und schließlich durch Ultraschallbehandlung die Mureinschicht zerstört, um so die exprimierten Proteine aus dem Zellinneren der *E. coli*-Zellen zu lösen.

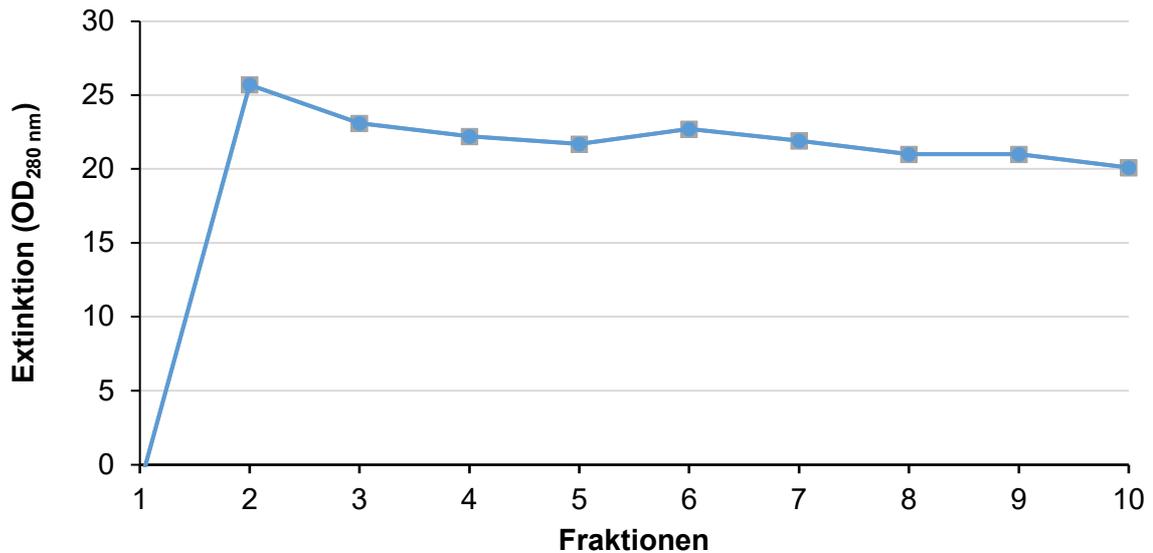
Um nun das rekombinante humane PAI-1 von den übrigen endogenen Proteinen trennen zu können, erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung von PAI-1 aus der Proteinmischung. PAI-1 wird in *E. coli*-Zellen in löslicher Form exprimiert und eignet sich so für die Reinigung unter nativen Bedingungen.

**Abbildung 9** stellt die Proteinprofile vor der Reinigung („Lysat“, pH 7,4), sowie während der Elution („1-9“, pH von 7,4 auf 5,6 schrittweise herabgesetzt, Imidazol von 20 auf 200 mM schrittweise erhöht) gegenüber und zeigt deutlich, dass sich bei schwach basischem pH noch unspezifische Proteine in der Chromatographiesäule befinden, durch weiteres schrittweises Absenken des pH-Wertes diese jedoch nahezu vollständig von der Säule gewaschen werden können. Rekombinantes PAI-1 wird im sauren Milieu und durch Zugabe des Histidinanalogs Imidazol in schrittweise steigender Konzentration (20 mM → 200 mM) aus dem Chelat-Komplex der Ni<sup>2+</sup>-Agarose der Säule gelöst. Ab Fraktion 6-9 (pH 5,6, 200 mM Imidazol) ist nahezu reines PAI-1 (~48 kDa) im Durchlauf befindlich. Diese Beobachtung wurde zusätzlich durch Messen der optischen Dichte der gewonnenen Fraktionen im Rahmen der Elution bestätigt.



**Abbildung 9. Vergleich PAI-1 vor und nach Aufreinigung unter nativen Bedingungen.** Links: Durchlauf des Lysats (pH 7,4, kein Imidazol) Rechts: Elution des gebundenen Proteins mit Elutionspuffer, pH 5,6 und Imidazol 200 mM (Fraktionen 1-9). Fraktionen 6-9 enthalten >95 % reines, rekombinantes PAI-1 (~48 kDa).

Die Bestimmung der optischen Dichte (**Abbildung 10**) zeigte deutlich, dass durch weiteres Herabsetzen des pH-Wertes und gleichzeitige Erhöhung der Imidazolkonzentration im Puffer, im Zuge der Elution, eine große Menge an Protein aus der Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose der Chromatographiesäule gelöst werden konnte. Die parallel durchgeführte Gelelektrophorese zeigte, dass dieses Protein ein Molekulargewicht von ~48 kDa aufwies, welches dem errechneten von rekombinantem humanen PAI-1 entspricht (~48 kDa) (**Abbildung 9**).



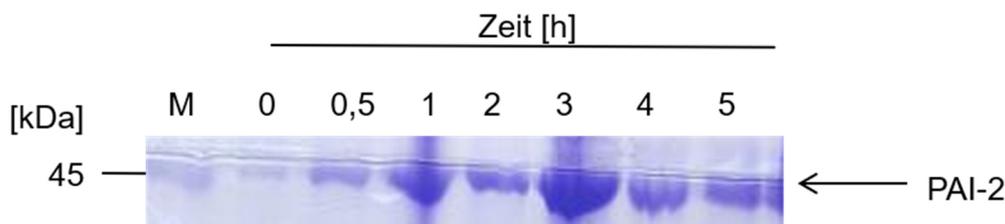
**Abbildung 10. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-1.** Durch Erhöhung der Konzentration des Histidinanalogs Imidazol von 20 mM auf 200 mM während der Elution und stufenweises Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 5,6 erfolgt die Lösung des 6xHis-tagged-Proteins PAI-1 aus der Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, welches durch den Anstieg der gemessenen Extinktion bei 280 nm zur Darstellung kommt.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Photometrie und Gelelektrophorese wurden für die darauffolgenden Versuchsreihen mit PAI-1 die mit Protein eines Molekulargewichtes von etwa 60 kDa verunreinigten Fraktionen 1-5 verworfen und nur die reineren Fraktionen 6-9 miteinander vereinigt und verwendet. Um die maximale inhibitorische Kapazität des gewonnenen PAI-1 zu erzielen wurde nach der Reinigung unter nativen Bedingungen eine Denaturierung und Rückfaltung durchgeführt (siehe 2.2.1.2 Denaturierung und Rückfaltung von PAI-1 und PAI-2).

## 3.2 Expression, Reinigung und Rückfaltung von PAI-2

### 3.2.1 Expression von rekombinantem humanen PAI-2 in *E. coli*

In analoger Weise wie PAI-1 wurde PAI-2 in *E. coli* exprimiert. In **Abbildung 11** ist die Zeitkinetik der Proteinexpression von PAI-2 in *E. coli* dargestellt. PAI-2 (~46 kDa) wurde in großer Menge exprimiert, wie die Zunahme der Bandenintensität von Stunde zu Stunde verdeutlicht. Die Expression ist wie bei PAI-1 bereits nach 30 min sichtbar.



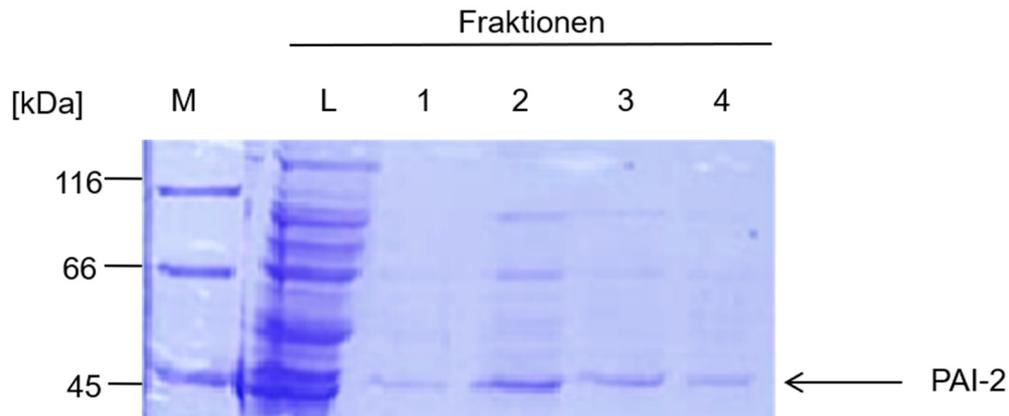
**Abbildung 11. Zeitkinetik der Proteinexpression PAI-2.** Aufgetragen wurden (halb-) stündlich gewonnene Proben der Zeitkinetik von PAI-2 (~46 kDa). Nach 30 min wurde bei Erreichen der  $OD_{600}$  von 1,0 IPTG zugegeben.

### 3.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinantem humanen PAI-2

Während PAI-1 ausschließlich unter nativen Bedingungen aufgereinigt wurde und nach darauffolgender Denaturierung und Rückfaltung eine gute Proteinausbeute an aktivem PAI-1 gewonnen werden konnte, war der Gewinn von PAI-2 nach Reinigung unter nativen Bedingungen gering (**Abbildung 12**). So wurde PAI-2 auch unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, was eine wesentlich höhere Ausbeute an Protein erbrachte.

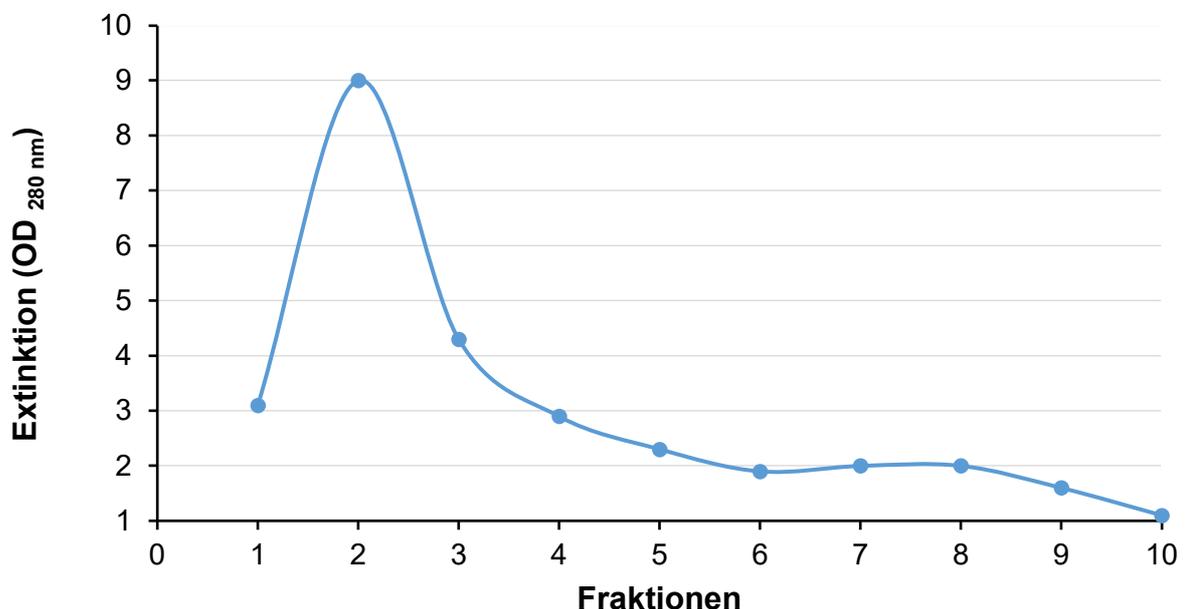
#### 3.2.2.1 PAI-2 Reinigung unter nativen Bedingungen

Analog zur Vorgehensweise mit PAI-1 wurde im Falle von PAI-2 aus der Bakteriensuspension der Übernachtskultur zunächst der zelluläre Anteil durch mehrfaches Abzentrifugieren gewonnen, das so gewonnene Bakterienpellet resuspendiert und schließlich durch Ultraschallbehandlung die bakterielle Zellwand zerstört. Das so gewonnene Zelllysat wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (siehe 2.2.1.1 Affinitätschromatographische Reinigung von humanem PAI-1 und PAI-2 aus *E. coli*). Durch schrittweises Herabsetzen des pH-Wertes gelang es aus dem Lysat PAI-2 ausreichend von unspezifischen Proteinen zu reinigen. Das Ablösen des an die Chromatographiesäule gebundenen PAI-2 wurde, wie bei PAI-1, durch Zugabe steigender Mengen an Imidazol erreicht. Im Vergleich zu PAI-1 erwies sich die gewonnene Menge an PAI-2 als vergleichsweise gering. Die Gegenüberstellung der exprimierten Proteine vor und nach nativer chromatographischer Reinigung ist in **Abbildung 12** dargestellt.



**Abbildung 12. Exprimiertes PAI-2 vor und nach Reinigung unter nativen Bedingungen.** Links ist ein Marker (M) mit 1 µg/Bande aufgetragen, daneben das Gesamtprotein des aufgeschlossenen *E. coli*-Pellets (L) vor Reinigung. *His-getaggt*es PAI-2 wurde mit Äquilibriumspuffer (pH 7,4) an die Chromatographie-Säule gebunden, durch Zugabe von Waschpuffer (pH 6,5, 20 mM Imidazol) wurden endogene *E. coli*-Proteine ausgewaschen und schließlich *His-getaggt*es PAI-2 im Rahmen der Elution (pH 6,0, 200 mM Imidazol) aus dem Chelat-Komplex abgetrennt und somit von der Säule gelöst (Fraktionen 1-4).

Die im Vergleich zum Lysat schwachen Proteinbanden von PAI-2 nach nativer Reinigung zeigten, dass sich mittels dieser Reinigungsmethode nur wenig PAI-2 gewinnen ließ. Die Bestimmung der optischen Dichte der einzelnen Fraktionen bestätigte dies.

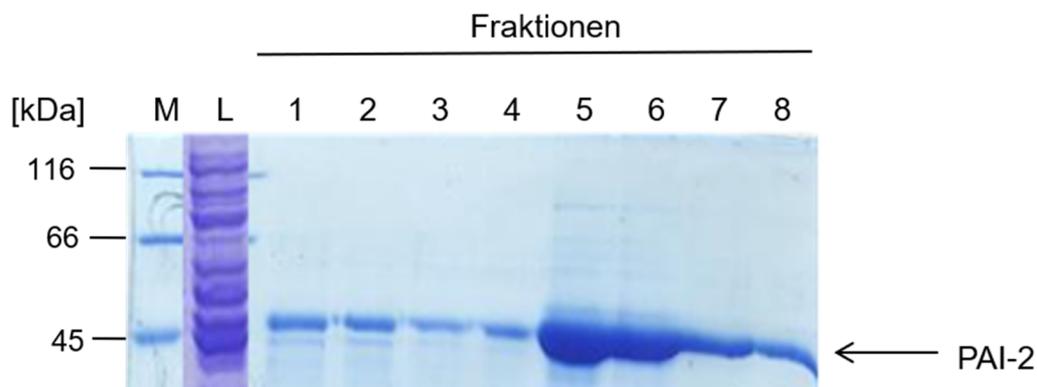


**Abbildung 13. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-2, nativ gereinigt.** Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration von 20 mM auf 200 mM während der Elution bei pH 6,0 erfolgt die Lösung des 6x*His-tagged*-Proteins PAI-2 aus der Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, jedoch ist, wie durch raschen Abfall der Extinktion bereits nach der 2. Fraktion zu erkennen, die erzielte Proteinmenge gering.

Die zweite Fraktion zeigte bei 46 kDa sowohl die höchste Bandenintensität bei der Gelelektrophorese als auch die höchste gemessene optische Dichte (**Abbildung 13**). Die 46 kDa-Banden der weiteren Fraktionen nahmen in der Intensität sprunghaft ab, ebenso die Extinktionen dieser Fraktionen. Das bedeutet, dass ab der 3. Fraktion nahezu kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren zeigte sich, dass durch die gewählte Reinigungsmethode die endogenen *E. coli*-Proteine nicht ausreichend ausgewaschen werden konnten.

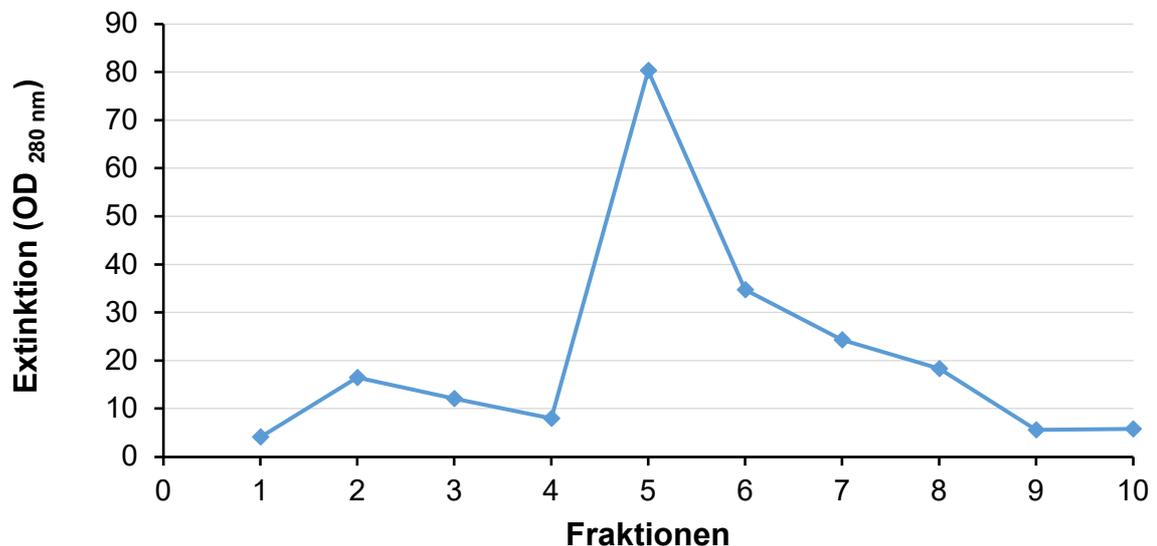
### 3.2.2.2 PAI-2 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Zur Reinigung von PAI-2 unter denaturierende Bedingungen wurde das Bakterienpellet zunächst in Mercaptoethanol-haltigem Puffer gelöst. Das so gewonnene Lysat wurde zentrifugiert, das Pellet verworfen und die Chromatographiesäule mit der Lysat-Agarose-Mischung befüllt. Das Auswaschen der unspezifischen Proteine erfolgte durch schrittweises Herabsenken des pH-Wertes von 8,0 auf 6,3 unter gleichzeitiger Zugabe steigender Mengen an Mercaptoethanol. Die Elution von PAI-2 wurde durch weiteres Herabsenken des pH-Wertes von 6,3 auf 4,5 erreicht. Hier konnten die unspezifischen *E. coli*-Proteine ausgewaschen werden und im Gegensatz zur nativen Reinigungsmethode konnte, wie in **Abbildung 14** dargestellt, eine wesentlich größere Menge von PAI-2 gewonnen werden.



**Abbildung 14. Exprimiertes PAI-2 vor und nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen.** Links dargestellt das Lysat bei pH 8. Von 1-8 nummeriert die Fraktionen, welche im Rahmen der Elution gewonnen wurden. Die unspezifischen Proteine im Zellextrakt konnten durch schrittweises Absenken des pH-Wertes von 8 auf 6,3 herausgewaschen werden. Die Elution von PAI-2 erfolgte schließlich durch weiteres Absenken auf pH 4,5. Die Fraktionen 5-8 zeigten sich in obiger Gelelektrophorese am reinsten und mit dem größten Anteil an PAI-2, weswegen diese Fraktionen vereinigt und für die darauffolgenden Tests verwendet wurden.

Die parallel durchgeführte Messung der Extinktion der einzelnen Fraktionen während der Elution bestätigte das Ergebnis der Gelelektrophorese. Die höchste optische Dichte, und somit der höchste Gehalt an Protein, wurde bei Fraktion 5 gemessen (**Abbildung 15**). Hier zeigte sich auch die Proteinbande im Gel am stärksten ausgeprägt (**Abbildung 14**).



**Abbildung 15. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-2 denaturierend gereinigt.** Die Kurve macht durch ihren Peak bei Fraktion 5-8 deutlich, dass der größte Anteil an PAI-2 in selbigen Fraktionen gewonnen werden konnte.

### 3.2.3 Rückfaltung von PAI-2 nach affinitätschromatographischer Reinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen

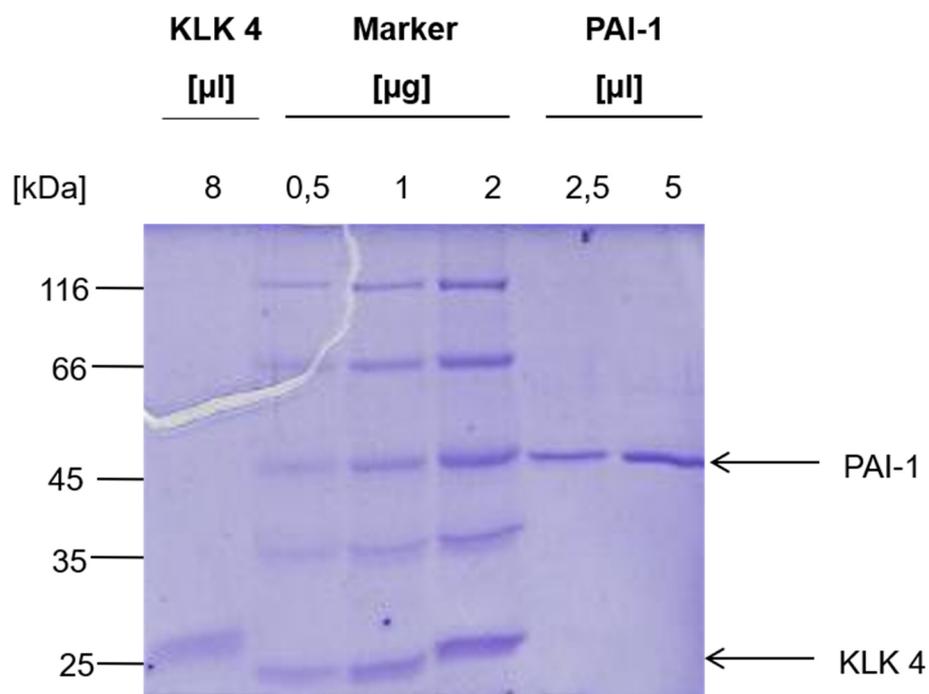
Unter Verwendung stark denaturierender Substanzen (Harnstoff und Guanidin Hydrochlorid) können die aggregierten, unlöslichen und funktionsuntüchtigen PAI-2-Moleküle wieder in Lösung gebracht werden. Um eine anschließende Rückfaltung ohne Reaggregation ermöglichen zu können, müssen die denaturierenden Agenzien langsam aus der Lösung entfernt werden. Hierzu wurden die in Denaturierungsmittel gelösten, entfalteten Proteine im Rahmen einer Dialyse einem denaturierungsmittelfreien Puffer ausgesetzt. Durch langsamen Konzentrationsausgleich der Harnstoff- und Guanidin Hydrochlorid-Konzentration durch Diffusion wurden die Proteine so in ihren nativen, gefalteten und funktionstüchtigen Zustand zurückgeführt.

### 3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

In den folgenden Schritten wurde daraufhin, wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben (2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration), mit Hilfe von weiteren Gelelektrophoresen, die sowohl mit Hilfe von Coomassie als auch Silber angefärbt wurden, die Konzentration der gewonnenen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 bestimmt.

#### 3.3.1 PAI-1

Durch Auftragen verschiedener Proteinmengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit einem Marker bekannter Konzentration und anschließenden Vergleich der Färbungsintensität der aufgetragenen Proteinmengen gegenüber der Markerbanden sowohl in Coomassie- als auch in Silber-gefärbten Gelen wurden durch optische Abschätzung die Proteinkonzentrationen von PAI-1 und KLK4 bestimmt (**Abbildung 16**).

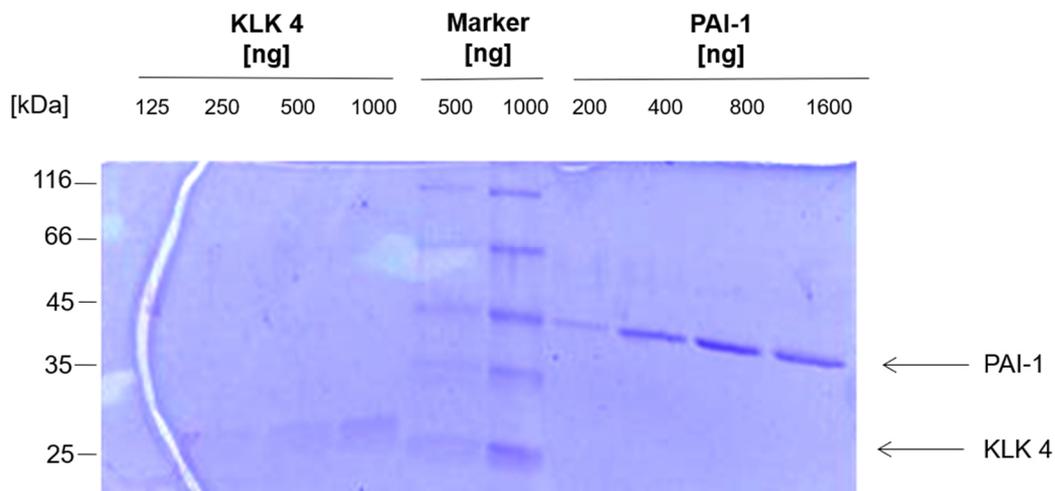


**Abbildung 16. Konzentrationsbestimmung KLK4 und PAI-1.** Durch Festlegen eines optischen Konzentrations-Referenzwertes durch die Marker bekannter Konzentration konnte die Konzentration der aufgetragenen Menge an PAI-1 (2,5 und 5 µl) und KLK4 (4 und 8 µl) abgeschätzt werden.

Diese Ermittlung erfolgte, indem die Banden der zu bestimmenden Proteine optisch in Bezug zum Färbungsgrad des Markers bekannter Konzentration gesetzt wurden. Auf Basis dieser Gelelektrophorese wurde die Konzentration von KLK4 mit  $c_{\text{KLK4}} = 0,0625 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , die des Serpins mit  $c_{\text{PAI-1}} = 0,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ermittelt.

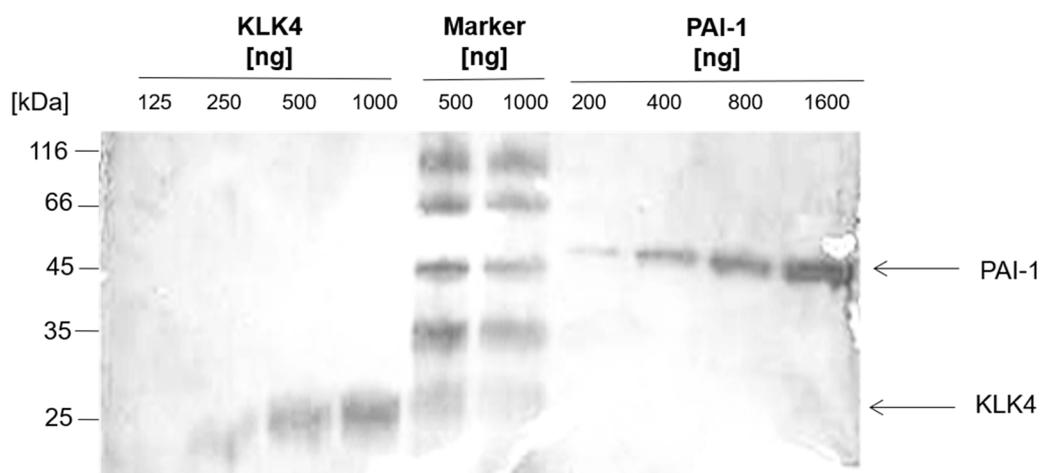
Im gleichen Zug wurde zudem die kleinstmögliche Menge an PAI-1 und KLK 4 bestimmt, die gerade noch mittels Coomassie-Färbung und/oder Silber-Färbung optisch sichtbar gemacht werden kann. Grund hierfür ist, dass zu einem späteren Zeitpunkt mittels Gelelektrophorese

der Komplex aus Serinprotease und PAI-1 nachgewiesen werden sollte. Dies war von Interesse, um abschätzen zu können, ob der Komplex aus Enzym und Inhibitor nicht dargestellt werden konnte, weil der Komplex als solcher sich nicht bildet, oder, weil mit den Färbemethoden die geringen Mengen, in denen sich der Komplex ausbildet, nicht sichtbar gemacht werden können. **Abbildung 17** zeigt, dass mittels Coomassie-Färbung Proteinmengen von 250 ng KLK4 und 200 ng PAI-1 nachgewiesen werden können.



**Abbildung 17. Minimal darstellbare Menge PAI-1 und KLK4 mittels Coomassie-Färbung.** Durch konsekutives Auftragen schrittweise geringerer Mengen an PAI-1 (1600 ng, 800 ng, 400 ng, 200 ng) und KLK4 (1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng) ließ sich die kleinste mittels Coomassie-Färbung noch darstellbare Menge des jeweiligen Proteins nachweisen.

Durch Silber-Färbung ließen sich, wie durch die Coomassie-Färbung auch, 200 ng PAI-1 und 250 ng KLK4 noch auf dem Gel sichtbar machen (**Abbildung 18**). Geringere Mengen konnten auch durch Silber-Färbung nicht visualisiert werden.

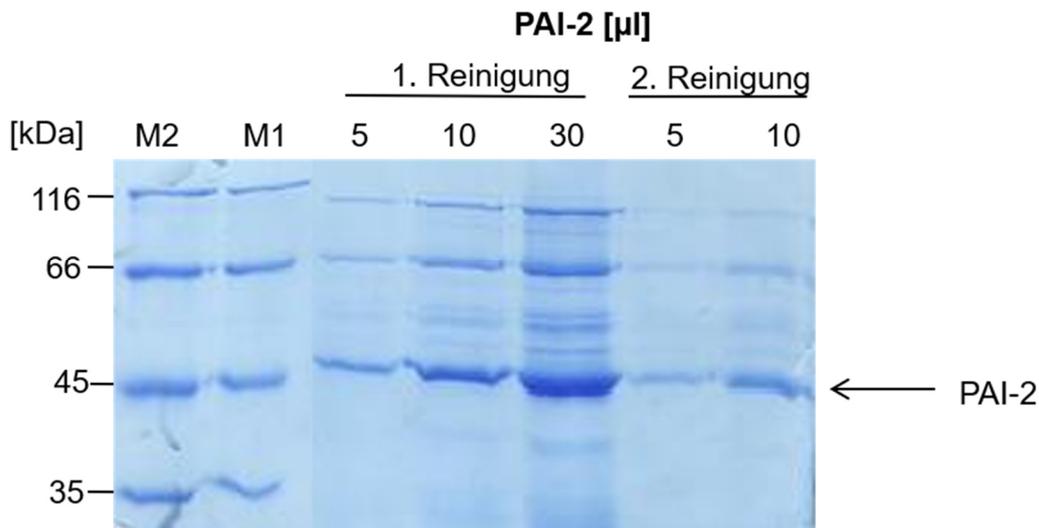


**Abbildung 18. Minimal darstellbare Menge PAI-1 und KLK4 mittels Silber-Färbung.** Die bereits durch Coomassie-Färbung ermittelte minimal darstellbare Menge an PAI-1 (200 ng) und KLK4 (250 ng) wurde mit Hilfe der noch sensitiveren Silber-Färbung noch einmal überprüft und führten zu demselben Ergebnis.

### 3.3.2 PAI-2

#### 3.3.2.1 Analyse von PAI-2 nach nativer Reinigung

Nachdem das unter nativen Bedingungen gereinigte PAI-2 gegen PBS dialysiert wurde, wurde die Konzentration von PAI-2 in analoger Weise zu PAI-1 visuell abgeschätzt.

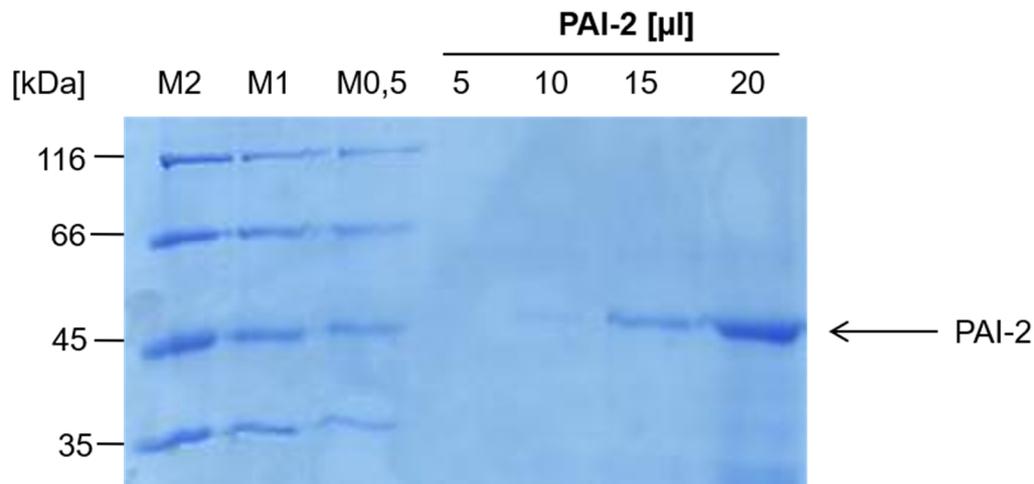


**Abbildung 19. Konzentrationsbestimmung PAI-2, nativ gereinigt.** Die Markerbanden (M2: 2  $\mu$ g/Bande, M1: 1  $\mu$ g/Bande) wurden als Referenzwert zu zwei verschiedenen nativ aufgereinigten PAI-2 Beständen aufgetragen. Erste Reinigung 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 30  $\mu$ l, 2. Reinigung 5  $\mu$ l und 10  $\mu$ l.

Auf Grundlage dieses Gels (**Abbildung 19**) wurde die Konzentration der ersten Reinigung von PAI-2 unter nativen Bedingungen auf 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l semiquantitativ ermittelt, die der 2. Reinigung auf 0,15  $\mu$ g/ $\mu$ l.

#### 3.3.2.2 Analyse von PAI-2 nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und Rückfaltung

Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte PAI-2 wurde zur Dialyse zunächst für 3 h einem Puffer aus PBS und 1 mM DTT ausgesetzt. Nach 3 h erfolgte der Wechsel des Puffers auf reines PBS ohne Zusatz von DTT, welchem PAI-2 über Nacht ausgesetzt wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des nach Rückfaltung vorhandenen löslichen PAI-2 erfolgte semiquantitativ mittels Coomassie- und Silber-Färbung (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20. Konzentrationsbestimmung PAI-2, denaturierend gereinigt.** Die Markerbanden in unterschiedlicher Konzentration (M2: 2 µg/Bande, M1: 1 µg/Bande, M0,5: 0,5 µg/Bande) bieten den optischen Konzentrations-Referenzwert zur aufgetragenen Menge an PAI-2 (5, 10, 15 und 20 µl).

Für das aufgetragene Volumen an PAI-2 (5, 10, 15 und 20 µl) wurde eine Konzentration von 0,09 µg/µl ermittelt.

Diese Versuche machen deutlich, dass durch Reinigung unter denaturierenden Bedingungen von PAI-2, zwar eine ausreichende Menge an PAI-2 gewonnen werden konnte, ein großer Anteil dieser Proteine durch Rückfaltung jedoch ausfallen. Wie sich in den späteren Versuchen zeigen sollte, war die geringe lösliche Menge an PAI-2 inhibitorisch inaktiv.

### 3.4 Messung der inhibitorischen Kapazität von PAI-1 und PAI-2 gegenüber verschiedenen Serinproteasen

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, ob die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen KLK2 und KLK4 durch PAI-1 und/oder PAI-2 gehemmt werden können. Bevor die hemmende Aktivität dieser Serpine gegenüber den KLKs gemessen wurde, erfolgte zunächst ein Vorversuch, der untersuchte, ob die exprimierten PAIs ihr hauptsächliches Substrat, den Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA), ausreichend hemmen.

Den Proteasen wurde ein synthetisches Substrat zugesetzt, das aus einem Tripeptid besteht, welches in der Lage ist an die Substratbindungstasche von uPA, aber auch KLK2 oder 4 zu binden. Der Peptidkette des Substrates ist eine fluorogene Gruppe angeheftet, welche von den Proteasen abgespaltet werden kann. Dadurch wird ein fluorogenes Reaktionsprodukt frei wird, welches im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen werden kann. Die Abspaltung der fluorogenen Gruppe verhält sich direkt proportional zur Enzymaktivität und bietet so eine gute Möglichkeit, die Enzymaktivität sichtbar und graphisch anschaulich zu machen.

#### 3.4.1 Die inhibitorische Kapazität von PAI-1

##### 3.4.1.1 Hemmversuche gegenüber uPA

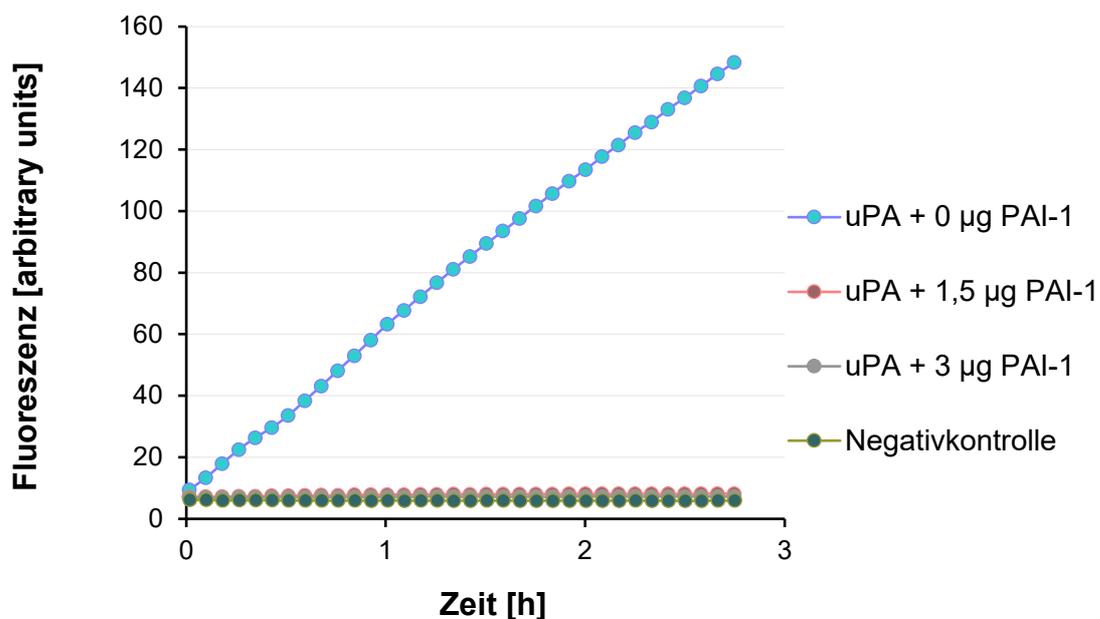
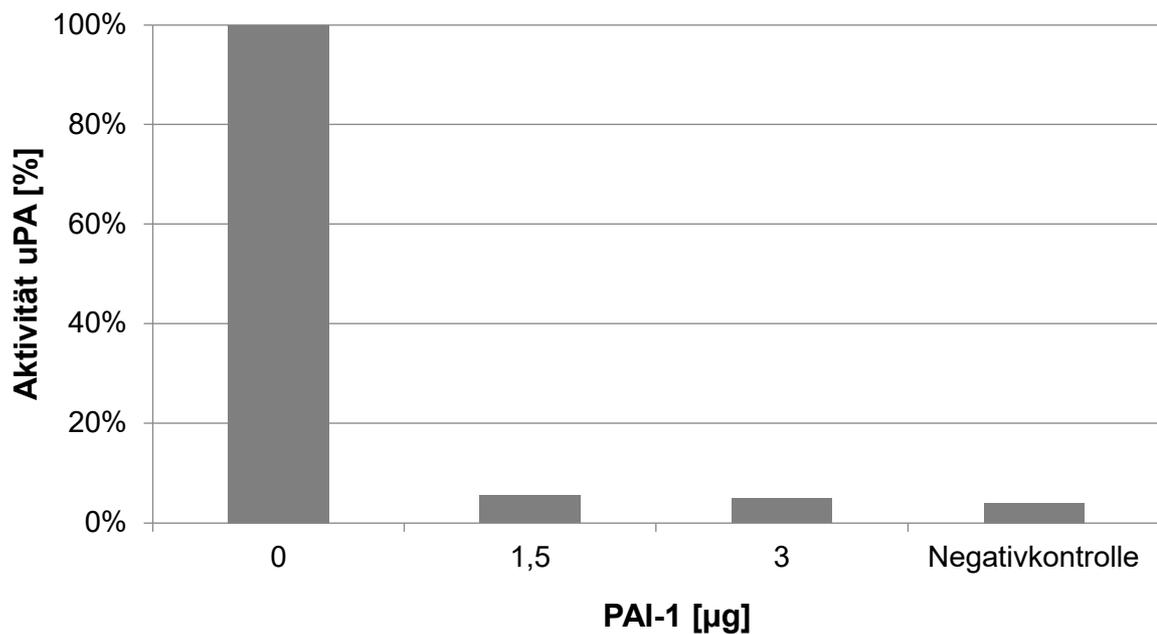


Abbildung 21. Zeitabhängige Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber uPA. Eingesetzt wurden 5 µg uPA und steigende Mengen an PAI-1 (0 µg, 1,5 µg und 3 µg). Die Negativkontrolle enthielt lediglich Puffer und Substrat (I-1595).

**Abbildung 21** zeigt die zeitabhängige Bildung fluorogenen Spaltprodukts. Es wird deutlich, dass in Anwesenheit von PAI-1 die Serinprotease uPA nicht mehr in der Lage ist, ihr Substrat umzusetzen, welches graphisch im Fehlen einer Zunahme der gemessenen Fluoreszenz resultiert. Bereits geringe Mengen des rekombinant hergestellten Hemmstoffes reichten aus, um den Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ suffizient zu hemmen.

Am Endpunkt der Messung betrug die uPA-Aktivität bei den eingesetzten PAI-1-Konzentrationen nur 5 % der Aktivität ohne Inhibitor (**Abbildung 22**).

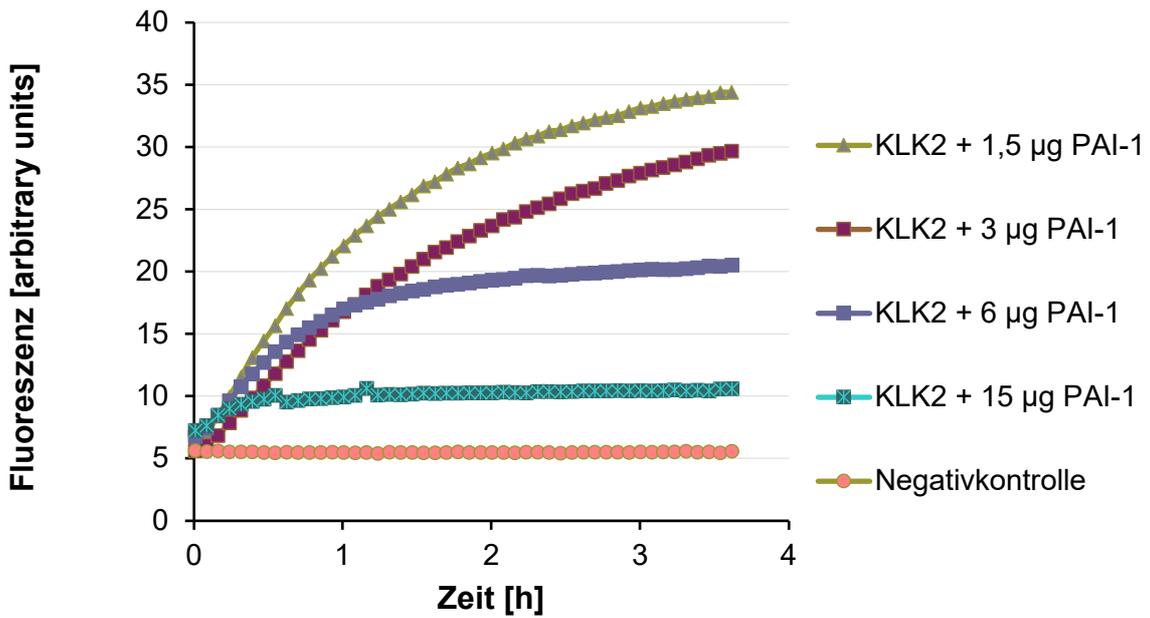


**Abbildung 22. Messung der inhibitorischen Kapazität von PAI-1 gegenüber uPA.** Das Diagramm zeigt die Endaktivität von uPA (~5 %) nach dreistündiger Inkubation mit uPA und dessen chromogenem Substrat I-1595.

Da das rekombinant hergestellte PAI-1 diese effiziente hemmende Wirkung gegenüber uPA zeigte, galt das weitere Interesse der Analyse der möglichen Wechselwirkung zwischen PAI-1 und ausgewählten Kallikrein-ähnlichen Peptidasen.

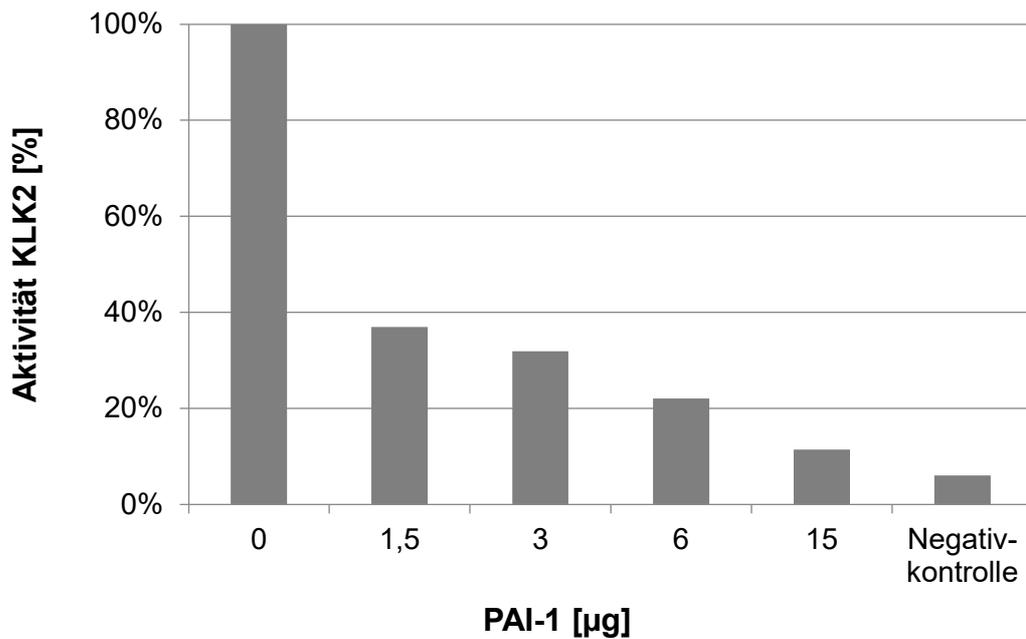
#### **3.4.1.2 Hemmversuche gegenüber KLK2**

Als synthetisches fluorogenes Substrat wurde für KLK2 I-1295 eingesetzt und in selber Weise wie unter 3.4.1.1 beschrieben vorgegangen. Die Aktivitätsmessung der Serinprotease KLK2 in Anwesenheit von PAI-1 ist in **Abbildung 23** dargestellt.



**Abbildung 23. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK2.** Eingesetzt wurden 1 µg KLK2 und steigende Mengen an PAI-1 (0 µg, 1,5 µg, 3 µg, 6 µg, 15 µg). Die Negativkontrolle enthielt lediglich Puffer und Substrat.

Der Graph zeigt, dass PAI-1 KLK2 konzentrationsabhängig am Umsatz des Substrates hemmen kann. Der Vergleich der Aktivität von KLK2 nach 3 h Inkubation ist in **Abbildung 24** dargestellt. Die Messungen zeigten, dass PAI-1 die Serinprotease KLK2 konzentrationsabhängig hemmt. 1,5 µg PAI-1 führten zu einer Minderung der Aktivität auf knapp 40 % der Ausgangsaktivität, 15 µg sind notwendig, um KLK2 vollständig in seiner Aktivität zu hemmen.

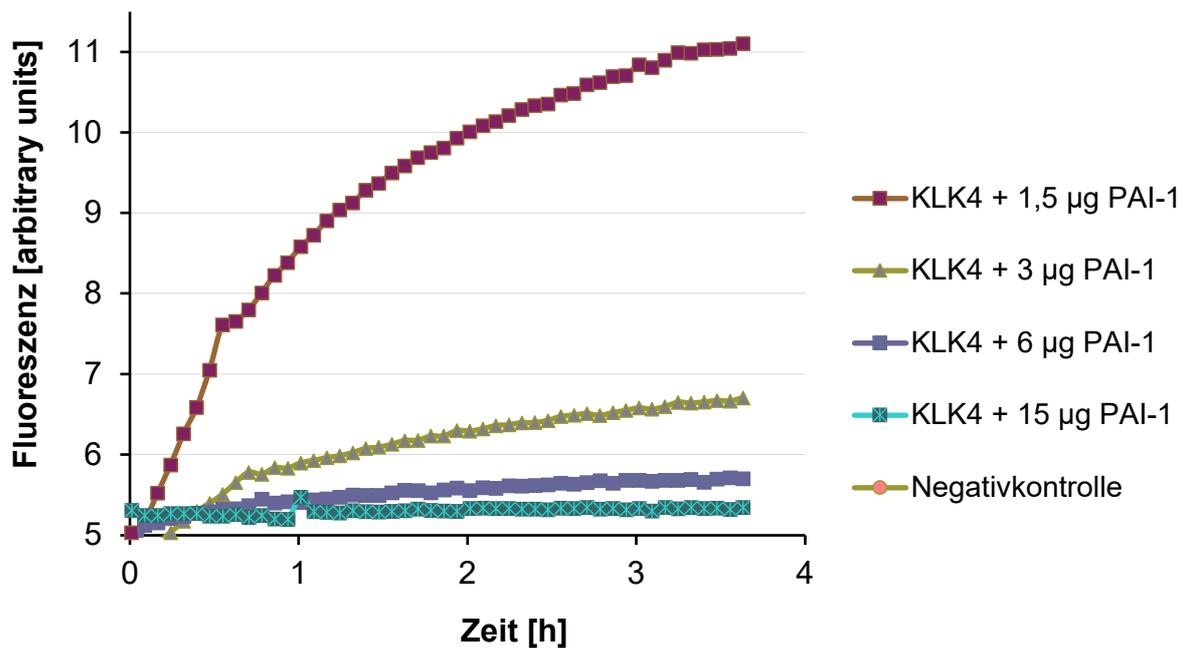


**Abbildung 24. Enzymatische Aktivität von KLK2 nach Reaktion mit PAI-1.** Aufgetragen ist die Aktivität von KLK2 in Prozent unter Zugabe steigender Mengen an PAI-1 (1,5 µg, 3 µg, 6 µg, 15 µg) nach 3 h Inkubation mit Substrat I-1595.

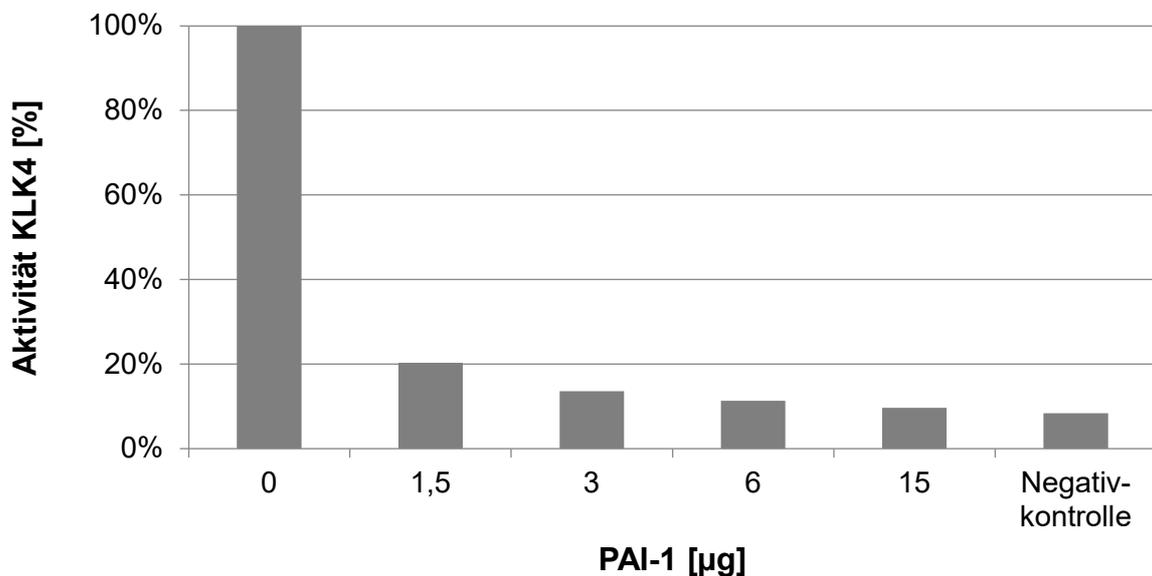
#### 3.4.1.2 Hemmversuche gegenüber KLK4

Auch gegenüber KLK4 hatte PAI-1 das Potential Kallikrein-ähnliche Peptidasen in ihrer Aktivität zu inhibieren. KLK4 konnte, wie in **Abbildung 25** dargestellt, in Gegenwart von PAI-1 unter den gewählten Bedingungen nahezu vollständig gehemmt werden.

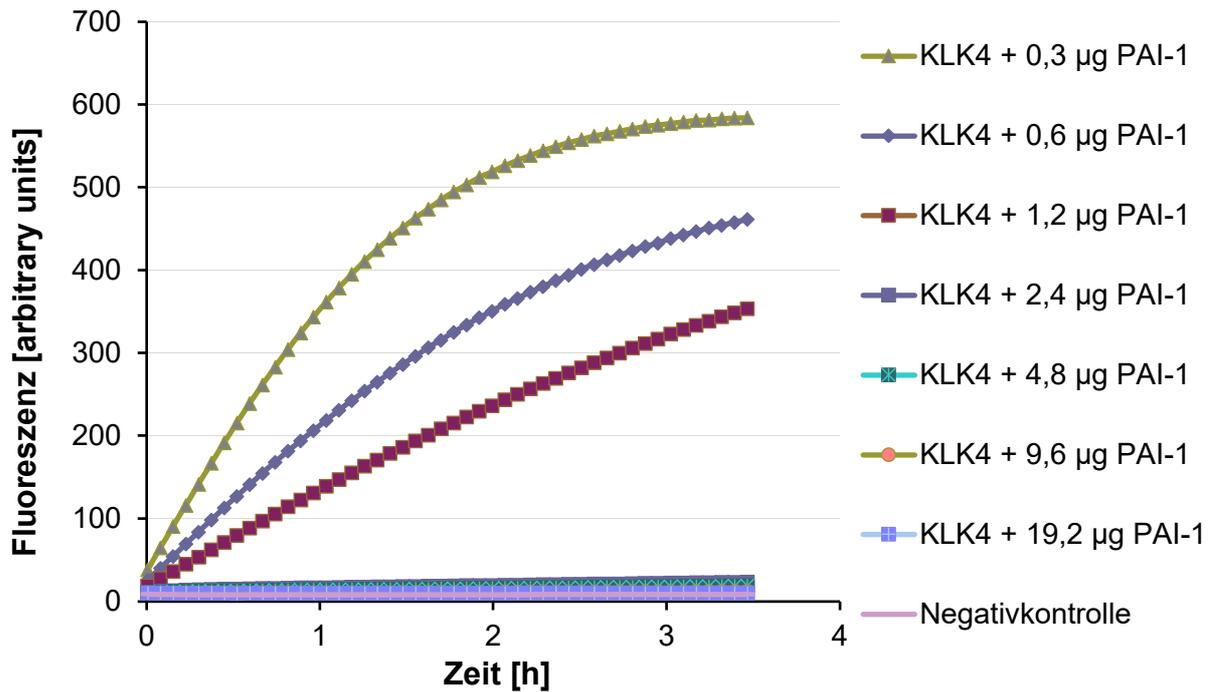
Unter Reaktion mit 1,5 µg PAI-1 zeigte KLK4 nach 3 h Inkubation noch 20 % seiner Ausgangaktivität (**Abbildung 26**). In dem in **Abbildung 27** gezeigten Versuch hemmten unter den gegebenen Bedingungen 0,3 µg PAI-1 KLK4 um 20 %, 0,6 µg PAI-1 um 40 % und 1,2 µg PAI-1 um 90 %. 2,4 µg PAI-1 bewirkten eine vollständige Hemmung von KLK4. Die prozentuale Aktivitätsabnahme von KLK4 unter Reaktion mit PAI-1 ist in **Abbildung 28** zusammengefasst.



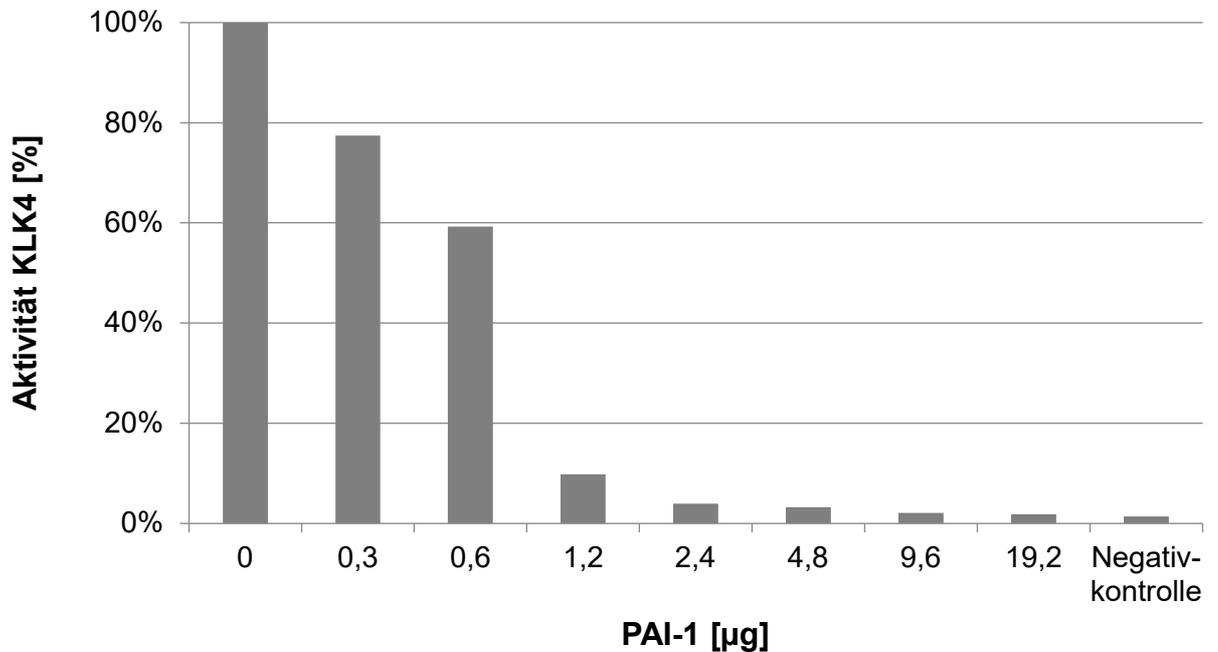
**Abbildung 25. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4.** Eingesetzt wurden 1,25 ng KLK4 und steigende Mengen an PAI-1 (0 µg, 1,5 µg, 3 µg, 6 µg, 15 µg). Die Negativkontrolle aus Puffer und Substrat.



**Abbildung 26. Minimale Aktivität von KLK4 nach Reaktion mit PAI-1.** Aktivität von KLK4 in Prozent unter Zugabe steigender Mengen an PAI-1 (1,5 µg, 3 µg, 6 µg, 15 µg) nach 3 h Inkubation mit Substrat I-1120. 1,5 µg PAI-1 hemmen KLK4 auf 20 % seiner Aktivität, 15 µg bewirken eine vollständige Hemmung.



**Abbildung 27. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4.** Ermittlung der minimalen Menge, die in der Lage ist, KLK4 ausreichend zu hemmen.



**Abbildung 28. Minimale Aktivität von KLK4 nach Reaktion mit PAI-1.** 2,4 µg waren ausreichend, um die Aktivität nahezu vollständig aufzuheben. Messung erfolgt nach 3h Inkubation.

### 3.4.2 Die inhibitorische Kapazität von PAI-2

Zur Messung der inhibitorischen Kapazität von PAI-2 gegenüber seinem natürlichen Substrat uPA, sowie den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen KLK2 und KLK4 wurde nach gleichem Versuchsprotokoll verfahren wie für PAI-1 (siehe 2.2.3 Messung der inhibitorischen Kapazität).

#### 3.4.2.1 Hemmversuche gegenüber uPA

Zur Bestätigung der inhibitorischen Aktivität des rekombinant hergestellten Serpins PAI-2 (Aufreinigung unter nativen Bedingungen) wurde wiederum ein Testversuch mit seiner hauptsächlichen Zielstruktur, uPA, durchgeführt.

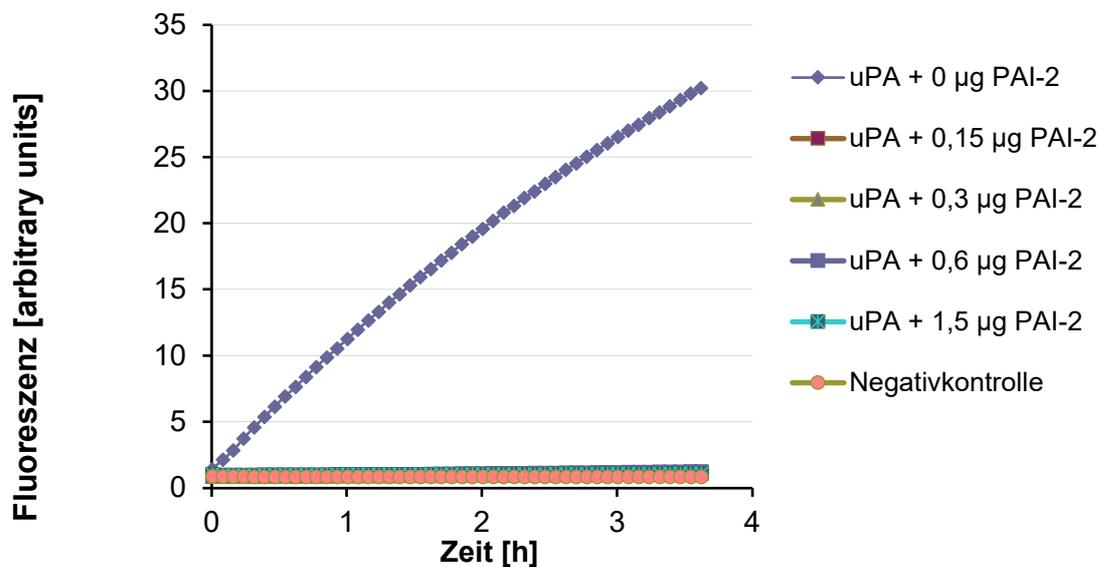


Abbildung 29. Zeitkinetik der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber uPA. Eingesetzt wurden 5 µg uPA und steigende Mengen an PAI-2 (0 µg, 0,15 µg, 0,3 µg, 0,6 µg, 1,5 µg).

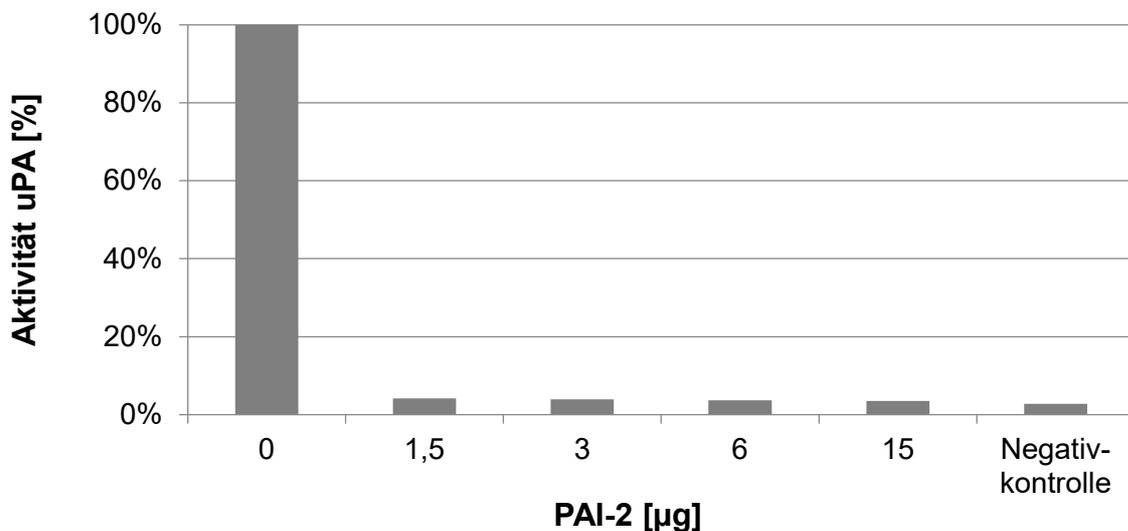
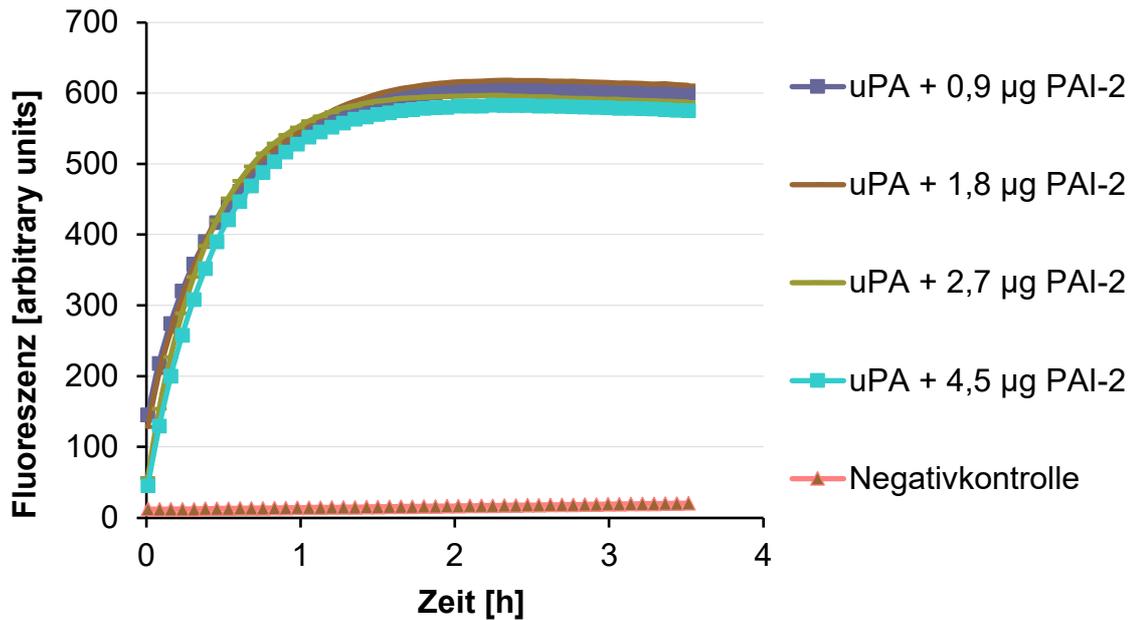


Abbildung 30. Maximale Hemmung der Aktivität von uPA durch PAI-2. 1,5 µg PAI-2 bewirken eine vollständige Hemmung von uPA.

**Abbildung 29 und Abbildung 30** zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen 1,5  $\mu\text{g}$  von unter nativen Bedingungen gereinigtem PAI-2 ausreichen, um uPA effektiv in seiner Aktivität zu hemmen.

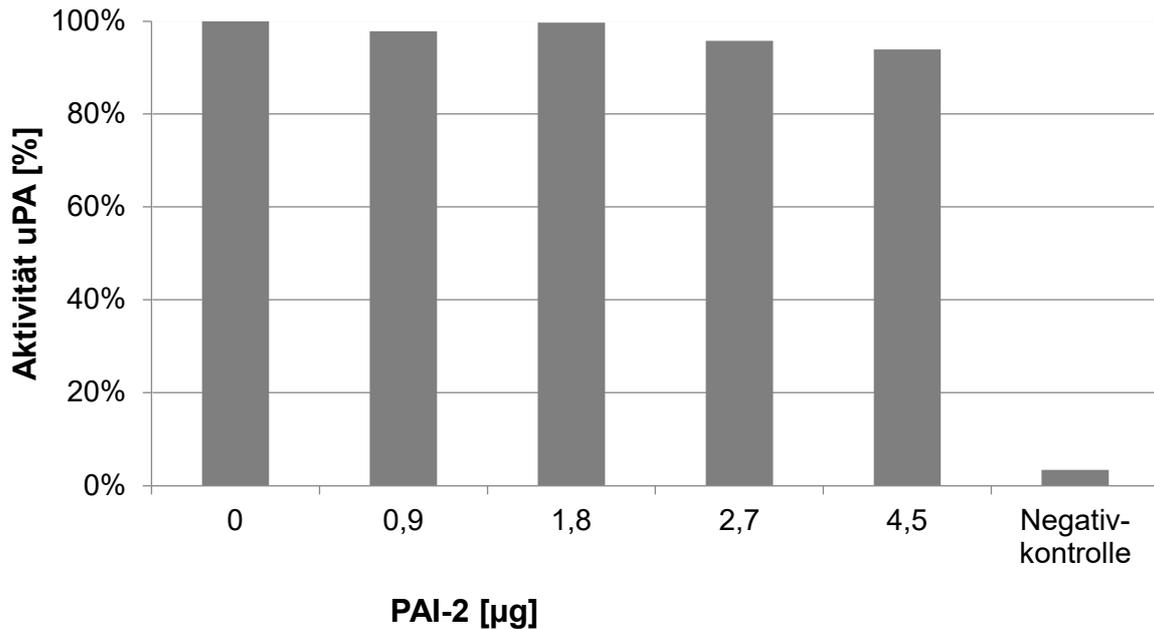
Unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes und rückgefaltetes PAI-2 verhielt sich anders. Es konnte keinerlei hemmende Wirkung auf sein natürliches Substrat ausüben.



**Abbildung 31. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (denaturierend gereinigt) gegenüber uPA.** Eingesetzt wurden 5  $\mu\text{g}$  uPA und steigende Mengen an PAI-2 (0  $\mu\text{g}$ , 0,9  $\mu\text{g}$ , 1,8  $\mu\text{g}$ , 2,7  $\mu\text{g}$ , 4,5  $\mu\text{g}$ ).

Durch Zugabe steigender Mengen an PAI-2 konnte keine Hemmung von uPA erreicht werden. uPA zeigte unter Zugabe von 0,9  $\mu\text{g}$ , 1,8  $\mu\text{g}$ , 2,7  $\mu\text{g}$  und 4,5  $\mu\text{g}$  PAI-2 weiterhin nahezu vollständige Aktivität (**Abbildung 31** und **Abbildung 32**).

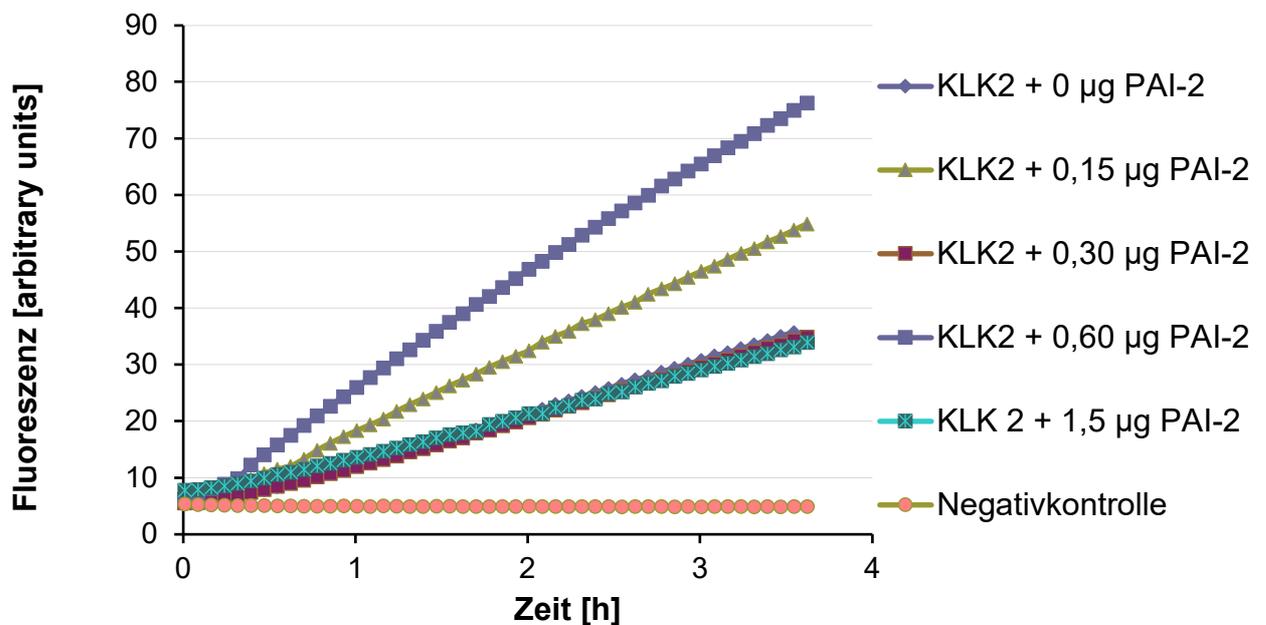
Aus diesem Grund wurde für die darauffolgenden Versuche, der Aktivitätstestung von PAI-2 gegenüber KLK2 und KLK4, mit PAI-2 gearbeitet, welches unter nativen Bedingungen gereinigt wurde.



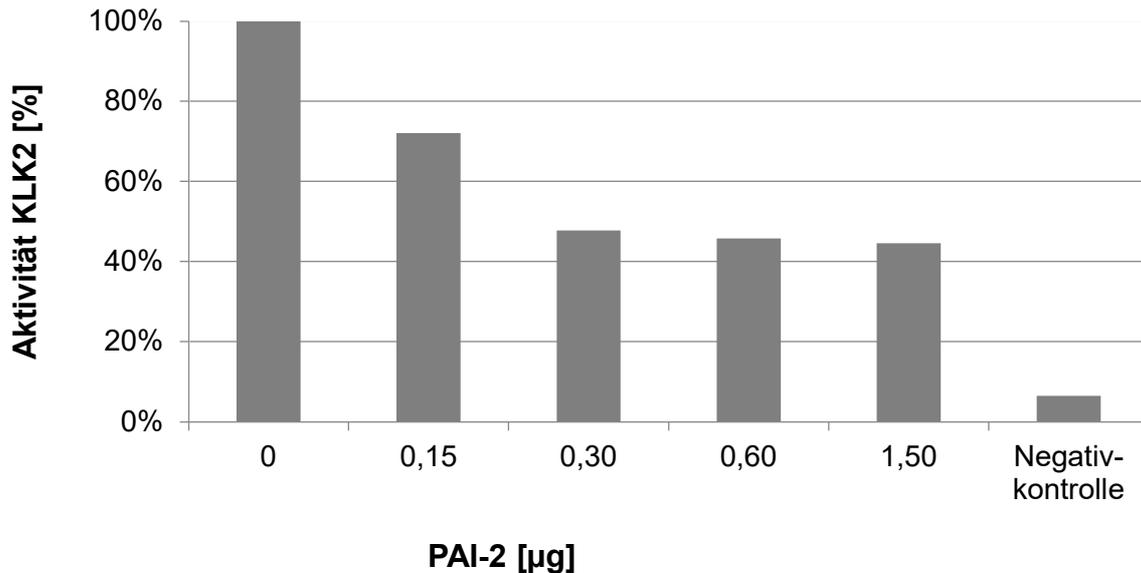
**Abbildung 32. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (denaturierend gereinigt) gegenüber uPA.** 0,5 µg uPA wurden mit steigenden Mengen PAI-2 (0 µg, 0,9 µg, 1,8 µg, 2,7 µg, 4,5 µg) versetzt. Die Messung erfolgte nach 3h Inkubation.

### 3.4.2.2 Hemmversuche gegenüber KLK2

**Abbildung 33** und **Abbildung 34** zeigen, dass PAI-2 KLK2 bis 50 % seiner Aktivität hemmen konnte. Auch durch Zugabe steigender Mengen an PAI-2 konnte keine Hemmung unter 50 % der Aktivität erreicht werden.



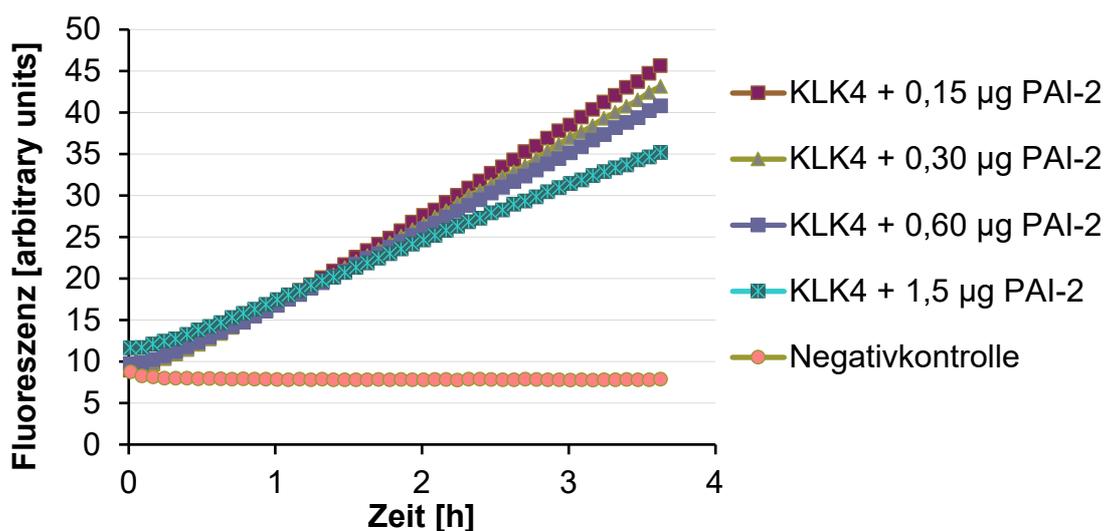
**Abbildung 33. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (unter nativen Bedingungen gereinigt) gegenüber KLK2.** 300 ng KLK2 wurden mit steigenden Mengen PAI-2 (0,15 µg, 0,30 µg, 0,60 µg, 1,5 µg) und 0,1 mM Substrat I-1295 versetzt. KLK2 behält auch unter Zugabe von 1,5 µg PAI-2 eine Restaktivität von 50 % bei.



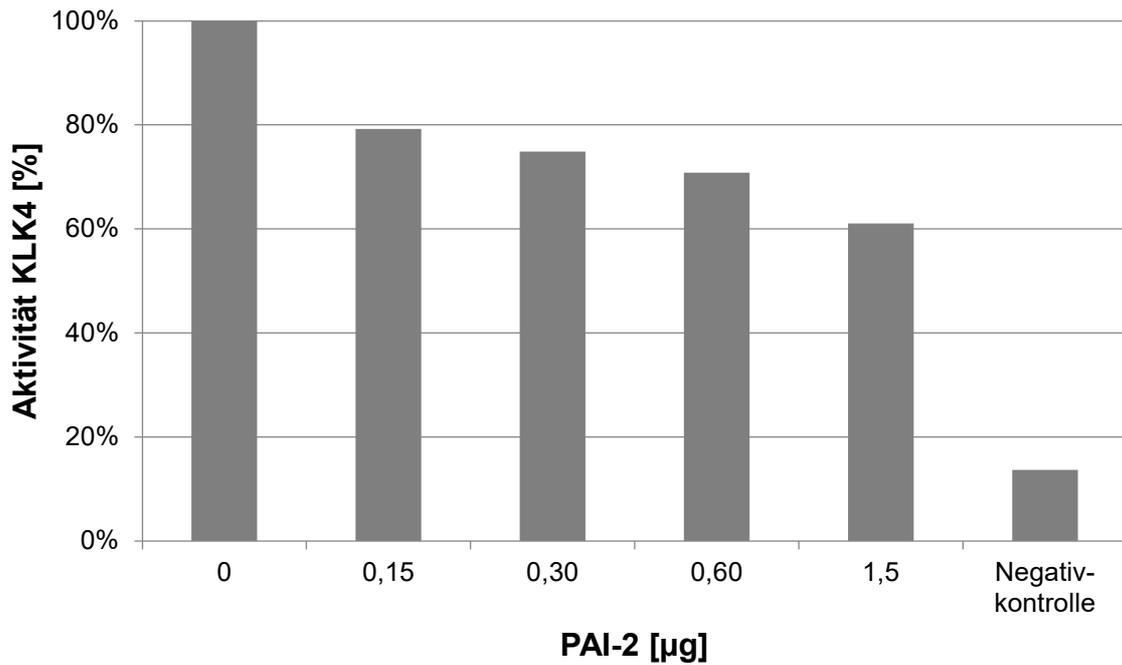
**Abbildung 34. Maximale inhibitorische Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK2.** 300 ng KLK2 wurden mit steigenden Mengen PAI-2 (0 µg, 0,15 µg, 0,3 µg, 0,6 µg und 1,5 µg) versetzt. Der Graph zeigt die minimale Aktivität von KLK2 nach dreistündiger Inkubation mit PAI-2 und Substrat I-1295.

### 3.4.2.3 Hemmversuche gegenüber KLK4

**Abbildung 35** zeigt die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 gegenüber KLK4. Die Inhibition verläuft zunächst konzentrationsabhängig (0,15 µg PAI-2 bis 1,5 µg PAI-2). Trotz Zugabe steigender Mengen an PAI-2 wurde diese jedoch nicht unter 60 % der Ausgangsaktivität gesenkt (**Abbildung 36**).



**Abbildung 35. Zeitabhängige Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4.** 2,5 ng KLK4 und 0,1 mM I-1120 wurden zu 0 µg, 0,15 µg, 0,30 µg, 0,60 µg und 1,5 µg PAI-2 pipettiert und die Fluoreszenz des chromogenen Substrates über 3 h gemessen.



**Abbildung 36. Maximale inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4.** 2,5 ng KLK4 wurden mit steigenden Mengen PAI-2 (0 µg, 1,5 µg, 0,3 µg, 0,6 µg und 1,5 µg) versetzt.

Alle beschriebenen Wechselwirkungen sind in **Tabelle 3** noch einmal zusammengefasst aufgeführt. PAI-1 zeigte sowohl gegenüber uPA, KLK2 und KLK4 gute inhibitorische Kapazität. Unter nativen Bedingungen gereinigtes PAI-2 zeigte gegenüber uPA gute Hemmeigenschaften, KLK2 und KLK4 hemmte es nur um 50 % in ihrer Aktivität. Unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes PAI-2 zeigte gegenüber uPA keine hemmenden Eigenschaften. Daher wurde es nicht zu weiteren Tests verwendet.

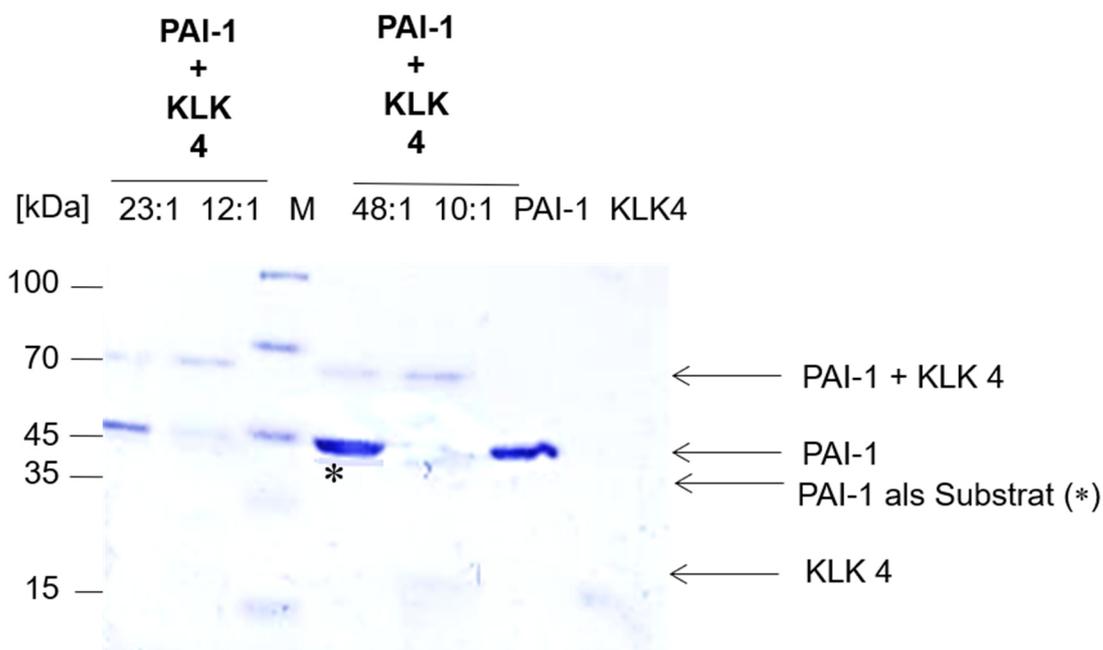
	uPA	KLK2	KLK4
<b>PAI-1</b>	+	+	+
<b>PAI-2 (nativ)</b>	+	(+) ~ 50%	(+) ~ 50%
<b>PAI-2 (denaturierend)</b>	-	Hemmeigenschaften gering, daher nicht weiter getestet	

**Tabelle 3. Zusammenfassung der inhibitorischen Kapazität der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2 gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 2 und 4.**

### 3.5 Visualisierung des kovalenten Komplexes aus PAI-1 und KLK4

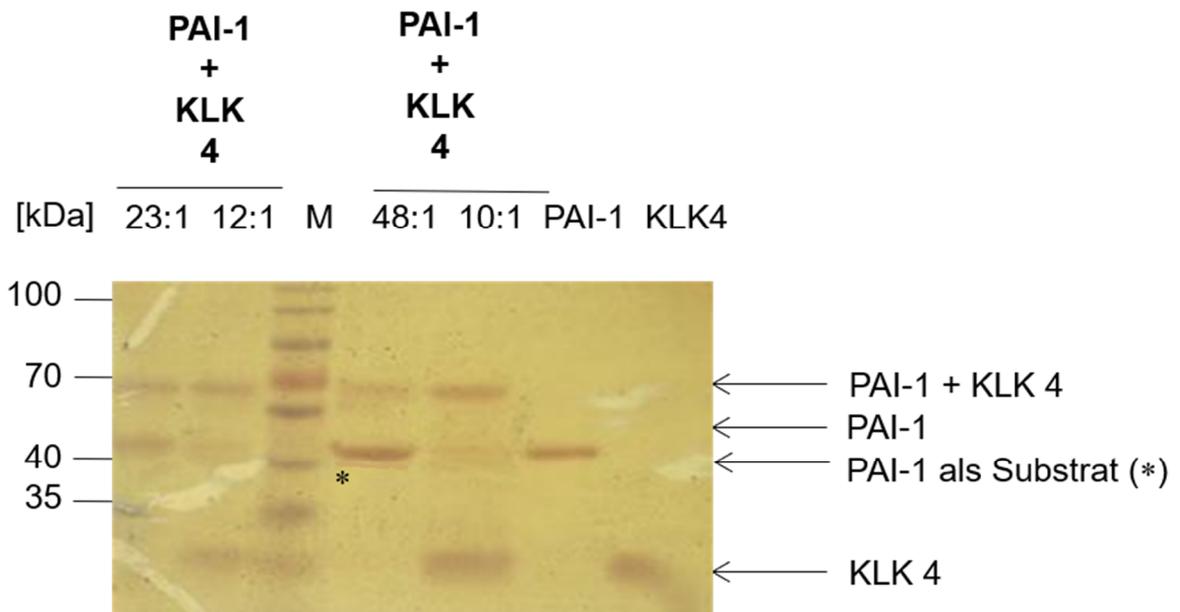
In den vorangegangenen Aktivitätstestungen konnte nachgewiesen werden, dass PAI-1 sowohl KLK2 als auch KLK4 inhibieren kann. Der Hemmmechanismus von Serpinen mit ihren Zielproteasen verläuft typischerweise unter Ausbildung eines kovalenten Komplexes zwischen Enzym und Inhibitor, welcher SDS- und hitzestabil ist und sich daher gelelektrophoretisch nachweisen lässt. In den vorangegangenen Versuchen wurde die kleinstmögliche Konzentration von PAI-1 und KLK4 bestimmt, die mittels Coomassie- bzw. Silberfärbung noch sichtbar gemacht werden kann. Ziel der folgenden Arbeitsschritte war es, den kovalenten Komplex mittels Coomassie-gefärbtem beziehungsweise Silber-gefärbtem PAA-Gel sowie Western Blot zu visualisieren und damit die Ergebnisse der Aktivitätstestungen zu bestätigen. Als exemplarisches Beispiel erfolgten die visuellen Nachweise des Komplexes aus PAI-1 und KLK4.

**Abbildung 37** zeigt das Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gel, auf das PAI-1 und KLK4 in verschiedenen Massen-Verhältnissen zueinander (10:1, 12:1, 23:1, 48:1) aufgetragen wurden. Unabhängig vom Verhältnis PAI-1:KLK4 konnte der Komplex aus PAI-1 (~48 kDa) und KLK4 (~27 kDa) als Summe der jeweiligen Molekulargewichte als Bande bei ~70 kDa nachgewiesen werden (**Abbildung 37**). Aufgrund der geringen Bandenintensität in der Coomassie-Färbung wurde ein SDS-PAGE-Gel mit identischem Versuchsansatz mit Silber angefärbt (**Abbildung 38**).



**Abbildung 37. Polyacrylamidgel der Komplexbildung von PAI-1 + KLK4.**

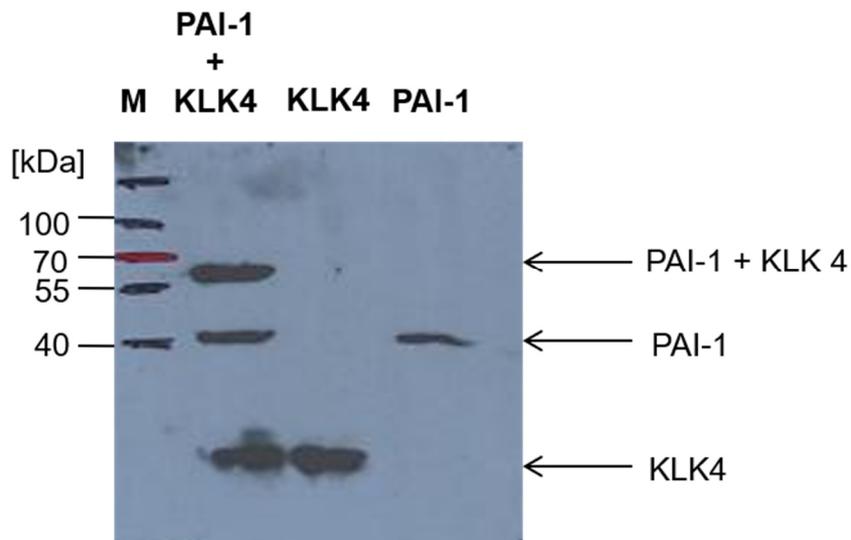
Polyacrylamidgel (Coomassie-Färbung). Links: PAI-1 und KLK4 im Verhältnis 23:1 und 12:1. M: Marker. Rechts: PAI-1 und KLK4 im Verhältnis 48:1 und 10:1. Bei Erhöhung des Verhältnisses PAI-1: KLK4 kommt es zur Ausbildung einer Doppelbande (\*).



**Abbildung 38. Silber-gefärbtes Gel der Komplexbildung aus PAI-1 und KLK4.** In den rechten Taschen sind jeweils PAI-1 und KLK4 einzeln aufgetragen. Die beiden linken Taschen zeigten PAI-1 und KLK4 im Verhältnis 23:1, bzw. 12:1 zueinander, die dritte Tasche den Marker, in der 4. und 5. Tasche wurde PAI-1 zu KLK4 im Verhältnis 48:1 bzw. 10:1 eingesetzt. Es können sowohl die Banden der einzelnen Reaktionspartner PAI-1 und KLK4 als auch des gebildeten Komplexes der beiden visuell nachgewiesen werden. Bei Erhöhung des Verhältnisses PAI-1: KLK4 kommt es zur Ausbildung einer Doppelbande (\*).

Trotz Inkubation von PAI-1 mit steigenden Mengen KLK4 konnte keine breitere Komplexbande erzeugt werden. Die KLK4-Bande nimmt an Intensität zu, wobei sich an der PAI-1-Bande die Ausbildung einer Doppelkontur beobachten lässt.

Als sensitivste Nachweismethode wurde schließlich noch eine Western Blot-Analyse durchgeführt (**Abbildung 39**). Hierbei wurde neben einem KLK4-Antikörper ein Antikörper gegen den His-Tag von PAI-1 verwendet.



**Abbildung 39. Western Blot der Komplexbildung aus PAI-1 und KLK4.** Links: Marker, 2. Tasche: PAI-1 und KLK4 im Verhältnis 10:1. Rechts KLK4 und PAI-1 als Referenz. KLK4-AK: Fa. Novus Biologicals rab 587 (1:500), PAI-1-AK: Fa. Qiagen, ID 34660 (1:1000).

In allen 3 Nachweismethoden konnten sowohl die einzelnen Reaktionspartner (PAI-1: ~48 kDa, KLK4: ~27 kDa) als auch eine neue MW-Bande bei 70 kDa nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass unter Reaktion von Serinprotease und Serinproteaseinhibitor ein 1:1-Komplex gebildet wird, entspricht diese Bande als Summe der Molekulargewichte der einzelnen Reaktionspartner, dem erwarteten Serinprotease-Serpin-Komplex.

## 4 Diskussion

Proteolytische Netzwerke wie das Plasminogenaktivator-System und das der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen spielen in vielen physiologischen Prozessen eine zentrale Rolle und bedürfen einer strikten Regulation. Abnorme oder fehlerhafte Regulation der Aktivität der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen kann zu pathologischen Prozessen und Ausbildung von Krankheitsbildern wie arterieller Hypertonie, Nierenfunktionsstörungen, Hauterkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Tumorerkrankungen führen, um nur einige klinisch relevante Beispiele zu nennen. Eine Vielzahl an Tumorerkrankungen ist mit einer abnormen KLK-Expression vergesellschaftet, was die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen zu attraktiven potenziellen Tumormarkern, Wegweisern in der Diagnosestellung und Prognoseabschätzung maligner Erkrankungen, sowie möglichen Therapiezielen macht (Sotiropoulou et al. 2009). Daher kommt der Erforschung der möglichen Regulationsmechanismen beider Systeme, sowie der Systeme untereinander und der Ableitung möglicher pharmakologischer Therapiestrategien eine große Bedeutung zu.

Die grundlegende Regulierung Kallikrein-ähnlicher Peptidasen beginnt bei der Steuerung der Genexpression. Einen weiteren Kontrollmechanismus stellt die Tatsache dar, dass Kallikrein-ähnliche Proteasen zunächst als inaktive Zymogene exprimiert werden. Auf dritter Ebene wird die Aktivität der Proteasen durch endogene Inhibitoren reguliert (Krowarsch et al. 2003). In einer Vielzahl an Studien der vergangenen Jahre konnten einige endogene Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen ausgemacht werden. Zudem werden zunehmend spezifische synthetische Inhibitoren der einzelnen KLKs entwickelt. Hierbei stellt die Tatsache, dass die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen ein großes, ineinander verwobenes katalytisches Netzwerk bildet, eine große Herausforderung in der Entwicklung von spezifischen Inhibitoren einzelner KLKs dar (Swedberg et al. 2009). Die endogenen Inhibitoren reichen von Metall-Ionen bis zu Proteinen unterschiedlicher molekularer Größe. Zu den Protein-Inhibitoren gehören  $\alpha_2$ -Makroglobulin, nicht-kanonische Inhibitoren, kanonische Inhibitoren und Serpine (Goettig et al. 2010; Krowarsch et al. 2003). Die Interaktion nicht-kanonischer und kanonischer Inhibitoren mit Kallikrein-ähnlichen Peptidasen ist bereits gut untersucht, wobei über die Hemmung durch Serpine bisher noch wenig bekannt ist. Bestens beforscht ist jedoch der hemmende Einfluss von Serpinen auf viele Proteasen von hoher tumorbiologischer Bedeutung, wie zum Beispiel uPA. PAI-1 und -2 sind die hauptsächlichen Inhibitoren von uPA. Kallikrein-ähnliche Peptidasen gehören wie uPA zu den trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob PAI-1 und -2 eventuell neben uPA auch andere Serinproteasen wie KLK2 und KLK4 hemmen können.

Zur Expression rekombinanter Proteine eignen sich Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugetierzellen. Für die Produktion der rekombinanten Proteine PAI-1 und PAI-2 wurde ein bakterielles *E. coli*-Expressionssystem genutzt. Die ektobe Genexpression in Prokaryonten ist eine schnelle und kostengünstige Methode PAI-1 und -2 in großer Menge zu synthetisieren (Arroyo De Prada et al. 2002). In Bezug auf die Proteinausbeute erwies sich in der vorliegenden Arbeit das *E. coli*-Expressionssystem sowohl für PAI-1 als auch für PAI-2 als geeignet: In beiden Fällen konnte eine gute Proteinausbeute erzielt werden. Dies entspricht den Ergebnissen aus zahlreichen vorherigen Studien zur Wahl des idealen Expressionssystems für PAI-1 und PAI-2 (Zhou et al. 1997). Die Art des Expressionssystems kann einen großen Einfluss auf die Qualität und Quantität der rekombinanten Proteine haben (Vallejo and Rinas 2004). Das *E. coli*-Genexpressionssystem birgt Nachteile und Probleme, die zur Synthese inaktiver Proteine bzw. Protasen und der Ausbildung von *inclusion bodies* führen können (Gellissen 2005; Vallejo and Rinas 2004). Die rekombinanten Proteine können zwar in großer Menge synthetisiert werden, zeigen jedoch in manchen Fällen keine inhibitorische Aktivität. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Prokaryonten fehlen beispielsweise geeignete Mechanismen zur posttranslationalen Modifikation. Die rekombinanten Proteine werden durch *E. coli* in nicht-glykosylierter Form exprimiert. Dies kann zu Beeinträchtigungen der Funktion der rekombinanten Proteine führen. Auf die inhibitorische Aktivität von PAI-1 und -2 hat die fehlende Glykosylierung jedoch keinen Einfluss, wie frühere Studien zeigen konnten (Arroyo De Prada et al. 2002; Lawrence et al. 1989). Neben prokaryotischen Expressionssystemen gibt es eukaryotische Genexpressionssysteme wie Hefen oder Säugetierzellen. In der Produktion rekombinanter Proteine durch Säugetierzellen finden diese posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung, statt. Studien haben gezeigt, dass PAI-1 nach Expression über eukaryotische Zelllinien größtenteils in latenter, inaktiver Form vorliegt. Für viele Proteine entspricht die native, aktive Form der energetisch günstigsten und somit stabilsten Form (Anfinsen 1973; Lee and Im 2003). Dies gilt allerdings nicht für PAI-1, welches in seiner nativen, aktiven Form, in der es das *RCL* exponiert, durch Fehlen von Disulfidbrücken metastabil (Vousden et al. 2019) ist. Obwohl die Familie der Serpine eine ähnliche gemeinsame Tertiärstruktur teilt (siehe 1.2 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) 1 und 2), ist die Konformationsinstabilität von PAI-1 unter den Serpinen einzigartig. Mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden (unter physiologischen Bedingungen bei 37° C) geht es durch Insertion des *RCL* als zusätzliches  $\beta$ -Faltblatt in die zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur in einen energetisch günstigeren, jedoch inaktiven, latenten Zustand über (Lee and Im 2003). Dieser Vorgang ähnelt dem der konstitutionellen Änderungen des Serpins bei Reaktion mit seiner Ziel-Protease. Die physiologische Funktion des Übergangs in die latente Form ist bisweilen noch nicht geklärt, mutmaßlich dient es dem Schutz vor überschießender anti-fibrinolytischer Aktivität von PAI-1 (Jensen et al. 2011; Stoop et al. 2001). Die spontane Konversion in die

inaktive Form kann in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von PAI-1 eine Herausforderung darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Inhibitionstests die inhibitorische Aktivität von PAI-1 gegenüber uPA, KLK2 und KLK4 sowohl sofort nach Zugabe als auch nach vorheriger 3-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Die Vorinkubation für 3 Stunden hatte keinen Einfluss auf die inhibitorische Kapazität von PAI-1 (Daten nicht gezeigt). 1995 wurde im Rahmen von Mutationsanalysen eine PAI-1 Quadrupel-Mutante beschrieben, welche bei 37°C 70-fach langsamer in den latenten Zustand konvertiert, als WT-PAI-1 (Berkenpas et al. 1995). Zudem zeigte die Mutante eine deutlich höhere thermodynamische Stabilität. Die inhibitorische Aktivität gegenüber tPA zeigte sich jedoch deutlich herabgesetzt (Sharp et al. 1999), was die Mutante zu weiteren Inhibitionstests unattraktiv macht. Kristallstrukturanalysen der Mutante konnten zeigen, dass die erschwerte Insertion des *RCL* für die herabgesetzte inhibitorische Aktivität ursächlich ist (Sharp et al. 1999). Die Erkenntnis, dass die Stabilität von PAI-1 durch Mutagenese positiv beeinflusst werden kann, wurde dann für die gezielte Herstellung weiterer Mutanten genutzt. So zeigten beispielsweise Stoop et al (2001), dass die Mutation von insgesamt 11 Aminosäuren die Halbwertszeit von PAI-1 um das 245-fache verlängern kann, ohne die inhibitorische Aktivität gegenüber tPA zu beeinflussen (Stoop et al. 2001). So könnte in weiterführenden Studien die Verwendung von stabilisierten Mutanten von PAI-1 eine Lösung sein, um den erschwerenden Faktor des Übergangs in den latenten Zustand zeitlich hinauszuzögern.

Andere Serpine konvertieren nur unter denaturierenden, nicht unter physiologischen Bedingungen in ihre latente Form (Lee and Im 2003). Durch Denaturierung und Rückfaltung können Serpine andererseits zumindest teilweise aus ihrem latenten Zustand in die aktive Form rückgeführt werden. Nicht selten führt die Denaturierung von Serpinen zu unlöslichen, biologisch inaktiven Einschlusskörperchen, den sogenannten *inclusion bodies*. In der vorliegenden Arbeit gelang es mit den gewählten Methoden nicht, oder nur zu einem geringen Teil, PAI-2, welches denaturierend gereinigt wurde, in seine aktive Form rückzufalten. Durch *E. coli* konnte eine gute Proteinausbeute erzielt und durch chromatographische Reinigung unter denaturierenden Bedingungen nahezu reines PAI-2 gewonnen werden. Nach dem Versuch der Rückfaltung zeigte es sich seinem physiologischen Substrat uPA gegenüber jedoch inhibitorisch inaktiv. Die mögliche Hemmwirkung gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen konnte daher nicht untersucht werden.

Für PAI-2 wurde die Ausbildung von *inclusion bodies* in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Zhang et al. 1998; Zhou et al. 1997). Neben den offensichtlichen Nachteilen birgt die Bildung von *inclusion bodies* auch potenzielle Vorteile. So enthalten die Einschlusskörperchen häufig ausschließlich rekombinantes Protein, da nur Moleküle gleicher oder nah verwandter Proteine zu *inclusion bodies* aggregieren und diese Aggregate wiederum als Trigger für die Anlagerung weiterer Moleküle gleicher oder nah verwandter Natur fungieren

(Singh et al. 2015). Dies kann die nachfolgende Proteinreinigung erleichtern und beschleunigen. Der aggregierte Zustand bietet zudem einen gewissen Schutz vor proteolytischem Abbau (Vallejo and Rinas 2004). Lee und Im konnten 2003 zeigen, dass durch Verlängerung der Inkubationszeit PAI-1 überexprimierender *E. coli*-Zellen, sowohl die Menge an exprimiertem PAI-1, als auch die Menge von PAI-1 in *inclusion bodies* stieg (Lee and Im 2003). Durch verschiedene Maßnahmen lässt sich das Risiko der Ausbildung von *inclusion bodies* senken: Erniedrigung der Inkubationstemperatur, Expression des rekombinanten Proteins mit einem Fusionsprotein, das die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöht, Expression des Proteins ins Periplasma und Koexpression von Faltungshelferproteinen (*Chaperone*) (Strandberg and Enfors 1991). Kommt es dennoch zur Ausbildung von *inclusion bodies*, gibt es in der aktuellen Literatur zahlreiche Herangehensweisen diese wieder in Lösung zu bringen und zu aktiven Proteinen rückzufalten (Singh et al. 2015). Im und Yu veröffentlichten im Jahr 2000 eine Arbeit, in der sie inaktives PAI-1 aus *inclusion bodies* in die aktive Form rückführten. In früheren Studien wurden ähnliche Protokolle zur Rückfaltung inaktiver rekombinanter Serpine, wie  $\alpha_1$ -Antitrypsin und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, aus *inclusion bodies* vorgestellt (Im and Yu 2000; Kwon et al. 1995). Die Wiederherstellung aktiver, löslicher rekombinanter Proteine ist aufwendig. Zunächst werden die *inclusion bodies* nach Zellaufschluss durch Zentrifugation aus der Wirtszelle isoliert. Durch denaturierende Agenzien werden die wasserunlöslichen Aggregate dann in Lösung gebracht, durch Dialyse renaturiert und schließlich gereinigt (Singh et al. 2015). Lange Zeit gelang die Renaturierung nur unzufriedenstellend. Erst mit dem Verständnis der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der in *inclusion bodies* aggregierten Proteine gelang deren Denaturierung, Rückfaltung und Reinigung (Singh et al. 2015). So zeigten Studien, dass die Formation von *inclusion bodies* keinesfalls ein statischer, sondern vielmehr ein dynamischer Prozess ist. Die *inclusion bodies* können reversibel zerfallen und spontan in ihre native Form zurückfalten. Letztlich handelt es sich um einen stetigen Auf- und Abbau der Einschlusskörperchen, wobei sich ein dynamisches Gleichgewicht aus aggregierten und in Lösung befindlichen Protein-Molekülen einstellt, die sowohl in ungefalteter, partiell gefalteter oder sogar nativer Form vorliegen können. Aggressive Denaturierung durch chaotrope Substanzen kann eine Zerstörung der Sekundärstruktur der in nativer Form vorliegenden Proteine und deren neuerliche Aggregation im Zuge der Rückfaltung zur Folge haben. Daher müssen die unterschiedlichen Proteinzustände in den weiteren Schritten der Proteinreinigung aus *inclusion bodies* berücksichtigt werden. Es wird empfohlen unter nicht-denaturierenden Bedingungen zu arbeiten, um so die Tertiärstruktur der in nativer Form vorliegenden Proteine zu erhalten und auf eine Rückfaltung verzichten zu können. Die in partiell gefalteter Form vorliegenden Proteine können durch milde Lösungsmittel in partiell gefaltetem Zustand gehalten werden, sodass zur Rückfaltung keine vollständige Denaturierung nötig wird und

damit die Gefahr der Aggregation während der Rückfaltung minimiert wird (Peternel and Komel 2010). Auch die Methode des Zellaufschlusses scheint einen Einfluss auf die Isolation von *inclusion bodies* aus *E.coli*-Zellen zu haben, hierbei sind chemische Methoden mechanischen Methoden überlegen (Wang 2009). Des Weiteren wird empfohlen *inclusion bodies* nach der Isolation aus der Wirtszelle von Verunreinigungen wie RNA-Resten und Proteinen der Wirtszelle zu reinigen, um so die Störungsrate durch Verunreinigungen während der Rückfaltung gering zu halten (Singh et al. 2015).

Die Rückfaltung der aus den *inclusion bodies* wieder in Lösung gebrachten Proteinen wird klassischer Weise durch Dilution und Dialyse des Proteins in einem Rückfaltungspuffer durchgeführt. Diese Methode erzielt, der Aggregation der Proteine im Rahmen der Rückfaltung geschuldet, jedoch meist nur eine geringe Ausbeute an aktivem Protein. Daher wird der Erarbeitung alternativer Rückfaltungsmethoden in den letzten Jahren erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt (Lanckriet and Middelberg 2004; Machold et al. 2005; Patra et al. 2000). Eine Möglichkeit stellt das sogenannte *on column refolding* dar. Verschiedene Chromatographie-Methoden (Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie) kommen hierbei zur Anwendung und bieten je nach Verfahren spezifische Vorteile (Singh et al. 2015). Durch Größenausschluss-Chromatographie kann das Gesamtprotein der *inclusion bodies* nach gefaltetem, fehlgefaltetem und aggregiertem Zustand getrennt werden. Durch die Immobilisation der Proteine auf dem Trägermaterial der Säule lassen sich Wechselwirkungen untereinander und somit neuerliche Aggregationen vermeiden. Des Weiteren kann die Rückfaltung mit Reinigungsschritten kombiniert werden, wodurch die Anzahl der Gesamtarbeitsschritte reduziert werden kann. Eine weitere neue Möglichkeit besteht in der Rückfaltung durch die Verwendung mikrofluidischer Chips, die sich insbesondere bei der problembehafteten Rückfaltung schwer faltbarer Proteine bewährt hat. Bei diesem Verfahren kann die Konzentration des Denaturierungsmittels durch verwirbelungsfreie Strömung durch die Mikrokanäle eines Mikrochips feingesteuert werden, wodurch das Auftreten von Aggregationen und fehlgefalteten Proteinen minimiert, der Faltungsprozess optimiert werden kann (Yamaguchi et al. 2010).

Eine weitere Ursache für die fehlende inhibitorische Aktivität von PAI-2 nach Expression via *E. coli* und denaturierender Reinigung ist denkbar. Bei der Rückfaltung eines denaturierten Proteins in seine native Form bildet sich immer die energetisch günstigste Konformation aus. Entspricht die energetisch günstigste Form jedoch nicht der aktiven Form, so bleibt das renaturierte Protein trotz korrekter Rückfaltung inhibitorisch inaktiv. Während der Proteinbiosynthese unter physiologischen Bedingungen kann die Proteinfaltung noch während der Biosynthese beginnen. Unter Umständen wird so also die energetisch günstigste Form unter physiologischen Bedingungen nicht erzielt, weil der N-Terminus bereits gefaltet wird,

während er C-Terminus noch nicht produziert ist. Die native und somit inhibitorisch aktive Form entspricht also nicht immer der energetisch günstigsten.

Einen wichtigen Beitrag zur korrekten Proteinfaltung leisten die Faltungshelferproteine (*Chaperone*). Diese treten mit aggregationsanfälligen Proteinen in Wechselwirkung und katalysieren die korrekte Faltung des Proteins, ohne Teil der Proteinstruktur zu werden. Studien haben gezeigt, dass bei fehlenden *Chaperonen* im Zytosol die Aggregation rekombinanter Proteine zu *inclusion bodies* steigt (Singh et al. 2015). So wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Strategien erarbeitet, die sich die Vorteile der Proteinfaltungskatalysatoren zu Nutze machen. Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass der Einsatz von *Chaperonen* im Rückfaltungsprozess rekombinanter Proteine zu einer höheren Erfolgsrate führen (Altamirano et al. 1997; Dong et al. 2000). Zur Proteinrückgewinnung und -rückfaltung aus *inclusion bodies* gibt es kein universales Rezept. Die ideale Methode muss für jedes Protein individuell erarbeitet werden. In der ektopen Genexpression von PAI-2 durch *E. coli* ist die Bildung von *inclusion bodies* beschrieben. In der vorliegenden Arbeit gelang allerdings die Rückfaltung des Proteins durch die beschriebenen konventionellen Methoden nicht.

Mit der Aufreinigung von PAI-2 unter nativen Bedingungen verhielt es sich anders als unter denaturierenden Bedingungen. Es konnte nur eine geringe Proteinausbeute erzielt werden. Die Reinigung der *His-tagged* Serpine erfolgt mittels Affinitätschromatographie. *His-Tags* können N- und C-terminal an rekombinante Proteine fusioniert werden. Eine Erklärung für die niedrigere Proteinausbeute bei Reinigung von PAI-2 unter nativen Bedingungen kann eine möglicherweise schlechte Zugänglichkeit des N-Terminus, der den *His-Tag* trägt, sein. Durch Konformationsänderungen des Proteins kann es dazu kommen, dass der *Tag* so in die Tertiärstruktur des Proteins eingebettet wird, dass dieser nicht mehr zur Bindung an die Nickel-Ionen der Chromatographiesäule zugänglich ist. Ein weiterer Faktor, der die Bindungsaffinität des *His-Tags* an die Metallionen der Chromatographie-Säule beeinflussen kann, ist die Puffer-Zusammensetzung. Hierbei spielen die Imidazol-Konzentration und der pH-Wert die größte Rolle. Eine zu hohe Imidazol-Konzentration in den Puffern, die vor der Elution verwendet werden, kann durch die Konkurrenz des Imidazols um die Metallionen-Bindungsstellen zur mangelnden Bindung des *his-tagged* Proteins an die  $Zi^{2+}$ -Ionen der Säule führen. In der vorliegenden Arbeit wurde Äquilibrierungspuffer ohne Imidazol und Waschpuffer mit 20mM Imidazol verwendet. Je nach zu reinigendem Protein kann die optimale Imidazol-Konzentration variieren, so könnten in weiterführenden Untersuchungen mit PAI-2 Versuchsreihen mit niedrigeren Imidazol-Konzentrationen ausgetestet werden. Ein zu niedriger pH-Wert kann, durch Protonierung der Histidin-Seitenkette, die Bindungsfähigkeit des *His-Tags* an die Metallionen der Chromatographiesäule ebenso negativ beeinflussen (Bornhorst and Falke 2000). Dabei gilt es zu beachten, dass Imidazol den pH-Wert des Puffers ebenso senken kann,

es empfiehlt sich eine Kontrolle und gegebenenfalls Neueinstellung des pHs nach Imidazol-Zugabe.

Insgesamt scheint die Theorie des verborgenen *His-Tags* als Ursache für die mangelnde Bindung des *his-tagged* Proteins an die Chromatographiesäule die Wahrscheinlichste zu sein. Diese wird dadurch gestützt, dass die denaturierende Reinigung, bei der die Quartär- und Tertiärstruktur durch die denaturierenden Substanzen aufgebrochen wird und somit der *His-Tag* frei zugänglich sein muss, problemlos funktionierte. Um auf die Vorteile der Reinigung unter nativen Bedingungen nicht verzichten zu müssen, kann alternativ eine Linker-Sequenz zwischen *His-Tag* und Fusionsprotein geschaltet werden, um so den Abstand des *Tags* zum Protein zu vergrößern und somit die potentielle Gefahr der Einbettung des *Tags* in die Tertiärstruktur des Proteins zu reduzieren (Chen et al. 2013).

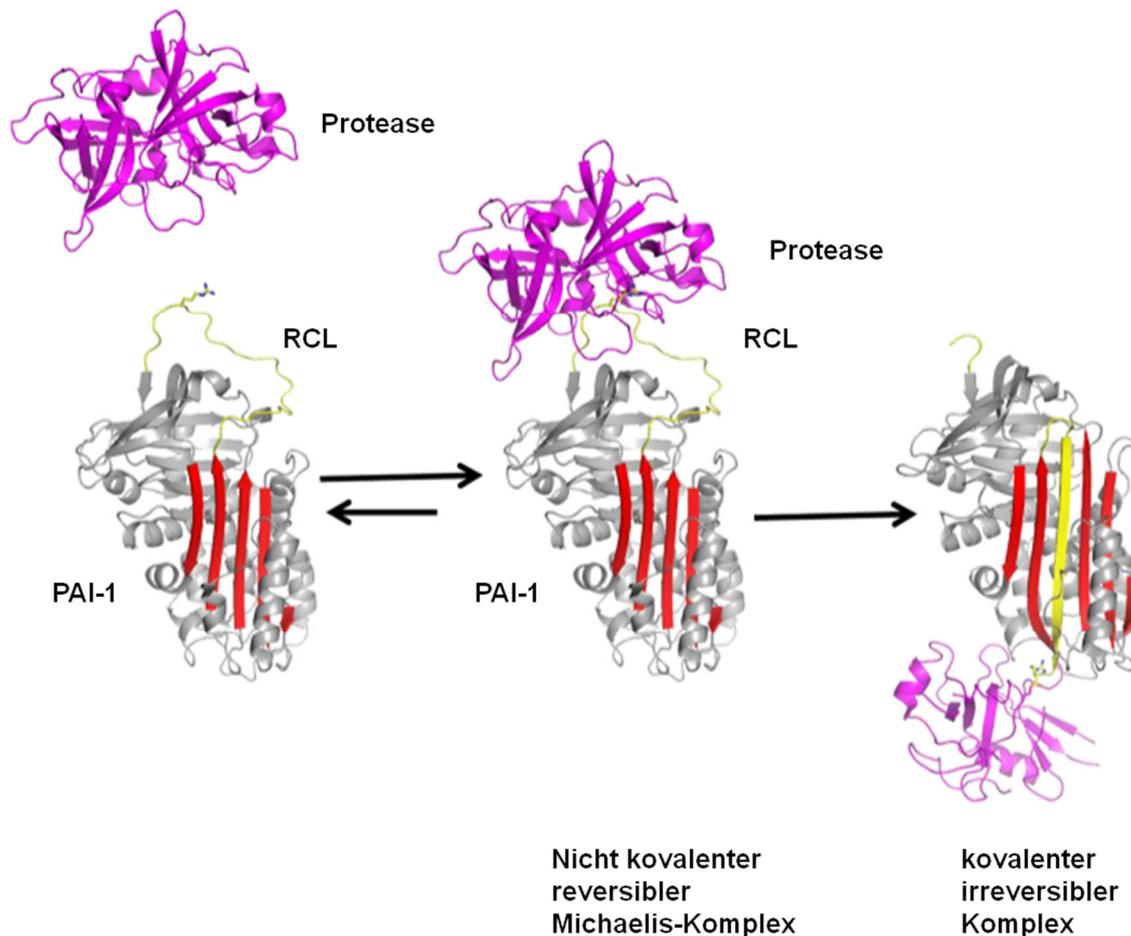
Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass *His-Tags* aufgrund ihrer vergleichsweise kleinen Größe (~2,5 kDa) und ihrer räumlichen Entfernung zum aktiven Zentrums der Protease, weder einen Einfluss auf die Struktur noch die Funktion des Proteins haben, an welches sie angeheftet werden (Aslantas and Surmeli 2019; Booth et al. 2018). Diese Annahme wurde aber durch mehrere Studien widerlegt. So zeigten Aslantas et al. (2019), dass die Wahl des Terminus, an welches das *His-Tag* geheftet wird, einen Einfluss sowohl auf die Struktur, das aktive Zentrum und somit auch die Funktion von CYP119 hat. CYP119 ist ein Mitglied der Cytochrom-P450-Familie. CYP119, welches am N-Terminus mit einem *His-Tag* versehen wurde (N-His-CYP119), zeigte sowohl eine höhere Stabilität als auch eine höhere enzymatische Aktivität im Vergleich zu C-His-CYP119. Durch den Einfluss auf die Proteinstruktur wird auch die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Eine Studie von Woestenenk et al. (2004) zeigte, dass durch die Anheftung von Histidin-Resten die Löslichkeit von insgesamt 20 humanen Proteinen negativ beeinflusst wurde, wobei die Positionierung am N-Terminus einen geringeren negativen Effekt zur Folge hatte als am C-Terminus (Woestenenk et al. 2004).

Einige *in vitro* und *in vivo* Studien konnten bisher zeigen, dass exogenes PAI-2 zielgerichtet gegen uPA eingesetzt werden kann (Cochran et al. 2009). In diesen Studien wurde PAI-2 ebenso mittels eines *E. coli*-Expressionssystems produziert und anschließend sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen gereinigt und bezüglich der Aktivität miteinander verglichen. Auch hier wird empfohlen die Reinigung unter nativen Bedingungen mittels *His-Tag*-Affinitätschromatographie durchzuführen und von Denaturierung und Rückfaltung abzusehen, um Funktionsverluste der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren zu vermeiden (Cochran et al. 2009). Von Ionenaustauschchromatographie beispielsweise wird aufgrund der Notwendigkeit starker pH-Absenkung abgeraten. Für *His-getaggt*es PAI-2 konnte gezeigt werden, dass der Polyhistidinrest keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität

gegenüber PAI-2 hat (Cochran et al. 2009). Was jedoch als Problem beschrieben wurde ist, dass rekombinantes Wildtyp-PAI-2 zwischen den  $\alpha$ -Helices C und D eine intrahelikale Schleife, den sogenannten *CD-loop*, aufweist. Diese Schleife ist in *E. coli*-Expressionssystemen leicht zur Spaltung zugänglich, weswegen es zur Bildung von zwei PAI-2 Fragmenten kommen kann. Diese bewahren zwar ihre inhibitorische Aktivität, allerdings bedürfen sie zusätzlichen Reinigungsschritten (Cochran et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass PAI-2 ohne *CD-loop* (*PAI-2  $\Delta$ CD-loop*) weniger problembehaftet gereinigt werden kann und trotzdem volle inhibitorische Aktivität gegenüber uPA aufweist (Cochran et al. 2009). Abgesehen davon, dass der *PAI-2  $\Delta$ CD-loop*, welcher 23 Aminosäuren kürzer ist als WT-PAI-2, leichter zu exprimieren und zu reinigen ist, könnte es auch pharmakokinetisch günstiger als WT-PAI-2 sein, da die Proteinaufnahme durch Tumoren mit sinkender Proteingröße steigt (Cochran et al. 2009). Ansätze für weiterführende Studien könnten also die Optimierung des Reinigungsprotokolls von WT-PAI-2 auf der einen Seite, oder der Versuch des Einsatzes von *PAI-2  $\Delta$ CD-loop* sein.

Die Regulation Kallikrein-ähnlicher Peptidasen durch endogene Inhibitoren, wie Metallionen und Protein-Inhibitoren vom kanonischen und nicht-kanonischen Typ wurde in den vergangenen Jahren bereits gut untersucht. Über den Einfluss von Serpinen auf die Aktivität Kallikrein-ähnlicher Peptidasen ist weitaus weniger bekannt. In dieser Arbeit wurde die inhibitorische Wirkung von PAI-1 und PAI-2 an seinem physiologischen Substrat uPA, sowie den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 2 und 4 untersucht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch Serpine an der Inhibierung von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen beteiligt sein können. Im Falle von PAI-1 zeigte sich eine lineare Hemmkurve gegenüber uPA, KLK2 und KLK4. Die inhibitorische Kapazität blieb wie erwartet nach Denaturierung und Rückfaltung erhalten. Serpine sind sogenannte Suizid-Inhibitoren (Oley 2006). Sie präsentieren dem zu hemmenden Enzym eine Schleife, das sogenannte *reactive center loop (RCL)*, welche die Proteolyse-Region von Serinproteasen imitiert, als Pseudo-Substrat. Die Aminosäuresequenz des Pseudosubstrates bestimmt die Proteasespezifität. Die Spaltung des *reactive center loop* des Serpins durch die Protease hat gravierende Konformationsänderungen im Enzym zufolge, was zu einer Deformation und damit Inaktivierung des Enzyms führt (Oley 2006). Es kommt zunächst zu Ausbildung eines nicht kovalenten, reversiblen Michaelis-Komplexes. Durch proteolytischen Angriff des Enzyms auf das *RCL* des Serpins dann zur Ausbildung eines intermediären Acyl-Enzym-Komplexes, dessen Hydrolyse sehr langsam vonstattengeht und das Enzym somit in seinem inaktiven Zustand in einem stabilen 1:1-Komplex mit dem Inhibitor gefangen bleibt (Andreasen et al. 1997; Lindahl et al. 1990). Durch Einlagerung des *RCL* in das  $\beta$ -Faltblatt wird das katalytische Zentrum der Protease irreversibel deformiert (Vousden et al. 2019). Durch den so gebildeten stabilen Komplex wird sowohl die Zielprotease in ihrer Aktivität gehemmt als auch das Serpin inaktiviert. Serpin/Serinprotease-Komplexe sind SDS-

und hitzestabil (Arroyo De Prada et al. 2002) und können mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Oley 2006). Der Inhibitionsmechanismus von PAI-1 ist in **Abbildung 40** dargestellt.



**Abbildung 40. Inhibitionsmechanismus von PAI-1.** PAI-1 (grau) präsentiert der Protease (magenta) das *reactive center loop* (RCL). Im ersten Schritt kommt es zur Ausbildung eines nicht kovalenten, reversiblen Michaelis-Komplexes. Durch Einlagerung des RCL in das  $\beta$ -Faltblatt (rot) wird die komplexierte Protease zum entgegengesetzten Pol von PAI-1 katapultiert. Modifiziert aus Vousden et al. 2019.

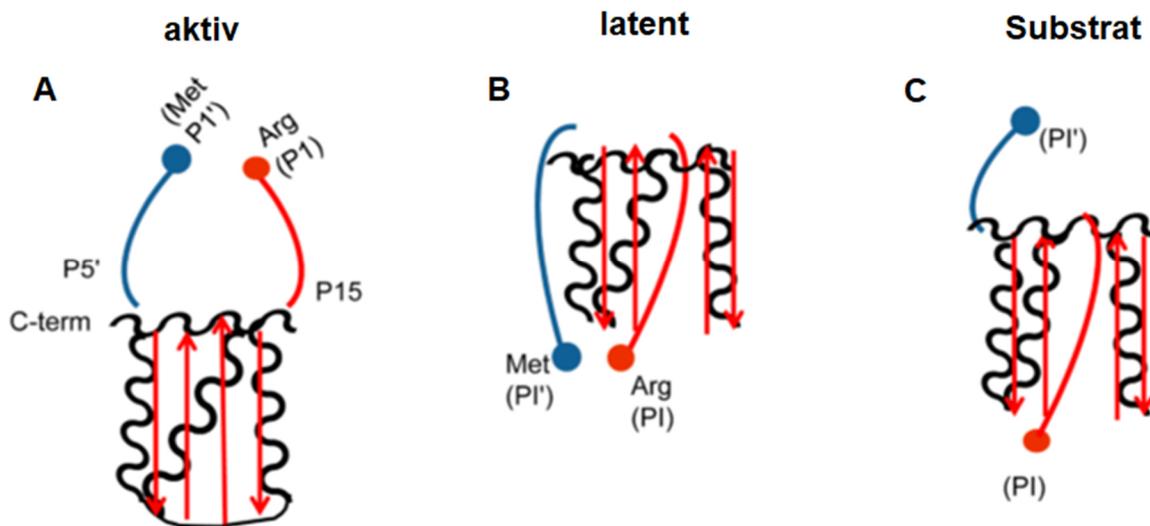
In einer 2006 veröffentlichten Studie von Luo und Jiang wurden ausgewählte Serpine, darunter PAI-1, auf ihre Hemmeigenschaften gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 5, 7, 8, 11, 12, 13 und 14 untersucht: Protein C-Inhibitor (PCI bzw. PAI-3) ist der physiologische Inhibitor von KLK2 und KLK3 (PSA) in der Samenflüssigkeit (Luo and Jiang 2006; Pampalakis and Sotiropoulou 2007). Ebenso konnte inhibitorische Kapazität gegenüber den KLKs 5, 7, 8 und 12-14 nachgewiesen werden (Luo and Jiang 2006).  $\alpha$ 1-Antitrypsin vermag KLK4 zu komplexieren und damit zu inhibieren (Goettig et al. 2010). Antithrombin III, größter Inhibitor von Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren, vermag auch KLK2 zu hemmen, ebenso wie  $\alpha$ 2-Antiplasmin, welches zudem auch KLK4 inhibieren kann. Proteinase Inhibitor 6 (PI-6) ist ein weiterer potenter endogener Inhibitor von KLK2. PAI-1 zeigte gegenüber den KLKs 11, 12 und 14 keine inhibitorische Kapazität und KLK8 vermochte es nur zu 50 % zu hemmen.

Gegenüber KLK5, 7 und 13 zeigte es jedoch gute Hemmeigenschaften (Luo and Jiang 2006). Mikolajczyk et al. beschrieben 1998 die Komplexbildung von KLK2 mit PAI-1. Durch die Bindung von KLK2 durch PAI-1 wird die Inaktivierung von uPA durch PAI-1 verhindert, wodurch die uPA-vermittelte Tumorprogression begünstigt wird (Mikolajczyk et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der aus PAI-1 und KLK4 gebildete Komplex exemplarisch mittels Coomassie- und Silber-Gel sowie Western Blot visualisiert. Trotz Erhöhung des Verhältnisses von eingesetztem KLK4 zu PAI-1 konnte ab einem gewissen Punkt keine breitere Komplexbande erzeugt werden. Vielmehr bildete sich bei höheren eingesetzten Mengen an KLK4 auf der PAI-1-Bande (~48 kDa) eine MW-Doppelbande aus. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der eigentliche Inhibitor PAI-1 zu einem gewissen Grad von KLK4 als Substrat erkannt und gespalten wird. Mikolajczyk et al. stellten in einer 1999 veröffentlichten Studie die These auf, dass im Falle von KLK2 PAI-1 sowohl als Substrat als auch als Inhibitor wirkt. Durch Aktivitätstests, in denen das Serpin PAI-1 in 8-fach molarem Überschuss gegenüber KLK2 eingesetzt wurde, konnte eine rasche Inhibition von KLK2 durch PAI-1 nachgewiesen werden. In Vortests wurde hierbei beobachtet, dass zur vollständigen Inhibition von KLK2 durch PAI-1 ein molarer Überschuss von PAI-1:KLK2 von mindestens 8:1 notwendig ist. Dies stand in Kontrast zu den weiteren untersuchten Wechselwirkungen zwischen KLK2/ $\alpha$ 1-Antichymotrypsin (ACT) und KLK2/Protein C Inhibitor (PCI bzw. PAI-3). Diese vermochten KLK2 ebenso zu hemmen, wobei hier das Verhältnis Inhibitor:KLK2 von 2:1 zur vollständigen Hemmung ausreichten. So wurde vermutet, dass dieser Überschuss notwendig ist, weil PAI-1 durch KLK2 zumindest teilweise inaktiviert wird. Diese Hypothese wurde in N-terminalen Sequenzanalysen der inkubierten Proben bestätigt. Es zeigte sich, dass ein 8-fach molarer Überschuss an PAI-1 gegenüber KLK2 nötig ist: 1 Mol bildet hierbei den kovalenten Komplex mit PAI-1, was zur Inaktivierung von KLK2 und PAI-1 führt, 6-7 Mol PAI-1 wurden pro Mol KLK2 direkt gespalten und inaktiviert.

Ähnliche Beobachtungen wurden durch Christensson et al. bezüglich KLK3 (PSA) und  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin (ACT) gemacht. Zur vollständigen Inhibition von KLK3 war ein 3- bis 5-facher Überschuss an ACT notwendig (Christensson et al. 1990).  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin scheint also für KLK3 gleichermaßen Substrat wie Inhibitor zu sein. Obwohl KLK2 und KLK3 eine Homologie von nahezu 80 % aufweisen, konnten Mikolajczyk et al. (1999) zeigen, dass unter identischen Bedingungen ACT KLK2 zwar inhibiert, nicht jedoch als Substrat fungiert. PAI-1 wird an der P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-Peptidbindung (Arg<sup>346</sup>-Met<sup>347</sup>) seines *reactive center loops* gespalten und bildet mit KLK2 einen intermediären Komplex. Doch statt zu einem kovalenten Komplex überzugehen, dissoziiert die aktive Serinprotease und hinterlässt das an der P<sub>1</sub>-Position gespaltene inaktive Serpin (Declerck et al. 1992; Mikolajczyk et al. 1999). Dieses Phänomen wurde von Gils und Declerck 1997 bereits für PAI-1 und sein natürliches Substrat uPA beschrieben. Die Studie zeigte, dass das Zusammenspiel von PAI-1 und uPA größtenteils zur

Ausbildung des kovalenten Komplexes führt, 20 % des eingesetzten PAI-1 jedoch als Substrat umgesetzt und durch uPA inaktiviert wurden (Gils and Declerck 1997). PAI-1 kann also in 3 unterschiedlichen Konformationen vorliegen: aktiv, latent und gespalten als Substrat (**Abbildung 41**).



**Abbildung 41. Die 3 Konformationszustände von PAI-1.**

(A) Im aktiven Zustand wird das *reactive center loop* von PAI-1 frei zugänglich exponiert, während es im latenten Zustand (B) als zusätzliches  $\beta$ -Faltblatt in die zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur des PAI-1 Moleküls eingebettet wird. Dieser Zustand ist reversibel. Fungiert PAI-1 als Substrat (C), kann das RCL an der P1-P1'- Peptidbindung gespalten werden, wodurch nur das N-terminale Ende des RCL als zusätzliches  $\beta$ -Faltblatt in die zentrale  $\beta$ -Faltblattstruktur eingebettet wird. Dieser Vorgang ist irreversibel, das Serpin kann nicht mehr als Inhibitor zu fungieren. Abbildung modifiziert aus **Simone und Higgins 2015**.

Ausschlaggebend dafür, ob ein Serpin als Substrat oder Inhibitor vorliegt wird die Flexibilität des *reactive center loops* gesehen (Declerck et al. 1992). Durch Herabsetzen der Flexibilität im RCL durch Mutagenese kann aus einem inhibitorisch aktiven Serpin ein rein als Substrat fungierendes Serpin generiert werden (Declerck et al. 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Komplex-Darstellung von PAI-1 und KLK4 ebenso mit unterschiedlichen Verhältnissen von KLK4 und PAI-1 gearbeitet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass bei verhältnismäßigem Überschuss von KLK4 gegenüber PAI-1 ebenso eine Doppelkontur zur Darstellung kommt.



Eine weitere Erklärung für die eingeschränkte (nativ gereinigt) bzw. mangelnde (denaturierend gereinigt) inhibitorische Aktivität von PAI-2 könnte demnach also sein, dass PAI-2 sowohl als Inhibitor als auch Substrat für uPA, KLK2 und KLK4 fungiert und der eingesetzte Überschuss an PAI-2 gegenüber den untersuchten Reaktionspartnern nicht ausgereicht hat. Sowohl uPA als auch KLK2 und KLK4, sind trypsin-ähnliche Serinproteasen. Für weiterführende Studien wäre die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von PAI-1 auf weitere trypsin-ähnliche Serinproteasen wie KLK1, 5, 6, 8, und 10-15 interessant. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits orientierende Aktivitätstests mit KLK8 und KLK13 durchgeführt. Auch hier konnte PAI-1 diese trypsin-ähnlichen Proteasen in ihrer Aktivität hemmen (Daten nicht gezeigt).

Die natürlich vorkommenden Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen eignen sich, trotz ihrer guten inhibitorischen Kapazität, aufgrund der mangelnden Selektivität größtenteils nicht zum direkten therapeutischen Einsatz (Mavridis et al. 2014). Allerdings können die Kenntnisse über die strukturellen Eigenschaften und Inhibitionsmechanismen der natürlich vorkommenden Inhibitoren bestens genutzt werden, um auf deren Basis spezifische synthetische Inhibitoren zu entwickeln. Die Methode endogene Inhibitoren als Grundgerüst für einen synthetisch generierten Inhibitor zu nutzen nennt sich „*bio-scaffolding*“ (Mavridis et al. 2014).

Die generierten synthetischen Inhibitoren Kallikrein-ähnlicher Peptidasen sollten folgende Voraussetzungen erfüllen (Mavridis et al. 2014):

- Gutes „*ADME*“-Profil (Adsorption, Distribution, Metabolismus, Elimination)
- Niedriges immunogenes Potenzial
- Stabile Struktur
- Kostengünstige Produktion

Swedberg et al. nutzten 2009 den natürlich vorkommenden Bowman-Birk-Typ Inhibitor SFTI-1 zur Entwicklung eines selektiven Inhibitors von KLK4. Da SFTI-1 ein potenter Trypsin-Inhibitor ist und Trypsin und KLK4 eine Homologie von 73 % aufweisen, vermutete das Team um Swedberg, dass Varianten des SFTI-1 auch KLK4 in seiner Aktivität zu hemmen vermögen. Hierzu wurde zunächst eine Tetrapeptid-Bibliothek auf das ideale Substrat gescreent und dieses dann in das Inhibitor-Gerüst von SFTI-1 eingefügt. Insbesondere in der Therapie des Prostata-Karzinoms können diese Entwicklungen einen großen Stellenwert haben, da durch die Inhibition von KLK4 dessen aktivierende Wirkung auf pro-KLK3 und pro-uPA unterbunden werden kann. Chen et al. entwickelten 2016 auch auf Basis von SFTI-1 synthetische Inhibitoren der hautspezifischen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 5 und 7. *In vitro* konnten hier vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Weiterentwicklungen der Ergebnisse dieser Studie könnten, wie oben beschrieben, Erfolge in der Therapie des Netherton-Syndroms erzielen.

Der erste rekombinante KLK-Inhibitor, der auch in einer klinischen Phase-I-Studien erprobt wurde, war *MDPK67b*. Aufbauend auf dem Grundgerüst des Serpins  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin wurde unter Austausch der vier Aminosäuren im *reactive center loop (RCL)* ein potenter Inhibitor des Prostata-Karzinom assoziierten KLK2 entwickelt (Mavridis et al. 2014). Zunächst konnte am Tiermodell an KLK2-überexprimierenden Mäusen bestätigt werden, dass erhöhte KLK2-Level mit einem Tumorwachstum einhergingen. Des Weiteren konnte eine bis zu 90%ige, dosisabhängige Inhibition von KLK2 durch *MDPK67b* gezeigt werden, weswegen die Ergebnisse in klinische Studien übergeführt wurden (Mavridis et al. 2014).

Ein weiterer Ansatz, um gewebspezifische Medikamente in der Tumorthherapie mit möglichst geringem Nebenwirkungsprofil zu entwickeln besteht darin, nicht toxische *Pro-Drugs* mit einer KLK-spezifischen Spaltungsstelle und einer cytotoxischen Substanz zu verbinden. Dieses soll dann, durch Spaltung gewebs- und tumormilieuspezifischer KLKs, freigesetzt werden. Für KLK2 beispielsweise wurde ein Heptapeptid-Substrat mit einem apoptoseinduzierenden Inhibitor synthetisiert. *In vitro*- Studien haben gezeigt, dass dieses *Pro-Drug* nach Aktivierung das Tumorwachstum von KLK2-überexprimierenden Prostata-Karzinomzellen hemmen konnte. Die Ergebnisse konnten in *in vivo* Modellen bestätigt werden (Mavridis et al. 2014). Die Hauptschwierigkeit in der Entwicklung synthetischer Proteasen-Inhibitoren und KLK-aktivierter *Pro-Drugs* besteht jedoch darin, Inhibitoren zu konstruieren, die eine bestimmte Zielprotease spezifisch und potent inhibieren ohne dabei Einfluss auf andere Proteasen beziehungsweise proteolytische Kaskaden zu nehmen (Swedberg et al. 2009). **Tabelle 4** fasst eine Auswahl natürlicher und synthetischer Inhibitoren von KLK2 und KLK4 zusammen.

Inhibitor			KLK2	KLK4	
Natürlich	Zink		+	+	
	Proteine	$\alpha$ 2-Makrogloblin	+	+	
		Kanonische Inhibitoren	Kazal-Typ	SPINK 1	-
			Kunitz-Typ	Aprotinin	Aprotinin
	Bowman-Birk-Typ		s.u.	s.u.	
	Serpine	Protein C Inhibitor	+	-	
		Antithrombin III	+	-	
		$\alpha$ 1-Antitrypsin	-	+	
		$\alpha$ 1-Antichymotrypsin	+	-	
		$\alpha$ 2-Antiplasmin	+	+	
Proteinase-Inhibitor 6		+	-		
PAI-1		+	-		
Synthetisch und rekombinant	<i>Bio scaffolding</i>		SFTI	SFTI-FCQR	
			$\alpha$ 1-Antichymotrypsin	MDPK67b	

Tabelle 4. Zusammenfassende Übersicht einer Auswahl natürlicher und synthetischer Inhibitoren von KLK2 und KLK4.

## 5 Zusammenfassung

Das Plasminogenaktivator System, als auch die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen bilden ein großes proteolytisches ineinander verwobenes extrazelluläres Netzwerk. Sie spielen in einer Vielzahl an physiologischen und pathologischen Prozessen des Körpers eine essenzielle Rolle. Sowohl die Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems als auch die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen sind auf Grund dessen in den vergangenen Jahren als diagnostische und prognostische Parameter, als auch therapeutische Angriffspunkte in den Fokus gerückt. Die Regulation Kallikrein-ähnlicher Peptidasen durch endogene Inhibitoren ist bereits gut untersucht. Sie werden in nicht-kanonische, kanonische Inhibitoren und Serpine unterteilt. Während über die Interaktion Kallikrein-ähnlicher Peptidasen mit nicht-kanonischen und kanonischen Inhibitoren bereits viel bekannt ist, ist die Wechselwirkung mit Serpinen noch wenig beforscht. Serpine haben auf eine Reihe von Proteinen mit hoher tumorbiologischer Bedeutung, wie beispielsweise trypsin-ähnlichen Serinproteasen, hemmenden Einfluss. Diese Arbeit hat die Untersuchung der Interaktion mit anderen Serinproteasen wie KLK2 und KLK4 zum Ziel. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen den Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 und den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen KLK2 und KLK4 untersucht. Zunächst wurden die Serpine als rekombinante Proteine durch ektope Expression in *E. coli* hergestellt. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung, Denaturierung und Rückfaltung der so gewonnenen Serpine PAI-1 und PAI-2 wurde deren Konzentration bestimmt. Durch Reinigung unter nativen Bedingungen, Denaturierung und Rückfaltung konnte eine zufriedenstellende Menge PAI-1 gewonnen werden. Unter gleichen Bedingungen konnte jedoch nur wenig PAI-2 gewonnen werden. Durch Reinigung unter denaturierenden Bedingungen konnte die Proteinausbeute deutlich gesteigert werden. Im Rahmen von Vorversuchen wurde dann untersucht, ob die so gewonnenen Serpine ihr physiologisches Substrat uPA zu inhibieren vermögen. PAI-1 zeigte sehr gute inhibitorische Kapazität. Im Falle von PAI-2 zeigte sich, dass nur PAI-2, welches unter nativen Bedingungen gereinigt wurde, inhibitorisch aktiv gegenüber seinem physiologischen Substrat uPA war. Unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes PAI-2 zeigte keine hemmende Wirkung auf uPA. So wurde für die weiterführenden Versuchsreihen lediglich nativ gereinigtes PAI-2 verwendet. Anschließend wurde die inhibitorische Kapazität von PAI-1 und PAI-2 gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen KLK2 und KLK4 photometrisch bestimmt. PAI-1 erwies sich hierbei als wirksamer Hemmstoff beider Kallikrein-ähnlicher Peptidasen. Unter PAI-2 hingegen zeigten die Proteasen, trotz initialer konzentrationsabhängiger Hemmung, noch eine Restaktivität von etwa 50 %.

Bei der Inhibition von Serinproteasen durch Serin-Protease-Inhibitoren kommt es zur Ausbildung eines kovalenten Komplexes und durch Konformationsänderungen sowohl in der

gebundenen Protease als auch im Inhibitor zu gravierenden Konformationsänderungen, die schließlich beide Reaktionspartner funktionsuntüchtig machen. Exemplarisch wurde, zur Untermauerung der Ergebnisse der Aktivitätsmessungen, der Komplex aus PAI-1 und KLK4 auf Coomassie- und Silber-gefärbten SDS-PAGE-Gelelektrophoresen, als auch via Western Blot visualisiert.

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse dieser Arbeit *in vitro* experimentelle Beweise für die Inhibition und Regulation von KLK2 und KLK4 durch PAI-1 und geben Anlass zur Vermutung, dass weitere Wechselwirkung zwischen den beiden katalytischen Systemen bestehen können, die bis dato noch nicht bekannt sind.

Offen bleibt die Frage, weswegen zwar durch PAI-1, nicht jedoch PAI-2 eine vollständige Inhibition der ausgewählten Kallikrein-ähnlichen Peptidasen erzielt werden konnte. Die weitere Charakterisierung der einzelnen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen sowie derer endogenen Substrate ist fundamental zu Weiterentwicklung des Verständnisses und Ableitung von weiteren diagnostischen und therapeutischen Ansätzen. Die physiologische und klinische Relevanz der Ergebnisse dieser Studie gilt es in weiterführenden Studien zu klären. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen sich auf *in vitro* Versuchsreihen, wie der Großteil der hierzu vorliegenden Daten aus der Literatur. Die Signifikanz der Ergebnisse *in vivo* bleiben abzuwarten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR (1997) Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3576–3578
- Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J. Cancer* 72:1–22
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230
- Arroyo De Prada N, Schroeck F, Sinner E-K, Muehlenweg B, Twellmeyer J, Sperl S, Wilhelm OG, Schmitt M, Magdolen V (2002a) Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin. *Eur J Biochem* 269:184–192
- Aslantas Y, Surmeli NB (2019) Effects of N-Terminal and C-Terminal Polyhistidine Tag on the Stability and Function of the Thermophilic P450 CYP119. *Bioinorg Chem Appl* 2019:8080697
- Audenaert AM, Knockaert I, Collen D, Declerck PJ (1994) Conversion of plasminogen activator inhibitor-1 from inhibitor to substrate by point mutations in the reactive-site loop. *J. Biol. Chem.* 269:19559–19564
- Beaufort N, Plaza K, Utzschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, Magdolen V (2010) Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem* 391:581–587
- Beaulieu LM, Whitley BR, Wiesner TF, Rehault SM, Palmieri D, Elkahloun AG, Church FC (2007) Breast cancer and metabolic syndrome linked through the plasminogen activator inhibitor-1 cycle. *Bioessays* 29:1029–1038
- Berkenpas MB, Lawrence DA, Ginsburg D (1995) Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *EMBO J* 14:2969–2977
- Bisswanger H (2015) *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*. Wiley
- Booth WT, Schlachter CR, Pote S, Ussin N, Mank NJ, Klapper V, Offermann LR, Tang C, Hurlburt BK, Chruszcz M (2018) Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega* 3:760–768
- Borgoño CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:876–890
- Bornhorst JA, Falke JJ (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Meth Enzymol* 326:245–254
- Bruice PY (2011) *Organische Chemie: Studieren kompakt*. Pearson Studium
- Cammalleri M, Dal Monte M, Locri F, Pecci V, Rosa M de, Pavone V, Bagnoli P (2019) The urokinase-type plasminogen activator system as drug target in retinitis pigmentosa: New pre-clinical evidence in the rd10 mouse model. *J Cell Mol Med* 23:5176–5192
- Chan JC, Duszczyszyn DA, Castellino FJ, Ploplis VA (2001) Accelerated Skin Wound Healing in Plasminogen Activator Inhibitor-1-Deficient Mice. *The American Journal of Pathology* 159:1681–1688

- Chen Y, Kelm RJ, Budd RC, Sobel BE, Schneider DJ (2004) Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *J Cell Biochem* 92:178–18
- Chen S-C, Henry DO, Reczek PR, Wong MKK (2008) Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:1227–1236
- Chen X, Zaro JL, Shen W-C (2013) Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 65:1357–1369
- Christensson A, Laurell CB, Lilja H (1990) Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 194:755–763
- Cochran BJ, Gunawardhana LP, Vine KL, Lee JA, Lobov S, Ranson M (2009) The CD-loop of PAI-2 (SERPINB2) is redundant in the targeting, inhibition and clearance of cell surface uPA activity. *BMC Biotechnol* 9:43
- Declerck PJ, Mol M de, Vaughan DE, Collen D (1992) Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 267:11693–11696
- Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y (2000) Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 16:169–172
- Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M (2014) uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* 16:428
- Dullweber F (2000) Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Philipps-Universität Marburg
- Fahlke C, Linke W, Rassler B, Wiesner R (2008) Taschenatlas Physiologie: Mit 26 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch], 1. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer, München
- Fortugno P, Bresciani A, Paolini C, Pazzagli C, El Hachem M, D'Alessio M, Zambruno G (2011) Proteolytic activation cascade of the Netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: Implications for skin homeostasis. *J Invest Dermatol* 131:2223–2232
- Furio L, Pampalakis G, Michael IP, Nagy A, Sotiropoulou G, Hovnanian A (2015) KLK5 Inactivation Reverses Cutaneous Hallmarks of Netherton Syndrome. *PLoS Genet* 11:e1005389
- Ganten D, Ruckpaul K (2013) Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Springer Berlin Heidelberg
- Gekle M (2015) Taschenlehrbuch Physiologie, 2., überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart
- Gellissen G (ed) (2005) Production of recombinant proteins: Novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH-Verl., Weinheim
- Gils A, Declerck PJ (1997) Proteinase Specificity and Functional Diversity in Point Mutants of Plasminogen Activator Inhibitor 1. *J. Biol. Chem.* 272:12662–12666
- Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H (2010) Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* 92:1546–1567

- Gressner AM, Arndt T (eds) (2018) Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik: Includes digital. SPRINGER, [Place of publication not identified]
- Grütter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J, Stone SR (1990) Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: A novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J* 9:2361–2365
- Horton HR (2008) Biochemie. Pearson Studium
- <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/proteasen/5092>  
<https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/proteasen/5092>
- Huppelsberg J, Walter K (2013) Kurzlehrbuch Physiologie. Thieme
- Hutterer R (2010) Fit in Biochemie: Das Prüfungstraining für Mediziner, Chemiker und Biologen. Vieweg+Teubner Verlag
- Im H, Yu MH (2000) Role of Lys335 in the metastability and function of inhibitory serpins. *Protein Sci* 9:934–941
- Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, Muschel RJ (2004) Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 64:8613–8619
- Jankova L, Harrop SJ, Saunders DN, Andrews JL, Bertram KC, Gould AR, Baker MS, Curmi PM (2001) Crystal structure of the complex of plasminogen activator inhibitor 2 with a peptide mimicking the reactive center loop. *J. Biol. Chem.* 276:43374–43382
- Jensen JK, Thompson LC, Bucci JC, Nissen P, Gettins PGW, Peterson CB, Andreasen PA, Morth JP (2011) Crystal structure of plasminogen activator inhibitor-1 in an active conformation with normal thermodynamic stability. *J Biol Chem* 286:29709–29717
- Kenny HA, Leonhardt P, Ladanyi A, Yamada SD, Montag A, Im HK, Jagadeeswaran S, Shaw DE, Mazar AP, Lengyel E (2011) Targeting the urokinase plasminogen activator receptor inhibits ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 17:459–471
- Klumpers F (2017) Biophysikalische Charakterisierung des Faltungsmechanismus der Nore1A SARAH Domäne und des Einflusses des Solvens auf die Bindung von p-Aminobenzamidin an Trypsin. <https://hss-opus.ub.ruhr-uni-bochum.de/opus4/files/5340/diss.pdf>
- Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J (2003) Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* 60:2427–2444
- Kwon K-S, Lee S, Yu M-H (1995) Refolding of  $\alpha$ 1-antitrypsin expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*: Characterization of aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1247:179–184
- Lanckriet H, Middelberg APJ (2004) Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A* 1022:103–113
- Lawrence D, Strandberg L, Grundström T, Ny T (1989) Purification of active human plasminogen activator inhibitor 1 from *Escherichia coli*. Comparison with natural and recombinant forms purified from eucaryotic cells. *Eur J Biochem* 186:523–533

- Lee H-J, Im H (2003) Purification of recombinant plasminogen activator inhibitor-1 in the active conformation by refolding from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 31:99–107
- Lee CC, Huang T-S (2005) Plasminogen Activator Inhibitor-1: The Expression, Biological Functions, and Effects on Tumorigenesis and Tumor Cell Adhesion and Migration. *Journal of Cancer Molecules*:25–36
- Lindahl TL, Ohlsson PI, Wiman B (1990) The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem. J.* 265:109–113
- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC-C, Bartlett JD, Simmer JP (2008) Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 389:695–700
- Luo L-Y, Jiang W (2006) Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biol Chem* 387:813–816
- Machold C, Schlegl R, Buchinger W, Jungbauer A (2005) Continuous matrix assisted refolding of alpha-lactalbumin by ion exchange chromatography with recycling of aggregates combined with ultrafiltration. *J Chromatogr A* 1080:29–42
- Magdolen V, Arroyo de Prada N, Sperl S, Muehlenweg B, Luther T, Wilhelm OG, Magdolen U, Graeff H, Reuning U, Schmitt M (2000) Natural and synthetic inhibitors of the tumor-associated serine protease urokinase-type plasminogen activator. *Adv Exp Med Biol* 477:331–341
- Mahmood N, Mihalciou C, Rabbani SA (2018) Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol* 8:24
- Marín-García J, Goldenthal MJ, Moe GW (2007) Molecular Basis of Lipoprotein Disorders, Atherogenesis, and Thrombosis. *Post-genomic cardiology*
- Marx UC, Korsinczky MLJ, Schirra HJ, Jones A, Condie B, Otvos L, Craik DJ (2003) Enzymatic cyclization of a potent bowman-birk protease inhibitor, sunflower trypsin inhibitor-1, and solution structure of an acyclic precursor peptide. *J Biol Chem* 278:21782–21789
- Masuda T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N (2013) SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 12:2378–2388
- Mavridis K, Avgeris M, Scorilas A (2014) Targeting kallikrein-related peptidases in prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets* 18:365–383
- MEROPS - the Peptidase Database (2018): The beginning of MEROPS. <https://www.ebi.ac.uk/merops/about/history.shtml#BEGINNING>. Accessed 9 January 2019
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Kumar A, Saedi MS (1998) Human glandular kallikrein, hK2, shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors. *Prostate* 34:44–50
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Kumar A, Saedi MS (1999) Prostatic human kallikrein 2 inactivates and complexes with plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Cancer* 81:438–442

- Oley M (2006) Identifizierung von Zielproteasen für das multifunktionelle Serpin-Gen Spn4. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktorin der Naturwissenschaften, Universität Bielefeld
- Pampalakis G, Sotiropoulou G (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1776:22–31
- Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK (2000) Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 18:182–192
- Peternel S, Komel R (2010) Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microb Cell Fact* 9:66
- Petzinger J (2010) Urokinase-Rezeptor (uPAR) und Zellkontakte: Mechanismen uPAR-abhängiger Zelladhäsion, Zellmigration und Signaltransduktion. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Preissner KT, Grulich-Henn J, Ehrlich HJ, Declerck P, Justus C, Collen D, Pannekoek H, Müller-Berghaus G (1990) Structural requirements for the extracellular interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with endothelial cell matrix-associated vitronectin. *J Biol Chem* 265:18490–18498
- Rebalka IA, Raleigh MJ, D'Souza DM, Coleman SK, Rebalka AN, Hawke TJ (2015) Inhibition of PAI-1 Via PAI-039 Improves Dermal Wound Closure in Diabetes. *Diabetes* 64:2593–2602
- Riley BT, Ilyichova O, Costa MGS, Porebski BT, Veer SJD, Swedberg JE, Kass I, Harris JM, Hoke DE, Buckle AM (2016) Direct and indirect mechanisms of KLK4 inhibition revealed by structure and dynamics. *Sci Rep* 6:35385
- Schultz GS, Mast BA (1999) Molecular Analysis of the Environments of Healing and Chronic Wounds: Cytokines, Proteases and Growth Factors. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*:7–14
- Shapiro RL, Duquette JG, Roses DF, Nunes I, Harris MN, Kamino H, Wilson EL, Rifkin DB (1996) Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: Cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res* 56:3597–3604
- Sharp AM, Stein PE, Pannu NS, Carrell RW, Berkenpas MB, Ginsburg D, Lawrence DA, Read RJ (1999) The active conformation of plasminogen activator inhibitor 1, a target for drugs to control fibrinolysis and cell adhesion. *Structure* 7:111–118
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14:41
- Skala W, Utschneider DT, Magdolen V, Debela M, Guo S, Craik CS, Brandstetter H, Goettig P (2014) Structure-function analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity. *J Biol Chem* 289:34267–34283
- Smola H, Eming SA, Hess S, Werner S, Krieg T (2001) Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Deutsches Ärzteblatt*:A2802-A2809

- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP (2009) Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 284:32989–32994
- Spring Cad (2006) Identifizierung ähnlicher Reaktionsmechanismen in homologen Enzymen unterschiedlicher Funktion unter Verwendung konservierter Sequenzdomänen
- Stefanini ACB, Rodrigues da Cunha B, Henrique T, Tajara EH (2015) Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Normal and Pathologic Processes. Hindawi Publishing Corporation:1–17
- Stoop AA, Eldering E, Dafforn TR, Read RJ, Pannekoek H (2001) Different structural requirements for plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) during latency transition and proteinase inhibition as evidenced by phage-displayed hypermutated PAI-1 libraries. *J Mol Biol* 305:773–783
- Strandberg L, Enfors SO (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57:1669–1674
- Su C-Y, Liu Y-P, Yang C-J, Lin Y-F, Chiou J, Chi L-H, Lee J-J, Wu ATH, Lu P-J, Huang M-S, Hsiao M (2015) Plasminogen Activator Inhibitor-2 Plays a Leading Prognostic Role among Protease Families in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE* 10:e0133411
- Subramanian R, Gondi C, Lakka S, Jutla A, Rao J (2006) siRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol*
- Swedberg JE, Nigon LV, Reid JC, Veer SJD, Walpole CM, Stephens CR, Walsh TP, Takayama TK, Hooper JD, Clements JA, Buckle AM, Harris JM (2009) Substrate-guided design of a potent and selective kallikrein-related peptidase inhibitor for kallikrein 4. *Chem Biol* 16:633–643
- Szeimies R-M, Hauschild A, Garbe C, Kaufmann R, Landthaler M (eds) (2010) Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie. Thieme, Stuttgart
- Szeimies R-M (2010) Tumoren der Haut. In: Szeimies R-M, Hauschild A, Garbe C, Kaufmann R, Landthaler M (eds) Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie. Thieme, Stuttgart
- Vallejo LF, Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 3:11
- Vousden KA, Lundqvist T, Popovic B, Naiman B, Carruthers AM, Newton P, Johnson DJD, Pomowski A, Wilkinson T, Dufner P, Mendez I de, Mallinder PR, Murray C, Strain M, Connor J, Murray LA, Sleeman MA, Lowe DC, Huntington JA, Vaughan TJ (2019) Discovery and characterisation of an antibody that selectively modulates the inhibitory activity of plasminogen activator inhibitor-1. *Sci Rep* 9:1605
- Wagener C, Müller O (2009) Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Thieme
- Wang L (2009) Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. *Prion* 3:139–145
- Woestenenk EA, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H (2004) His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: A comparison between four expression vectors. *J Struct Funct Genomics* 5:217–229

- Wu Y, Long Q, Xu Y, Guo S, Chen T, Wang L, Zhou M, Zhang Y, Shaw C, Walker B (2017) A structural and functional analogue of a Bowman–Birk-type protease inhibitor from *Odorana schmackeri*. *Biosci Rep* 37
- Yamaguchi H, Miyazaki M, Briones-Nagata MP, Maeda H (2010) Refolding of difficult-to-fold proteins by a gradual decrease of denaturant using microfluidic chips. *The Journal of Biochemistry* 147:895–903
- Yang L, Mei Y, Fang Q, Wang J, Yan Z, Song Q, Lin Z, Ye G (2017) Identification and characterization of serine protease inhibitors in a parasitic wasp, *Pteromalus puparum*. *Sci Rep* 7:15755
- Zhang X-W, Sun T, Zhou X-F, Zeng X-Y, Liu X, Gu D-X (1998) Expression of human PAI-2 in the baculovirus expression system. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21:175–177
- Zhou A, Jiang X, Dou F, Zhu D, Xu X (1997) Renaturation, purification, and characterization of human plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) accumulated at high level in *Escherichia coli*. *J Biochem* 121:930–934
- Zhou Y, Zhang Y (2011) Serine protease acylation proceeds with a subtle re-orientation of the histidine ring at the tetrahedral intermediate. *Chem Commun (Camb)* 47:1577–1579

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Übersicht über das PA-System und die uPAR-vermittelte Signaltransduktion. ....	3
Abbildung 2. Tumormetastasierung am Beispiel eines malignen Melanoms. ....	8
Abbildung 3. Proteinstruktur PAI-1 in nativer und latenter Form. ....	14
Abbildung 4. Tertiärstruktur KLK2 in Komplexbindung mit Benzamidin in Standardorientierung. ....	18
Abbildung 5. Katalytischer Wirkmechanismus von Serinproteasen. ....	20
Abbildung 6. Prinzip der affinitätschromatographischen Proteinreinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen. ....	38
Abbildung 7. Zeitkinetik des Zellwachstums von PAI-1- und PAI-2-überexprimierenden <i>E. coli</i> -Bakterien.....	47
Abbildung 8. Zeitkinetik der Proteinexpression von PAI-1.....	48
Abbildung 9. Vergleich PAI-1 vor und nach Aufreinigung unter nativen Bedingungen. ....	49
Abbildung 10. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-1.....	50
Abbildung 11. Zeitkinetik der Proteinexpression PAI-2.....	51
Abbildung 12. Exprimiertes PAI-2 vor und nach Reinigung unter nativen Bedingungen. ....	52
Abbildung 13. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-2, nativ gereinigt. ....	52
Abbildung 14. Exprimiertes PAI-2 vor und nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen.....	53
Abbildung 15. Extinktion der Fraktionen während der Elution von PAI-2 denaturierend gereinigt. ....	54
Abbildung 16. Konzentrationsbestimmung KLK4 und PAI-1. ....	55
Abbildung 17. Minimal darstellbare Menge PAI-1 und KLK4 mittels Coomassie-Färbung. ....	56
Abbildung 18. Minimal darstellbare Menge PAI-1 und KLK4 mittels Silber-Färbung. ...	56
Abbildung 19. Konzentrationsbestimmung PAI-2, nativ gereinigt.....	57
Abbildung 20. Konzentrationsbestimmung PAI-2, denaturierend gereinigt.....	58
Abbildung 21. Zeitabhängige Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber uPA. ....	59
Abbildung 22. Messung der inhibitorischen Kapazität von PAI-1 gegenüber uPA.....	60

Abbildung 23. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK2. ....	61
Abbildung 24. Enzymatische Aktivität von KLK2 nach Reaktion mit PAI-1. ....	62
Abbildung 25. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4. ....	63
Abbildung 26. Minimale Aktivität von KLK4 nach Reaktion mit PAI-1.....	63
Abbildung 27. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-1 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4. ....	64
Abbildung 28. Minimale Aktivität von KLK4 nach Reaktion mit PAI-1.....	64
Abbildung 29. Zeitkinetik der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber uPA. ....	65
Abbildung 30. Maximale Hemmung der Aktivität von uPA durch PAI-2. ....	65
Abbildung 31. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (denaturierend gereinigt) gegenüber uPA. ....	66
Abbildung 32. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (denaturierend gereinigt) gegenüber uPA. ....	67
Abbildung 33. Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (unter nativen Bedingungen gereinigt) gegenüber KLK2.....	67
Abbildung 34. Maximale inhibitorische Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK2. ....	68
Abbildung 35. Zeitabhängige Messung der inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4. ....	68
Abbildung 36. Maximale inhibitorischen Aktivität von PAI-2 (nativ gereinigt) gegenüber KLK4. ....	69
Abbildung 37. Polyacrylamidgel der Komplexbildung von PAI-1 + KLK4. ....	70
Abbildung 38. Silber-gefärbtes Gel der Komplexbildung aus PAI-1 und KLK4. ....	71
Abbildung 39. Western Blot der Komplexbildung aus PAI-1 und KLK4. ....	72
Abbildung 40. Inhibitionsmechanismus von PAI-1.....	81
Abbildung 41. Die 3 Konformationszustände von PAI-1.....	83
Abbildung 42. Aminosäuresequenz des <i>RCL</i> von PAI-1. ....	84
Abbildung 43. Ausbildung einer Doppelbande von PAI-1 bei Reaktion mit tPA (A) und KLK4 (B). ....	84

## **8 Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1. Einteilung der Peptidasen nach Art des aktiven Zentrums.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 2. KLK2- und KLK4-Substrate und deren Rolle in physiologischen Prozessen, sowie der Tumorgenese .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 3. Zusammenfassung der inhibitorischen Kapazität der Plasminogen-Aktivator- Inhibitoren 1 und 2 gegenüber den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 2 und 4. ....</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 4. Zusammenfassende Übersicht einer Auswahl natürlicher und synthetischer Inhibitoren von KLK2 und KLK4. ....</b>	<b>87</b>

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Viktor Magdolen* für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine jahrelange, geduldige Betreuung. Seine unermüdliche konstruktive Kritik hat maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Frau *Sabine Creutzburg* danke ich für die geduldige Anleitung zur Laborarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und das konstruktive Korrekturlesen dieser Dissertation.

Ich danke *Benny* für sein immerwährendes Verständnis, seine emotionale Unterstützung, die unermüdliche Ermutigung und seine Geduld bis zur Vollendung meiner Promotion.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Mutter *Iris* für ihre bedingungslose, liebevolle Unterstützung, die ich bereits mein ganzes Leben erfahren darf. Ihr ist diese Doktorarbeit gewidmet.

München, Oktober 2020.