

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

**Die Kallikrein-verwandten Peptidasen als Bestandteil  
proteolytischer Kaskaden:  
Klonierung, Expression und Rückfaltung von Pro-KLK 3-15**

Susanne Wagner

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

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. V. Magdolen
2. Univ. -Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 25.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

*Für meine Eltern*

# ***Inhaltsverzeichnis***

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	
<b>1.1 Tumorentstehung</b>	1
1.1.1 Tumorinvasion und Metastasierung	1
1.1.2 Das Ovarialkarzinom	2
1.1.3 Das Mammakarzinom	3
1.1.4 Tumorassoziierte Biomarker	4
<b>1.2 Die Familie der Kallikrein-verwandten Peptidasen</b>	6
1.2.1 Serinproteasen	8
1.2.2 Nomenklatur	8
1.2.3 Genlokus und Genstruktur	9
1.2.4 <i>Splice</i> -Varianten	10
1.2.5 Regulation der Genexpression	11
1.2.6 Struktur und Physiologie der KLK-Proteasen	11
1.2.7 Die KLK-Proteasen als Teil proteolytischer Kaskaden	13
1.2.8 Regulation der Proteinaktivität	14
1.2.9 Die Expressionsmuster der KLK-Proteasen	15
<b>1.3 Die Rolle der Kallikrein-verwandten Peptidasen im Tumorgeschehen</b>	18
1.3.1 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen und das Ovarialkarzinom	22
1.3.2 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen und das Mammakarzinom	25
<b>1.4 Zielsetzung</b>	27
<b>2. Material</b>	28
<b>2.1 Chemikalien</b>	28
<b>2.2 Puffer und Lösungen</b>	28
<b>2.3 Bakterienstämme</b>	29
<b>2.4 Bakterienkulturmedien</b>	29
<b>2.5 Zelllinien</b>	30
<b>2.6 Plasmid</b>	30
<b>2.7 Primer</b>	30
2.7.1 Entwurf der <i>reverse</i> Primer	32
2.7.2 Entwurf der <i>forward</i> Primer	33

<b>3. Methoden</b>	34
<b>3.1 Klonierung der Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 3-15</b>	34
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	34
3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	36
3.1.3 Reinigung des PCR-Produkts	36
3.1.4 Behandlung der DNA Restriktionsendonukleasen	38
3.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	39
3.1.6 Ligation	40
3.1.7 Transformation	41
3.1.8 Plasmid-Präparation	41
3.1.9 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide	42
3.1.10 Sequenzierung von DNA	42
<b>3.2 Proteinexpression und Proteinreinigung</b>	43
3.2.1 Transformation	43
3.2.2 Expression der rekombinanten Plasmide	43
3.2.3 Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitäts-Chromatographie	44
3.2.4 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.5 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	47
3.2.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	48
<b>3.3 Rückfaltung der exprimierten Proteine</b>	49
3.3.1 Allgemeines	49
3.3.2 Rückfaltungsprotokoll Nr.1	50
3.3.3 Rückfaltungsprotokoll Nr.2	51
3.3.4 Rückfaltungsprotokoll Nr.3	52
3.3.5 Rückfaltungsprotokoll Nr.4	52
3.3.6 Rückfaltungsprotokoll Nr.5	53
3.3.7 Rückfaltungsprotokoll Nr.6	54
3.3.8 Rückfaltungsprotokoll Nr.7	55
3.3.9 Rückfaltungsprotokoll Nr.8	56
3.3.10 Aufkonzentrieren der rückgefalteten Proteine	57

<b>4. Ergebnisse</b>	58
<b>4.1 Klonierung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen</b>	58
4.1.1 Vervielfältigung der Pro- <i>KLK</i> -cDNA mittels PCR	60
4.1.2 Darstellung der DNA- Fragmente nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen	62
4.1.3 Ligation der DNA-Fragmente mit der Vektor-DNA und Transformation der neu gebildeten Plasmide in <i>E. coli</i>	62
4.1.4 Restriktionsanalyse der klonierten Plasmide	63
4.1.5 Sequenzierungsergebnisse	64
<b>4.2 Expression und Reinigung der Pro-Kallikrein-Fragmente 3-15</b>	66
4.2.1 Die gereinigten Proformen der <i>KLK</i> -Proteasen	67
4.2.2 Darstellung der gereinigten Pro- <i>KLK</i> -Proteasen 3-15	73
<b>4.3 Rückfaltung der Pro-<i>KLK</i>-Proteine 3-15</b>	74
4.3.1 Die Rückfaltung Nr. 1	75
4.3.2 Die Rückfaltung Nr. 2	76
4.3.3 Die Rückfaltung Nr. 3	77
4.3.4 Die Rückfaltung Nr. 4	78
4.3.5 Die Rückfaltung Nr. 5	80
4.3.6 Die Rückfaltung Nr. 6	81
4.3.7 Die Rückfaltung Nr. 7	82
4.3.8 Die Rückfaltung Nr. 8	83
<b>5. Diskussion</b>	84
<b>5.1 Klonierungsstrategie</b>	84
<b>5.2 Die Rückfaltungen der Kallikrein-verwandten Peptidasen</b>	86
<b>5.3 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen als Teil proteolytischer Kaskaden</b>	90
5.3.1 Die Samenflüssigkeit	90
5.3.2 Die Hornhautabschilferung	91
<b>5.4 Zusammenfassung und Ausblick</b>	93

<b>6. Literaturverzeichnis</b>	94
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	104
<i>Lebenslauf</i>	105
<i>Danksagung</i>	107

# ***1. Einleitung***

## **1.1 Tumorentstehung**

Krebserkrankungen zählen nach den kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Welt. In Deutschland erkranken jährlich fast 400 000 Menschen an Krebs. Da die Diagnose in vielen Fällen erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung gestellt wird, ist oft trotz verschiedener Therapieoptionen eine Heilung nicht mehr möglich. Forschergruppen aus aller Welt versuchen daher ununterbrochen, Ursachen und Zusammenhänge von Krebserkrankungen näher zu ergründen, um Früherkennung und Behandlung betroffener Patienten weiterzuentwickeln.

Tumorentstehung ist das Ergebnis verschiedener irreversibler genetischer Veränderungen von ursprünglich gesunden Zellen (Hanahan und Weinberg, 2000). Zu diesen Veränderungen zählen:

- Eigenständigkeit bezüglich wachstumsfördernder und Unempfindlichkeit bezüglich wachstumshemmender Signale
- Umgehung des programmierten Zelltodes
- unbegrenzte Teilungsfähigkeit
- zeitlich unbegrenzte Angiogenese sowie
- Invasion und Metastasierung.

### **1.1.1 Tumorinvasion und Metastasierung**

Die extrazelluläre Matrix befindet sich in einem ständigen Umbauvorgang, der sowohl mit physiologischen (z.B. Schwangerschaft, Wundheilung) als auch pathologischen Prozessen (Arteriosklerose, Tumorinvasion, Metastasierung) in Verbindung steht. Im Folgenden soll auf die pathologischen Veränderungen der extrazellulären Matrix im Rahmen von Tumorinvasion und Metastasierung näher eingegangen werden.

Beim Wachstum maligner Tumoren spielt der Schritt der Invasion von Tumorzellen in das angrenzende Wirtsgewebe eine Schlüsselrolle. Es handelt sich dabei um einen komplexen biologischen Prozess, bei dem sich die Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors lösen und aktiv in das umgebende Gewebe eindringen (Hanahan und Weinberg, 2000). Hier kommt es zunächst zu einer Anlagerung an Glykoproteine der extrazellulären Matrix mit anschließender Durchbrechung bzw. Um- oder Abbau der Basalmembran, was die Infiltration in das Gewebe erst ermöglicht (Basbaum und Werb, 1996). Dieser Vorgang wird durch

verschiedene proteolytische Enzyme gesteuert, die sich entweder auf der Oberfläche der Tumorzelle befinden oder dort freigesetzt werden (Aznavorian *et al.*, 1993). Hierzu zählen folgende Protease-Hauptgruppen:

- **Serinproteasen** (z.B. Gewebekallikreine, uPA, Plasmin, Thrombin)
- **Cysteinproteasen** (z.B. Kathepsin B, Kaspasen)
- **Metalloproteasen** (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen)

Diese Proteasen sind direkt oder indirekt an verschiedenen Prozessen der Tumorgenese wie Proliferation, Chemotaxis und Angiogenese beteiligt. Die Infiltration des Tumors ins Gewebe ist der wegweisende Schritt, denn je aggressiver die Tumorzellen im Wachstum voranschreiten, umso schneller erhalten sie Anschluss an Lymph- und oder Blutgefäße, was schließlich zur Entstehung von Lymphknotenmetastasen und Organmetastasen führen kann.

### 1.1.2 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist ein maligner, von den Epithelzellen des Ovars ausgehender Tumor. Er kann in jedem Lebensalter auftreten, ein Häufigkeitsgipfel findet sich aber zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Unter den bösartigen Genitaltumoren bei Frauen kommt das Ovarialkarzinom am dritthäufigsten vor, in der Mortalitätsrate ist es führend. Dies ist in erster Linie dadurch bedingt, dass beim Ovarialkarzinom die klassischen Frühsymptome in aller Regel fehlen und der Tumor meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. So wird als typisches Spätsymptom die Zunahme des Bauchumfanges geschildert, was auf Aszitesbildung zurückzuführen ist. In ca. 75 % der Fälle liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits FIGO Stadium III oder IV vor (s. Tab. 1).

Die derzeitige Therapie der Wahl des Ovarialkarzinoms ist die operative Resektion. Der entscheidende Prognosefaktor ist hierbei der postoperativ verbleibende Tumorrest (R0 = kein Resttumor, R1 = Resttumor < 2 cm, R2 = Resttumor  $\geq$  2 cm). Ziel ist eine komplette Tumorsektion gefolgt von einer kombinierten Chemotherapie.



## 1. Einleitung

FIGO	TNM	Befund
I	T1	Tumor auf die Ovarien begrenzt
IA	T1a	Tumor in einem Ovar, Kapsel intakt, kein Aszites
IB	T1b	Tumor in beiden Ovarien, Kapsel intakt
IC	T1c	Tumor in einem oder beiden Ovarien, Kapselruptur, Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen in der Peritoneallavage oder im Aszites
II	T2	Tumor auf das Becken beschränkt
IIA	T2a	Befall von Uterus und/oder Tuben, ohne Aszites
IIB	T2b	Befall anderer Beckengewebe, ohne Aszites
IIC	T2c	Befall von Beckenorganen, maligne Zellen in der Peritoneallavage oder im Aszites
III	T3	Tumor in einem oder beiden Ovarien, peritoneale Metastasen und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IIIA	T3a	Mikroskopisch peritoneale Metastasen
IIIB	T3b	Makroskopisch peritoneale Metastasen
IIIC	T3c	Metastasen $\geq 2$ cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IV	M1	Fernmetastasen (Lunge, Leber, Skelett) außerhalb der Bauchhöhle
	N0	Kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten
	N1	Befall regionärer Lymphknoten

Tab. 1: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) und TNM (Primärtumor, *Nodi lymphatici*, Fernmetastase)

Die Stadieneinteilung nach FIGO wird in römischen Ziffern angegeben, die TNM-Klassifikation in arabischen Ziffern. Je nach Stadieneinteilung bzw. Befund wird die Therapie angepasst. Die Tabelle wurde modifiziert nach Emmert und Gerstorfer, Crashkurs Gynäkologie, 2005.

### 1.1.3 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die am häufigsten vorkommende maligne Erkrankung bei Frauen generell und gleichzeitig die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr. Der Tumor geht vom Brustdrüsengewebe aus, je nach Ursprung des Karzinoms wird zwischen duktalem und lobulärem Karzinom unterschieden. Eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt nachweislich die Entstehung eines Mammakarzinoms, allen voran ist die familiäre und genetische Disposition zu nennen. Eine Mutation der sogenannten *breast-cancer*-Gene BRCA 1 und BRCA 2 birgt für die betroffenen Patientinnen das hohe Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, von diesen Mutationen sind allerdings weniger als 0,5 % der weiblichen Bevölkerung betroffen. Der Großteil der Mammakarzinome tritt sporadisch auf, klassisches Leitsymptom ist ein derber Knoten, der oft von der Patientin selbst getastet wird. Besonders wichtig hinsichtlich der Prognose sind die Metastasierungswege des Mammakarzinoms, denn typischerweise metastasiert es bereits früh hämatogen und lymphogen. Die derzeitige Therapie der Wahl ist die Operation mit anschließender adjuvanter Radiochemotherapie, wobei die brusterhaltende Therapie der *Ablatio mammae* gegenübersteht. Bei Nachweis von Hormonrezeptoren ist auch eine Hormontherapie möglich.

## 1. Einleitung

<b>TNM</b>	<b>Kriterien</b>
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor $\leq 2$ cm
T1mic	Mikroinvasion $\leq 0,1$ cm (d.h. über die Basalmembran hinaus)
T1a	Tumorgröße $> 0,1$ und $\leq 0,5$ cm
T1b	Tumorgröße $> 0,5$ und $\leq 1,0$ cm
T1c	Tumorgröße $> 1,0$ und $\leq 2$ cm
T2	Tumorgröße $\leq 5$ cm
T3	Tumorgröße $> 5$ cm
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration der Brustwand oder Haut
T4a	Ausdehnung auf die Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur und <i>M.serratus</i> ohne <i>M.pectoralis</i> )
T4b	Infiltration der Brustwand mit Hautödem, Ulzerationen oder Hautmetastasen der ipsilateralen Brust
T4c	T4a und T4b gleichzeitig
T4d	Inflammatorisches Karzinom mit diffuser Induration der betroffenen Haut, zusätzlich erysipelähnliches klinisches Bild
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N1	Metastasen in beweglichen, ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN1a	Nur Mikrometastasen $< 0,2$ cm
pN1b	Metastasen in Lymphknoten, davon zumindest eine $> 0,2$ cm
N2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
N3	Homolaterale, verdächtige Lymphknoten supraklavikulär, infraklavikulär oder Lymphödem des Armes
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tab. 2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach TNM

Das jeweilige Stadium der Erkrankung wird anhand verschiedener Kriterien (T=Tumorgröße, N=Befall der regionären Lymphknoten, M=Fernmetastasen) eingeteilt. Die Tabelle wurde modifiziert nach Emmert und Gerstorfer, Crashkurs Gynäkologie 2005.

### 1.1.4 Tumorassoziierte Biomarker

Im Blut von Krebspatienten können im Vergleich zu Gesunden Stoffe nachgewiesen werden, die entweder vom Tumor selbst oder von den umgebenden normalen Wirtszellen als Reaktion auf die Tumorzellen gebildet werden. Diese sogenannten tumorassoziierten Biomarker können auf mRNA-, DNA- und Protein-Ebene bei Vorhandensein eines Tumors qualitativ oder quantitativ erhöht sein. Sie werden zum Teil in verschiedensten Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen, wie z. B. in Gewebe, Blut, Aszitesflüssigkeit, Speichel und Urin. Großer Vorteil von in Körperflüssigkeiten nachweisbaren Tumormarkern ist, daß ihre Gewinnung im Vergleich zu Tumorgewebe viel einfacher und für die Patienten weniger belastend ist.

Entsprechend ihrer klinischen Verwendung werden die tumorassoziierten Biomarker in fünf Kategorien unterteilt:

- Diagnostische Marker
- Prognostische Marker
- Marker zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs (*monitoring*)
- Marker zur Vorhersage des Therapieansprechens (*responder/non-responder*)
- Marker zur visuellen Darstellung in der molekularen Bildgebung (MRT/PET).

Die Tumorentwicklung ist ein relativ langsamer Prozess und oft dauert es Jahre bevor ein Tumor sich klinisch manifestiert. Ein idealer Tumor-Biomarker würde die Erkrankung in einem möglichst frühen, vielleicht sogar symptomfreien Stadium entdecken (z.B. im Rahmen von Routine-Gesundheitsuntersuchungen) wo durch eine Standardbehandlung noch hohe Heilungschancen erreicht werden können. So könnte im Optimalfall die klinische Situation eines Patienten deutlich verbessert werden, was die Länge der metastasenfren Überlebenszeit, die Gesamtüberlebenszeit und im Allgemeinen die Verbesserung der Lebensqualität betrifft (Schmitt *et al.*, 2004, Diamandis *et al.*, 2002).

## 1.2 Die Familie der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Die Bezeichnung Kallikrein wurde um 1930 von Kraut und Kollegen geprägt, und bezeichnet Enzyme, die ausgehend von einem Precursor-Protein (Kininogen) durch spezifische Proteolyse ein bioaktives Peptid (Kinin) freisetzen (Bhoola *et al.*, 1992). Kallikrein leitet sich von *kallikreas* ab, dem griechischen Wort für Bauchspeicheldrüse. Dies ist der Tatsache zu verdanken, dass erstmals in der Bauchspeicheldrüse sehr hohe Spiegel von KLK 1 nachgewiesen worden waren (Kraut *et al.*, 1930).

Die Kallikrein-verwandten Peptidasen oder auch humanen Gewebekallikreine sind die größte zusammenhängende Gruppe unter den Serinproteasen, die drei klassischen Vertreter sind Kallikrein 1 (KLK 1), die Kallikrein-verwandte Peptidase 2 (KLK 2) und das Prostata-spezifische Antigen (PSA/KLK 3). Dieses Prostata-spezifische Antigen ist das bekannteste Mitglied Kallikrein-verwandten Peptidasen und heute im klinischen Alltag als wichtigster Marker bei Diagnosefindung und Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms nicht mehr wegzudenken (Balk und Ko, 2003).

Im letzten Jahrzehnt gelang mit der Entdeckung von zwölf neuen Mitgliedern der Proteasefamilie ein großer Durchbruch (Yousef *et al.*, 1999, Yousef und Diamandis, 2001). Ende 2000 waren all diese neuen Mitglieder vollständig kloniert worden und es folgte die komplette Beschreibung des Genlokus (Gan *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2000; Yousef *et al.*, 2000). Die 12 neuen KLK-Proteasen werden analog zu den klassischen Kallikreinen mit KLK 4-15 bezeichnet. Über die geläufige Genbezeichnung hinaus existieren für die einzelnen Kallikrein-verwandten Peptidasen verschiedene Bezeichnungen (s. Tab. 3).

Nachdem KLK 3 im Rahmen der Früherkennung und Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms eine tragende Rolle spielt, lag die Vermutung nahe, dass aufgrund der großen Ähnlichkeit der Kallikrein-verwandten Peptidasen untereinander auch andere Mitglieder dieser Genfamilie bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen über- bzw. neuexprimiert werden. Man geht heute davon aus, dass sie gemeinsam mit anderen Proteasen Teil von proteolytischen Kaskaden sind, ähnlich wie andere Serinproteasen zum Beispiel bei der Blutgerinnungskaskade oder im Rahmen der intestinalen Verdauung.

Die genaue physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung der Kallikrein-verwandten Peptidasen gilt es derzeit noch immer zu klären (Borgono und Diamandis, 2004, Paliouras und Diamandis, 2006, Emami und Diamandis, 2007, Pampalakis und Sotiropoulou, 2007, Yoon *et al.*, 2007).

## 1. Einleitung

---

<b>Gen- Bezeichnung</b>	<b>Protein- Bezeichnung</b>	<b>Andere Bezeichnungen</b>
<i>KLK 1</i>	KLK 1	Gewebekallikrein, renales/pankreatisches Kallikrein
<i>KLK 2</i>	KLK 2	Kallikrein-verwandte Peptidase 2, Glanduläres Kallikrein, hGK1
<i>KLK 3</i>	KLK 3	Kallikrein-verwandte Peptidase 3, Prostata spezifisches Antigen, PSA
<i>KLK 4</i>	KLK 4	Kallikrein-verwandte Peptidase 4, PRSS17, <i>KLK-like 1</i> , <i>Enamel Matrix Serin Protease</i> (EMSP1), <i>Androgen regulated message 1</i> (ARM1), Prostase
<i>KLK 5</i>	KLK 5	Kallikrein-verwandte Peptidase 5, <i>KLK-like 2</i> , Stratum Corneum trypsin-ähnliches Enzym (SCTE)
<i>KLK 6</i>	KLK 6	Kallikrein-verwandte Peptidase 6, PRSS9, Protease M, Zyme, Neurosin, Myelenzephalon Spezifische Protease (MSP)
<i>KLK 7</i>	KLK 7	Kallikrein-verwandte Peptidase 7, PRSS6, Stratum Corneum Chymotrypsin-ähnliches Enzym (SCCE)
<i>KLK 8</i>	KLK 8	Kallikrein-verwandte Peptidase 8, PRSS19, Neuropsin, <i>tumor-associated differentially expressed gene 14</i> (TADG14), Ovasin, <i>brain serine protease 1</i> (BSP1)
<i>KLK 9</i>	KLK 9	Kallikrein-verwandte Peptidase 9, <i>KLK-like 3</i>
<i>KLK 10</i>	KLK 10	Kallikrein-verwandte Peptidase 10, <i>Normal epithelial specific-1</i> (NES1)
<i>KLK 11</i>	KLK 11	Kallikrein-verwandte Peptidase 11, PRSS20, Trypsin-ähnliche Serin-Protease (TLSP), Hippostatin
<i>KLK 12</i>	KLK 12	Kallikrein-verwandte Peptidase 12, <i>KLK-like 5</i>
<i>KLK 13</i>	KLK 13	Kallikrein-verwandte Peptidase 13, <i>KLK-like 4</i>
<i>KLK 14</i>	KLK 14	Kallikrein-verwandte Peptidase 14, <i>KLK-like 6</i>
<i>KLK 15</i>	KLK 15	Kallikrein-verwandte Peptidase 15, Prostin (ogen), ACO Protease

Tab. 3: Gen- und Proteinbezeichnungen der humanen Gewebekallikreine 1-15

Gemäß der anerkannten Nomenklatur steht die Kursivschrift für das jeweilige Gen, Standard-Großbuchstaben für das jeweilige Protein. Die Tabelle wurde modifiziert nach Yousef und Diamandis, 2003.

### 1.2.1 Serinproteasen

Serinproteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen. Zu dieser Proteasegruppe zählen unter anderem die Verdauungsenzyme Chymotrypsin, Trypsin und Pepsin, die von den Azinuszellen des Pankreas sezerniert werden.

Charakteristischerweise verfügen die Serinproteasen über einen Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms, der in Verbindung mit zwei weiteren Aminosäuren die sogenannte katalytische Triade der Serinproteasen bildet. In seiner aktiven Form kann dieser Serinrest Peptidbindungen katalytisch hydrolysieren. Nach der Aminosäuresequenz der katalytischen Reste werden die Serinproteasen weiter differenziert: Die Trypsin-ähnliche Gruppe der Serinproteasen spaltet Peptidbindungen, die auf basische Aminosäuren folgen (wie zum Beispiel Arginin oder Lysin), denn sie verfügen über einen Aspartat- (oder Glutamat-) Rest in der substratbindenden Tasche, der mit den basischen Aminosäuren starke elektrostatische Bindungen eingehen kann. Die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen haben eine unpolare substratbindende Tasche und bevorzugen eine aromatische oder unpolare Aminosäure wie Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin oder Leucin als Substrat. Serinproteasen sind in viele physiologische und pathologische Vorgänge involviert, sie spielen unter anderem bei der Blutgerinnung, Komplementaktivierung und verschiedenen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle (Horl, 1989, Yousef und Diamandis, 2002, 2003).

### 1.2.2 Nomenklatur

Die anerkannte Nomenklatur für die Kallikrein-verwandten Peptidasen lautete bis vor kurzem noch Gen (*KLK 1*, *KLK 2*, etc.) und Enzym/Protein (*K 1*, *K 2*, etc.). Um die Spezies zu kennzeichnen wurde eine Vorsilbe gebraucht, z.B. *h* (*human*) für die menschliche Spezies und *m* (*mouse*) für die Spezies der Nagetiere.

Die neue Nomenklatur bezeichnet Proteine ohne erwiesene Kininogenase-Aktivität als Kallikrein-verwandte Peptidasen. Außer *KLK 1*, das Kininogenase-Aktivität besitzt und deshalb immer noch Kallikrein 1 genannt wird, lauten die neuen Namen von *KLK 2- KLK 15* nun Kallikrein-verwandte Peptidasen, gefolgt von der Nummer des Gens. So heißt zum Beispiel *KLK 2* Kallikrein-verwandte Peptidase 2. Um zwischen Protein und Gen zu unterscheiden steht *KLK* in Standard-Großbuchstaben für das Protein, *KLK* in Kursivschrift steht für die Bezeichnung des Gens (Lundwall *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Genlokus und Genstruktur

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

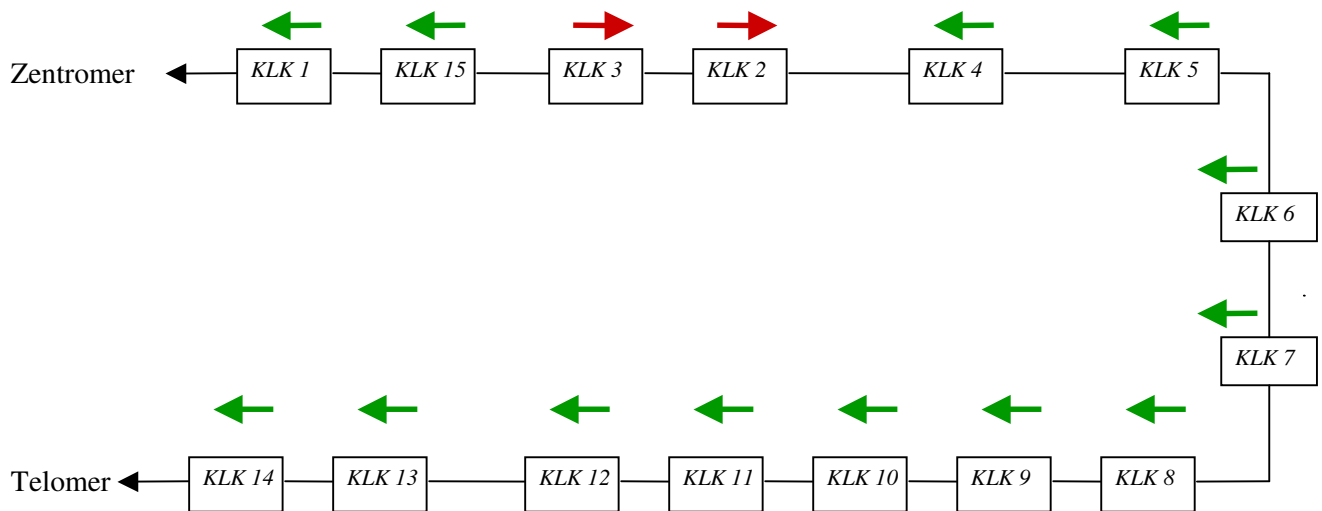


Abb. 1: Der Genlokus der humanen Gewebekallikreine

Schematische Darstellung des Genlokus der humanen Gewebekallikreine (*KLK*) auf Chromosom 19q13.4. Es sind nur die funktionalen Gene gemäß ihrer Position gezeigt, die roten und grünen Pfeile markieren die Richtung der Transkription. Mit Ausnahme von *KLK 2* und *KLK 3* werden alle Mitglieder der Genfamilie in Richtung Telomer nach Zentromer transkribiert.

Die drei klassischen Kallikreine (*KLK 1*, *2* und *3*) und *KLK 15* befinden sich in einer nur 60 kb großen Region, gefolgt von den übrigen 11 Kallikrein-verwandten Peptidasen. Die genomische Struktur ist hochkonserviert, grundsätzlich sind die kodierenden Regionen auf fünf Exons mit ähnlicher oder sogar identischer Länge verteilt. Alle Gene kodieren für wahrscheinlich sezernierte Serinproteasen mit einer typischen katalytischen Triade bestehend aus Histidin-Aspartat-Serin in den Exons 2, 3 und 5 (Yousef und Diamandis, 2001, Yousef *et al.*, 2005) und werden, mit Ausnahme von *KLK 2* und *KLK 3*, in Richtung Telomer nach Zentromer transkribiert.

**KLK Gen**

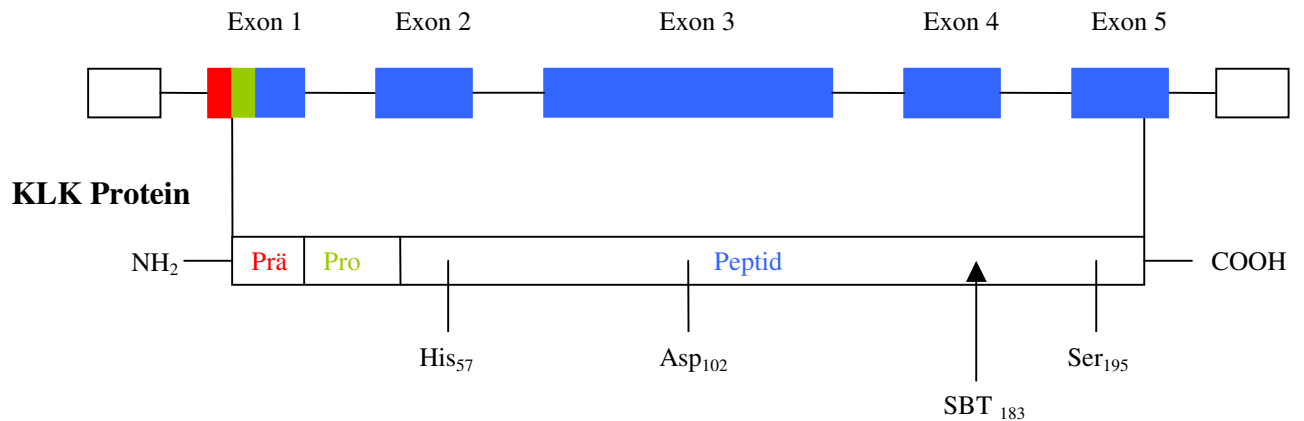


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Kallikrein-Gens bzw. -Proteins

Ein Kallikrein-Gen besteht aus 5 kodierenden Exons und dazwischen 4 Introns, die sich in einer 5-10 kb großen Region befinden. Jedes Protein wird als Prä-Proenzym synthetisiert, die katalytische Triade, bestehend aus His 57, Asp 102 und Ser 195 ist gekennzeichnet (Chymotrypsin-Nummerierung). Der Pfeil kennzeichnet die Stelle der Aminosäure in der substratbindenden Tasche (SBT), die festlegt, ob das spätere Protein Trypsin- oder Chymotrypsin-spaltende Fähigkeiten besitzt. Das relativ kurze Signalpeptid (Prä-Sequenz) besteht aus 16-33 Aminosäuren, das Pro-Peptid aus 4-9 Aminosäuren (außer bei *KLK 5* mit 37 Aminosäuren). Das mature, enzymatisch aktive Enzym besteht aus 227-252 Aminosäuren. 10-12 konservierte Cystein-Reste bilden 5 (*KLK 1-3*, *KLK 13*) oder 6 (restliche *KLK*) Disulfidbrücken.

**1.2.4 *Splice*-Varianten**

Von fast allen Kallikrein-verwandten Peptidasen existiert, mit Ausnahme von *KLK 14*, zumindest ein alternatives Transkript (sog. *Splice*-Varianten) zusätzlich zu den *full-length* mRNAs. Sie entstehen in erster Linie in den kodierenden Bereichen durch Überspringen eines Exons gefolgt von einer Exonverlängerung bzw. einem Exonabbruch. Die meisten dieser alternativen *KLK*-Transkripte kodieren wohl für verstümmelte Proteine, deren biologische und physiologische Bedeutung noch unklar ist.

Nach derzeitigem Stand der Forschung sind rund 70 alternative *Splice*-Varianten der Kallikrein-verwandten Peptidasen bekannt, die in ihrer Form einzigartig sind. PSA verfügt über die größte Zahl an alternativen Transkripten, gefolgt von *KLK 13* (Yousef *et al.*, 2005, Kurlender *et al.*, 2005).



### 1.2.5 Regulation der Genexpression

Die meisten *KLK*-Gene stehen unter steroidhormoneller Regulation, so zum Beispiel PSA, *KLK 2* und *KLK 4* (Borgono *et al.*, 2004, Paliouras und Diamandis, 2007). Bei allen drei Genen wurden sogenannte *androgen response elements* (ARE) identifiziert, die in LNCaP, einer Prostatakarzinom-Zelllinie aktiv sind (Riegmann *et al.*, 1991, Cleutjens *et al.*, 1996, 1997). Verschiedene andere *KLKs* reagieren sensibel auf hormonelle Stimulation in Tumorzellen, dazu gehören *KLK 5, 6, 10, 11, 13* und *14* (Paliouras und Diamandis, 2007). Der genaue Mechanismus, der dieser Stimulation zugrunde liegt ist bislang noch unklar.

Die Genexpression der Kallikrein-verwandten Peptidasen wird auch über die Methylierung von CpG-Inseln reguliert, einen Regulationsmechanismus, der auch als *gene-silencing* bekannt ist und dazu führt, dass diese methylierten Gene nicht abgelesen werden können (Sidiropoulous *et al.*, 2005).

### 1.2.6 Struktur und Physiologie der KLK-Proteasen

Die Kallikrein-Transkripte kodieren für *single chain* Serin-Proteasen in Form eines Prä-Proenzym. Neben den Gemeinsamkeiten auf genomischer Ebene teilen sich auch die *KLK*-Proteine einige gemeinsame Elemente:

Alle Proteine verfügen über ein Signalpeptid, ein typisches Merkmal sezernierter Proteasen, das während der Ausschleusung aus der Zelle abgespalten wird. Die Aktivierung der Proenzyme erfolgt (mit Ausnahme von *KLK 4*) durch Spaltung nach Arginin- bzw. Lysinresten durch Trypsin-ähnliche Proteasen (Paliouras und Diamandis, 2006). Elf der 15 Kallikrein-verwandten Peptidasen haben wahrscheinlich Trypsin-ähnliche Aktivität (*KLK 1-2, KLK 4-6, KLK 8, KLK 10-14*) mit einem Aspartatrest in der substratbindenden Tasche, die übrigen vier (*KLK 3, KLK 7, KLK 9* und *KLK 15*) scheinen Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen zu sein (Paliouras und Diamandis, 2006, Emami und Diamandis, 2007). Bei *KLK 3* findet sich ein Serinrest in der substratbindenden Tasche, bei *KLK 7* ein Asparaginrest, bei *KLK 9* ein Glycinrest und bei *KLK 15* ein Glutaminsäurerest. Alle Proteine beinhalten 10-12 konservierte Cysteinreste, durch die 5 (*KLK 1 - 3* und *KLK 13*) bzw. 6 (*KLK 4 - 12* und *KLK 14 - 15*) Disulfidbrücken ausgebildet werden.

## 1. Einleitung

<b>Kallikrein-verwandte Peptidase</b>	<b>Enzym-Aktivität</b>	<b>P3</b>	<b>P2</b>	<b>P1</b>	<b>P1`</b>	<b>P2`</b>
KLK 1	Trypsin-ähnlich	Q	S	<b>R</b>	I	V
KLK 2	Trypsin-ähnlich	Q	S	<b>R</b>	I	V
KLK 3	Chymotrypsin-ähnlich	L	S	<b>R</b>	I	V
KLK 4	Trypsin-ähnlich	C	S	<b>Q</b>	I	I
KLK 5	Trypsin-ähnlich	S	S	<b>R</b>	I	I
KLK 6	Trypsin-ähnlich	Q	N	<b>K</b>	L	V
KLK 7	Chymotrypsin-ähnlich	G	D	<b>K</b>	I	I
KLK 8	Trypsin-ähnlich	E	D	<b>K</b>	V	L
KLK 9	Chymotrypsin-ähnlich	D	T	<b>R</b>	A	I
KLK 10	Trypsin-ähnlich	D	T	<b>R</b>	L	D
KLK 11	Trypsin-ähnlich	E	T	<b>R</b>	I	I
KLK 12	Trypsin-ähnlich	T	P	<b>K</b>	I	F
KLK 13	Trypsin-ähnlich	S	S	<b>K</b>	V	L
KLK 14	Trypsin-ähnlich	E	N	<b>K</b>	I	I
KLK 15	Chymotrypsin-ähnlich	G	D	<b>K</b>	L	L

*Tab. 4:* Enzymaktivität und Aktivierungs-Stelle der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Dargestellt sind die Aminosäuren, die sich rund um die Aktivierungs-Stelle der verschiedenen Kallikrein-verwandten Peptidasen befinden. Mit P1, 2, 3, P1` und P2` werden die Positionen der Aminosäuren relativ zur Spaltungsschnittstelle beschrieben. Durch Spaltung nach der fettgedruckten Aminosäure an Position P1 wird das Protein aktiviert. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code angegeben.

Über die physiologischen Funktionen der humanen Gewebekallikreine im normalen Gewebe ist noch sehr wenig bekannt. Es deutet jedoch viel darauf hin, dass sie, je nachdem in welchem Gewebetyp und unter welchen Umständen sie exprimiert werden, ganz unterschiedliche Funktionen haben. Die biologische Aktivität von KLK 1 besteht zum Beispiel hauptsächlich in der Freisetzung von Lysyl-Bradykinin (Kallidin), das niedermolekulares Kininogen zu vasoaktivem Kinin spaltet, welches bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle spielt. Intakte Kininpeptide wiederum binden

an den Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor im Zielgewebe und sind für eine Vielzahl biologischer Funktionen verantwortlich: reaktive Vasodilatation, Senkung des Blutdrucks, Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur, Schmerzinduktion und Entzündungsreaktion (Bhoola *et al.*, 1992). Störungen des Gewebekallikrein-Kinin-Systems scheinen mit der Entwicklung einiger kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen direkt in Verbindung zu stehen (Sharma *et al.*, 1996). Bei Versuchen mit Knockout-Mäusen stellte sich heraus, dass Mäuse, die keine Gewebekallikreine exprimieren können, in den meisten Geweben keine signifikanten Kininspiegel erzeugen können. Sie entwickeln meist im frühen Erwachsenenalter trotz normaler Blutdruckwerte kardiovaskuläre Abnormalitäten (Meneton *et al.*, 2001). KLK 3 ist in sehr hoher Konzentration in der Samenflüssigkeit vorhanden, es hydrolysiert Semenogelin I und II sowie Fibronectin und ist maßgeblich für die Verflüssigung des Sperma verantwortlich (Lilja, 1985). KLK 5 und KLK 7 sind in Prozesse der Hornhautabschilferung involviert und werden vorwiegend in der Haut exprimiert (Borgono *et al.*, 2007).

### **1.2.7 Die KLK-Proteasen als Teil proteolytischer Kaskaden**

Serinproteasen interagieren häufig untereinander und für gewöhnlich sind einige ihrer Substrate andere Serinproteasen. Sie sind in verschiedene enzymatische Kaskaden verwickelt, das wohl bekannteste Beispiel ist die Blutgerinnungskaskade. Blutklümpchen können erst nach einer ganzen Reihe von Zymogenaktivierungen entstehen. In der Blutgerinnungskaskade katalysiert die aktivierte Form eines Faktors die Aktivierung des nächsten Faktors und aufgrund der katalytischen Natur dieses Vorgangs genügen schon kleinste Mengen des Ausgangsfaktors, um die Kaskade in Gang zu setzen. Der Sinn dieser Verstärkung ist, mit vielen kleinen Schritten eine starke Signalvervielfältigung zu erreichen und so eine rasche Reaktion des Körpers auf ein Trauma zu ermöglichen (Silverthorn, 1995). Mittlerweile ist exemplarisch gezeigt worden, dass die inaktiven Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen als Substrat für aktivierte Kallikrein-verwandte Peptidasen dienen können (Pampalakis und Sotiropoulou, 2007, Shaw und Diamandis, 2007, Yoon *et al.*, 2007). Die Grundvoraussetzung für die Existenz proteolytischer Kaskaden in denen die KLK-Proteasen eine bedeutende Rolle spielen ist somit gegeben.

### **1.2.8 Regulation der Proteinaktivität**

Es gibt drei verschiedene Mechanismen zur Aktivitätskontrolle der Serinproteasen, durch die einerseits das Auftreten unerwünschter Effekte vermieden und andererseits eine räumliche und zeitliche Regulation der proteolytischen Aktivität ermöglicht wird. Einer dieser Mechanismen funktioniert dadurch, dass die Kallikrein-verwandten Peptidasen als inaktive Prä-Proenzyme synthetisiert werden, die bei Bedarf aktiviert werden. Durch das Prosegment liegt das Protein in einer räumlich blockierenden Konformation vor, die eine Substratbindung verhindert. Darüber hinaus trägt es auch zu Faltung und Stabilität des Zymogens bei und ist wahrscheinlich auch an intrazellulären Sortierprozessen beteiligt (Khan und James, 1998). Die Aktivierung des Proenzym kann sowohl intrazellulär, in den sekretorischen Körperchen als auch nach der Sekretion extrazellulär stattfinden und erfolgt autolytisch oder durch die Aktivität eines anderen Enzyms. Nach der Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung im aktiven Zentrum und der substratbindenden Tasche, und es entsteht das aktive KLK-Protein. Die proteolytische Aktivierung eines Enzyms ist zwar ein irreversibler Schritt, es muss aber trotzdem Möglichkeiten geben, um die Enzymaktivität wieder abzuschalten. Eine dieser Möglichkeiten ist die Bindung der Kallikrein-verwandten Peptidasen an Serin-Protease-Inhibitoren, z. B. die sogenannten Serpine. Diese für gewöhnlich schwachen Substrate sind starke Inhibitoren und werden von der Protease durch Hydrolyse einer Peptidbindung aktiviert. Eine weitere Möglichkeit zur Aktivitätskontrolle erfolgt durch interne Spaltung mit anschließendem Enzymabbau, auch Autodigestionsprozesse sind bekannt.

### **1.2.9 Die Expressionsmuster der KLK-Proteasen**

Die humanen Gewebekallikreine werden in den unterschiedlichsten Organen exprimiert, manche KLKs sehr spezifisch in einzelnen Organen, andere KLKs können in vielen Organen bzw. sogar ubiquitär nachgewiesen werden (Paliouras und Diamandis 2006, Shaw und Diamandis, 2007, Emami und Diamandis, 2007). Mittlerweile ist die Koexpression ganzer Gruppen von *KLK*-Genen in verschiedenen Geweben exemplarisch erwiesen, und auch in zahlreichen Körperflüssigkeiten werden einige KLK-Gene und/oder KLK-Proteine gleichzeitig exprimiert (Shaw und Diamandis 2007, s. Tab. 5 und 6).

KLK 1 liegt in relativ hohen Konzentrationen im Gewebe von Prostata und Speicheldrüse, sowie im Speichel, der Samenflüssigkeit und im Urin vor. KLK 2 und KLK 3 finden sich in großer Menge im Prostata-Gewebe und, wie erwartet in der Samenflüssigkeit, in allen anderen Geweben und Körperflüssigkeiten ist die Expression dieser Kallikreine deutlich niedriger.

KLK 5 und KLK 7 spielen in Prozessen der Hautabschilferung nachweislich eine herausragende Rolle (Borgono et al., 2007, Pampalakis und Sotiropoulou, 2007), dementsprechend zeigen sich stark erhöhte Konzentrationen beider Proteine im Hautgewebe. KLK 6 ist in hohen Konzentrationen u. a. im Gehirn und im Speicheldrüsengewebe vorhanden, sowie in der Samenflüssigkeit, in Muttermilch, im Zytosol von Brustkrebs-Zellen, im Aszites bei Ovarialkarzinom-Patientinnen sowie in hoher Konzentration in der zervikovaginalen Flüssigkeit. KLK 9 wurde in nahezu allen untersuchten Geweben und Körperflüssigkeiten in unterschiedlich hoher Konzentrationen nachgewiesen. KLK 10, 14 und 15 werden in vielen Geweben und Körperflüssigkeiten exprimiert, jedoch immer in sehr niedriger Konzentration. KLK 12 liegt in einer Großzahl der menschlichen Geweben in einer hohen Konzentration vor, in den Körperflüssigkeiten (mit Ausnahme der zervikovaginalen Flüssigkeit) hingegen ist KLK 12 eher niedrig konzentriert.

## 1. Einleitung

KLK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Samenflüssigkeit	-	+++	++++	-	-	o	-	o	-	-	++	-	-	-	-
Muttermilch	-	o	-	o	-	+	-	-	-	-	-	-	o	o	-
Aszites v. OvarialCA	o	o	o	o	-	-	-	o	-	-	-	-	o	o	o
Speichel	-	o	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o
Zytosol v. MammaCA	o	o	-	o	o	o	-	o	-	o	o	-	o	o	o
Zervikovaginale Flüssigkeit	-	o	-	o	-	+	+	+	o	+	++	++	++	-	-
Urin	-	o	-	-	o	o	o	o	-	o	o	+	o	o	o

Tab. 5: Proteinkonzentrationen der Kallikrein-verwandten Peptidasen in Körperflüssigkeiten

Dargestellt sind die Proteinkonzentration der Kallikrein-verwandten Peptidasen 1-15 in den verschiedenen Körperflüssigkeiten. Die Körperflüssigkeiten stammten in diesem Versuch aus Routineuntersuchungen, die zervikovaginale Flüssigkeit wurde gesunden Frauen zwischen 20 und 30 Jahren entnommen. Für jede Kallikrein-verwandte Peptidase wurde ein spezifischer und sensitiver ELISA entwickelt. Einige KLK-Proteine werden in zahlreichen Körperflüssigkeiten gleichzeitig exprimiert (z.B. KLK 7, KLK 12), andere werden hingegen sehr spezifisch nur in einer oder wenigen Körperflüssigkeiten exprimiert (z.B. KLK 2, KLK 3).

Die Tabelle wurde modifiziert nach Shaw und Diamandis, 2007.

Erklärung der Symbole:

- ++++ > 100 000 µg/l
- +++ 10 000-100 000 µg/l
- ++ 1 000-10 000 µg/l
- + 100-1000 µg/l
- 1-100 µg/l
- 0 nicht nachweisbar

## 1. Einleitung

KLK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Knochenmark</b>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+++	o	o	o
<b>Knochen</b>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+++	o	o	o
<b>Gehirn</b>	-	o	+	-	-	+++	o	o	+	+	++	o	o	-	-
<b>Brustgewebe</b>	-	+	o	-	+	+	o	+	++	o	++	o	-	+	+
<b>Zervix</b>	+	o	o	+	+	+	+	-	++	-	++	++	+	-	o
<b>Kolon</b>	++	o	+	o	o	o	o	o	++	o	+	+++	o	o	o
<b>Speiseröhre</b>	+	o	o	o	+	+	++	+	+	++	++	+++	++	o	o
<b>Eileiter</b>	+	o	o	o	o	+	+	o	+	+	+	+++	-	-	o
<b>Herz</b>	-	-	+	-	-	-	++	-	+++	o	++	o	-	o	+
<b>Lunge</b>	-	o	-	o	-	-	+	o	o	+	+	+++	o	-	o
<b>Pankreas</b>	+++	o	o	-	o	o	o	o	o	o	++	o	o	o	o
<b>Prostata</b>	++	+++	+++	-	-	o	o	o	++	o	+++	o	-	-	-
<b>Speicheldrüse</b>	+++	o	o	-	+	++	+	-	o	+	++	o	+	-	+
<b>Haut</b>	+	o	-	o	+++	+	++	+	++	++	++	++	-	o	o
<b>Dünndarm</b>	++	o	+	-	o	o	+	o	++	o	+	+++	-	o	o
<b>Milz</b>	+	-	+	-	o	-	+	o	-	o	o	+++	o	o	o
<b>Magen</b>	++	o	+	o	o	+	o	o	+	o	++	+++	-	-	o
<b>Hoden</b>	+	+	++	-	+	+	o	o	++	-	+	o	-	o	o
<b>Ovar</b>	+	o	o	o	o	+	+	-	o	+	+	o	o	-	o
<b>Trachea</b>	+	o	o	o	o	-	-	o	++	+	++	+++	o	o	o
<b>Uterus</b>	+	o	o	-	o	-	o	o	++	o	+	++	-	-	o
<b>Vagina</b>	+	o	o	o	+	+	+	-	++	+	++	+++	+	+	o

Tab. 6: Proteinkonzentrationen der Kallikrein-verwandten Peptidasen in Gewebeextrakten

Dargestellt sind die geschätzten Proteinkonzentrationen der Kallikrein-verwandten Peptidasen in verschiedenen Gewebeextrakten. Die Gewebe wurden Erwachsenen und Feten unterschiedlichen Geschlechts *post mortem* entnommen, pulverisiert und die DNA anschließend extrahiert. Mittels spezieller ELISA-Verfahren wurden die Proteine kenntlich gemacht und quantifiziert. Einige KLK-Proteasen werden in mehreren verschiedenen Geweben in unterschiedlich hoher Konzentration exprimiert (z.B. KLK 11 wird in allen aufgeführten Geweben exprimiert, mit Ausnahme von Knochen, Knochenmark und Milz), andere KLK-Proteasen werden hingegen spezifisch in nur wenigen Organen in zum Teil hoher Konzentration nachgewiesen (z.B. KLK 2 und KLK 3, die beide in hoher Konzentration im Prostatagewebe exprimiert werden, in wenigen Organen noch in mittlerer bis hoher Konzentration, in vielen Organgeweben jedoch gar nicht).

Von anderer Seite betrachtet kommt es in einem Organ zur gleichzeitigen Expression von vielen KLK-Proteasen, wie zum Beispiel im Zervixgewebe, wo mit Ausnahme von KLK 2, 3 und 15 alle Kallikrein-verwandten Peptidasen exprimiert werden.

Modifiziert nach Shaw und Diamandis, 2007.

Erklärung der Symbole:   +++   >10.000 ng/g  
                                   ++    1.000-10.000 ng/g  
                                   +    100-1.000 ng/g  
                                   -    10-100 ng/g  
                                   o    nicht nachweisbar

### 1.3 Die Rolle der Kallikrein-verwandten Peptidasen im Tumorgeschehen

Die Karzinogenese ist ein komplexer Vorgang, der Veränderungen in Genstruktur und Genexpression mit sich bringt. In Tabelle 7 sind Expressionsmuster und prognostische Signifikanz aller Kallikrein-Proteine nach derzeitigem Wissensstand im Zusammenhang mit vielen malignen Tumorerkrankungen aufgeführt. Die Expression der verschiedenen Kallikrein-verwandten Peptidasen kann je nach Tumor mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose verknüpft sein.

Karzinom	KLK	Lokalisation	Expression	Klinische Relevanz
ALL	10		↓Expression (Methylierung↑) in allen ALL-Zelllinien verglichen mit normalen mononuklearen Knochenmarkzellen	Ungünstige Prognose (Überleben↓)
Gehirn	6		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit Normalgewebe	Nicht bekannt
Brust	1	Krebszellen	Nicht bekannt	Nicht bekannt
	3	Krebszellen, Serum	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem Gewebe	Günstige Prognose (Überleben↑)
	5	Serum	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz Ungünstige Prognose (Überleben↓)
	6		↓Expression in metastasierten Tumoren ↑Expression im Primärtumor, ↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	7		Nicht bekannt	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben)
	8		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	
	9		Nicht bekannt	Günstige Prognose (↓ Stadium, ↑Überleben)
	10		↓Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Expression in einer Teilmenge maligner Zelllinien	Prädiktiver Wert (bezügl. Tamoxifen-Therapie)
	12		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	13		↓Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem Gewebe	Günstige Prognose (Überleben↑)
	14	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem Gewebe ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben)
	15		Nicht bekannt	Günstige Prognose (Überleben↑)
	Zervix	7	Krebszellen	↑Expression in Tumoren verglichen mit Normalgewebe
8		Krebszellen	↑Expression in Tumor-Zelllinien und Zellen des Primärtumors verglichen mit Normalgewebe	Nicht bekannt
Kolon	1		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	6		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt



## 1. Einleitung

	8		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	10		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
Kolorektale Tumoren	6	Krebszellen	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben)
Ösophagus Karzinome	6		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
Magen-Tumoren	6	Krebszellen	↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem Gewebe	Ungünstige Prognose (↓Überleben)
	10		↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
Lungen-Krebs	5		↑Expression in squamöszelligen Tumoren verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	7		↓Expression in Adenokarzinomen, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	10	Krebszellen	↑Anwesenheit von Splice-Varianten im Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs	Nicht bekannt
	11	Krebszellen	↑Expression in einer Untergruppe neuroendokriner Tumoren (C2-Tumoren) ↑Anwesenheit von Splice-Varianten im Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs	Ungünstige Prognose (↓Überleben): Schlechtestes Ergebnis C2-Subtyp, verglichen mit anderen
Ovar	2		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	3		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom	Nicht bekannt
	4	Krebszellen, Bindegewebszellen	↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Expression in Tumorzellen in Ergüssen, verglichen mit Primärtumoren und soliden Metastasen ↑Expression in Bindegewebszellen von Primärtumoren und soliden Metastasen	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↓Überleben) Expression korreliert nicht mit Überleben Prädiktiver Wert (bezügl. Paclitaxel-Therapie)
	5	Serum, Aszites	↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Level im Serum und der Aszitesflüssigkeit von Krebspatienten verglichen mit Gesunden	Diagnostische Relevanz Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↓Überleben)
	6	Krebszellen, Serum	↑Expression in malignen und niedrigmalignen Tumoren verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom ↑Level im im Serum von Krebspatienten verglichen mit Gesunden Frauen und Frauen mit benignen Tumoren	Diagnostische Relevanz Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↓Überleben) Monitoring
	7		↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben) Günstige Prognose
	8	Krebszellen, Serum, Aszites	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz Günstige Prognose (↓Stadium, ↓Tumorgrad, ↑Überleben) Monitoring

## 1. Einleitung

	9	Krebszellen		Günstige Prognose (↓ Stadium, ↑Überleben)
	10	Krebszellen, Serum	↑Expression in malignen Tumoren und Zelllinien verglichen mit normalem und benignem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom ↑Level im im Serum von Krebspatienten verglichen mit Gesunden Frauen und Frauen mit benignen Tumoren	Diagnostische Relevanz  Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↓Überleben) Monitoring
	11	Krebszellen	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe ↑Expression in niedrig malignen serösen Tumoren verglichen mit dem serösen Karzinom ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz  Günstige Prognose (↓ Stadium, ↑Überleben)  Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben)
	13	Aszites	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe	Günstige Prognose (↓ Stadium, ↑Überleben)
	14	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz  Günstige Prognose (↓ Stadium, ↑Überleben)
	15		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignen Geweben	Ungünstige Prognose (↓Überleben)
Pankreas	1	Krebszellen, Fibroblasten, Neutrophile, Lymphozyten	Nicht bekannt	Nicht bekannt
	6		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	10		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe	Nicht bekannt
Prostata	2	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Diagnostische Relevanz
	3	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Screeningmarker, Diagnostik, Prognostik, Monitoring
	4	Krebszellen	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe	Nicht bekannt
	5		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Günstige Prognose (↓ Tumorgrad, ↓ Gleason Score)
	6		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe	Nicht bekannt
	10		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe ↑Expression in einer Untergruppe maligner Zelllinien	Nicht bekannt
	11		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit Geunden ↑Level im Serum der Krebspatienten verglichen mit dem Serum Gesunder	Diagnostische Relevanz  Günstige Prognose (↓Stadium ↓Tumorgrad, ↓Gleason Score)
	13	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit benignem und normalem Gewebe	Nicht bekannt
	14	Krebszellen	↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↑Gleason Score)
	15		↑Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↑Tumorgrad, ↑Gleason Score)

## 1. Einleitung

Nierenzellkarzinom	1	Krebszellen	Nicht bekannt	Nicht bekannt
	5	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	6	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑Expression in hochmalignen verglichen mit niedrigmalignen Tumoren	Ungünstige Prognose (↑Stadium, ↓Überleben)
	10	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑Expression in hochmalignen verglichen mit niedrigmalignen Tumoren	Nicht bekannt
	11	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Ungünstige Prognose (↑Stadium)
Hodenkrebs	5		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Günstige Prognose (↓Stadium )
	10	Krebszellen	↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
	14		↓Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt
Uterus	6	Serum	↑ Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe ↑ Expression in serös papillären Uterustumoren verglichen mit Endometriumkarzinom ↑Level im Serum von Patientinnen mit serös papillären Uterustumoren verglichen mit Patientinnen mit Endometriumkarzinom und gesunden Frauen	Nicht bekannt
	10		↑ Expression in malignen Tumoren, verglichen mit normalem Gewebe	Nicht bekannt

*Tab. 7: Expressionsmuster der Kallikrein-verwandten Peptidasen*

Unterschiedliche Expression und klinische Relevanz der Kallikrein-verwandten Peptidasen bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Aufgeführt sind die Erkrankungen mit dem Nachweis der verschiedenen relevanten Kallikrein-verwandten Peptidasen in den verschiedenen Tumorgeweben und/oder Körperflüssigkeiten. Die nach oben bzw. nach unten gerichteten Pfeile symbolisieren die vermehrte bzw. erniedrigte Expression der verschiedenen KLK-Proteasen. In der letzten Spalte ist die nach derzeitigem Wissenstand bekannte Relevanz als prognostisches, diagnostisches oder therapeutisches Mittel aufgeführt.

Die Tabelle wurde modifiziert nach Paliouras und Diamandis, 2007

### 1.3.1 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen und das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist ein äußerst aggressiver Tumor und durch eine sehr schlechte Prognose gekennzeichnet. Der tückisch schleichende Krankheitsverlauf, fehlende typische Symptome und derzeit noch nicht vorhandene Früherkennungsmethoden tragen dazu bei, dass die Diagnose meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, wo therapeutische Optionen oft nur noch begrenzt möglich und häufig wenig erfolgversprechend sind. Die Mortalitätsrate bei Patientinnen mit der Diagnose Ovarialkarzinom ist daher seit Jahren unverändert hoch (Jemal *et al.*, 2005).

Die Kallikrein-verwandten Peptidasen *KLK 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14* und *15* werden in karzinomatös verändertem Ovarialgewebe, Serum von an Ovarialkarzinom erkrankten Frauen und Ovarialkarzinom-Zelllinien auf mRNA- und/oder Protein- Ebene nachweislich vermehrt exprimiert (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Besonders die mRNA von *KLK 4* und *5* ist stark überexprimiert und dies wurde mit einer schlechten Prognose und sehr aggressiven Formen des Ovarialkarzinoms in Verbindung gebracht. Die *KLK*-Protease *6* wird in tumorösem Ovarialgewebe nachweislich signifikant überexprimiert (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Patientinnen mit erhöhtem *KLK 6*-Level im Serum sprechen schlecht auf Chemotherapie an, ihre Prognose ist vergleichsweise schlecht. Die Expression der *KLK*-Protease *7* ist im Gewebe fortgeschrittener Ovarialkarzinome im Vergleich zu Normalgewebe, benignen Ovarialtumoren und Geweben von ins Ovar metastasierten Tumoren deutlich erhöht und kann im fortgeschrittenen Krankheitsfall zur Verlaufskontrolle herangezogen werden. Bei *KLK 7*- negativen Patientinnen wurde im Vergleich zu Patientinnen mit Nachweis von *KLK 7* im Tumorgewebe eine längere symptomfreie Überlebenszeit bestätigt (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Bei Patientinnen mit erhöhter Expression von *KLK 8* im Gewebe ist die Tumorerkrankung scheinbar weniger aggressiv, die Gesamtüberlebenszeit länger und die Rückfallquote niedriger. Erhöhte Spiegel der *KLK*-Protease *8* in der Aszitesflüssigkeit scheinen mit einem langsamen Fortschreiten der Erkrankung und guten Gesamtüberlebenschancen assoziiert zu sein, und auch die *KLK 9/KLK 9*-Expression im Tumorgewebe steht für eine günstige Prognose (Obiezu und Diamandis, 2005). Die Expression von *KLK 10/KLK 10* ist beim Ovarialkarzinom mit einer schlechten Prognose verknüpft. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wird *KLK 10* im Tumorgewebe, verglichen mit normalen Epithel- oder Bindegewebszellen, deutlich überexprimiert. Hohe Konzentrationen von *KLK 10* scheinen mit dem Auftreten von Karzinomen des serösen Gewebetypus, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und der Größe des Residualtumors in

Verbindung zu stehen (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Auch im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen wurden im Vergleich zu gesunden Frauen erhöhte Konzentrationen der KLK-Protease 10 im Serum gemessen (Shvartsman *et al.*, 2003). KLK 11 und KLK 13 zeigten sich in verschiedenen Studien als unabhängige Indikatoren für einen günstigen Krankheitsverlauf (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Die Expression von *KLK 14* ist im Ovarialkarzinomgewebe herunterreguliert und scheint mit dem Fortschreiten der Erkrankung eng zu korrelieren (Yousef *et al.*, 2002, 2003). Die *KLK 15* Expression ist wahrscheinlich mit einer ungünstigen Prognose für die am Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen verknüpft (Yousef *et al.*, 2003).

In der folgenden Tabelle wird die Expression der verschiedenen Kallikrein-verwandten Peptidasen (auf mRNA- und Protein-Ebene) und ihre Relevanz als tumorassoziierte Biomarker bei am Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen übersichtlich dargestellt (s. Tab. 8).

## 1. Einleitung

<b>Kallikrein</b>	<b>Gewebe/Körperflüssigkeit</b>	<b>Status als Biomarker</b>
<i>KLK 4</i> mRNA	mRNA aus normalem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 4</i> Protein	Tumoröses Ovarialgewebe	Marker zur Resistenzentwicklung bei Therapie mit Paclitaxel
<i>KLK 5</i> mRNA/ <i>KLK 5</i> Protein	mRNA und Zytosole aus normalem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 5</i> Protein	Zytosol von Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
	Serum und Gewebe von Patienten mit Ovarialkarzinom	Diagnostischer Marker
<i>KLK 6</i> mRNA/ <i>KLK 6</i> Protein	mRNA und Proteinextrakte aus normalem, benignem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker zur Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle
<i>KLK 6</i> Protein	Zytosol von Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
	Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom	Marker zur Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle
<i>KLK 7</i> mRNA	mRNA aus Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 7</i> mRNA/ <i>KLK 7</i> Protein	mRNA und Proteinextrakte aus normalem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 8</i> mRNA	mRNA aus Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 8</i> Protein	Serum und Gewebe von Patienten mit Ovarialkarzinom	Marker zur Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle
<i>KLK 9</i> mRNA	mRNA aus Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 10</i> Protein	Serum und Gewebe von Patienten mit Ovarialkarzinom	Marker zur Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle
	Zytosol aus normalem, benignem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 11</i> mRNA	mRNA aus normalem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
<i>KLK 11</i> Protein	Zytosol von Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
	Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom	Diagnostischer Marker
<i>KLK 13</i> Protein	Zytosol von Ovarialkarzinomgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 14</i> mRNA	mRNA aus normalem, benignem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 14</i> Protein	Serum und Gewebe von Patienten mit Ovarialkarzinom	Diagnostischer Marker
<i>KLK 15</i> mRNA	mRNA aus benignem und tumorösem Ovarialgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose

Tab. 8: Expression und Relevanz der Kallikrein-verwandten Peptidasen beim Ovarialkarzinom

Tabellarische Darstellung der Kallikrein-verwandten Peptidasen (auf mRNA/ Protein-Level) und ihre Expression in den unterschiedlichen Geweben bzw. Körperflüssigkeiten bei der Erkrankung Ovarialkarzinom. In der dritten Spalte ist die nach derzeitigem Wissensstand aktuelle Relevanz als Tumormarker aufgeführt (modifiziert nach Obiezu und Diamandis, 2005).

### 1.3.2 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen und das Mammakarzinom

Nach Lungenkrebs steht Brustkrebs an zweiter Stelle in der Statistik der durch Krebs verursachten Todesfälle. Obwohl die statistischen Zahlen im Lauf der letzten zehn Jahre gerade durch Früherkennungsmethoden wie die Mammographie stark abgesunken sind, werden immer noch viele Karzinome übersehen. Es ist außerordentlich wichtig, die Diagnose Brustkrebs bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung zu stellen, denn die 5-Jahres-Überlebensraten betragen beim nicht metastasierten, lokalisierten Brustkrebs noch 97 %, bei regionaler Streuung sinken sie auf 79 % und fallen beim Vorliegen von Fernmetastasen auf 23 % ab (Jemal *et al.*, 2005). Viele neue Mitglieder der Familie der humanen Gewebekallikreine wurden bereits bezüglich ihrer Expression im Zusammenhang mit Brustkrebs untersucht. Die Expression von *KLK 5* im Gewebe scheint ein Indikator bezüglich einer schlechten Prognose zu sein, *KLK 6* Protein wird in Mammakarzinom-Zelllinien überexprimiert (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Patientinnen mit *KLK 9* positiven Tumoren haben im Vergleich zu Patientinnen mit *KLK 9* negativen Tumoren eine längere krankheitsfreie und Gesamtüberlebenszeit, was vermuten lässt dass die Expression von *KLK 9* ein guter Indikator für eine positive Prognose ist (Obiezu und Diamandis, 2005). Ein weiteres Kallikrein, dessen mRNA- Expression im Brustkrebsgewebe bereits ausführlich untersucht wurde ist *KLK 10*. Zunächst wurde *KLK 10* als Tumorsuppressor-Gen gehandelt, das bei Brustkrebserkrankungen nicht exprimiert wird. Mittlerweile ist erwiesen, daß ein kompletter Verlust der *KLK 10*-Expression für dem Tumorprogress unabdingbar ist und ein hohes Invasivitätsrisiko mit sich bringt (Paliouras und Sotiropoulou, 2007). Auch die Expression von *KLK 12* und *KLK 14* scheint im Brustkrebsgewebe erniedrigt zu sein, wobei *KLK 14* mit einer schlechten Prognose und raschem Tumorwachstum in Verbindung zu stehen scheint (Paliouras und Sotiropoulou, 2007).

Im Serum von Brustkrebspatientinnen sind die Spiegel der Proteasen *KLK 5* und *KLK 14* deutlich erhöht (Obiezu und Diamandis, 2005), *KLK 3* wird im Brustwarzenaspirat erkrankter Frauen, im Verleich zu Gesunden in niedrigerer Konzentration nachgewiesen. *KLK 6* und *KLK 10* zeigen sich im Brustwarzenaspirat und Zytosol von Brustkrebszellen stark erhöht (Sauter *et al.*, 2004). Eine Konzentrationserhöhung der *KLK*-Protease 10 im Serum scheint mit einer schlechten Prognose in Verbindung zu stehen, darüber hinaus aber auch mit einem schlechten Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie (Obiezu und Diamandis, 2005).

## 1. Einleitung

<b>Kallikrein-verwandte Peptidase (<i>KLK</i> mRNA/ <i>KLK</i> Protein)</b>	<b>Gewebe / biologische Flüssigkeit</b>	<b>Status als Biomarker</b>
KLK 3 Protein	Serum und Gewebe von Brustkrebspatienten	Marker für Diagnose und Prognose
<i>KLK 5</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
KLK 5 Protein	Serum von Brustkrebspatienten	Diagnostischer Marker
<i>KLK 7</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 9</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 10</i> mRNA	mRNA aus Gewebe eines duktales <i>Carcinoma in situ</i>	Vorhersage der Invasivität
KLK 10 Protein	Zytosol tumorösen Brustgewebes	Marker für Diagnose und Prognose
<i>KLK 13</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose
<i>KLK 14</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. ungünstiger Prognose
KLK 14 Protein	Serum und Gewebe von Brustkrebspatienten	Diagnostischer Marker
<i>KLK 15</i> mRNA	mRNA aus tumorösem Brustgewebe	Marker bzgl. günstiger Prognose

*Tab. 9:* Expression und Relevanz der Kallikrein-verwandten Peptidasen beim Mamma-Karzinom

Tabellarische Darstellung der Expression der Kallikrein-verwandten Peptidasen 1-15 (mRNA/Protein-Level) im Brustgewebe, Zytosol oder Serum von an Brustkrebs erkrankten Patientinnen (modifiziert nach Obiezu und Diamandis, 2005, Holzscheiter *et al.*, 2006). In der letzten Spalte ist der nach derzeitigem Stand der Wissenschaft gehandelte Status als tumorassoziierte Biomarker aufgeführt.



## **1.4 Zielsetzung**

Die Kallikrein-verwandten Peptidasen spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen aber auch pathologischen Prozessen, unter anderem auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Es gibt derzeit noch viele Unklarheiten in der Kallikrein-Forschung, was beispielsweise die Aktivierungswege der KLK-Proteasen betrifft oder das komplexe kaskadenartige Zusammenspiel zwischen inaktiven und aktiven KLK-Proteasen. Unbestritten aber ist ihre enorme Wertigkeit als prognostische und/oder diagnostische Tumormarker und auch ihre Relevanz als mögliche Ansatzpunkte in der Tumorthherapie wird diskutiert.

Die simultan gesteigerte Expression der KLK-Proteasen in verschiedenen Tumorgeweben bzw. Körperflüssigkeiten spricht sehr für die Existenz von kaskadenartigen Aktivierungsprozessen, die es weiter zu erforschen gilt.

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung, Expression und Rückfaltung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 um eine Grundlage zur systematischen Analyse der Aktivierungsprozesse in dieser Proteasegruppe zu schaffen.

## 2. *Material*

### 2.1 Chemikalien

Der Großteil der verwendeten Chemikalien wurde von den Firmen Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Puffer und Lösungen

#### Lösungen / Puffer

#### Zusammensetzung

Agarosegel 1%

0,4 g Agarose werden in 40 ml 1xTBE-Puffer bei 100°C gelöst und unter Rühren abgekühlt

dNTP-Mix 2,5 mM

360µl H<sub>2</sub>O

10 µl dATP, 10 µl dTTP, 10 µl dGTP 10 µl dCTP (aus jew. 100 mM Lösungen)

DNA-Marker

1 kb DNA-Leiter 25\_2030, Peqlab Biotechnologie GmbH

Protein-Marker Peq Gold

Protein-Marker I 27\_1010, Peqlab Biotechnologie GmbH

Ligationspuffer (5x)

250mM Tris/HCl pH 7,6

50mM MgCl<sub>2</sub>

5mM ATP

5mM DTT

25 % Polyethylenglycol

Ladepuffer

Glycerin 30 %

Bromphenolblau 0,25 %

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid 1 mg/l

TBE-Puffer (10 x)

0,89 M Tris-Cl pH 8,3; 0,89 M Borsäure, 0,1 M EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0

## 2. Material

---

SDS-Puffer 10 x	Glycin	288 g	
	Trisbase	60 g	
	SDS	20 g	ad 2L

### 2.3 Bakterienstämme

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

- *E.coli* XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)  
Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*[F'*proAB*, *lacI*<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]
- *E.coli* M15 [pREP4] (Zamenhof und Villarejo, 1972)  
Genotyp: *Nal*<sup>s</sup>, *Str*<sup>s</sup>, *Rif*<sup>s</sup>, *Thi*<sup>-</sup>, *Lac*<sup>-</sup>, *Ara*<sup>+</sup>, *Gal*<sup>+</sup>, *Mtl*<sup>-</sup>, *F*<sup>-</sup>, *RecA*<sup>+</sup>, *Uvr*<sup>+</sup>, *Lon*<sup>+</sup>

### 2.4 Bakterienkulturmedien

Die Nährmedien wurden bei 121 °C 20 Minuten lang autoklaviert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden dem jeweiligen Flüssigmedium 15 g Agar pro Liter Medium hinzugefügt.

LB-Medium: Bacto-Trypton 10 g; Hefeextrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7; ad 1L

LB-Selektionsmedium: Je nach Resistenz der zu züchtenden Stämme wurde zugegeben  
Ampicillin 100 µg/ml  
Kanamycin 25 µg/ml

2 x TY-Medium: Trypton 16 g; Hefeextrakt 10 g; NaCl 5 g; pH 7; ad 1L

2 x TY-Selektionsmedium: Je nach Resistenz der zu züchtenden Stämme wurde zugegeben:  
Ampicillin 100 µg/ml  
Kanamycin 25 µg/ml

## 2.5 Zelllinien

Die Zelllinien wurden aus Tumorgewebe von an Mamma- bzw. Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen isoliert (Dr. M. Debela, Protein Research Group des Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; P. Victorov und M. Valachova, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München). Die für das jeweilige aktive Kallikrein kodierenden Sequenzen waren zu Versuchsbeginn als cDNA in einen pRcRSV Vektor ligiert.

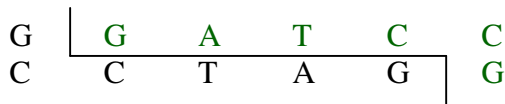
## 2.6 Plasmid

Der Vektor pQE100 (Qiagen, Hilden) gehört zur Familie der pDS Plasmide (Bujard *et al.*, 1987) und verfügt unter anderem über ein Ampicillin- Resistenzgen, eine *multiple cloning site* zur Einfügung von DNA-Fragmenten sowie das *lac* Operator Gen in zweifacher Ausführung. Als Besonderheit enthält es zwei *Tags*, sogenannte Erkennungssequenzen, die eine Identifikation des Plasmids bzw. späteren Proteins mit Hilfe von speziellen Antikörpern bzw. Ni<sup>2+</sup>-Ionen ermöglicht.

## 2.7 Primer

Für jede Proform der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 wurde ein geeigneter *forward* und *reverse* Primer entworfen. Hierfür wurde zunächst geprüft, welche der Restriktionsenzyme der *multiplen cloning site* zur Bearbeitung der Pro-Kallikrein-DNA in Frage kommen, und ob es innerhalb der interessanten Gensequenz eine Schnittstelle für sie gibt, was nicht der Fall sein soll. Zusätzliche Schnittstellen sind bei der Bearbeitung der Sequenzen eine unnötige Erschwernis, die es zu verhindern gilt. Nach ausführlicher Prüfung wurde *Sal I* als Restriktionsenzym ausgewählt, denn es konnte in keiner der Kallikrein-Prosequenzen eine zusätzliche Schnittstelle für dieses Enzym nachgewiesen werden. Alle anderen Restriktionsenzyme die entsprechend der *multiplen cloning site* zur Auswahl standen sowie *Bgl II* wiesen eine zusätzliche Schnittstelle bei mindestens einem der Pro-*KLK-Inserts* auf. Von besonderem Interesse waren die Enzyme *Bam HI* und *Bgl II*, denn die Schnittstellen dieser Enzyme können wie unten beschrieben zur Fusion gebracht werden.

## 2. Material



Schnittstelle *Bam H I*



Die fusionierten Schnittstellen *Bam H I* und *Bgl II*



Schnittstelle *Bgl II*

Wird die mit beiden Enzymen behandelte DNA bzw. werden ihre Schnittstellen zur Fusion gebracht, kann diese fusionierte DNA anschließend weder mit *Bam H I* noch *Bgl II* erneut geschnitten werden, da die Schnittstelle verändert wurde. Diesen Vorgaben folgend wurden für die verschiedenen Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen die verschiedenen Primer entworfen. Für Pro-*KLK* 5, 6, 9, 11, 12 und 13 wurden jeweils ein *forward* Primer mit einer Restriktionsschnittstelle für *Sal I* sowie ein *reverse* Primer mit einer Schnittstelle für *Bgl II* entworfen, im Falle von *KLK* 4, 7, 8, 10, 14 und 15 wurde als *forward* Primer wiederum ein Primer mit einer Restriktionsschnittstelle für *Sal I* dagegen der *reverse* Primer mit einer Schnittstelle für *Bam H I* ausgewählt. In Tabelle 10 ist die Auswahl der verschiedenen Restriktionsenzyme für jede Proform der Kallikrein-verwandten Peptidasen dargestellt.

Restriktions- Enzyme:	Pro- <i>KLK4</i>	Pro- <i>KLK5</i>	Pro- <i>KLK6</i>	Pro- <i>KLK7</i>	Pro- <i>KLK8</i>	Pro- <i>KLK9</i>	Pro- <i>KLK10</i>	Pro- <i>KLK11</i>	Pro- <i>KLK12</i>	Pro- <i>KLK13</i>	Pro- <i>KLK14</i>	Pro- <i>KLK15</i>
<b>Sal I</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Bgl II</b>	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<b>BamH I</b>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+

*Tab. 10:* Restriktion der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Tabelle der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 zur übersichtlichen Darstellung der Behandlung mit den Restriktionsenzymen *Sal I*, *Bam H I* und *Bgl II*. Das Pluszeichen symbolisiert die Restriktion mit dem jeweiligen Enzym.

### 2.7.1 Entwurf der *reverse*- Primer

Die TATA-Box am 5'-Ende mit der Sequenz AATAT dient den Polymerasen als Erkennungssequenz mit dem Signal, sich anzuheften und mit der Replikation zu beginnen. Für *KLK* 5, 6, 9, 11, 12, 13 folgt die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bgl II*; für *KLK* 4, 7, 8, 10, 14, 15 wird die Sequenz für die Schnittstelle *Bam HI* eingefügt. Anschließend an die Restriktionsschnittstelle folgen die ersten ca. 10 Basenpaare der Pro-Sequenz der jeweiligen Kallikrein-verwandten Peptidase.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') der <i>reverse</i> Primer B/G
QE100-KLK 4-B	5' - AAT ATG GAT CCA GCT GCA GCC AAA TCA TA - 3'
QE100-KLK 5-G	5' - AAT ATA GAT CTA ACA ATG ATG TTT CCT GT - 3'
QE100-KLK 6-G	5' - AAT ATA GAG CTG AGG AGC AGA ATA AGT TG - 3'
QE100-KLK 7-B	5' - AAT ATG GAT CCG AAG AAG CCC AGG GTG AC - 3'
QE100-KLK 8-B	5' - AAT ATG GAT CCC AGG AGG ACA AGG TGC TG -3'
QE100-KLK 9-G	5' - AAT ATA GAT CTG ACA CCC GTG CCA TCG GG -3'
QE100-KLK 10-B	5' - AAT ATG GAT CCG CGC TGC TCC CCC AAA AC - 3'
QE100-KLK 11-G	5' - AAT ATA GAT CTG GAG AGA CCA GGA TCA TC -3'
QE100-KLK 12-G	5' - AAT ATA GAT CTG CCA CAC CGA AGA TTT TC - 3'
QE100-KLK 13-G	5' - AAT ATA GAT CTC AGG AGT CTT CCA AGG TT - 3'
QE100-KLK 14-B	5' - AAT ATG GAT CCC AAG AGG ATG AGA ACA AG -3'
QE100-KLK 15-B	5' - AAT ATG GAT CCG CCC AGG ATG GTG ACA AG - 3'

Tab. 11: Die Nukleotidsequenzen der *reverse* Primer

QE100 steht für den Vektor pQE100, die Buchstaben B und G stehen für die Restriktionsenzyme *Bam HI* (B) und *Bgl II* (G) mit denen die Kallikreine geschnitten wurden. Die Primer beginnen mit der AATAT-Sequenz, an denen sich später die Polymerasen anheften können. Es folgen die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen und die ersten Basenpaare der Prosequenz.

### 2.7.2 Entwurf der *forward* Primer

Das 5'-Ende des Primers beginnt wiederum mit der Sequenz AATAT, gefolgt von der Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sal I*. Als Besonderheit muß eine zusätzliche Base Cytosin nach der Schnittstelle für *Sal I* eingefügt werden, da das Leseraster durch die Fusion um eine Base verschoben ist, was zu einer kompletten Leserasterverschiebung führen würde. Durch Einfügen der zusätzlichen Base gelangt das Leseraster wieder *in frame*. Anschließend folgen die ersten Basenpaare vom 3' Ende des aktiven Kallikreins

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') der <i>forward</i> Primer S
QE100-KLK 4-S	5' – AAT ATG TCG ACC ACT GGC CTG GAC GGT TT – 3'
QE100-KLK 5-S	5' – AAT ATG TCG ACC GGA GTT GGC CTG GAT GG – 3'
QE100-KLK 6-S	5' – AAT ATG TCG ACC CTT GGC CTG AAT GGT TT – 3'
QE100-KLK 7-S	5' – AAT ATG TCG ACC GCG ATG CTT TTT CAT GG – 3'
QE100-KLK 8-S	5' – AAT ATG TCG ACC GCC CTT GCT GCC TAT GA – 3'
QE100-KLK 9-S	5' – AAT ATG TCG ACC GTT CTC CAT GAT TTC TT – 3'
QE100-KLK 10-S	5' – AAT ATG TCG ACC GTT GGA GCG TAT GAC TTT – 3'
QE100-KLK 11-S	5' – AAT ATG TCG ACC ATT GTT CTT CAT CGT CT – 3'
QE100-KLK 12-S	5' – AAT ATG TCG ACC GTT GTT CCT CAT GAT CA – 3'
QE100-KLK 13-S	5' – AAT ATG TCG ACC TTG TGG GCC CTT CAA CC – 3'
QE100-KLK 14-S	5' – AAT ATG TCG ACC TTT GTC CCG CAT CGT TT – 3'
QE100-KLK 15-S	5' – AAT ATG TCG ACC GTT CCT CTT CAT GGT TTC – 3'

Tab. 12: Die Nukleotidsequenzen der *forward* Primer.

Analog zu den *reverse* Primern steht QE100 für den Vektor pQE100, in den die Nukleotidsequenzen letztendlich eingefügt werden sollen. S steht für das Restriktionsenzym *Sal I*, dessen Schnittstelle in alle Primer-Nukleotidsequenzen eingefügt wurde. Die DNA-Sequenzen beginnen wiederum mit der Erkennungssequenz für die DNA-Polymerasen gefolgt von der Schnittstelle *Sal I*.

### **3. Methoden**

#### **3.1 Klonierung der Kallikrein-verwandten Peptidasen *KLK* 3-15**

##### **3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde Mitte der 80er Jahre von Mullis und Kollegen (1987) entwickelt. Sie ist bis heute eine der wichtigsten Errungenschaften in der Molekularbiologie und ermöglicht eine millionenfache Vervielfältigung eines einzelnen DNA-Stranges. Die PCR wurde hier zur Vervielfältigung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 angewandt. Für jedes *KLK* wurden, wie bereits beschrieben, jeweils 2 Oligonukleotid-Primer entworfen, deren Sequenzen den Anfang- bzw. Endsequenzen der jeweiligen Pro-*KLK*-Protease komplementär entsprachen. Diese Primer hybridisieren an beiden Seiten des interessanten DNA-Abschnitts und limitieren so den zu vervielfältigenden Abschnitt beidseitig.

DNA-Matritze und zwei Primer genügen jedoch nicht, um eine PCR in Gang zu setzen. Hierzu ist eine thermostabile DNA-Polymerase vonnöten, die 4 Desoxy-Nukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP und dCTP sowie Magnesium-Ionen. Die *taq*-DNA-Polymerase wurde ursprünglich in einer heißen Quelle im Yellowstone National Park entdeckt und aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Sie kann länger andauernde Inkubationen bei 95 °C unbeschadet überstehen und wird in ihrer Aktivität auch während der wiederholten Denaturierungsprozesse nicht beeinträchtigt.

Zunächst wird das Gemisch von DNA-Matritze, dNTPs, Primern sowie DNA-Polymerase bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf 94 °C erhitzt und die DNA-Stränge lösen sich voneinander. Aus ursprünglich einem DNA-Doppelstrang entstehen durch hohe Temperaturen mit Hilfe der DNA-Polymerase zwei DNA-Einzelstränge, an die sich die Primer nun anlagern können. Für die *KLK*-Primer wurde die *Annealing*-Temperatur für die ersten 10 Zyklen bei 37 °C festgelegt. Diese *Annealing*- bzw. Hybridisierungstemperatur ist von größter Wichtigkeit, denn sie kann die Spezifität der Reaktion enorm beeinflussen. Ist die Temperatur zu hoch, hybridisieren die Primer nicht an die DNA. Ist sie zu niedrig gewählt, sind auch die Hybride stabil, in denen nicht alle Basen richtig gepaart sind. Es entstehen sogenannte fehlgepaarte Hybride, und die Amplifikation ist fehlerhaft. Im nächsten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Bei dieser Temperatur arbeitet die hier verwendete *High Fidelity Plus* Polymerase optimal, und so wird der erste Zyklus der DNA-Synthese vervollständigt.



### 3. Methoden

Der Kreislauf von Denaturieren, Hybridisieren und Synthese wird in der Regel 20-30mal wiederholt. Danach liegt das gewünschte DNA-Fragment in mehreren hundert Millionen Exemplaren vor.

#### *Durchführung:*

Um ein Endvolumen von 150  $\mu\text{l}$  zu erreichen, wurden folgende Substanzen zusammengemischt:

<i>High Fidelity Expand Plus</i> Polymerase	2,5 $\mu\text{l}$
<i>High Fidelity Expand Plus</i> Puffer	15 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix	15 $\mu\text{l}$
Primer <i>Sal I</i>	15 $\mu\text{l}$
Primer <i>Bgl II/ Bam H I</i>	15 $\mu\text{l}$
DNA-Template	3 $\mu\text{l}$
<i>Aqua dest.</i>	84,5 $\mu\text{l}$

Die Substanzen wurden auf Eis pipettiert und vorsichtig durchmischt. Bei vorgeheiztem Deckel wurde dann das PCR-Programm gestartet:

Anzahl der Zyklen	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit(min)	Reaktion
1	94	2	Denaturierung
10	94	30 sek.	Denaturierung
	37	30 sek.	<i>Annealing</i>
15	72	2	Elongation
	94	1	Denaturation
	50	1	<i>Annealing</i>
1	72	2	Elongation
	72	8	Elongation
1	4	$\infty$	

*Tab. 13:* Das PCR-Programm zur Amplifizierung der DNA-Fragmente

Für die hier verwendete *High Fidelity Plus* Polymerase wurden spezielle Temperaturen für die verschiedenen Phasen gewählt unter denen eine optimale Ausbeute bei der Amplifikation erreicht werden kann.

Durch Verunreinigungen im Reaktionsansatz kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Um eine Kontamination auszuschließen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, ein kompletter PCR-Ansatz, der allerdings keine DNA enthält.

#### **3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Anhand seiner Größe kann das PCR-Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden denn im auspolymerisierten Zustand bildet Agarose ein dreidimensionales Maschenwerk. Die DNA wird in das Agarosegel eingebracht und anschließend eine Spannung angelegt in der sich die kürzeren DNA-Stränge schneller auf den Pluspol zu bewegen als die längeren DNA-Stränge.

##### *Durchführung*

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurden zu 40 ml 1 x TBE-Puffer 0,4 g Agarosepulver gegeben. Diese wurde bei 100 °C geschmolzen und unter langsamem Rühren auf 50 °C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die lauwarmer Agarose wurde in die Gelschlitten gegossen und Taschenkämme wurden eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde mitsamt Gelschlitten in einer Gelkammer befestigt, die mit 1 x TBE-Puffer so aufgefüllt wurde, dass das Gel vollständig bedeckt war. Die Kämme konnten nun entfernt werden. Den DNA-Proben wurde ¼ ihres Volumens an Beladungspuffer hinzugefügt und dieses Gemisch nun vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Um später die Größe der DNA-Fragmente richtig abschätzen zu können, musste ein DNA-Marker aufgetragen werden, dessen Banden einer exakten Basenpaarlänge zugeordnet werden können. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für 1 Stunde bei Raumtemperatur und wurde unter UV-Anregung mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

#### **3.1.3 Reinigung des PCR-Produkts**

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

##### **PCI- Extraktion (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) 1:1**

Ein gängiges Verfahren, Proteine aus DNA-haltigen Lösungen abzutrennen, ist die Reinigung mit den Lösungsmitteln Phenol und Chloroform. Phenol denaturiert Proteine während es mit Nukleinsäuren nicht interagiert, und löst sich in Chloroform sehr viel besser als in Wasser. Durch den Zusatz von Chloroform wird größtenteils verhindert, dass Phenolreste in der wässrigen DNA-haltigen Phase zurückbleiben und nachfolgende Reaktionen stören könnten.

#### *Durchführung*

Die Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch durch Schütteln versetzt. Hierbei kommt es zum Ausfallen der Proteine in der Interphase, die sich zwischen der oberen wässrigen und der unteren organischen Phase befindet. Aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen bleiben die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst. Durch dreiminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit wurde eine Phasentrennung erreicht, und die sich in der oberen, wässrigen Phase befindende DNA konnte vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt werden.

#### **Verdau mit Proteinase K**

Eine einmalige PCI-Extraktion reicht nicht aus, um die DNA von allen Proteinen zu reinigen. Ein zusätzlicher Verdau mit Proteinase K, einer Serinprotease, ist hilfreich. Proteinase K spaltet peptidische Bindungen und baut damit Polypeptide zu kleineren Oligopeptiden ab, die durch eine erneute PCI-Extraktion leichter entfernt werden können.

#### *Durchführung*

Für ein DNA-Volumen von 200 µl wurden je Ansatz folgende Substanzen benötigt:

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

Die Reagenzien wurden gemischt und bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert. Durch eine darauf folgende 10minütige Inkubation bei 68 °C wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde eine erneute PCI-Extraktion wie oben beschrieben durchgeführt, um Oligonukleotide und Proteinase K wieder zu entfernen.

#### **Ethanolfällung**

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

#### *Durchführung*

Zum Präzipitieren der DNA wurde dem Ansatz 1/10 Volumen 4 M LiCl-Lösung und 2 Volumina Ethanol (100 %) zugefügt. Nach anschließendem Mischen wurde der Ansatz für mindestens 5 Minuten auf Eis oder alternativ über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die DNA wurde anschließend mit Alkohol (70 %) gewaschen und nach dem Trocknen unter Vakuum in 20 µl *Aqua dest.* gelöst.

### 3.1.4 Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von DNA werden Restriktionsenzyme verwendet. Dies sind Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung spalten. Werden Spaltungen zu analytischen Zwecken durchgeführt, so werden in einem Reaktionsansatz (10 µl) zu der gelösten DNA (1 µg) die entsprechende Menge Restriktionspuffer und 5-10 Units Enzym beigelegt. Der Ansatz wird für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Soll eine größere Menge DNA gespalten werden, die später über ein Agarosegel isoliert und ausgeschnitten wird, werden in einem Reaktionsansatz von 200 µl 5 µg gelöste DNA mit 30 Units Enzym und dem jeweiligen Restriktionspuffer vermengt. Die Inkubationszeit bei 37 °C wird auf 3 Stunden erhöht.

Bei Behandlung der DNA mit 2 verschiedenen Restriktionsenzymen hängt es von den dazugehörigen Restriktionspuffern ab, ob sie für beide Enzyme optimale Bedingungen schaffen und die Restriktion in einem Restriktionsansatz stattfinden kann. Ist dies nicht der Fall, wird die DNA zuerst mit einem Enzym gespalten und anschließend gefällt und gewaschen. Erst dann wird die zweite Restriktion durchgeführt.

*Durchführung:*

Die Restriktion mit den Enzymen *Sal I* und *Bgl II* konnte als Doppelrestriktion mit dem Puffer H (Roche), der für beide Enzyme optimale Bedingungen bietet, in einem Restriktionsansatz durchgeführt werden. Das Restriktionsenzym *Bam HI* benötigt hingegen einen völlig anderen Puffer als *Sal I*, weshalb diese Restriktion in zwei Schritten durchgeführt werden musste.

<b>Pro-KLK 5, 6, 9, 11, 12, 13</b>	<b>Pro-KLK 4, 7, 8, 10, 14, 15, pQE100</b>
Restriktion mit <i>Sal I</i> und <i>Bgl II</i>	Restriktion mit <i>Sal I</i> und <i>Bam HI</i>
Doppelverdau mit Puffer H	Nacheinander Verdau mit NEB Puffer 2 und Puffer <i>Sal</i>

Tab.14: Die Restriktion von Vektor und Insert

Übersichtliche Darstellung der Restriktionsschritte für die verschiedenen Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen, sowie für den Vektor pQE100.

### 3. Methoden

---

<u>Ansatz <i>Sal I</i> / <i>Bgl II</i></u>		<u>Ansatz <i>Bam HI</i></u>	
DNA	10 µl (5 µg)	DNA	10 µl (5 µg)
<i>Bgl II</i> (10 U/µl)	3 µl	<i>Bam HI</i> (20 U/µl)	2 µl
<i>Sal I</i> (20 U/µl)	1,5 µl	Puffer 2 (10 x)	20 µl
Puffer H (10 x)	20 µl	<i>Aqua dest.</i>	168 µl
<i>Aqua dest.</i>	165,5 µl		

<u>Ansatz <i>Sal I</i></u>	
DNA	10 µl (5 µg)
<i>Sal I</i> (20 U/µl)	2 µl
Puffer Sal (10 x)	20 µl
<i>Aqua dest.</i>	168 µl

#### 3.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um nach einer enzymatischen Spaltung bestimmte DNA-Fragmente isolieren zu können, wird die DNA elektrophoretisch getrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Das UV-Licht sollte möglichst kurz auf die DNA einwirken, da die DNA sonst Schaden nehmen kann. Mit einem sauberen Skalpell wird das Fragment der gesuchten Größe aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Die anschließende DNA-Extraktion wurde mit dem *GeneClean-Gel-Extraktions-Kit* (Macherey-Nagel) durchgeführt. Diese Methode macht sich die Bindungseigenschaften von DNA an Glas (Silika) zunutze, welche sich bei verschiedenen hohen Salzkonzentrationen verändert. Bei hoher Salzkonzentration und Zugabe von Natriumionen werden die DNA-Moleküle zunächst an Silika-Partikel gebunden. Durch mehrere Waschschrte werden Salz und Agarose entfernt, die DNA löst sich von den Silikapartikeln und kann wieder in Lösung gebracht werden.

##### *Durchführung:*

Das die DNA enthaltende Gelstück wurde mit 0,5 x Volumen *TBE-Modifier* sowie 3 Volumina Natrium-Iodid versehen und so lange bei 55 °C inkubiert bis das Gelstück völlig aufgelöst war (ca. 10 Minuten). Enthielt die Lösung 5 µg oder weniger DNA, so wurden 5 µl Glasmilch zugegeben. Die Bindung von DNA an die Silika-Matrix benötigte bei Raumtemperatur ca. 5 Minuten, während der das Gemisch vorsichtig geschwenkt wurde, um einen gleichmäßigen Kontakt der DNA- und Silikamoleküle miteinander zu ermöglichen. Die

Glasmilch mit den gebundenen DNA-Molekülen wurde anschließend 2 Minuten bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt und verworfen. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit *NEW Wash* Waschlösung gewaschen. Hierfür wurde das Pellet in 300 µl *NEW Wash* resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf den letzten Waschschrift folgte eine zweiminütige Zentrifugation unter Vakuum, um eventuell vorhandene Ethanolreste, die aus der *NEW Wash* Lösung stammten, zu entfernen. Um die DNA von der Glasmilch zu lösen, wurde das Pellet mit Wasser oder TE resuspendiert, denn beide haben die Eigenschaft DNA von ihrer Bindungsstelle an Silika-Molekülen zu verdrängen. Das Gemisch wurde zentrifugiert und die gelöste DNA konnte im Überstand abpipettiert werden.

#### 3.1.6 Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe der *T<sub>4</sub>-DNA-Ligase*. In Gegenwart von ATP und Mg<sup>2+</sup>-Ionen katalysiert die Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-OH-Ende und dem 5'-Phosphatende zweier doppelsträngiger DNA-Moleküle. Für die Ligation wird ein molares Verhältnis Vektor/Insert von 1:5 bis 1:10 gewählt. Die Konzentrationsabschätzung von Vektor und Insert erfolgt durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten im Agarose-Gel.

##### *Durchführung:*

Für den Reaktionsansatz von 21 µl wurden folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

Vektor pQE100	0,5-1 µl (50-100 ng)
DNA-Insert Pro-KLK 3-15	0,5-1 µl (150-300 ng)
5x Ligasepuffer	4 µl
ATP (10 mM)	3 µl
<i>T<sub>4</sub>-DNA-Ligase</i> (5 U/µl)	1 µl
<i>Aqua dest.</i>	11-11,5 µl

Die Reagenzien wurden durchmischt und für 3,5 h bzw. alternativ über Nacht im Wasserbad bei 25 °C inkubiert.

#### **3.1.7 Transformation**

Viele Bakterien, unter anderem auch das gramnegative Bakterium *E. coli*, sind nicht in der Lage, Fremd-DNA von außen ausreichend effizient aufzunehmen. Um die Aufnahmefähigkeit der Zellen für DNA zu steigern, wird ihre Zellwand mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallionen behandelt und so destabilisiert. Diese Zellen werden als kompetente Zellen bezeichnet.

#### **Transformation der ligierten Plasmide in *E.coli* XL1 Blue**

Fügt man DNA zu diesen kompetenten Zellen hinzu, bleibt die DNA an der behandelten Außenseite der Bakterienzellen haften. Die eigentliche Aufnahme in die Zelle hinein wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung (Hitzeschock) auf 37 °C in Gang gesetzt.

#### *Durchführung*

Die bei -80 °C eingefrorenen kompetenten Zellen wurden 20 Minuten auf Eis aufgetaut. 100 µl kompetente Zellen wurden mit 50 µl verdünntem Ligationsansatz (8 µl Ligationsansatz + 42 µl TE-Puffer) vorsichtig vermischt und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Bei 37 °C wurde 105 Sekunden lang ein Hitzeschock durchgeführt, gefolgt von einer sofortigen 5minütigen Inkubation auf Eis. Den Zellen wurde 1 ml 2 x TY-Medium zugefügt und alles sanft durchmischt. Anschließend folgte eine einstündige Regenerationsphase mit Inkubation bei 37 °C. In dieser Zeit konnten die transformierten Bakterien die jeweilige Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie bei 4600 g und RT abzentrifugiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert wurden, die das für die Selektion nötige Antibiotikum enthielt. Die transformierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Zellen, die den kompletten Vektor oder das Plasmid mit Insertion aufgenommen hatten, hatten dadurch auch das Ampicillin-Resistenzgen erworben und konnten Kolonien bilden.

#### **3.1.8 Plasmid-Präparation**

Zur Reinigung der Plasmid-DNA züchtet man eine Kultur der plasmidhaltigen Bakterien in Flüssigmedium. Die Zellen werden von Proteinen und RNA gereinigt und enthalten nach diesem Schritt Plasmid-DNA und chromosomale DNA, die in der Bakterienzelle unabhängig voneinander vermehrt werden. Diese zwei Arten von DNA gilt es zu trennen.

#### *Durchführung:*

Von den bebrüteten Agarplatten wurden mit sterilen Zahnstochern Einzelkolonien entnommen und in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. Da das Plasmid PQE100 ein sogenanntes *low copy plasmid* ist, wurden für

die Plasmid-Präparation anstelle der üblichen 1,5 ml Übernachtskultur 3-4 ml eingesetzt. Die Plasmid-Isolation erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid Isolation Kit* der Firma Macherey-Nagel. 4 ml der *E.coli* Kultur wurden 30 Sekunden bei 11000 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde nach Angaben des Herstellers mit den verschiedenen Puffern versetzt, mehrfach inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine *NucleoSpin*-Plasmid-Säule gefüllt, die zuvor in einem Sammeltube platziert worden war. Die *NucleoSpin*-Plasmid-Säule enthält eine Silika-Membran, an die die DNA bindet. Diese Silika-Membran wurde in mehreren Schritten gewaschen und getrocknet, bevor mittels eines speziellen Elutionspuffers die DNA von der Membran gelöst wurde.

#### **3.1.9 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide**

Die Restriktionsanalyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 3.1.4). Der DNA-Ansatz wurde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen versetzt, bei 37 °C ca. eine Stunde inkubiert, und das Gemisch anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der geschätzten Größe der fluoreszierenden Banden wurde das Plasmid auf das gewünschte Insert hin untersucht.

#### **3.1.10 Sequenzierung von DNA**

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Medigenomix, Martinsried, durchgeführt. Durch Sequenzierung mittels des Kettenabbruchverfahrens kann die genaue Basenfolge von DNA-Abschnitten ermittelt werden. Fluoreszierende Marker werden so an Didesoxynukleotide gekoppelt, dass jede abgebrochene Molekülkette an ihrem 3'-Ende eine einzige Markierung trägt. Für jedes der vier Didesoxy-dNTPs wird ein anderer Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die verschieden großen Fragmente werden über ein Sequenziergel aufgetrennt und laufen an einem Fluoreszenzdetektor vorbei, der die einzelnen Fluoreszenzsignale identifiziert und an einen Computer sendet, der die Information in die richtige DNA-Sequenz übersetzt.



## 3.2 Proteinexpression und Proteinreinigung

### 3.2.1 Transformation

Die rekombinanten Plasmide wurden wie oben (3.1.7) beschrieben in *E.coli* M15 [pREP4] Zellen transformiert. Dieser Stamm ist zur Herstellung von Proteinen sehr gut geeignet.

### 3.2.2 Expression der rekombinanten Plasmide

Die rekombinanten Plasmide wurden über das *QIAexpressionist*-System exprimiert. Sie enthalten außer dem interessanten Genabschnitt einige wichtige DNA-Sequenzen die die Replikation des Plasmids in der Bakterienzelle steuern und somit Transkription und Translation des Gens ermöglichen.

Der Vektor pQE100 enthält ein Promoter/Operator-Element mit einem starken T5 Promoter, der von der *E. coli*-RNA-Polymerase als die Stelle erkannt wird, an der die Transkription des Gens beginnen soll. Der T5-Promoter sorgt für eine hohe Transkriptionsgeschwindigkeit und ist eine der wichtigsten Stellen eines Expressionsvektors. In direkter Nachbarschaft liegt eine zweifache *lac*-Operator-Sequenz, die das *lac*-Repressor-Protein bindet und so eine effiziente Unterdrückung des starken T5-Promoters gewährleistet. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG) bindet an den *lac*-Repressor und inaktiviert ihn. Wird ein Kulturmedium mit IPTG beimpft, so folgt die Expression jedes Proteins, das sich stromabwärts des Promoters befindet.

Durch den pQE100-*Double-Tag*-Vektor wird an jedem Ende des exprimierten Proteins ein *Tag*, eine sog. Erkennungssequenz platziert, der 6 x *His-Tag* am N-Terminus und der *Tag*-100 am C-Terminus. Durch die 6 x *His-Tag*-Struktur wird eine auf die Expression folgende Reinigung ermöglicht, auch eine Bindung mittels spezieller Histidin-Antikörper ist möglich. Das *Tag*-100-Epitop kann mit einem speziellen *Tag*-100-Antikörper identifiziert werden und macht das Protein für weiterführende Untersuchungen mittels ELISA zugänglich. Nach erfolgter Transformation und Vermehrung der Wirtszelle wird durch Induktion gezielt die Transkription des Gens ausgelöst. Das gewünschte Protein entsteht durch Translation der gebildeten mRNA in großen Mengen.

#### *Durchführung:*

Zur Anzucht der Klone *E.coli* M15 (pREP4) mit pQE100-Plasmid wurden 5 ml Übernachtskultur aus LB-Selektionsmedium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) und Kanamycin (25  $\mu$ g/ml) verwendet. Für die Hauptkultur wurde 2 x TY-Selektionsmedium verwendet, das im Vergleich mit LB-Medium bei vorherigen Proteinexpressionen zu besseren Ergebnissen geführt hatte. 250 ml Hauptkultur wurden mit 5 ml der Übernachtskultur beimpft und bei

37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach einer Stunde wurde im Abstand von 20 Minuten die OD<sub>600</sub> gemessen. Bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 wurden 500 µl IPTG zugefügt, so dass die Endkonzentration 2 mmol betrug. Nach der Zugabe von IPTG wurde die Kultur für weitere 4-5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend geerntet (RT, 4000 g, 20 min). Die Zellen wurden über Nacht bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitäts-Chromatographie

Die in M15-Bakterien exprimierten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 3-15 tragen am N-Terminus sechs Histidin-Einheiten, die eine große Affinität zu Nickel-NTA (Nitrilotriessigsäure)-Agarose aufweisen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine säulenchromatographische Reinigung der überexprimierten Proteine an Ni<sup>2+</sup>-NTA mittels IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*). NTA ist ein Chelatbildner, der vier der sechs freien Bindungsstellen des Nickel-Ions besetzt. Zwei Bindungsstellen bleiben frei und können mit dem 6 x His-Tag interagieren. Die Proteine bleiben solange an die NTA-Agarose gebunden, bis durch Senkung des pH-Werts auf ca. pH 4,5 eine Lösung der Proteine erfolgt. Bei niedrigem pH-Wert werden die Histidin-Reste protoniert und können dadurch nicht mehr an die Nickelionen binden. Durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol (0,53 µl/ml) zu jedem Puffer wird eine Bildung von Disulfid-Querverbindungen verhindert.

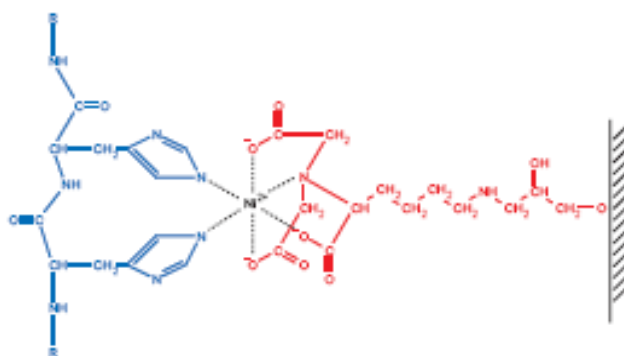


Abb 3: Prinzip der Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Interaktion zwischen dem benachbarten 6 x His-Tag (blau dargestellt) und der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix (rot dargestellt). Entnommen aus *Qiaexpressionist*, Qiagen, 6/2003, S.19

#### Durchführung:

**Vorbereitung der Chromatographiesäulen:** Die bei 4 °C gelagerte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde durch Schütteln völlig resuspendiert, und die Chromatographiesäulen mit jeweils 5 ml des Gemisches befüllt. Nach Absinken der Agarose (ca. 30 Minuten) wurde die untere Kappe

der Säulen geöffnet und der Überstand konnte abfließen. Die Säulen wurden mit 20 ml Puffer A äquilibriert.

**Vorbereitung des Zell-Lysats:** Die Zellpellets wurden 30 Minuten auf Eis aufgetaut und abgewogen. Pro ein Gramm nassen Zellpellets wurden 5 ml Puffer A zugegeben, die Reaktionsgemische blieben mindestens eine Stunde, alternativ über Nacht auf dem Rotator. Durch 30minütige Zentrifugation bei RT und 10 000 g wurde das klare, proteinhaltige Lysat von den Zellresten getrennt und die vorbereitete Säule damit befüllt. Sobald die Agarose wieder vollständig abgesetzt war, wurde die untere Kappe geöffnet und das Lysat durchlief langsam die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Es folgten 5 Waschschritte, zunächst mit 20 ml Puffer A, dann mit jeweils 12 ml Puffer B, C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> und 6 ml Puffer C<sub>3</sub>. Anschließend wurden die Proteine eluiert, beginnend mit 6 ml Puffer D<sub>1</sub> und 3 ml D<sub>2</sub>, gefolgt von 5 Fraktionen à 2 ml Puffer E<sub>1</sub> und 2 Fraktionen Puffer E<sub>2</sub> à 1,5 ml. Der pH-Wert der Puffer wurde, beginnend mit pH 8 bei Puffer A/B, mit Hilfe von HCl verschiedener Konzentration nach und nach auf pH 4 bei Puffer E<sub>2</sub> reduziert. Die Proben wurden zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

<b>Waschpuffer</b>		
Puffer A	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-Cl 6 M GuHCl	pH 8
Puffer B	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-Cl 8 M Urea	pH 8
Puffer C <sub>1</sub>	Wie Puffer B	pH 7
Puffer C <sub>2</sub>	Wie Puffer B	pH 6,6
Puffer C <sub>3</sub>	Wie Puffer B	pH 6,3
<b>Elutionspuffer</b>		
Puffer D <sub>1</sub>	Wie Puffer B	pH 5,9
Puffer D <sub>2</sub>	Wie Puffer B	pH 5,5
Puffer E <sub>1</sub>	Wie Puffer B	pH 4,5
Puffer E <sub>2</sub>	Wie Puffer B	pH 4,0

Tab. 15: Die verschiedenen Wasch- und Elutionspuffer

Darstellung der verschiedenen Wasch- und Elutionspuffer, mit Hilfe derer die Proteine in Anwesenheit von Nickel affinitätschromatografisch getrennt werden. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von HCl verschiedener Konzentrationen von anfänglich pH 8 auf pH 4 gesenkt.

#### 3.2.4 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

*Durchführung:*

**Herstellung der Gele:** Die Glasplatten der Apparatur wurden mit SDS 10 % gereinigt und mit Ethanol entfettet, die Apparatur wurde gemäß den Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Ein 13 %iges Trenngel wurde so zwischen die Glasplatten gefüllt, dass die oberen 2 cm frei blieben und mit SDS 0,5 % überschichtet wurden. Nach der Auspolymerisation des Gels wurde das SDS abgegossen und Reste vollständig entfernt. Ca. 3 ml der Sammelgel-Stammlösung wurden mit 50  $\mu$ l APS und 10  $\mu$ l TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm wurde eingesetzt. Nach Aushärten des Gels wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Puffer befüllt. Der Probenkamm wurde entfernt und die entstandenen Geltaschen mit den vorbereiteten Proben befüllt.

#### Trenngel 13 % (1 mm)

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,16 ml
SDS 10 %	0,05 ml
<i>Aqua dest.</i>	2,16 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	1,75 ml
APS	40 µl
TEMED	5 µl

#### PAA-Sammelgel (5 %) Stammlösung

<i>Aqua dest.</i>	11,95 ml
Tris-Cl 0,5M (pH 6,8)	5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,5 ml
SDS 10 %	200 µl

#### **Vorbereitung der Proben**

Die Proteinproben wurden mit 3 x reduzierendem Proteinpuffer versetzt. Dieser Puffer enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol, um eine Reduktion der Disulfidbrücken zu erreichen. Zu 10 µl Protein wurde 5 µl 3 x reduzierenden Beladungspuffer hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und auf Eis kurz abgekühlt. Die Geltaschen wurden mit den Proteinproben sowie einem Größenstandard (Protein Marker *Peq Gold* der Fa. Peqlab) beladen, die Auftrennung der Proteine erfolgte ca. 2 Stunden bei 150 V Elektrodenspannung.

#### **3.2.5 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

Nach der Auftrennung der Proteine können diese direkt im Gel gefärbt werden. Der meistverwendete Farbstoff ist Coomassie *Blue*. Mit diesem Farbstoff kann eine Nachweisempfindlichkeit von 1 µg bis 0,1 µg erreicht werden.

##### *Durchführung:*

Die Proteine wurden hierbei zunächst in einer Fixierlösung, bestehend aus einem Ethanol-Essigsäure-Wassergemisch denaturiert und ausgefällt. Es folgte eine mindestens einstündige Inkubation in der Färbelösung mit anschließender 20-25stündiger Inkubation in Entfärbelösung. Vor der Geltrocknung musste das Gel ca. 30 Minuten in Dehydrierlösung geschwenkt werden, bevor es im Geltrockner bei 2 x 45 Minuten und 60 °C vollständig getrocknet wurde.

### 3. Methoden

#### Fixierlösung

Ethanol 70 %	200 ml
Essigsäure 96 %	50 ml
<i>Aqua bidest</i>	250 ml

#### Färbelösung

Essigsäure 96 %	20 ml
Coomassie	20 mg

#### Entfärbelösung

<i>Aqua bidest</i>	900 ml
Essigsäure 96 %	100 ml

#### Dehydrierlösung

<i>Aqua bidest</i>	700 ml
Glycerin	50 ml
Ethanol 70 %	250 ml

### 3.2.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

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

#### *Durchführung:*

Das Polyacrylamidgel wurde für ca. 20 Minuten in Fixierlösung geschwenkt und anschließend 2 x 5 Minuten mit *Aqua bidest* gewaschen. Es folgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur in *Farmer's Reducer* (eine Spatelspitze in 20 ml *Aqua bidest*), danach wurde das Gel 6 x 10 Minuten in *Aqua bidest* gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift folgte eine 30minütige Inkubation in 0,1 %iger Silbernitratlösung und anschließend ein kurzes Waschen in *Aqua bidest*. Das Gel wurde dann 15-20 Minuten lang in Entwicklerlösung inkubiert und die Färbung bei ausreichender Bandenintensität, mit Essigsäure 10 % gestoppt.

#### Silber-Fixierlösung

Ethanol 100 %	5 ml
<i>Aqua bidest</i>	5 ml
Essigsäure 96 %	1 ml

#### Farmer's Reducer

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	16 g
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	10 g

#### Entwicklerlösung

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 2,5 %	20 ml
Formaldehydlösung 37 %	20 $\mu\text{l}$

#### Silbernitratlösung

0,1 % $\text{AgNO}_3$
-----------------------

### 3.3 Rückfaltung der exprimierten Proteine

#### 3.3.1 Allgemeines

Die meisten Proteine sind nur dann biologisch aktiv, wenn sie in ihre 3D-Konfiguration gefaltet sind. Da es keinen universalen Rückfaltungspuffer gibt, müssen für jedes Protein bestimmte Rückfaltungsbedingungen festgelegt werden.

Jede Probe wurde zu Beginn der Rückfaltung mit 2 M DTT-Lösung versetzt, um alle eventuell bestehenden Disulfidbrücken zu lösen und das Protein somit komplett zu entfalten. Bei der Wahl des Dialyseschlauchs ist zu berücksichtigen, dass die Porengröße des Schlauches möglichst 1/3 des Molekulargewichts nicht übersteigen soll. Im Falle der KLK-Proformen wurde eine Porengröße mit 6-8 kD Molekulargewicht gewählt. Nach Berechnung der benötigten Schlauchlänge wurden die Dialyseschläuche zurechtgeschnitten und für ca. 5 Minuten in *Aqua dest.* eingeweicht.

Reagenzien	Wirkung für die Rückfaltung
Harnstoff	Stabilisierung der Löslichkeit des Proteins, Denaturierung
MgCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub>	Zweiwertige Ionen
Tris/HCl	Erzeugen des benötigten pH
GSH/GSSH	Redoxsystem
Glycin	gute Löslichkeitseigenschaften
Tween20	Detergenz
HEPES	organisches Pufferreagens zum Erhalt des physiologischen pH
L-Arginin	Unterdrückung der Proteinaggregation und damit Erhöhung der Ausbeute an nativem Protein
Saccharose	Stabilisierung des Proteins

Tab. 16: Verschiedene Rückfaltungszusätze und ihre Wirkung

Die verschiedenen zur Rückfaltung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen verwendeten Reagenzien sowie ihre Wirkung.

**3.3.2 Rückfaltungsprotokoll Nr. 1***Durchführung:*

Es wurde jeweils 1 ml Fraktion in einen Dialyseschlauch gefüllt. Die Proben wurden so ausgewählt, dass der Proteingehalt jeder Fraktion bei ca. 0,1-1 mg/ml lag. Jede Probe wurde mit 2 M DTT-Lösung (Endkonzentration 10 mM) versetzt und für 4 Stunden sanft durchmischt. Anhand der Probenvolumina wurde das Puffervolumen berechnet, das mindestens das 100fache der Probenvolumina betragen sollte.

	14 x 1 ml	=	14 ml Probenvolumen
+	14 x 25,6 µl DTT	=	358,4 µl DTT
		=	ca. 14,5 ml x 100 = ca. 1,5 L Puffervolumen

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl	pH 8,0 (8-24 Stunden bei 4 °C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSG	pH 8,0 (40 Stunden bei 4 °C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	1 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSG	pH 8,0 (30-40 Stunden bei 4 °C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	300 mM NaCl 50 mM Tris-Cl	pH 8,0 (12-24 Stunden bei 4 °C)
<b>5. Lagerungspuffer</b>	100 mM NaCl 50 mM Tris-Cl	pH 8,0 (12-24 Stunden bei 4 °C)

Tab. 17: Rückfaltungsprotokoll Nr. 1

Die verschiedenen Pufferzusammensetzungen für die Rückfaltung Nr. 1. Die Dialyseschläuche wurden nacheinander in die verschiedenen vorgekühlten Puffer überführt und für die angegebene Zeit in diesem belassen.



### 3.3.3 Rückfaltungsprotokoll Nr. 2

#### Durchführung:

Es wurde wie bei Rückfaltungsprotokoll Nr. 1 wiederum je 1 ml Fraktion zum Einsatz gebracht. Der Proteingehalt der ausgewählten Fraktionen wurde auf ca. 0,1-1 mg/ml geschätzt.

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 µm ZnCl <sub>2</sub> 5 mM GSH	pH 8,0 (8-24 Stunden bei 4 °C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 µM ZnCl <sub>2</sub> 5 mM GSH 0,5 mM GSSG 50 mM Glycin 0,005% Tween 20	pH 8,0 (30-40 Stunden bei 4 °C)
<b>3. Lagerungspuffer</b>	300 mM NaCl 50 mM Tris-Cl	pH 8,0 (12-24 Stunden bei 4 °C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	100 mM NaCl 50 mM Tris-Cl	pH 8,0 (12-24 Stunden bei 4 °C)

Tab. 18: Rückfaltungsprotokoll Nr. 2

Die verschiedenen Puffer der Rückfaltung Nr. 2. Die Dialyseschläuche wurden nacheinander in die verschiedenen vorbereiteten und bei 4 °C temperierten Puffer überführt. Je nach Zeitangabe wurden sie in den Puffern für 8 bis 40 Stunden belassen.

### 3.3.4 Rückfaltungsprotokoll Nr. 3

Das Rückfaltungsprotokoll der Rückfaltung Nr. 3 entsprach exakt dem Rückfaltungsprotokoll Nr. 1, jedoch wurden die Proteinkonzentrationen der getesteten Fraktionen stark verringert um eine Aggregation zu vermeiden.

### 3.3.5 Rückfaltungsprotokoll Nr. 4

*Durchführung:*

Für Rückfaltung Nr. 4 wurden Proteinkonzentrationen von ca. 100-200 µg/ml gewählt. Die Proben wurden wiederum mit 1 mM DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzt und nach ca. 8 Stunden Rotation bei Zimmertemperatur in einen geeigneten Dialyseschlauch gefüllt.

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl	pH 8,0 (12 Stunden bei 4°C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 50 mM Tris-Cl 300 mM NaCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM GSH 0,5 mM GSSH 50 mM Glycin 0,005% Tween20	pH 8,0 (32-40 Stunden bei 4°C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	1 M Urea 150mM NaCl 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSH	pH 8,0 (20-30 Stunden bei 4°C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM TrisCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,005%Tween20	pH 8,0 (12 Stunden bei 4°C)

Tab. 19: Rückfaltungsprotokoll Nr. 4

Die verschiedenen Puffer der Rückfaltung Nr. 4. Die Dialyseschläuche wurden nacheinander in die verschiedenen Puffer überführt und für die angegebene Zeit in dem jeweiligen Puffer belassen.

### 3.3.6 Rückfaltungsprotokoll Nr. 5

#### Durchführung:

Für die Rückfaltung Nr. 5 wurden wiederum Proteinkonzentrationen von ca. 100-200 µg/ml gewählt. Nach Versetzen mit 1 mM DTT-Lösung (Endkonzentration 10 mM) wurden die Proben wie bereits oben beschrieben für ca. 8 Stunden auf dem Rotator sanft geschwenkt und nach Ablauf dieser Zeit in den ersten Puffer überführt.

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris 300 mM NaCl	pH 8,0 (24 Stunden bei 4 °C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 50 mM Tris 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM CaCl <sub>2</sub> 150 mM NaCl 50 mM Glycin 5 mM Saccharose 2,5 mM Gluthathion red. Form 0,25 mM Gluthathion ox. Form 0,005% Tween 20	pH 8,0 (32 Stunden bei 4 °C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	1 M Urea 50 mM TrisCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM CaCl <sub>2</sub> 150 mM NaCl 50 mM Glycin 5 mM Saccharose 0,005 % Tween 20	pH 8,0 (24 Stunden bei 4 °C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM Tris 0,005 % Tween 20	pH 8,0 (48 Stunden bei 4 °C)

Tab.20: Rückfaltungsprotokoll Nr. 5

Die verschiedenen Puffer und ihre Zusammensetzung für die Rückfaltung Nr. 5. Die Dialyseschläuche wurden der Reihe nach in die verschiedenen Rückfaltungs- und Lagerungspuffer überführt. Als Besonderheit enthielt der 2. Rückfaltungspuffer das Redoxsystem Gluthathion in oxidiert und reduzierter Form. Alle Puffer waren auf 4 °C temperiert, die Schläuche wurden je nach angegebener Zeit in den Puffern belassen.

**3.3.7 Rückfaltungsprotokoll Nr. 6***Durchführung:*

Auch für die Rückfaltung Nr. 6 wurde die Proteinkonzentrationen mit ca. 100-200 µg/ml gewählt. Nach Versetzen der Proben mit 1 mM DTT und anschließend 8stündiger Inkubation auf dem Rotator wurden die vorbereiteten Dialyseschläuche mit den Proben beschickt.

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Hepes 300 mM NaCl	pH 7,5 (24 Stunden bei 4°C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 150 mM NaCl 50 mM Hepes 50 mM Glycin 1 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM L-Arginin 5 mM Gluthathion red.Form 0,25 mM Gluthathion ox. Form 0,005 % Tween 20	pH 7,5 (32 Stunden bei 4°C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM Hepes 50 mM Glycin 1 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM L-Arginin 5 mM Gluthathion red. Form 0,25 mM Gluthathion ox. Form 0,005 % Tween 20	pH 7,2 (32 Stunden bei 4°C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM Tris 0,005 % Tween 20	pH 8,0 (48 Stunden bei 4°C)

*Tab. 21:* Rückfaltungsprotokoll Nr. 6

Darstellung der verschiedenen Rückfaltungs- und Lagerungspuffer der Rückfaltung Nr. 6. Die Proben in den Dialyseschläuchen wurden nacheinander in die verschiedenen Puffer überführt. Auch in diesem Rückfaltungsprotokoll wurde die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer variiert, so enthalten die Rückfaltungspuffer 2 und 3 neben dem Gluthathion-Redoxsystem L-Arginin, das die Proteinaggregation unterdrücken soll um die Ausbeute an nativem Protein zu erhöhen

**3.3.8 Rückfaltungsprotokoll Nr. 7***Durchführung:*

Für Rückfaltung Nr.7 wurden Proteinkonzentrationen der Proben von ca. 100-200 µg/ml gewählt. Die Proben wurden wiederum mit 1 mM DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzt und nach ca. 8 Stunden auf dem Rotator in die jeweiligen Puffer überführt

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris 300 mM NaCl	pH 8,0 (24 Stunden bei 4 °C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 100 mM NaCl 50 mM Hepes 2 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM Glycin 5 mM Gluthathion red. Form 0,5 mM Gluthathion ox. Form 100 mM L-Arginin 0,005 % Tween 20	pH 7,4 (32 Stunden bei 4 °C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	100 mM NaCl 50 mM Hepes 2 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM Glycin 5 mM Gluthathion red. Form 0,5 mM Gluthathion ox. Form 100 mM Arginin 0,005 % Tween 20	pH 7,4 (32 Stunden bei 4 °C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM Tris 0,005 % Tween 20	pH 8 (48 Stunden bei 4 °C)

Tab. 22: Rückfaltungsprotokoll Nr. 7

Das Rückfaltungsprotokoll Nr. 7 mit den verschiedenen zusammengesetzten Rückfaltungs- und Lagerungspuffern. Die Dialyseschläuche wurden wiederum der Reihe nach in die verschiedenen vorgekühlten Puffer überführt.

### 3.3.9 Rückfaltungsprotokoll Nr. 8

#### Durchführung:

Auch für die letzte Rückfaltung wurde eine Proteinkonzentration von ca. 100-200 µg/ml gewählt und entsprechend verdünnt. Nach Versetzen der Proben mit 1 mM DTT und 8stündiger Inkubation auf dem Rotator wurden sie in Dialyseschläuche gefüllt und in die jeweiligen Puffer überführt.

<b>1. Rückfaltungspuffer</b>	4 M Urea 50 mM Tris 300 mM NaCl	pH 7,5 (24 Stunden bei 4 °C)
<b>2. Rückfaltungspuffer</b>	2 M Urea 350 mM NaCl 50 mM Hepes 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Glycin 5 mM Gluthathion red. Form 0,5 mM Gluthathion ox. Form 20 mM L-Arginin 20 mM Saccharose 0,005 % Tween 20	pH 7,5 (32 Stunden bei 4 °C)
<b>3. Rückfaltungspuffer</b>	350 mM NaCl 50 mM Hepes 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Glycin 5 mM Gluthathion red. Form 0,5 mM Gluthathion ox. Form 20 mM Arginin 20 mM Saccharose	pH 7,5 (32 Stunden bei 4 °C)
<b>4. Lagerungspuffer</b>	150 mM NaCl 50 mM Tris 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0,005% Tween 20	pH 8,0 (48 Stunden bei 4 °C)

Tab. 23: Die verschiedenen Puffer mit ihren unterschiedlichen Zusammensetzungen für die Rückfaltung Nr. 8. Auch dieses Protokoll variiert in Zusammensetzung und pH-Wert der Rückfaltungs- und Lagerungspuffer. Die Dialyseschläuche wurden in die verschiedenen Puffer überführt und gemäß der Zeitangabe in diesen Puffern belassen.

#### **3.3.10 Aufkonzentrieren der rückgefalteten Proteine**

Konnten nach Abschluß der Rückfaltung nur geringe Mengen an Protein rückgefaltet werden, so besteht die Möglichkeit, die Proteinkonzentration höher zu zentrifugieren. Hierfür werden die Proben mit geringer Proteinkonzentration in ein spezielles Behältnis überführt, das eine Membran mit einer bestimmten Porengröße enthält. Durch Zentrifugation können überschüssiges Wasser und Puffersubstanzen durch diese Poren abzentrifugiert werden, wohingegen die Proteine die Membran nicht passieren können.

##### *Durchführung:*

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

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Klonierung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Zur Klonierung der Pro-KLK-Proteasen wurden die jeweiligen Inserts amplifiziert, mit geeigneten Restriktionsenzymen behandelt und in den vorbereiteten Vektor pQE100 ligiert.

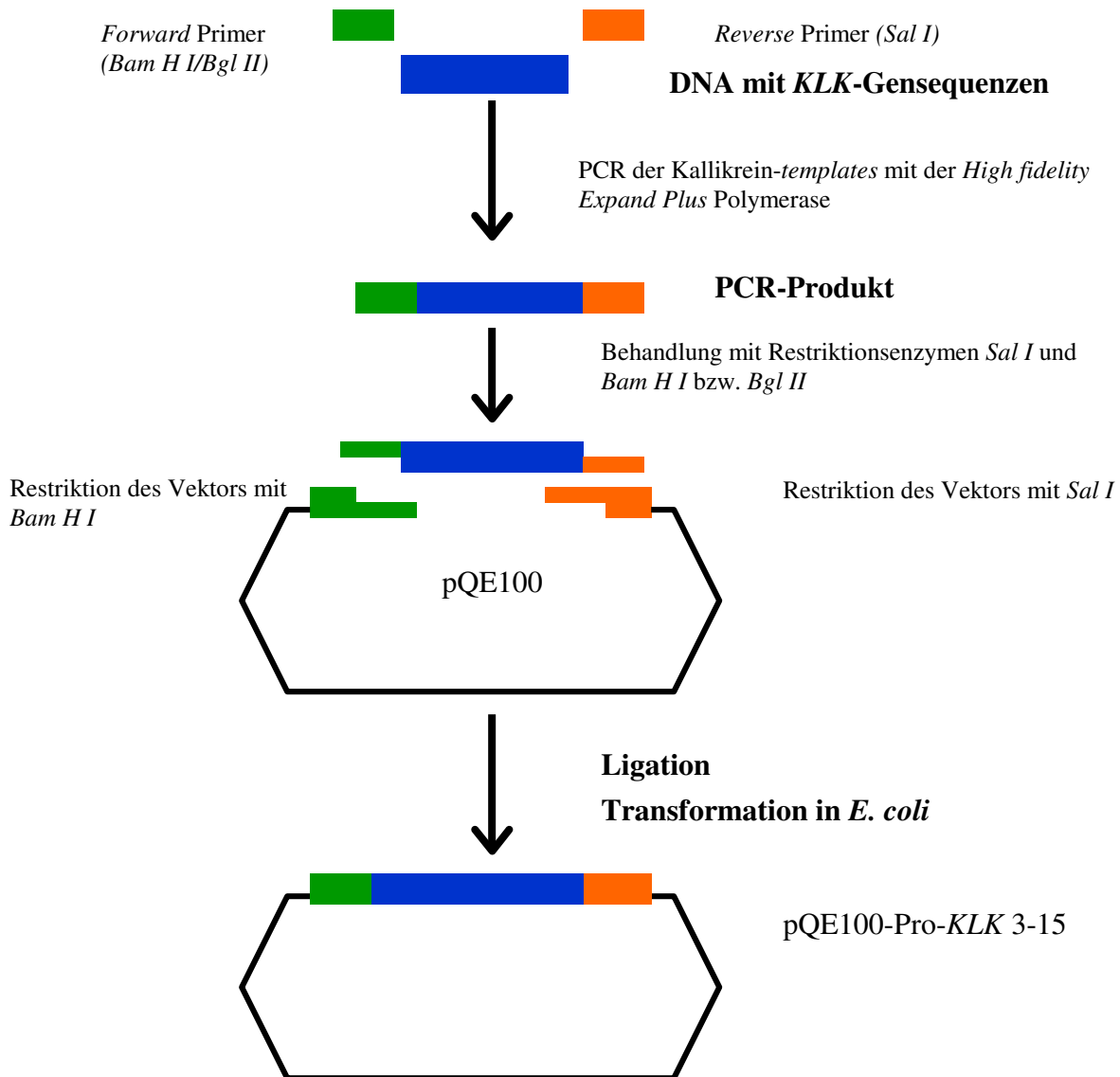


Abb. 4: Schematische Darstellung der Konstruktion des Expressionsplasmids pQE100/Pro-KLK 3-15.

Zur Vervielfältigung der *templates* wurden jeweils geeignete *forward* und *reverse* Primer entworfen. PCR-Produkt und Vektor wurden anschließend mit Restriktionsenzymen behandelt um eine spätere Ligation von Vektor und Insert zu ermöglichen. Die Auswahl der Restriktionsenzyme gestaltete sich insofern problematisch da die untersuchten Pro-KLK-Sequenzen für alle gängigen Restriktionsenzyme interne Schnittstellen aufwiesen. Als Lösung dieses Problems wurde eine Kombination von drei Restriktionsenzymen ausgewählt, einerseits *Sal I*,



## 4. Ergebnisse

---

*Fortsetzung der Legende von Abb. 4:*

andererseits die Kombination aus *Bam H I* und *Bgl II*. Die Besonderheit an diesen beiden Restriktionsenzymen ist, dass eine *Bam H I* Schnittstelle mit einer *Bgl II* Schnittstelle fusioniert werden kann (zur exakten Darstellung der Methode siehe 2.7 und 3.4.1). Die fusionierte Stelle kann nach allerdings danach mit keinem der beiden Enzyme erneut gespalten werden. Der Vektor pQE100 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sal I* und *Bam H I* behandelt, und das mit *Sal I* und *Bam H I* bzw. *Bgl II* behandelte PCR-Produkt wurde in den Vektor ligiert. Das fertige Expressionsplasmid wurde schließlich in *E. coli* transformiert.

Folgende Pro-KLK-Proteasen wurden kloniert: Die Pro-KLK-Proteasen 3-15 sowie eine anerkannte *Splice*-Variante von Pro-KLK 15. Diese Variante wird als *ntfl* entsprechend *near to full length* bezeichnet, die Wildtyp-Form als *fl*, entsprechend *full length*.

Stellvertretend für die Klonierung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 werden im Folgenden die einzelnen Schritte einer Klonierung am Beispiel der *KLK*-Proformen 4, 5, 6, 7, 9 und 13 dargestellt.

#### 4.1.1 Vervielfältigung der Pro-*KLK*-cDNA mittels PCR

Die mRNA der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 wurde von Petar Viktorov, Martina Valachova (Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar, München) und Dr. Mekdes Debela (*Protein Research Group* des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried) aus Mamma- bzw. Ovarialkarzinomgewebe sowie Keratinozyten isoliert und war zu Versuchsbeginn als cDNA in pRcRSV-Vektoren ligiert. Die Matrizen wurden zur Vervielfältigung mit Primern, der DNA-Polymerase und den 4 Nukleotidtriphosphat-Bausteinen in einem Ansatz vermengt und einem speziell entworfenen PCR-Programm zugeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

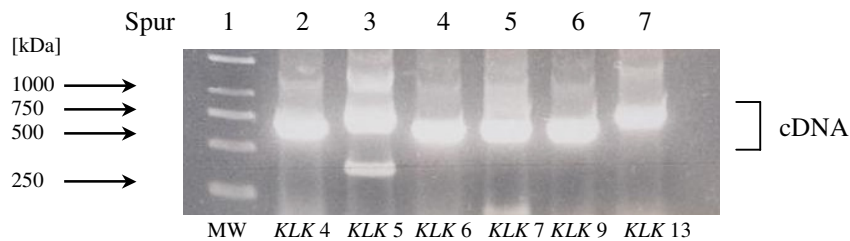


Abb. 5: Die PCR-Produkte von Pro-*KLK* 4, 5, 6, 7, 9 und 13

Dargestellt sind die PCR-Produkte (cDNA) von Pro-*KLK* 4, 5, 6, 7, 9 und 13, vervielfältigt mit den für jede *KLK*-Proform speziell entworfenen Primern. Durch die Primer werden den Amplikons an beiden Seiten kurze Sequenzen angefügt, die eine spätere Restriktion und Ligation mit bestimmten Enzymen ermöglichen. Im Falle von *KLK* 4 und 7 sind das die Restriktionsschnittstellen für *Sal I* und *Bam HI*, im Falle von Pro-*KLK* 5, 7, 9 und 13 die Restriktionsschnittstellen für *Sal I* und *Bgl II*.

Anhand des 250 bp-Markers lässt sich die Größe der einzelnen DNA-Fragmente erkennen. In allen Spuren ist je eine sehr stark fluoreszierende Bande zu erkennen, die für die vervielfältigten Pro-*KLK*-Fragmente steht. Daneben sind einige fluoreszierende Banden unterschiedlicher Fragmentgröße zu sehen, die durch unerwünschte DNA, Enzyme oder Proteine zu erklären sind.

Für die Pro-*KLKs* 4, 6, 7 und 9 wurden jeweils Fragmente der Größenordnung 750-770 bp erwartet, Pro-*KLK* 9 ist mit 780 bp etwas größer. Pro-*KLK* 5 hat im Gegensatz zu allen anderen Pro-Kallikreinen mit 37 Aminosäuren ein vergleichsweise langes Propeptid und ist mit einer Fragmentgröße von 835 bp das längste der Pro-*KLKs* (s. Tab 24).

<b><i>KLK</i>-Gen</b>	<b>Prä-Pro-Enzym</b>	<b>Signal-Peptid</b>	<b>Aktivierungs-Peptid</b>	<b>Matures Protein</b>
<i>KLK 1</i>	262	17	7	238
<i>KLK 2</i>	261	17	7	237
<i>KLK 3</i>	261	17	7	237
<i>KLK 4</i>	254	26	4	224
<i>KLK 5</i>	293	29	37	227
<i>KLK 6</i>	244	16	5	223
<i>KLK 7</i>	253	22	7	224
<i>KLK 8</i>	260	28	4	228
<i>KLK 9</i>	251	19	3	229
<i>KLK 10</i>	276	33	9	234
<i>KLK 11</i>	250	18	3	229
<i>KLK 12</i>	248	17	4	227
<i>KLK 13</i>	277	20	5	252
<i>KLK 14</i>	251	18	6	227
<i>KLK 15</i>	256	16	5	235

Tab. 24: Die Größe von Signal-und Aktivierungspeptid der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Tabellarische Darstellung der Größe der verschiedenen Abschnitte bei den Kallikrein-verwandten Peptidasen. Das Aktivierungspeptid besteht aus 3-9 Aminosäuren, mit Ausnahme von *KLK 5*, das mit 37 Aminosäuren über ein vergleichsweise langes Aktivierungspeptid verfügt. Die maturen, enzymatisch aktiven *KLK*-Proteasen bewegen sich in einer Größenordnung von ca. 230 Aminosäuren.

#### 4.1.2 Darstellung der DNA-Fragmente nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen

Die DNA-Fragmente wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen behandelt, deren Schnittstellen zuvor bei der PCR eingefügt worden waren. Anschließend wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

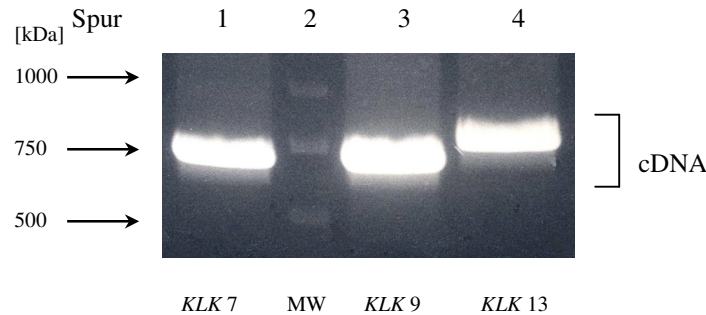


Abb. 6: Die Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 7, 9 und 13 nach Restriktion

Stellvertretend sind die mit Restriktionsenzymen behandelten Proformen der Kallikrein-verwandten Proteasen 7, 9 und 13 dargestellt. In der Spur Nr. 2 befindet sich der 250 bp-Marker durch den eine Abschätzung der Fragmentgröße ermöglicht wird. Die erste Spur enthält das mit *Bam* *H* *I* und *Sal* *I* geschnittene Pro-*KLK* 7, das der erwarteten Größe von ca. 750 bp entspricht. In der dritten Spur findet sich die mit *Bgl* *II* und *Sal* *I* behandelte DNA von Pro-*KLK* 9, die der erwarteten Größe von ca. 745 bp entspricht. Die vierte Spur enthält die DNA von Pro-*KLK* 13, das, geschnitten mit *Bgl* *II* und *Sal* *I* eine Größe von 830 bp aufweist.

#### 4.1.3 Ligation der DNA-Fragmente mit der Vektor-DNA und Transformation der neu gebildeten Plasmide in *E.coli*

Klonierung von DNA-Fragmenten bedeutet zunächst eine Vervielfältigung der DNA, die nach einer Aufreinigung der Sequenzanalyse zugeführt werden kann. Durch die vorherige Behandlung mit Restriktionsendonukleasen sind an Vektor und Pro-*KLK*-Fragmenten sogenannte *sticky ends* vorhanden, deren genaue Gensequenzen aufeinander abgestimmt sind und die somit ligiert werden können.

Zunächst wurden die verschiedenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert und isoliert. Der linearisierte Vektor pQE100 und das jeweilige Insert wurden im Verhältnis 1:5 (Vektor : Insert) mit *T4-Ligase* ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert und auf Agarplatten ausgesät. Da der Vektor pQE100 als Selektionskriterium ein Ampicillin-Resistenzgen trägt wurden alle zur Anzucht verwendeten Medien mit Ampicillin versetzt. Nach ca. 15stündiger Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C wurden mit sterilen Zahnstochern Bakterienkolonien gepickt und in LB-Flüssigmedium überführt, wo sie bei 37 °C und ca. 180 rpm für ca. 15 Stunden bebrütet wurden.

#### 4.1.4 Restriktionsanalyse der klonierten Plasmide

Die Plasmid-DNA wurde durch Plasmid-Präparation isoliert und der Erfolg der Ligation mittels Restriktionsanalyse (Enzyme *Eco R I* und *Sal I*) überprüft. Anschließend wurden die Restriktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 7). Um für jede Proform der Kallikrein-verwandten Peptidasen einen geeigneten Klon zu finden wurden zum Teil wiederholt neue Bakterienkolonien analysiert. Schließlich wurde jeweils ein Klon jedes Fragments der Sequenzanalyse zugeführt.

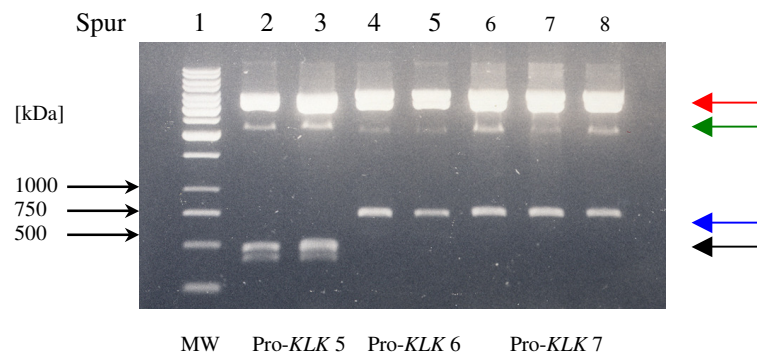


Abb. 7: Die Restriktionsprodukte von Pro-KLK 5, 6, und 7 nach Restriktionsanalyse

Stellvertretend für die Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 sind die Restriktionsprodukte von Pro-KLK 5, 6 und 7 nach Restriktion mit den Enzymen *Eco R I* und *Sal I* dargestellt. Da die fusionierte Schnittstelle von *Bgl II* und *Bam H I* eine Restriktion mit diesen beiden Enzymen nicht mehr zulässt, wurde das Restriktionsenzym *Eco R I* ausgewählt. In Spur 1 befindet sich der 250 bp-Marker, mit Hilfe dessen sich die Größe der einzelnen Fragmente abschätzen lässt. Nach der Restriktion werden für alle Pro-KLKs zunächst zwei starke Banden erwartet, eine ca. 3500 bp starke Bande für den Vektor (roter Pfeil) und eine kleinere, ca. 700-850 bp starke Bande (blauer Pfeil) für die jeweiligen Pro-KLK-Fragmente. Als Besonderheit verfügt das Pro-KLK 5-Fragment über eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Eco R I*, so dass in diesen Fällen die Fragment-DNA nochmals in zwei kleinere Fragmente der Größenordnung 550 und 300 bp geteilt ist (Spur 2 und 3, schwarzer Pfeil). In den Spuren 4 bis 5 sind die Restriktionsprodukte von Pro-KLK 6 aufgetragen. Das DNA-Fragment ist mit einer Größe von ca. 720 bp im erwarteten Größenbereich. Ebenso im Fall von Pro-KLK 7 (Spuren 6 bis 8), wo die DNA-Fragmente ca. 750 bp groß sind.

In allen Spuren ist darüber hinaus eine weitere relativ schwach fluoreszierende Bande (grüner Pfeil) zu sehen. Diese entspricht der Plasmid-DNA des Empfängerstammes, der eine Tetrazyklin-Resistenz besitzt.

### 4.1.5 Sequenzierungsergebnisse

Die Firma Medigenomix (Martinsried) analysierte durch Plasmidsequenzierung die Nukleotidsequenz der Pro-*KLK*-Klone. Diese Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen Abweichungen überprüft.

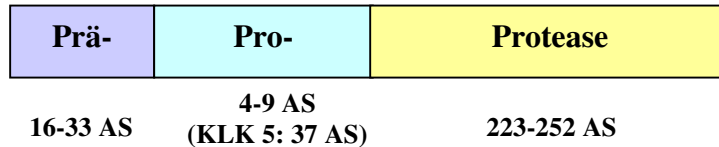


Abb. 8: Die Prä-Pro-Proteasen-Domäne der *KLK*-Proteasen

Schematische Abbildung der Prä-Pro-Proteasen-Domäne der Proformen der Kallikrein-verwandten Proteasen. Von besonderer Wichtigkeit ist die Pro-Sequenz, nach deren Abspaltung die Aktivierung des Proteins erfolgt.

	<b>Pro-Sequenz</b>	<b>Beurteilung/ Mutation</b>
<b><i>KLK 3</i></b>		
Klon Pro- <i>KLK3</i>	MRGSHHHHHHGSAPLILSR	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK 4</i></b>		
Klon Pro- <i>KLK 4</i>	MRGSHHHHHHGSSCSQ	E/K-Mutation 39
Klon Pro- <i>KLK 4-2</i>	MRGSHHHHHHGSSCSQ	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK 5</i></b>		
Klon Pro- <i>KLK 5</i>	MRGSHHHHHHGSNNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAG EDARSDDSSSR	F/L-Mutation 213
Klon Pro- <i>KLK 5-1</i>	MRGSHHHHHHGSNNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAG EDARSDDSSSR	F/L-Mutation 213
Klon Pro- <i>KLK 5-3</i>	MRGSHHHHHHGSNNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAG EDARSDDSSSR	F/L-Mutation 213
Klon Pro- <i>KLK 5-8</i>	MRGSHHHHHHGSNNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAG EDARSDDSSSR	N/S-Mutation 246

Tab. 25: Die Sequenzierungsergebnisse der Pro-*KLK*-Proteasen 3-5

Tabellarische Darstellung Sequenzierungsergebnisse der Klonierungen von Pro-*KLK* 3-5. Die Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3 und 4 konnten in ihrer Wildtyp-Form kloniert werden. Beim ersten Versuch *KLK 4* zu klonieren wurde eine E/K-Mutation an Aminosäure 39 nachgewiesen. Die Pro-*KLK 5*-DNA wurde insgesamt viermal neu kloniert, letztendlich wiesen jedoch alle Klone nach der Sequenzierung Punktmutationen im Bereich der Proteasen-Sequenz auf: eine N/S-Mutation an Aminosäure 246, sowie in drei weiteren unabhängigen Klonierungen eine F/L-Mutation bei Aminosäure 213. Dies spricht am ehesten dafür daß die Mutation schon nach der DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe vorgelegen haben muß. Zur Expression wurde der Klon Pro-*KLK 5-8* verwendet. Die Sequenzen sind im Aminosäure-Einbuchstaben-Code angegeben.

#### 4. Ergebnisse

	<b>Pro-Sequenz</b>	<b>Beurteilung/ Mutation</b>
<b><i>KLK6</i></b>		
Klon Pro-KLK6-17	MRGSHHHHHHGSEEQNK	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK7</i></b>		
Klon Pro-KLK 7	MRGSHHHHHHGSEEAQGDK	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK8</i></b>		
Klon Pro-KLK 8-1	MRGSHHHHHHGSEQEDK	V/G-Mut 179 (Publ.Var.)
<b><i>KLK9</i></b>		
Klon Pro-KLK 9	MRGSHHHHHHGSDTR	G/S-Mut. 76; M/K-Mut. 241
Klon Pro-KLK 9-1	MRGSHHHHHHGSDTR	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK10</i></b>		
Klon Pro-KLK10-4	MRGSHHHHHHGSAALLPQNDTR	S/A-Mut. 29 (Publ.Var.)
<b><i>KLK11</i></b>		
Klon Pro-KLK11-3	MRGSHHHHHHGSGETR	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK12</i></b>		
Klon Pro- KLK 12-2	MRGSHHHHHHGSAATPK	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK13</i></b>		
Klon Pro- KLK 13	MRGSHHHHHHGSEQESSK	I/V-Mutation 250
Klon Pro- KLK 13-2N	MRGSHHHHHHGSEQESSK	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK14</i></b>		
Klon Pro- KLK 14-4	MRGSHHHHHHGSEQEDENK	<b>Wildtyp</b>
<b><i>KLK15ntfl</i></b>		
Klon Pro- KLK 15-3nt	MRGSHHHHHHGSAQDGDK	Publizierte Variante
<b><i>KLK15fl</i></b>		
Klon Pro- KLK 15-3fl	MRGSHHHHHHGSAQDGDK	<b>Wildtyp</b>

Tab. 26: Die Sequenzierungsergebnisse der Pro-KLK-Proteasen 6-15 fl

Die Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14 und 15 *full length* konnten - nach zum Teil mehrmaligem Versuchsansatz - in ihrer Wildtyp-Form kloniert werden, es liegen keine Mutationen vor. Der Klon Pro-KLK 8-1 weist eine Mutation bei Aminosäure 179 (V/G) auf, diese ist jedoch als anerkannte Variante des Wildtyps publiziert. Ebenso verhält es sich bei Pro-KLK 10-4 und Pro-KLK 15-3-nt (*near to full length*). Die *near to full length* Variante von Pro-KLK 15 ist eine anerkannte *Splice*-Variante von Pro-KLK 15, die ebenfalls aus Tumorzellgewebe gewonnen wurde. Die Sequenzen sind im Aminosäure-Einbuchstaben-Code angegeben.

## 4.2 Expression und Reinigung der Pro-Kallikrein Fragmente 3-15

Die klonierten Plasmide enthalten durch den Vektor pQE100 einige wichtige DNA-Abschnitte, die die Replikation des Plasmids in der Bakterienzelle steuern und die Transkription und Translation des Gens ermöglichen.

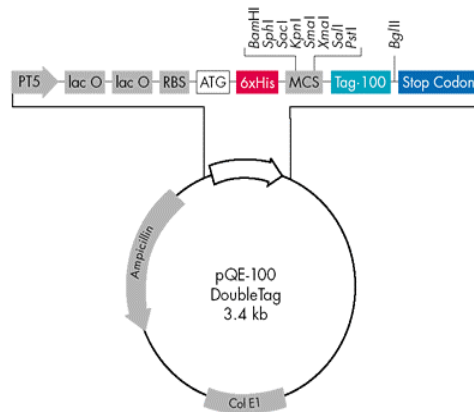


Abb. 9: Der Vektor pQE100

Schematische Darstellung der wichtigen Charakteristika des Vektors pQE100. Als Besonderheit enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, eine *multiple cloning site* zur Einfügung von DNA-Fragmenten sowie das *lac* Operator Gen in zweifacher Ausführung. Weiterhin sind zwei *Tags* vorhanden, der Tag 100 und der 6x His *Tag*. Dies sind Erkennungsstellen für Antikörper (*Tag 100* und 6xHis *Tag*) und Nickelionen (6xHis *Tag*) über die eine Identifikation des Plasmids bzw. späteren Proteins erfolgen kann. Die Abbildung wurde entnommen aus *QiaExpressionist handbook 2003*, S.24.

In der DNA des Vektors pQE100 ist das *lac*-Operator-Gen zweifach vorhanden, an das der *lac*-Repressor in Abwesenheit von Lactose bindet. Steht Lactose zur Verfügung wird daraus die isomere Allolactose gebildet, die an den Repressor bindet und ihn so vom Operator ablöst. Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wirkt als Aktivator indem es an den Repressor bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert. Im Gegensatz zur Lactose wird IPTG nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt, seine Konzentration bleibt deshalb während des Versuchs konstant und das Gen bleibt aktiv.

pQE100 enthält einen sogenannten 6 x His-*Tag*, eine Basensequenz, die für 6 aufeinander folgende Aminosäuren Histidin kodiert. Nach der Proteinexpression befinden sich diese 6 Histidine, die durch eine große Affinität zu Nickelionen gekennzeichnet sind, am aminoterminalen Ende der Pro-KLK-Proteine. Diese Affinität ermöglicht eine spätere säulenchromatographische Reinigung der überexprimierten Proteine an Ni<sup>2+</sup>-NTA mittels IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*). NTA ist ein Chelatbildner, der vier der sechs Ligandbindungsstellen eines Nickelions besetzt und diese dadurch an der

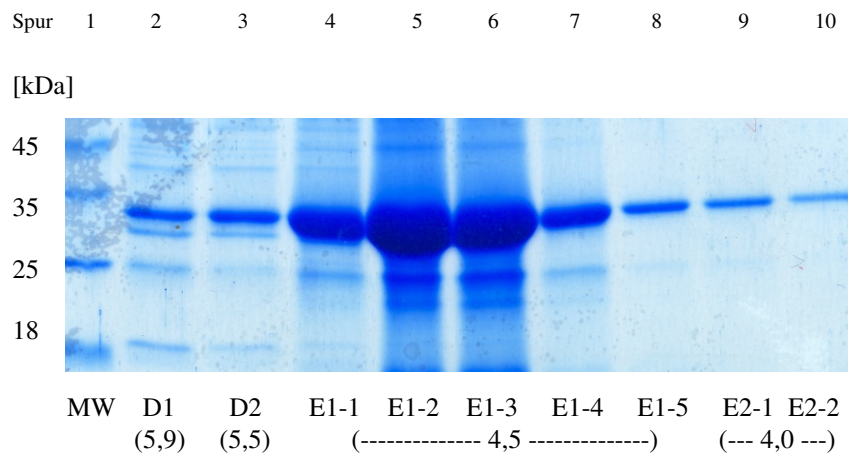


Säulenmatrix fixiert. Die zwei freibleibenden Ligandbindungsstellen können mit je einem Histidinrest der Pro-KLKs über den Imidazolring interagieren. Durch langsames Absenken des pH-Wertes werden die Histidin-Reste des 6 x His-*Tags* protoniert und können dadurch nicht mehr an die Nickelionen binden. Die Absenkung des pH erfolgt in kleinen Schritten von pH 8,0 auf pH 4,0. Meist erfolgt die Lösung der Proteine bei ca. pH 6,0-4,0.

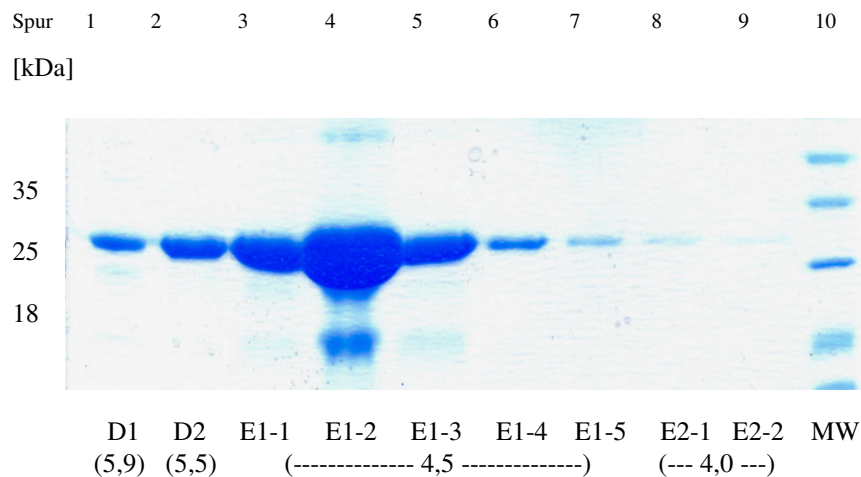
#### 4.2.1 Die gereinigten Proformen der KLK-Proteasen

Die Proteine wurden wie obig beschrieben gereinigt und mittels denaturierender SDS-PAGE aufgetrennt. In den folgenden Abbildungen sind die verschiedenen Elutionspuffer-Fractionen dargestellt. In der 1. Spur bzw. wahlweise in der 10. Spur befindet sich der Marker Peqlab-1010 (1,4 mg/ml). Die größten Proteinkonzentrationen konnten in den Elutionsfraktionen E1-1 bis 1-4 (Spur 4-7) angefärbt werden (pH 4,5).

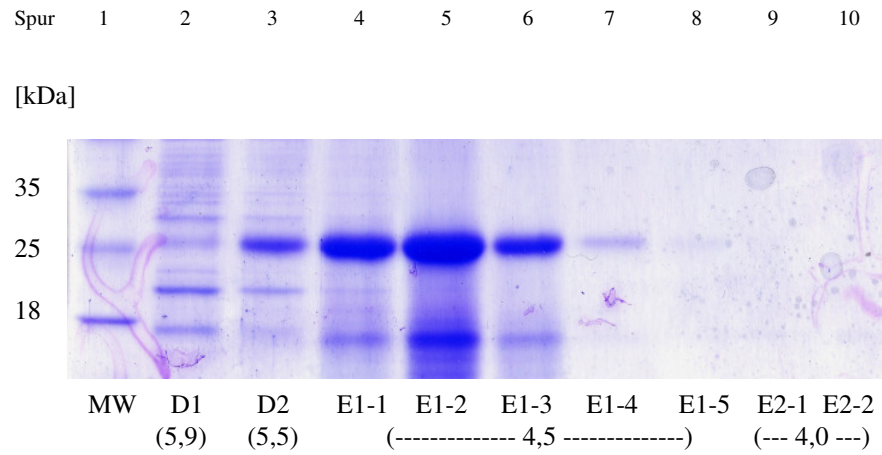
##### Pro-KLK 3 (Abb. 10)



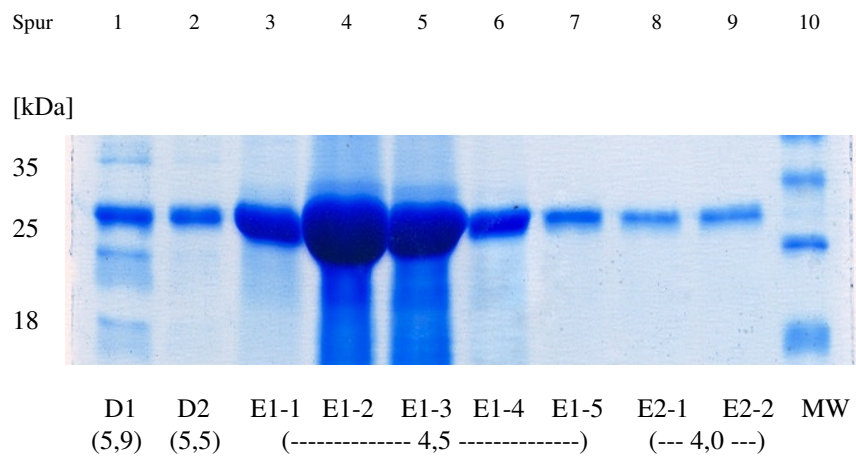
##### Pro-KLK 4 (Abb. 11)



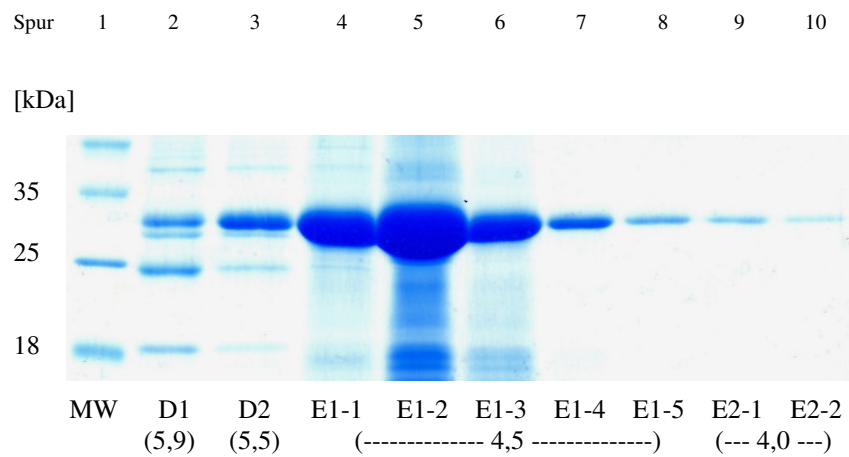
**Pro-KLK 5** (Abb. 12)



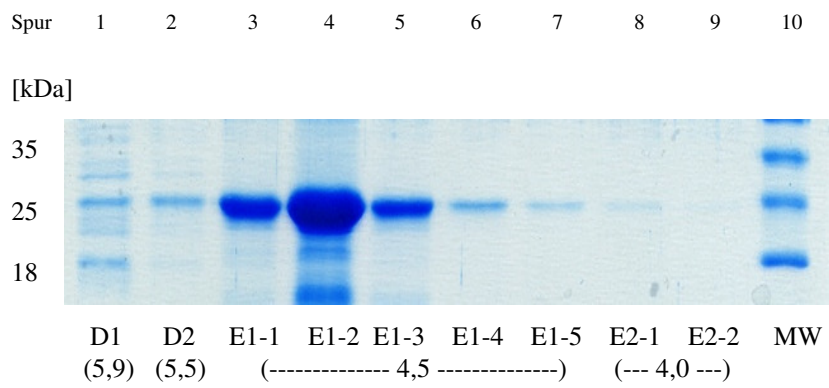
**Pro-KLK 6** (Abb. 13)



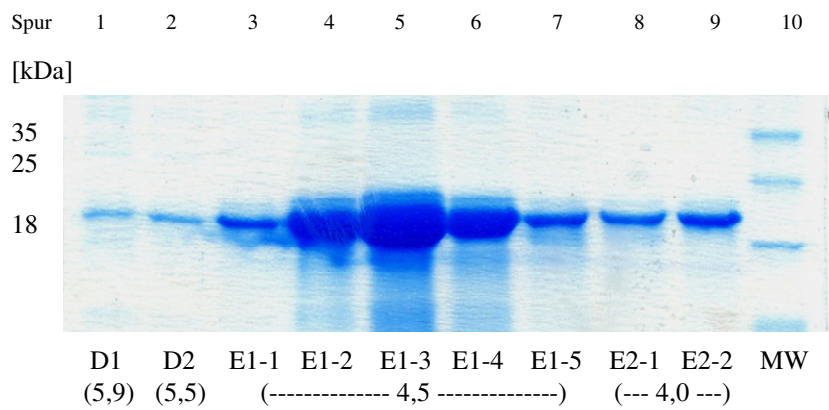
**Pro-KLK 7** (Abb. 14)



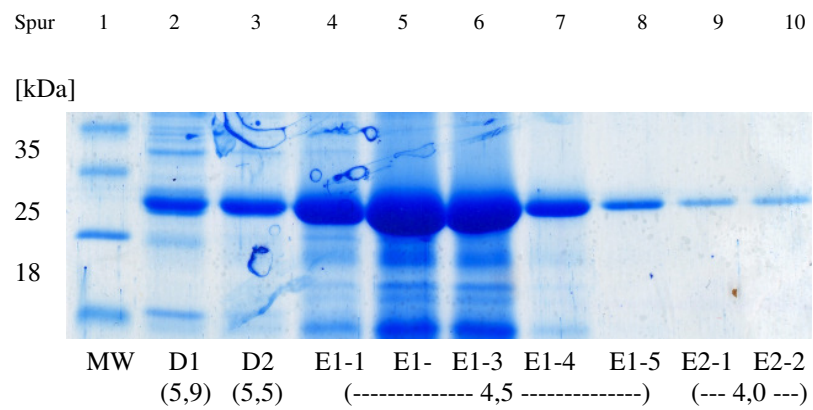
**Pro-KLK 8 (Abb. 15)**



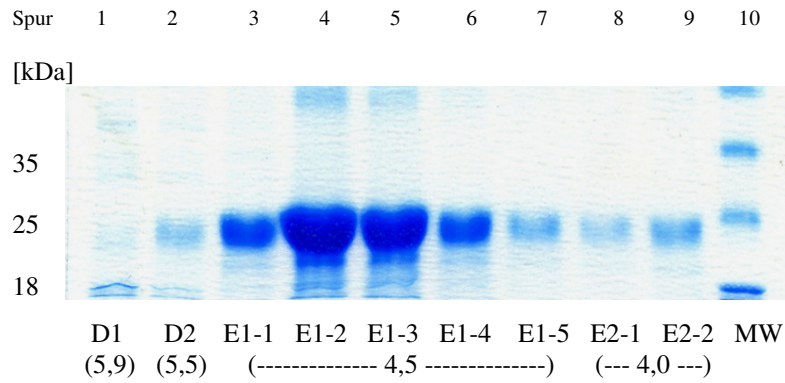
**Pro-KLK 9 (Abb. 16)**



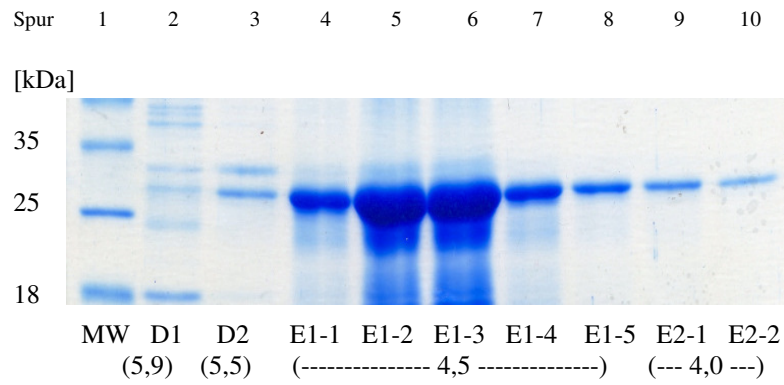
**Pro-KLK 10 (Abb. 17)**



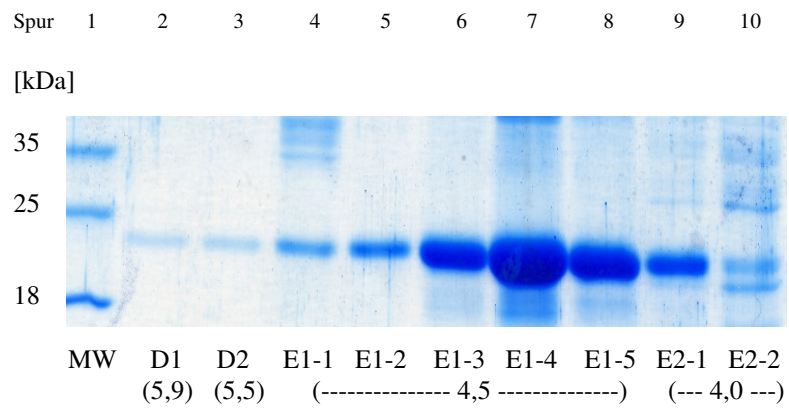
**Pro-KLK 11** (Abb. 18)



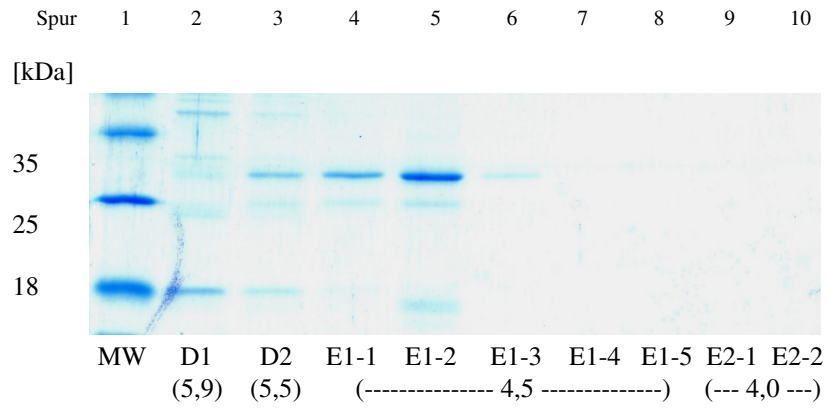
**Pro-KLK 12** (Abb. 19)



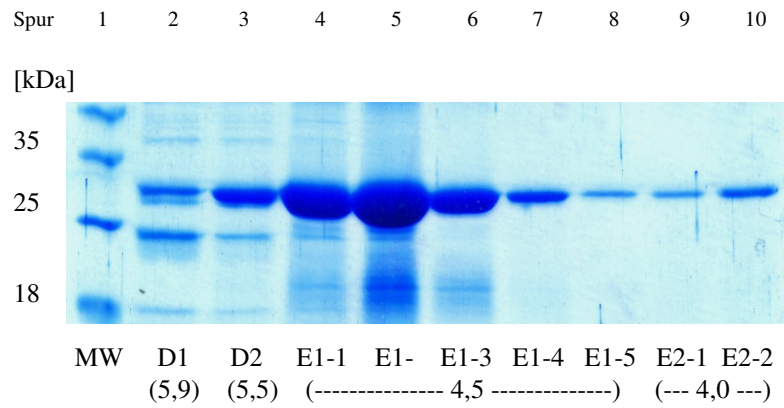
**Pro-KLK 13** (Abb. 20)



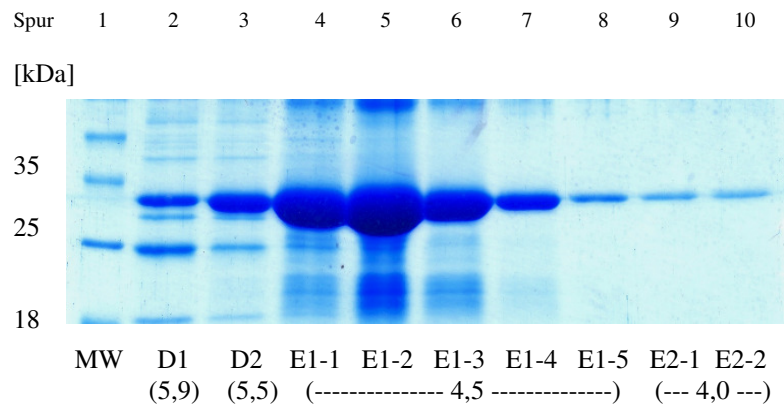
**Pro-KLK 14** (Abb. 21)



**Pro-KLK 15 full length** (Abb. 22)



**Pro-KLK 15 near to full length** (Abb. 23)



## 4. Ergebnisse

---

*Abb. 10 bis 23:* Die gereinigten und mittels Nickelaffinitäts-Chromatographie dargestellten Pro-KLKs

Je 5 ml LB-Amp/Kan-Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur der Klone Pro-KLK 3-15 angeimpft, 75 Minuten bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert, mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 Stunden inkubiert. 250 ml Hauptkultur wurden mit 5 ml der Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 wurde IPTG zugefügt, die Kulturen wurden für weitere 4-5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellpellets wurden bei -80 °C eingefroren, auf Eis aufgetaut und abgewogen. Pro ein Gramm nasser Zellen wurden 5 ml Puffer A (siehe 3.2.3) zugegeben, die Reaktionsgemische wurden sanft durchmischt bis alle Klümpchen vollständig gelöst waren. Durch 30minütige Zentrifugation bei RT und 10 000 g wurde das klare, proteinhaltige Lysat von den Zellresten getrennt und die vorbereitete Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule damit befüllt. Sobald die Agarose wieder vollständig abgesetzt war, wurde die untere Kappe der Säule geöffnet, und das Lysat durchlief langsam die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Es folgten 5 Waschstritte mit verschiedenen Puffern, zunächst mit 20 ml Puffer A, dann mit jeweils 12 ml Puffer B, C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> und 6 ml Puffer C<sub>3</sub>, die sich vor allem im pH-Wert unterscheiden. Anschließend wurden die Proteine eluiert, beginnend mit 6 ml Puffer D1 und 3 ml D2, gefolgt von 5 Fraktionen à 2 ml Puffer E<sub>1</sub> und 2 Fraktionen Puffer E<sub>2</sub> à 1,5 ml. Der pH-Wert der Puffer wurde, beginnend mit pH 8 bei Puffer A/B mit Hilfe von HCl verschiedener Konzentration nach und nach auf pH 4 bei Puffer E<sub>2</sub> reduziert (zur exakten Beschreibung der Methode siehe 3.2.3)

Die Abbildungen 11 bis 24 zeigen die mittels denaturierender SDS-PAGE (12 %) aufgetrennten Fraktionen der exprimierten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 nach Blaufärbung mit Coomassie. Der Marker (MW) wurde wahlweise in Spur 1 oder Spur 10 aufgetragen. Unter den jeweiligen Fraktionen steht in Klammern der pH-Wert der Fraktion.

### 4.2.2 Darstellung der gereinigten Pro-KLK-Proteasen 3-15

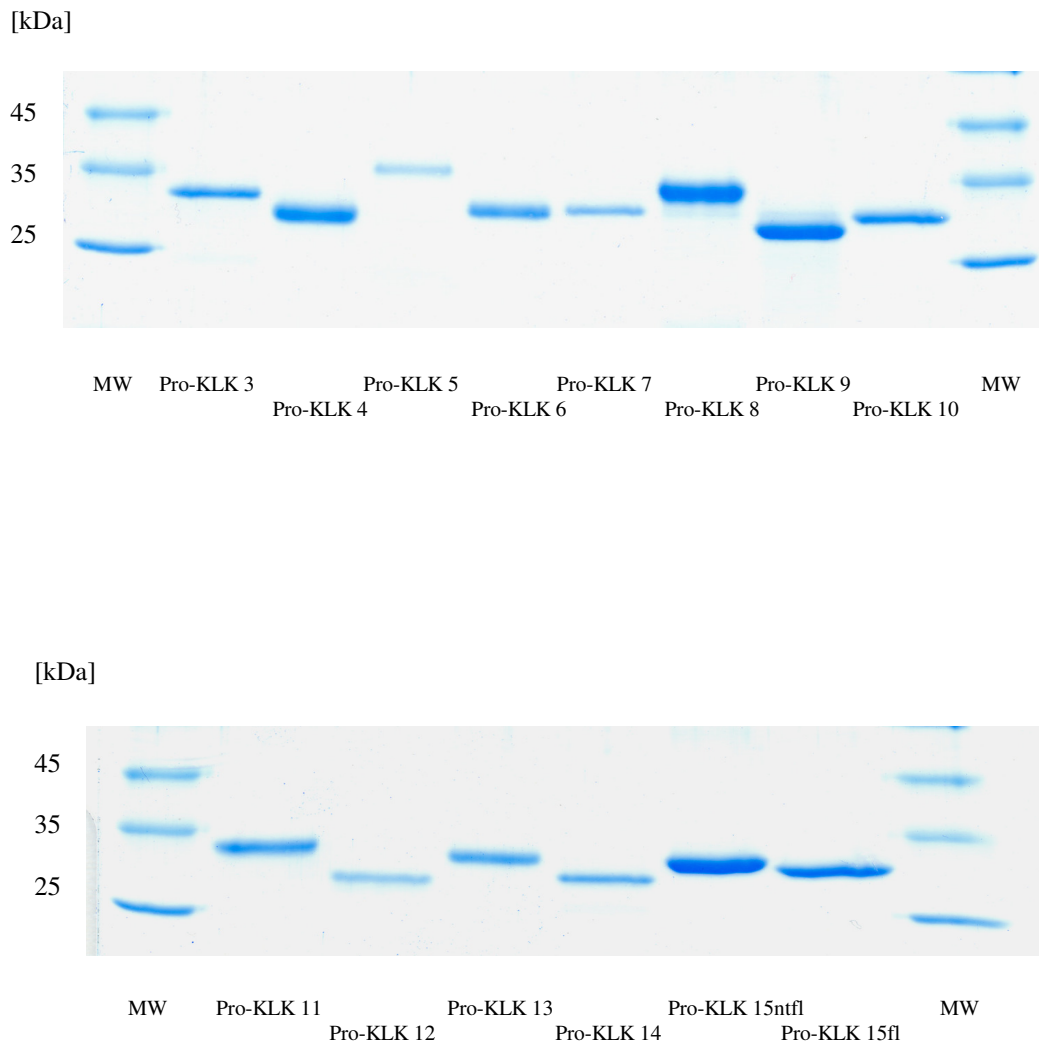


Abb. 24: Die exprimierten und gereinigten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15

Dargestellt sind alle exprimierten und gereinigten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15. Um annähernd gleiche Bandenintensitäten zu erhalten wurden nach Augenmaß die unterschiedlichen Fraktionen ausgewählt und mit je 15  $\mu$ l Fraktion und 8  $\mu$ l Beladungspuffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch denaturierende SDS-PAGE (12 %), die Protein-Fraktionen wurden mit Coomassie blau angefärbt.

Folgende Fraktionen wurden ausgewählt:

Pro-KLK 3: Fraktion E<sub>2-1</sub>, Pro-KLK 4: Fraktion E<sub>1-4</sub>, Pro-KLK 5: Fraktion E<sub>1-4</sub>, Pro-KLK 6: Fraktion E<sub>1-5</sub>, Pro-KLK 7: Fraktion E<sub>1-5</sub>, Pro-KLK 8: Fraktion E<sub>1-3</sub>, Pro-KLK 9: Fraktion E<sub>2-1</sub>, Pro-KLK 10: Fraktion E<sub>1-5</sub>, Pro-KLK 11: Fraktion E<sub>2-1</sub>, Pro-KLK 12: Fraktion E<sub>2-1</sub>, Pro-KLK 13: Fraktion E<sub>1-4</sub>, Pro-KLK 14: Fraktion E<sub>1-2</sub>, Pro-KLK 15 *full length*: Fraktion E<sub>1-4</sub>, Pro-KLK 15 *near to full length*: Fraktion E<sub>1-4</sub>.



### 4.3 Rückfaltung der Pro-KLK-Proteine 3-15

Die Erstellung eines Rückfaltungsprotokolls unterliegt für jedes Protein anderen, individuellen Regeln. Es gibt keine Rezepte die die Rückfaltung eines Proteins oder seiner Proteinfamilie garantieren oder den Ablauf der Rückfaltung beschleunigen. Die Zusammensetzung der Rückfaltungspuffer muss in wiederholten Versuchen immer wieder optimiert und an das jeweilige Protein angepasst werden. Diese Tatsache macht die Rückfaltung von Proteinen gegebenenfalls sehr langwierig und kompliziert.

Für alle Rückfaltungen wurde jeweils 1 ml Probenvolumen der Proteine (in 8 M Harnstoff) gewählt, das vorab mit DTT in einer Endkonzentration von 10 mM über Nacht inkubiert wurde. Die Proben wurden in die Dialyseschläuche gefüllt und gemäß des jeweiligen Rückfaltungsprotokolls in die 4 °C temperierten Rückfaltungs- und Lagerungspuffer überführt. Nach Beendigung der Rückfaltung wurden die Proben aus den Schläuchen in Eppendorf-Gefäße pipettiert und anschließend das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -80 °C über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen wurden ca. 20 µl der Probe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, das je nach vorhandener Proteinkonzentration mit Coomassie oder Silber gefärbt wurde.

Von Dr. Mekdes Debela und Dr. Peter Goettig (*Proteinase Research Group* des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried) wurden einige Kallikrein-verwandte Peptidasen mit synthetischem Propeptid kloniert, unter anderem um die räumliche Struktur verschiedener KLK-Proteasen zu untersuchen (Debela *et al.*, 2006). Diese synthetisierten Pro-KLK-Formen unterscheiden sich von der Wildtyp-Form in der Sequenz des Propeptides. Für diese Pro-KLK-Proteasen bzw. die nach Abspaltung des Propeptides aktiven Proteasen wurden Rückfaltungsprotokolle entworfen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Rückfaltung eines aktiven Proteins ist durch die sofortige Entwicklung seiner enzymatischen Aktivität im Allgemeinen um einiges komplizierter als die seiner inaktiven Vorstufe. Dementsprechend lag die Vermutung nahe, dass die Rückfaltungsprotokolle, die von oben genannter Arbeitsgruppe zur Faltung der verschiedenen synthetisierten rekombinanten Kallikrein-verwandten Peptidasen entwickelt worden waren, auch in der Rückfaltung der Proformen dieser Proteine erfolgreich sind.





Peptidasen 3, 5, 7 und 9 bis 15 schon mit bloßem Auge deutlich erkannt werden. Bezüglich der Pro-KLKs 4, 6 und 8 erwies sich das Rückfaltungsprotokoll als äußerst erfolgreich, denn obwohl eine relativ hohe Konzentration an Protein als Einsatz gewählt worden war, konnte eine hohe Ausbeute erzielt werden. Da diese drei Kallikrein-verwandten Peptidasen zufriedenstellend rückgefaltet werden konnten, wurden sie in den folgenden Versuchen nicht mehr getestet.

### 4.3.2 Die Rückfaltung Nr. 2

Im Rückfaltungsprotokoll Nr. 2 sollten folgende Proteine zur Rückfaltung gebracht werden: Pro-KLK 3, 5, 7 und 9 bis 15 (in *full length*- und *near to full length*-Variante). Die Proteinkonzentration der Proben betrug 0,5-1 mg/ml. Die Puffer dieses Protokolls bestanden aus zwei Rückfaltungspuffern und zwei Lagerungspuffern. Die beiden Rückfaltungspuffer enthielten neben dem denaturierenden Harnstoff in 4M bzw. 2M Konzentration die Komponenten Tris/HCl, NaCl, die Komponenten des Gluthathion-Redoxsystem sowie weitere zweiwertige Ionen ( $MgCl_2$  und  $ZnCl_2$ ). Darüber hinaus enthielten beide Rückfaltungspuffer Glycin mit charakteristisch guten Löslichkeitseigenschaften und Tween20, auch bekannt unter dem Namen Polysorbat20, ein Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat. Polysorbat20 ist ein nichtionisches Tensid, das stabilisierende Eigenschaften besitzt und unter anderem in der Lebensmittelindustrie als Emulgator und Netzmittel sowie in Reinigungsmitteln und im pharmakologischen Bereich Verwendung findet. Die beiden Lagerungspuffer enthielten ausschließlich die beiden Bestandteile Tris/HCl und NaCl in unterschiedlicher Konzentration. Nach der Überführung der Proben in den ersten Lagerungspuffer, der keinen denaturierenden Harnstoff mehr enthielt, konnten die abermals aggregierten Proteine in den Dialyseschläuchen schon mit bloßem Auge deutlich wahrgenommen werden. Ein anschließend angefertigtes PAA-Gel bestätigte, dass das Protokoll Nr. 2 für die Rückfaltung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen gänzlich ungeeignet ist.

### 4.3.3 Die Rückfaltung Nr. 3

Für eine erfolgreiche Rückfaltung ist die Proteinkonzentration der Proben von entscheidender Bedeutung. Ist die Konzentration zu hoch gewählt, so besteht die große Wahrscheinlichkeit, dass die Proteine interagieren und sich so gegenseitig in ihrer Rückfaltung behindern. Als Ergebnis werden Proteine falsch gefaltet bzw. aggregieren. Um dieses Risiko zu verringern, kann die Proteinkonzentration zunächst durch Verdünnung der Proben herabgesetzt werden um nach erfolgreicher Rückfaltung wieder aufkonzentriert zu werden. Da das Rückfaltungsprotokoll Nr. 1 bei den drei Pro-KLKs 4, 6 und 8 bereits bei hoher Proteinkonzentration erfolgreich war, wurde das gleiche Protokoll ein weiteres Mal getestet, in der Hoffnung, dass viele der anderen Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen aufgrund ihrer hohen Struktur- und Sequenzhomologien mit diesem Protokoll rückgefaltet werden können. Um diesmal die Gefahr der Aggregation zu verringern, wurde im Gegensatz zum ersten Versuch die Proteinkonzentration deutlich erniedrigt auf ca. 150 µg/ml. Folgende Proteine wurden für den Versuch verwendet: Pro-KLK 3, 5, 7 und 9 bis 15 (in *full length* und *near to full length* Variante). Die Rückfaltung wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 4.3.1) und anschließend mit Hilfe eines PAA-Gels ausgewertet. Trotz der massiv verringerten Proteinkonzentration war wiederum bereits in Rückfaltungspuffer 2 eine Aggregation der Proteine zu erkennen. Der Versuch machte deutlich, dass das Rückfaltungsprotokoll Nr. 1 ausschließlich für die Pro-KLK-Proteine 4, 6 und 8 geeignet ist und für alle anderen Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen, völlig unabhängig von der verwendeten Proteinkonzentration, ungeeignet zu sein scheint. Trotz der großen Ähnlichkeit der KLK-Proformen untereinander sind ihre Rückfaltungseigenschaften sehr unterschiedlich.

#### 4.3.4 Die Rückfaltung Nr. 4

Die denaturierten und reduzierten Proteine Pro-KLK 3, 5, 7 und 9 bis 15 (in *full length* und *near to full length* Variante) wurden einem neuen Rückfaltungsprotokoll zugeführt. Die Proteinkonzentration betrug ca. 150 µg/ml. Das Rückfaltungsprotokoll Nr. 4 setzte sich zusammen aus drei Rückfaltungspuffern und einem Lagerungspuffer. Der erste Puffer bestand aus nur drei Bestandteilen, dem denaturierenden Harnstoff in 4M Konzentration, Tris/HCl und NaCl, der zweite Rückfaltungspuffer enthielt zusätzlich einige sog. Rückfaltungshelfer in unterschiedlichen Konzentrationen, die beiden Bestandteile des Gluthathion-Redoxsystems sowie die oben bereits beschriebenen Komponenten Tween20 und Glycin. Im dritten Rückfaltungspuffer war die Konzentration des Harnstoffs auf 1M gesenkt worden, weitere Bestandteile waren NaCl und Gluthathion in reduzierter und oxidiertes Form. Im vierten Puffer, dem Lagerungspuffer, war kein Harnstoff mehr enthalten, er setzte sich zusammen aus Tris/HCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub> und Tween20. Schon während der Rückfaltung, besonders aber nach der Überführung der Proben in den Rückfaltungspuffer 3, konnten in den Dialyseschläuchen, die die Pro-KLK-Proteasen 3, 5, 9 und 12 enthielten, deutlich die Proteine als Aggregationsklümpchen erkannt werden. Im PAA-Gel wurden die Proben aufgetrennt und anschließend mit Coomassie blau angefärbt. Aufgrund sehr geringer Mengen an rückgefalteten Proteinen waren die Banden nur äußerst schwach angefärbt. Zum sensitiveren Nachweis wurde das Gel anschließend mit Silberfärbung angefärbt. Aufgrund der zwar nachweisbaren aber geringen Proteinkonzentration wurden die Volumina der verschiedenen Pro-KLKs mit dem *Vivaspin*-System der Firma Vivascience (Membranstärke 5000 MWCO PES) auf etwa die Hälfte reduziert. Anschließend wurden die Proben erneut auf ein PAA-Gel aufgetragen und der Erfolg des Versuchs überprüft.

#### 4. Ergebnisse

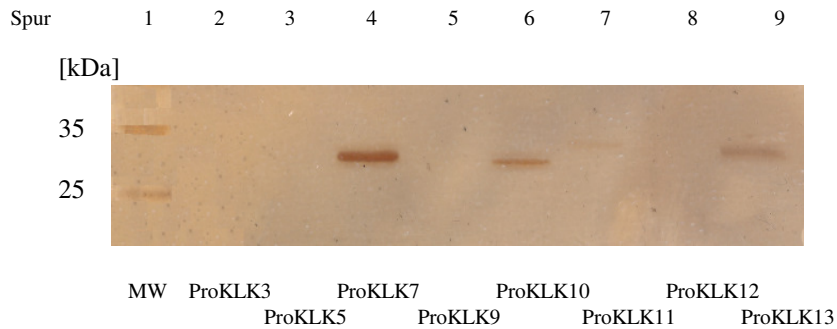


Abb. 26: Das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 4

In der 1. Spur ist der Marker *peq Gold* aufgetragen, anhand dessen sich die Größe der rückgefalteten Proteine abschätzen lässt. In den anderen Spuren sind die KLK-Proteine 3-13 mit jeweils 15 µl aufgetragen. Pro-KLK 7 ist anhand einer intensiv angefärbten Bande deutlich zu erkennen und wurde demnach nicht weiter aufkonzentriert. Bei Pro-KLK 3, 5, 9 und 12 ist keine Bande zu sehen bzw. zu erahnen, so dass auch eine Konzentrationserhöhung nicht erfolversprechend schien und diese Proben nicht aufkonzentriert wurden. Die Spuren 6, 7 und 9 enthalten Banden der Pro-KLKs 10, 12 und 13 in schwacher Anfärbung. Diese Proben, sowie die Pro-KLK's 15 *near to full length* und *full length*, die auf obigem Gel nicht dargestellt sind, wurden mit Hilfe des *Vivaspin*-Systems aufkonzentriert.

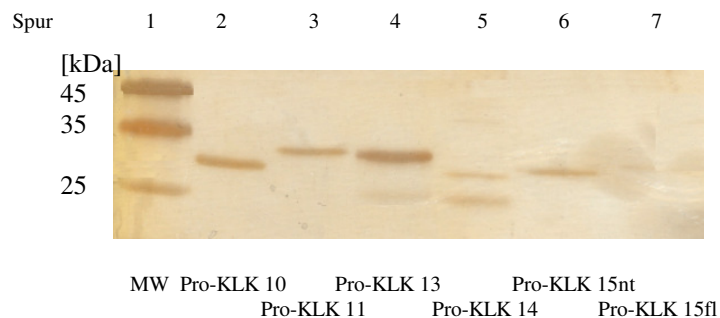


Abb. 27: Die rückgefalteten Proteine aus Rückfaltung Nr. 4 nach Aufkonzentration

Die Abbildung zeigt die rückgefalteten Proteine der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 10, 11, 13, 14 und 15 (in *full length* und *near to full length*-Variante) nach dem Aufkonzentrieren. Verglichen mit Abb. 27 konnten bei Pro-KLK 10, 11 und 13 gute Ergebnisse erzielt werden. Die beiden relativ schwachen Banden in Spur 5 (Pro-KLK 14) deuten auf eine mögliche Autoaktivierung des Proteins hin.

Das Rückfaltungsprotokoll Nr. 4 scheint zur Rückfaltung von Pro-KLK 7 sehr gut geeignet zu sein, die Pro-KLKs 10, 11 und 13 konnten nur sehr niedrig konzentriert rückgefaltet werden, was für die weitere Verwendung eines Proteins von Nachteil ist. Nach dem Aufkonzentrieren der Proben zeichneten sich die Banden der Pro-KLKs 10, 11 und 13 deutlicher ab, 14, 15ntfl und 15fl hingegen weiterhin schwach. Pro-KLK 14 wurde bei ohnehin geringer Proteinausbeute (s. Abb. 21) nicht weiter getestet. Anhand obiger Abbildung (Abb. 27) lag die Vermutung nahe, dass Pro-KLK 14 autokatalytischen Aktivierungsprozessen unterliegt.

### 4.3.5 Die Rückfaltung Nr. 5

Das Rückfaltungsprotokoll Nr. 5 orientiert sich an einem Protokoll, das von Dr. M. Debela (Max-Planck-Institut für Biochemie, *Proteinase Research Group*, Martinsried) zur Rückfaltung einer Proform von KLK 14 entworfen worden war. Es setzt sich aus drei Rückfaltungspuffern und einem Lagerungspuffer zusammen. Der erste Rückfaltungspuffer bestand aus Harnstoff in 4 M Konzentration sowie Tris/HCL und NaCl. Der zweite Rückfaltungspuffer enthielt neben CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> die Bestandteile des Gluthathion-Redoxsystems sowie Glycin, Tween20 und Saccharose. Bei den rückzufaltenden Proben wurden Proteinkonzentrationen von ca. 0,5-1 mg/ml gewählt.

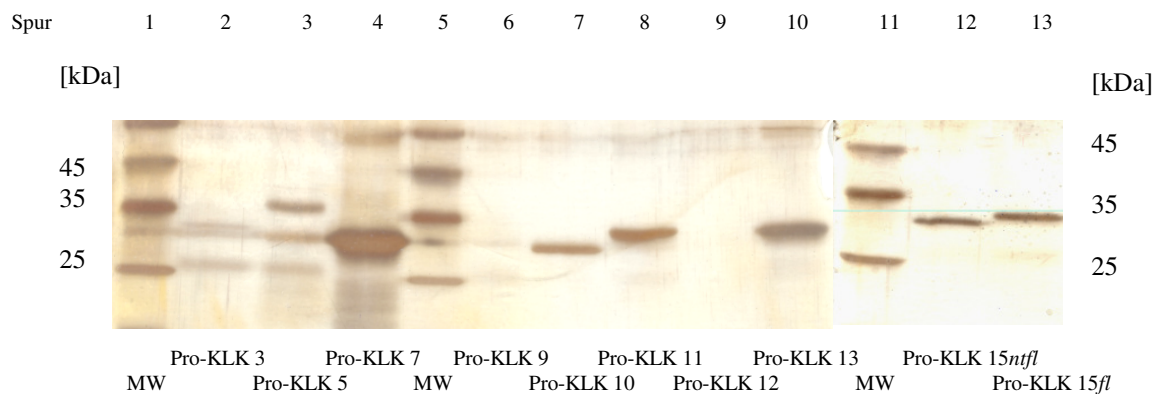


Abb. 28: Das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 5

Dargestellt sind die rückgefalteten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3, 5, 7 und 9-15 (in *full length* und *near to full length*-Version) nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat.

In Spur 1, 5 und 11 ist ein Standard-Marker *peq Gold* aufgetragen, anhand derer sich die Größe der Fragmente abschätzen lässt. Sehr gute Faltungsergebnisse konnten für Pro-KLK 5 und 7 in Spur 3 und 4, Pro-KLK 10 und 11 in Spur 7 und 8 sowie Pro-KLK 13 in Spur 10 sowie für die beiden Varianten von Pro-KLK 15 in den Spuren 12 und 13 erzielt werden. Schlechte Faltungsergebnisse bzw. kein Rückfaltungsprodukt wurde im Fall von Pro-KLK 3, 9 und 12 erreicht. Die Proteine wurden mittels denaturierender SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silberfärbung angefärbt.

Die Rückfaltung Nr. 5 zeigte sich insgesamt sehr erfolgreich, besonders im Falle von Pro-KLK 7, 10, 11, 15 *near to full length* und 15 *full length* konnten gute Rückfaltungsergebnisse erzielt werden. Als problematisch stellen sich die Pro-KLK-Proteasen 3, 9 und 12 dar, die nahezu zu 100 % ausgefallen waren, bzw. nur äußerst schwach angefärbt werden konnten.

### 4.3.6 Die Rückfaltung Nr. 6

Die nachfolgend beschriebene Rückfaltung wurde zur Rückfaltung einer Proform der Kallikrein-verwandten Peptidase 3 (PSA), allerdings mit synthetischem Propeptid, das sich von der Wildtyp-Form unterscheidet, entwickelt. Das Protokoll bestand aus vier Puffern, drei Rückfaltungspuffern mit abfallender Harnstoffkonzentration und einem Lagerungspuffer. Eine Besonderheit war, daß der erste Rückfaltungspuffer neben Harnstoff und NaCl den Bestandteil HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) enthielt, ein organisches Pufferreagens, das vielfach in Gebrauch ist, um einen physiologischen pH-Wert zu erhalten. Im zweiten Rückfaltungspuffer war die Harnstoffkonzentration noch 2molar, weitere Bestandteile des Puffers waren NaCl, HEPES, Glycin, L-Arginin, Gluthation, Tween20 und die Faltungshelfer MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> in verschiedenen Molaritäten. Der dritte Rückfaltungspuffer enthielt die gleichen Komponenten in zum Teil veränderter Konzentration mit Ausnahme von Harnstoff, der nicht mehr hinzugefügt worden war. Der vierte Puffer, der Lagerungspuffer bestand aus NaCl, Tris/HCl und Tween20. Die Proteinkonzentration betrug ca. 0,5-1mg/ml.

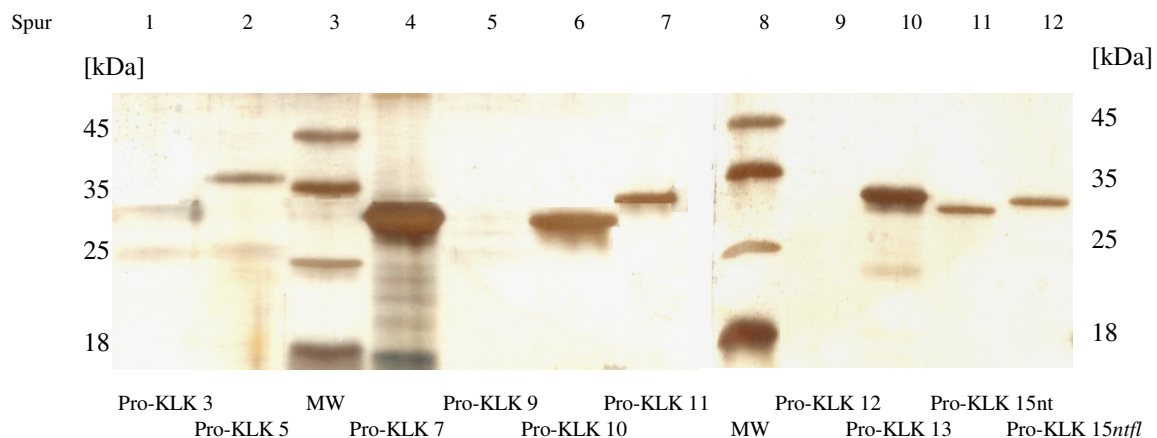


Abb. 29: Das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 6

Dargestellt ist das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 6 mit den Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3, 5, 7, 9 bis 13 und 15 (*full length* und *near to full length* Variante) nach Auftrennung mit SDS-PAGE und in Silberfärbung. In den Spuren 3 und 8 finden sich die Marker *peq Gold*, durch die eine Abschätzung der Fragmentgröße möglich wird.

Das Protokoll bietet zur Rückfaltung der Pro-KLKs 7, 10 und 13 hervorragende Bedingungen mit sehr intensiver Bandenanfärbung sowie gute Rückfaltungsbedingungen für die Pro-KLKs 5, 11, 15 *near to full length* und 15 *full length*. Pro-KLK 3, 9 und 12 können erneut nicht rückgefaltet werden, was besonders im Falle von Pro-KLK 3 überrascht, da dieses Protokoll gute Ergebnisse bei der Rückfaltung der synthetisierten Proform von KLK 3 mit erzielen konnte. Obwohl sich beide Proteine nur in ihren Prosequenzen unterscheiden, weichen sie in ihren Rückfaltungseigenschaften stark voneinander ab.



### 4.3.7 Die Rückfaltung Nr. 7

Das nachfolgend beschriebene Protokoll wurde zur Rückfaltung einer Proform von KLK 11 entwickelt. Der erste der drei Rückfaltungspuffer setzte sich zusammen aus Harnstoff in 4molarer Konzentration, sowie Tris/HCl und NaCl. Der zweite Rückfaltungspuffer enthielt Harnstoff in 2molarer Konzentration, außerdem HEPES, MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>, Glycin, Arginin, Tween20 sowie Gluthation in reduzierter und oxidiertes Form. Der darauf folgende dritte Rückfaltungspuffer enthielt, mit der Ausnahme, dass kein Harnstoff enthalten war, die gleichen Komponenten in gleicher Konzentration wie der vorangegangene Puffer. Der vierte Puffer, der Lagerungspuffer, enthielt nur noch die Bestandteile NaCl, Tris/HCl und Tween20. Bei den rückzufaltenden Proben wurden Proteinkonzentrationen von ca. 0,5-1 mg/ml gewählt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Ergebnisse der Rückfaltung mit Hilfe eines PAA-Gels ausgewertet.

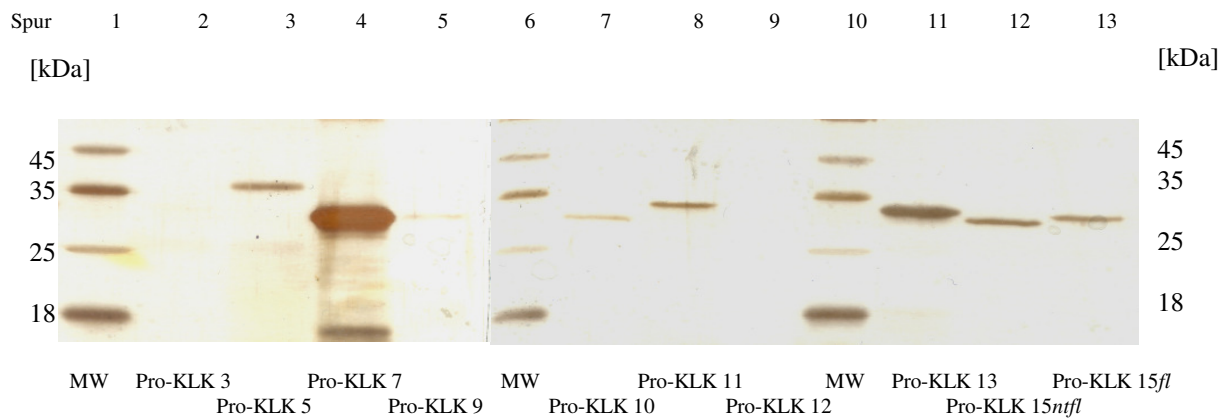


Abb. 30: Das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 7

Dargestellt sind die rückgefalteten Protein-Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3, 5, 7, 9 bis 13 und 15 (in *full length* und *near to full length* Variante) nach Auftrennung mit SDS-PAGE und Anfärbung mit Silbernitrat.

In Spur 1, 6 und 10 ist der *Molecular Weight* Marker *peq Gold* aufgetragen. In Spur 4 ist sehr stark die Bande von Pro-KLK 7 zu erkennen, das mit großer Ausbeute rückgefaltet werden konnte. Auch Pro-KLK 13 zeigte gute Rückfaltungsergebnisse, im Vergleich zu Rückfaltungsprotokoll 5 und 6 jedoch mit deutlich niedrigerer Ausbeute. Im Falle von Pro-KLK 5, 10, 11, 15 *near to full length* und 15 *full length* waren nach der Rückfaltung die Proteine zwar deutlich anfärbbar, jedoch, verglichen mit den vorangegangenen Rückfaltungsprotokollen zum Teil in weitaus niedrigerer Konzentration. Pro-KLK 9 konnte, wenn auch sehr schwach anfärbbar, als zarte Bande in Spur 5 erstmalig mit erfolgreichem Ergebnis angefärbt werden. Pro-KLK 3 und 12 zeigten erneut kein positives Ergebnis.



### 4.3.8 Die Rückfaltung Nr. 8

Dieses Protokoll wurde zur Rückfaltung einer Proform von KLK 10 entworfen, es bestand aus drei Rückfaltungspuffern und einem Lagerungspuffer. Der erste Rückfaltungspuffer enthielt Harnstoff, Tris/HCl und NaCl. Der zweite Rückfaltungspuffer enthielt neben Harnstoff und NaCl noch folgende Bestandteile: HEPES, MgCl<sub>2</sub>, Glycin, L-Arginin, Saccharose, Tween20 und die beiden Komponenten des Gluthation-Redoxsystems. Der darauf folgende dritte Rückfaltungspuffer war aus den gleichen Komponenten zusammengesetzt wie der vorangegangene, mit der Einschränkung, dass bei diesem Puffer kein Harnstoff beigefügt wurde. Der letzte Puffer, ein Lagerungspuffer, enthielt NaCl, Tris/HCl, CaCl<sub>2</sub> und Tween20. Die Proteinkonzentration betrug 0,5-1 mg/ml.

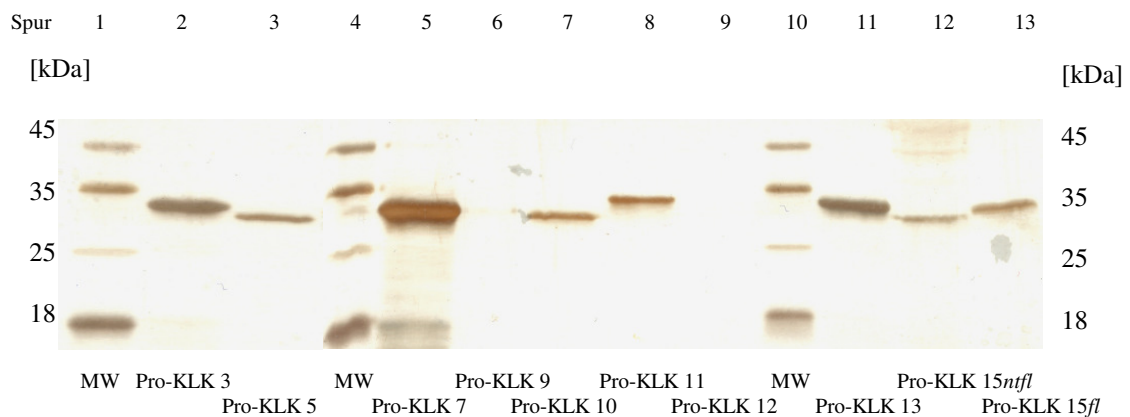


Abb. 31: Das Ergebnis der Rückfaltung Nr. 8

Dargestellt sind die rückgefalteten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3, 5, 7 und 9 bis 13 und 15 (in *full length* und *near to full length*-Variante) nach Auftrennung mit SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat. In Spur 1, 4 und 10 ist der peq Gold Marker aufgetragen, anhand dessen sich die Fragmentgröße der verschiedenen Spuren abschätzen lässt.

Dieses Rückfaltungsprotokoll bietet erstmalig sehr gute Faltungsbedingungen für Pro-KLK 3, das in Spur 2 mit einer starken Bande intensiv angefärbt werden konnte. Sehr gute Bedingungen auch für die Pro-KLKs 7 und 13 (Spur 5 und 11) sowie gute Bedingungen für die Pro-KLKs 5, 10, 11 und 15 (beide Varianten) in den Spuren 3, 7, 8, 12 und 13. Schlechte bzw. keine Rückfaltungsergebnisse wurden erneut bei Pro-KLK 9 und 12 erreicht.

## 5. *Diskussion*

### 5.1 **Klonierungsstrategie**

Zur Klonierung der Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 3-15 war vor Beginn die Auswahl eines geeigneten Vektors von großer Bedeutung. Durch die Tatsache, daß bei vielen KLKs Autoaktivierung bzw. gegenseitige Aktivierung der Proteine in aktiver oder inaktiver Form beschrieben wurde, und um dem komplexen Zusammenspiel der Gewebekallikreine näher auf den Grund gehen zu können, musste eine Möglichkeit gefunden werden, aktive und inaktive Proteine exakt voneinander unterscheiden zu können. Die Pro-KLKs unterscheiden sich vom maturen, enzymatisch aktiven Protein in erster Linie durch das Vorhandensein eines Propeptides, das (mit Ausnahme von KLK 5) sehr klein ist und nach Aktivierung der Proform abgespalten wird .

Der Vektor pQE100 enthält zwei sog. *Tags* (Erkennungsstellen): ein 6 x His-*Tag* (6 Histidinreste hintereinander) sowie ein *Tag* 100-Epitop (Antikörper-Erkennungssequenz). Nach Ligation der Pro-KLK-Sequenz in pQE100 befindet sich der Histidin-*Tag* am N-terminalen Ende und der *Tag* 100 am C-terminalen Ende des Inserts (s.Abb. 32). Durch diese Erkennungssequenzen wurde eine Unterscheidung zwischen Proform und maturem Protein ermöglicht. Die Pro-KLK-Proteine werden mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitäts-Chromatographie über den 6 x His-*Tag* gereinigt, der nach Aktivierung der Prosequenz mit abgespalten wird. Danach kann das aktive Protein anhand des *Tag* 100-Epitops am N-Terminus mittels Western Blot und speziellen Antikörpern erkannt werden. Diese Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Form der KLK-Proteasen ist die Grundvoraussetzung um die Aktivierungsmuster der Kallikrein-verwandten Peptidasen weiter untersuchen zu können.

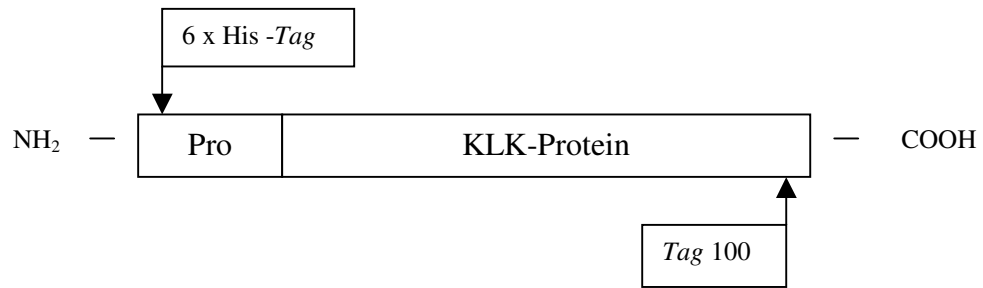


Abb. 32: Schematische Darstellung der Pro-KLK-Proteasen nach Klonierung in pQE100

Vereinfachte Darstellung eines Pro-KLK-Proteins nach der Klonierung in den Vektor pQE100. Die beiden Pfeile markieren die beiden *Tags*, den 6 x His-*Tag* und den *Tag* 100 über die eine Identifikation der Proteine sowohl in Proform als auch nach Abspaltung der Prosequenz ermöglicht wird. Der 6 x His-*Tag* besteht aus 6 Histidinresten, über die eine Bindung an Nickelionen mit späterer Reinigung über Nickel-Affinitäts-Chromatographie erfolgen kann. Darüber hinaus können an beide *Tags* spezifische Antikörper binden, so dass Pro-Sequenz und matures Enzym exakt voneinander unterschieden werden können.

## 5.2 Die Rückfaltungen der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Jedes Protein verfügt über eine charakteristische native Konformation, die in mehrere Strukturebenen differenziert werden kann. Die Aminosäuresequenz wird als Primärstruktur bezeichnet,  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind Elemente der Sekundärstruktur, und die komplexe Anordnung einer Polypeptidkette im Raum wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Durch Zusammenlagerung mehrerer Polypeptide und die Bindung von Kofaktoren, prosthetischen Gruppen oder Metallionen entsteht die Quartärstruktur eines Proteins. Die räumliche Struktur eines jeden Proteins ist bereits durch seine Aminosäuresequenz festgelegt, der Prozess der spontanen Proteinfaltung folgt thermodynamischen Regeln. Der thermodynamische Gradient zwischen der ungefalteten und nativen Konformation ist die treibende Kraft, die die Proteinfaltung erst möglich macht. Jedoch können auch thermodynamische Parameter nicht erklären, warum die Faltung bei manchen Proteinen schneller abläuft als bei anderen.

Die Proteinfaltung *in vitro* kann mehrere Tage dauern, während sie *in vivo* oft innerhalb weniger Sekunden oder Minuten abgeschlossen ist. Diese große Diskrepanz in der Reaktionsgeschwindigkeit ist verursacht durch die Beteiligung von Protein-Disulfid-Isomerasen, die die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken katalysieren, sowie durch Peptidylprolyl-Isomerasen und molekulare Chaperone, die die *cis/trans*-Isomerie einstellen (Jaenicke, 1991, Hiniker und Bardwell, 2003). Es gibt verschiedene Theorien zum Mechanismus der Proteinfaltung. Das sog. *Two-State-Modell* beschreibt den unmittelbaren Übergang vom ungefalteten in den gefalteten Zustand (Itzhaki *et al*, 1995). Die Entdeckung von Faltungs-Intermediaten, den sog. *Molten Globules* ließ einen neuen Faltungsweg vermuten. Bei den *Molten Globules* handelt es sich um Proteine in einem kompakten Zustand, die bereits Sekundärstrukturelemente enthalten und im Rahmen eines hierarchischen Faltungsweges schließlich die Tertiärstruktur einnehmen (Pitsyn, 1995). Mitte der 90er Jahre wurde der Begriff Faltungsweg durch den sog. Faltungstrichter ersetzt (Bryngelson *et al*, 1995). Man versteht hierunter eine energetische Landschaft, in der verschiedene ungefaltete Zustände eines Proteins auf verschiedenen Wegen den gleichen Endzustand erreichen, der mit der nativen Proteinkonformation und dessen energetischem Minimum identisch ist. Die glatte oder eher raue Beschaffenheit des Energietrichters ist in Abb. 33 exemplarisch dargestellt und bestimmt die Kinetik der Faltung (Chen und Dill, 2006).

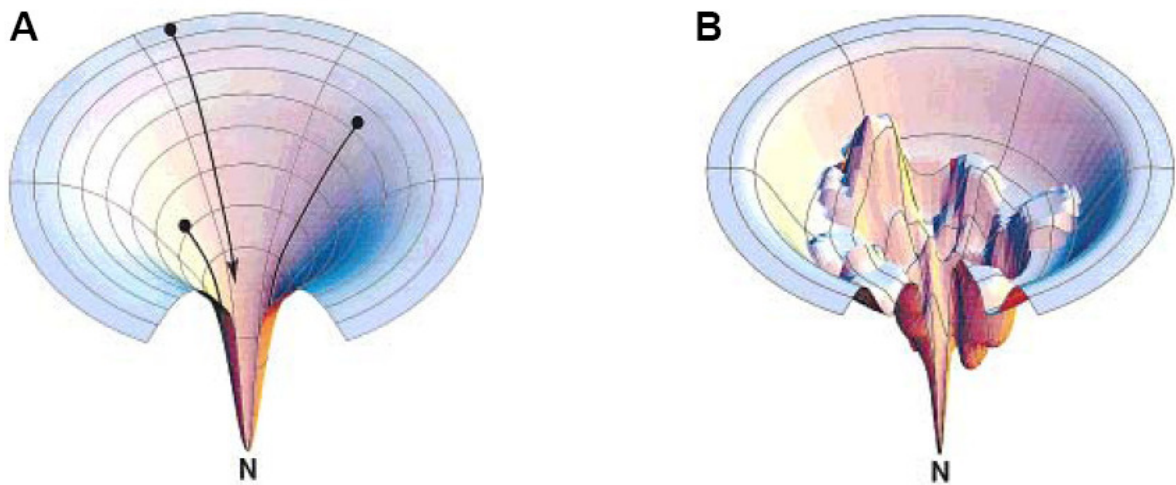


Abb. 33.: Schematische Darstellung eines Faltungstrichters mit glatter (A) oder rauher (B) Energielandschaft (entnommen aus Chen und Dill, 1998). N steht für das energetische Minimum. Die vertikale Achse repräsentiert die innere freie Energie der Proteinkonformation an jedem Punkt der Energielandschaft, d.h. die Summe der Energien der in der Struktur auftretenden Wechselwirkungen. Die lateralen Koordinaten repräsentieren die Freiheitsgrade der Polypeptidkette, die aus den Torsionswinkeln des Peptidrückgrats und der Seitenketten resultieren.

Bei der Protein-Überexpression entstehen im Inneren der Bakterienzellen unlösliche Einschluss-Körperchen, die eine große Menge falsch gefalteter und nicht funktionsfähiger Proteine enthalten. Um aus diesen Einschlusskörperchen das biologisch aktive Protein zu gewinnen, müssen diese zunächst isoliert und aufgelöst werden, hierfür werden sog. chaotropische Reagenzien wie Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff benutzt. Enthält das zu gewinnende Protein Disulfidbrücken, müssen reduzierende Agentien beigelegt werden, um das Protein aus den Einschlusskörperchen komplett zu lösen und sicherzustellen, dass falsch ausgebildete Disulfidbrücken zunächst reduziert werden, um anschließend während des Rückfaltungsprozesses korrekt ausgebildet zu werden. Der Prozess der Rückfaltung beginnt, sobald die Konzentration des denaturierenden Reagens sinkt. Dies kann durch Verdünnung der hochkonzentrierten Proteinlösung im Rückfaltungspuffer erfolgen, andere Möglichkeiten sind die Dialyse oder die Diafiltration.

Ein grundlegendes Problem bei der Proteinrückfaltung ist die Ausbildung von Aggregaten. Zwar kann dieses Risiko durch eine größere Verdünnung verringert werden, jedoch sind große Volumina niedrig konzentrierter Proteinlösung für die weitere Verarbeitung äußerst unpraktisch. Ziel ist es, Rückfaltungsstrategien zu entwickeln, die gerade auch bei hoher

Konzentration zuverlässige Ergebnisse erzielen. Einige Ansätze wurden entwickelt, um eine Proteinaggregation nach Möglichkeit zu unterdrücken:

- Hohe Verdünnung der denaturierten Proteinlösungen zur Rückfaltung
- Schrittweise Zugabe des denaturierten Proteins
- Fixierung des rückzufaltenden Proteins an einer Matrix, Rückfaltung des gebundenen Proteins (Stempfer *et al.*, 1996)
- Gebrauch spezifischer Antikörper, um die Aggregationsstellen zu blockieren und Protein-Protein-Interaktionen zu verhindern (Katzav-Gozensky *et al.*, 1996)
- Ausübung eines hydrostatischen Druckes von 1-3 kbar zur Trennung der Proteine (Randolph *et al.*, 2002)
- Zugabe molekularer Hitzeschockproteine um die Ausbeute an rückgefaltetem Protein zu erhöhen (Hartl, 1996)
- Beimengung niedermolekularer Zusätze in den Rückfaltungspuffer (De Bernardez Clark *et al.*, 1999) die eine Aggregation unterdrücken.

Zur Rückfaltung der exprimierten Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 wurden insgesamt 8 Versuchsansätze mit Veränderungen in Zusammensetzung und Konzentration der verwendeten Puffer gestartet. Für alle Rückfaltungen wurden Faltungshelfer verwendet, kleine Moleküle oder Detergenzien, die die Proteinstabilität auf verschiedene Weise erhöhen können. Sie werden in zwei Substanzgruppen unterteilt, die entweder den Vorgang der Proteinfaltung unterstützen oder die Aggregatbildung der Proteine verhindern.

Wie bereits beschrieben, ist die Rückfaltung verschiedener Proteine oft trotz struktureller Ähnlichkeiten auf genomischer und/oder Protein-Ebene äußerst schwierig und gestaltet sich häufig nach dem Motto *trial and error*. Dies trifft auch für die Familie der Kallikrein-verwandten Proteasen zu. Trotz ihrer großen Ähnlichkeiten untereinander konnte kein einheitliches Rückfaltungsprotokoll entwickelt werden.

Ähnlich auch den unterschiedlichen Expressionsmustern, wo zum Teil ganze Gruppen an KLKs koexprimiert werden, zeichnete sich im Laufe der Rückfaltungsversuche ab, dass einige Pro-KLK-Gruppen generell scheinbar unkomplizierter rückzufalten sind, da sie auch bei wechselnden Bedingungen in den verschiedenen Protokollen zu teilweise guter Ausbeute führten. Andere Pro-KLKs konnten erst nach mehreren Anläufen und selbst dann nur in niedriger Konzentration rückgefaltet werden, und wieder andere konnten mit den verwendeten Rückfaltungsversuchen gar nicht zur Rückfaltung gebracht werden.

## 5. Diskussion

	RF 1	RF 2	RF 3	RF 4	RF 5	RF 6	RF 7	RF 8
Pro-KLK3	-	-	-	-	-	-	-	++
Pro-KLK4	++++							
Pro-KLK5	-	-	-	-	++	+	+	+
Pro-KLK6	+++							
Pro-KLK7	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
Pro-KLK8	++							
Pro-KLK9	-	-	-	-	-	-	+	-
Pro-KLK10	-	-	-	+	+	+++	-	+
Pro-KLK11	-	-	-	-	+	+	+	+
Pro-KLK12	-	-	-	-	-	-	-	-
Pro-KLK13	-	-	-	+	++	+++	+	+
Pro-KLK14	-	-	-	+				
Pro-KLK15 ntl	-	-	-	+	+	+	+	+
Pro-KLK15 fl	-	-	-	+	+	+	+	+

Tab. 27: Die Rückfaltungen Nr. 1-8 und die Ausbeute der rückgefalteten Pro-KLK-Proteasen

Tabellarische Darstellung der Ausbeute an rückgefaltetem Protein bei den Rückfaltungen (RF) 1-8. Die Symbole sind, wie unten aufgeführt zu interpretieren und repräsentieren die quantitative Menge der Proteine. Im Falle von Pro-KLK 4, 6 und 8 konnten bereits in der ersten Rückfaltung (RF 1) große Mengen an Protein rückgefaltet werden, so dass diese Proteine in den weiteren Rückfaltungsversuchen nicht weiter getestet wurden (schraffierte Felder). Ähnlich verhält es sich bei Pro-KLK 14, das aufgrund von sehr geringer Proteinexpression nach dem vierten Rückfaltungsprotokoll nicht mehr weiter ausgetestet wurde.

Die Pro-KLKs 3, 5, 9-11 und 13-15 konnten mit den Rückfaltungsprotokollen 4-8 teilweise in geringer Menge bis hin zu sehr guter Ausbeute rückgefaltet werden. Besonders bei Pro-KLK 7, KLK 10 und KLK 13 konnten mitunter sehr gute Rückfaltungsergebnisse erzielt werden. Für KLK 12 wurde kein geeigneter Ansatz gefunden, ähnlich KLK 9, das in Rückfaltung 8 nur minimale Ausbeute zeigte.

Erklärung der Symbole:

- ++++ gute Ausbeute
- +++ mittlere Ausbeute
- ++ geringe Ausbeute
- + sehr geringe Ausbeute
- kein Nachweis von rückgefaltetem Protein

---

## 5.3 Die Kallikrein-verwandten Peptidasen als Teil proteolytischer Kaskaden

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen werden ganze Gruppen von Kallikrein-verwandten Peptidasen in unterschiedlichen Geweben gleichzeitig exprimiert. Die Tatsache dass sie in aktiver und/oder inaktiver Form an verschiedenen proteolytischen Kaskaden beteiligt sind ist mittlerweile unumstritten.

### 5.3.1 Die Samenflüssigkeit

Das Prostata-Sekret enthält neben Zinkionen und Saurer Phosphatase PSA, das bereits vielfach erwähnte Prostata-spezifische Antigen (KLK 3). PSA wird vom Epithel der Prostata in die Samenflüssigkeit sezerniert, wo es die Gel-bildenden Proteine Semenogelin I und Semenogelin II und zu einem kleinen Teil Fibronectin spaltet. Dadurch kommt es zu einer Verflüssigung des Samens mit erhöhter Mobilität der Spermien.

Semenogelin I und Semenogelin II werden von den Samenbläschen sezerniert und aggregieren nach der Ejakulation mit Fibronectin zu einer gelatineartigen Masse. Innerhalb von 5-20 Minuten kommt es durch proteolytische Aktivität zur Verflüssigung dieser Masse und die Spermien werden freigesetzt (Lilja *et al.*, 1987, 1998, Malm *et al.*, 1996). Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch PSA/KLK 3 erreicht, das aber scheinbar erst der letzte Dominostein in einer aufs Feinste regulierten proteolytischen Kaskade ist.

Die Kaskade beginnt mit der Ejakulation wo die spermienreiche Flüssigkeit des Nebenhodens mit Prostata-Sekret vermischt wird. Das Prostata-Sekret enthält neben den Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 2 bis 5, 8, 11, 12, 14 und 15 (Yousef und Diamandis 2001) das von den Samenbläschen gebildete Sekret mit Semenogelin I, Semenogelin II und Fibronectin. Sowohl Prostata als auch Prostata-Sekret sind durch eine hohe Konzentration an Zink-Ionen gekennzeichnet, und erwiesenermaßen werden viele KLKs durch allosterische reversible Bindung an Zink-Ionen inaktiviert (Malm *et al.*, 2000, Debela *et al.*, 2006, Debela *et al.*, 2007).

Die KLKs werden erst nach der Ejakulation durch Übertrag der Zink-Ionen auf die Semenogeline wieder aktiviert. Dieser Übertrag der Zinkionen bringt eine proteolytische Kaskade ins Rollen, die, hauptsächlich vermittelt durch Autoaktivierung von KLK 5, zur Aktivierung zahlreicher Kallikreine führt (Borgono *et al.*, 2007).



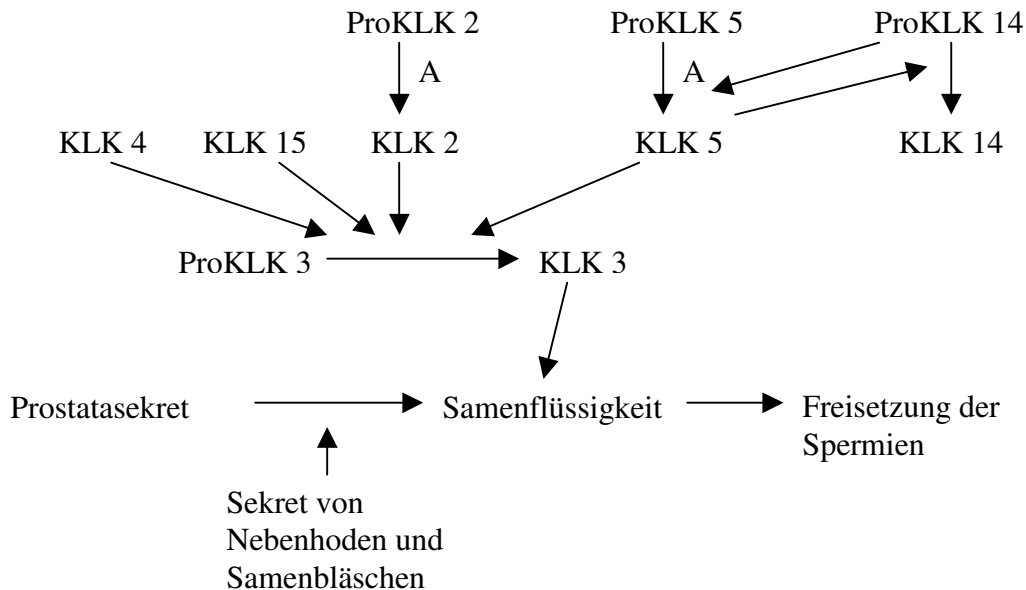


Abb 34: Die proteolytische Kaskade der Verflüssigung des Sperma

Vereinfachte Darstellung der proteolytischen Kaskade die zur Verflüssigung der Samenflüssigkeit mit Freisetzung der Spermien führt (modifiziert nach Pampalakis und Sotiropoulou, 2007). A steht für Autoaktivierung, die sowohl bei Pro-KLK 5 als auch bei ProKLK 2 beschrieben wurde (Brattsand *et al.*, 2005, Mikolajczyk *et al.*, 1997). Pro-KLK 3 wird von KLK 2, KLK 4, KLK 5 und KLK 15 aktiviert (Lovgren *et al.*, 1997, Takayama *et al.*, 2001, Michael *et al.*, 2006). KLK 14 ist ebenso in der Samenflüssigkeit exprimiert und wird durch KLK 5 aktiviert. Die Proform von KLK 5 wird auch von KLK 14 aktiviert (Brattsand *et al.*, 2005). Wichtigster Effekt dieser Kaskade ist die Aktivierung von KLK 3, das die in der Samenflüssigkeit enthaltenen Proteine Semenogelin I und II sowie Fibronektin spaltet und so zur Verflüssigung des Sperma führt.

### 5.3.2 Die Hornhautabschilferung

Die Haut setzt sich aus zwei Schichten zusammen, der Oberhaut und der Lederhaut. Der äußerlich sichtbare Teil der Oberhaut ist die Hornschicht, das *Stratum corneum*. Aufgabe der Hornschicht ist es, die unteren Hautschichten vor physischen und chemischen Noxen, vor der Gefahr der Dehydrierung und generell gegen pathogene Erreger zu schützen. Sie besteht aus etwa zwanzig Lagen ziegelsteinartig dicht aufeinander gepackter Hornzellen, den Keratinozyten, die durch Desmosomen mit den Nachbarzellen verzahnt sind. Die Keratinozyten sind abgestorbene Zellen ohne Zellorganellen, die im Rahmen der Desquamation als Schuppen abgestoßen werden.

Dieser Vorgang geschieht durch Proteolyse der Adhäsionsmoleküle die sich an den Desmosomen befinden (Lundstrom und Egelrud, 1990) und wird unter anderem über

verschiedene KLK-Proteasen gesteuert. Die beiden Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 5 und KLK 7 wurden schon seit langem mit Abschilferungsprozessen der Hornhaut in Zusammenhang gebracht, ihre ursprüngliche Bezeichnung lautete sogar *stratum corneum tryptic enzyme* (KLK 5) und *stratum corneum chymotryptic enzyme* (KLK 7), da sie in sehr hoher Konzentration im *Stratum granulosum*, der Oberhaut exprimiert werden (Borgono *et al.*, 2006). Sie werden von dieser Hautschicht ins *Stratum corneum* transportiert, wo sie Teil einer proteolytischen Kaskade sind.

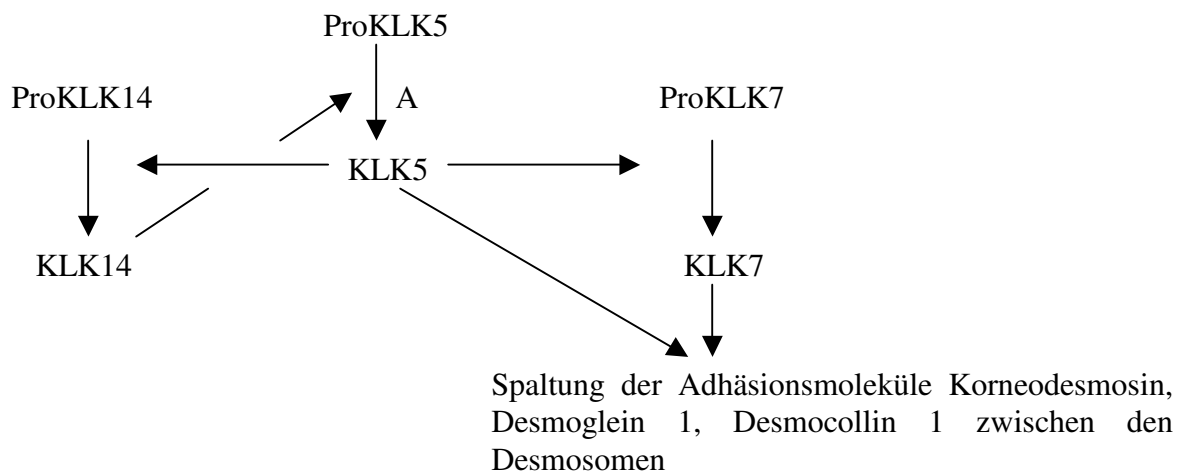


Abb 35: Die proteolytische Kaskade der Hornhautabschilferung

Vereinfachte Darstellung der Kallikrein-Kaskade die zur Hornhautabschilferung führt (modifiziert nach Pampalakis und Sotiropoulou, 2007). KLK 5 ist zu Autoaktivierung befähigt, daneben kann es die Proformen der beiden Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK 7 und 14 aktivieren (Brattsand *et al.*, 2005). KLK 14 wiederum aktiviert Pro-KLK 5 und erhöht somit die enzymatische Aktivität von KLK 5. KLK 5 spaltet Korneodesmosin, Desmoglein 1 und Desmocollin 1, KLK 7 spaltet Korneodesmosin und Desmocollin 1 (Caubet *et al.*, 2004). Nach Spaltung dieser Adhäsionsmoleküle lösen sich die Desmosomen an der Oberfläche der Keratinozyten voneinander und die abgestorbenen Zellen können abgestoßen werden.

## 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kallikrein-verwandten Peptidasen sind eine Gruppe von 15 Serinproteasen, mit Kallikrein 1 und der Kallikrein-verwandten Peptidase 3 (PSA) als bekannteste Mitglieder. Auf dem Gebiet der Kallikrein-Forschung konnten in den letzten 10 Jahren große Fortschritte erreicht werden. Sie sind zweifellos an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, jedoch auch eine enge Korrelation zwischen erhöhter Expression vieler Kallikrein-verwandter Peptidasen und Tumorerkrankungen wie dem Ovarial- und Mamma-Karzinom ist mittlerweile exemplarisch erwiesen. Einige KLK-Proteasen werden bereits als vielversprechende tumorassoziierte Biomarker zur Diagnosestellung, Verlaufskontrolle und Abschätzung der Prognose gehandelt, in der Hoffnung, ähnliche Erfolge wie bei dem bereits etablierten Tumormarker PSA zu erzielen. Auch die mögliche Verwendung einiger KLK-Proteasen als therapeutisches Mittel in der Tumorthherapie wird viel diskutiert.

Der Aktivierungsmechanismus der Kallikrein-verwandten Peptidasen konnte bislang nur in Bruchstücken geklärt werden. Die gleichzeitige Expression ganzer Gruppen von KLK-Proteasen in verschiedenen Organen und Geweben deutet stark auf die Existenz kaskadenartiger Aktivierungsprozesse hin. Ziel ist, diesen Mechanismus systematisch zu analysieren, um das komplexe Zusammenspiel zwischen inaktiven KLK-Proformen und aktiven KLK-Proteasen aufzudecken.

In dieser Arbeit wurden die Proformen der Kallikrein-verwandten Peptidasen 3-15 kloniert und 12 der 14 untersuchten Peptidasen konnten erfolgreich rückgefaltet werden. Die Grundlage zur fortführenden Analyse der Aktivierungs- und Expressionsmuster von KLK-Proteasen konnte somit geschaffen werden.

## 6. *Literaturverzeichnis*

Aznavorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA (1993) Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71, 1368-83.

Balk SP, Ko YJ (2003) Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 21, 383-91.

Basbaum CB and Werb Z (1996) Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 8, 731-8.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 44, 1-80.

Borgono CA and Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 876-90.

Borgono CA, Michael IP, and Diamandis EP (2004) Human tissue Kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2, 257-280.

Borgono CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, Sotiropoulou G, Diamandis EP (2007) A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem* 282, 3640-52.

Brattsand M and Egelrud T (1999) Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274, 30033-40.

Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, and Egelrud T (2005) A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 124, 198–203.

Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND, Wolynes PG (1995) Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21, 167-95.

Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, Ibrahimi I, Haeuptle MT, Dobberstein B (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 155, 416-433.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G (2004) Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122, 1235–1244.

Chen SJ and Dill KA (1998) Theory for the conformational changes of doublestranded chain molecules. *J Chem Phys* 109, 4602–4616.

Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J (1996) Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271, 6379–6388.

Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J (1997) An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11, 148–161.

Debela M, Magdolen V, Grimminger V, Sommerhoff C, Messerschmidt A, Huber R, Friedrich R, Bode W, Goetting P (2006) Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4: Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *J Mol Biol* 362, 1094-1107.

Debela M, Magdolen V, Schechter N, Valachova M, Lottspeich F, Craik CS, Choe Y, Bode W, Goetting P (2006) Specificity Profiling of Seven Human Tissue Kallikreins Reveals Individual Subsite Preferences. *Journal of Biol Chem* 281, 22678-25688.

De Bernardez Clark, E (1999) Refolding of recombinant proteins. *Curr Op in Biotechnology* 9, 157-163.

Diamandis EP, Fritsche H, Lilja H, Chan DW, Schwartz M (2002) Tumor Markers: Physiology Technology and Clinical Application. AAC Press Washington DC, 3-8.

Diamandis EP and Yousef GM (2002) Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 48, 1198-205.

Emami N and Diamandis EP (2007) Human tissue kallikreins: A road under construction. *Clin Chim Acta* 381, 78-84.

Emmert B und Gerstorfer M (2005) Crashkurs Gynäkologie, Urban & Fischer Verlag.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moses P, Paeper B, and Wang K (2000) Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 257, 119–130.
- Gierasch LM, Lacy JE, Thompson KF, Rockwell AL, Watnick PI (1982) Conformations of model peptides in membrane-mimetic environments. *Biophys J* 37, 275-84.
- Hanahan D and Weinberg LA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-9.
- Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, and Clements JA (2000) Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (*KLK*) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem* 275, 37397–37406.
- Hiniker A and Bardwell JC (2003) Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochemistry* 42, 1179-85.
- Holzscheiter L, Biermann JC, Kotsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, Luther T, Tjan-Heijnen VCG, Taliere M, Schmitt M, Sweep FCGJ, Span PN, Magdolen V (2006) Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of *KLK7* mRNA expression in breast cancer. *Clin Chem* 52, 1070-9.
- Horl WH (1989) Proteinases: potential role in health and disease. Design of enzyme inhibitors as drugs. Oxford university press, 573-81.
- Hsieh MH, Kuo JC, Tsai HJ (1997) Optimization of the solubilization and renaturation of fish growth hormone produced by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 66-72.
- Itzhaki LS, Otzen DE, Fersht AR (1995). The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J Mol Biol* 254, 260-88.
- Jaenicke R (1991) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* 30, 3147-61.
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ (2005) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55, 10-30.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Katzav-Gozansky T, Hanan E, Solomon B (1996) Effect of monoclonal antibodies in preventing carboxypeptidase A aggregation. *Biotechnol Appl Biochem* 23, 227-30.
- Khan AR, James MN (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 7, 815-36.
- Kraut H, Frey EK, and Werle E (1930) Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 192 1–21.
- Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, and Diamandis EP (2005) A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta* 1755, 1–14.
- Lilja H (1985) A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76, 1899-903.
- Lilja H (1997) Prostate-specific antigen: molecular forms and the human kallikrein gene family. *Br J Urol* 79, 44-8.
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB (1987) Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 80, 281-5.
- Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H (1997) Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular Kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 549-55.
- Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Olsson AY, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman UH, Stephan C, Talieri M and Yousef GM (2006) A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem* 387, 637–641.
- Lundström A, Egelrud T (1990) Evidence that cell shedding from plantar stratum corneum in vitro involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein I. *J Invest Dermatol* 94, 216-20.
- Magklara A, Grass L, Diamandis EP (2000) Differential steroid hormone regulation of human glandular Kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 59, 263–270.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, Diamandis EP (2003) Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6 : autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 948-955.
- Malm J, Hellman J, Hogg P, and Lilja H (2000) Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn<sup>2+</sup>, a tight-binding inhibitor. *Prostate* 45, 132–139.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc JM, Heudes D, Bruneval P, Doetschmann T, Menard J, Alheuc-Gelas (2001) Cardiovascular abnormalitis with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 98, 2634-9.
- Michael IP, Pampalakis G, Mikolajczyk SD, Malm J, Sotiropoulou G, and Diamandis EP (2006) Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression. *J Biol Chem* 281, 12743–12750.
- Obiezu CV and Diamandis EP (2005) Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* 224, 1–22.
- Pampalakis G, Diamandis EP, Sotiropoulou G (2006) The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. *Biol Chem* 387, 795–799.
- Qiagen, The QIAexpressionist (2003) A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
- Pampalakis G and Sotiropoulou G (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1776, 22-31.
- Paliouras M and Diamandis EP (2006) The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biol Chem* 387, 643–652.
- Paliouras M and Diamandis EP (2007) Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 102, 7-18.
- Pitsyn OB (1995) How the molten globule became. *Trends Biochem Sci* 20, 376-9.
- Randolph TW, Seefeldt M, Carpenter JF (2002) High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. *Biochim Biophys Acta* 1595, 224-34.



## 6. Literaturverzeichnis

---

- Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J (1991) The promoter of the prostatespecific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 5, 1921–1930.
- Sauter ER, Lininger J, Magklara A, Hewett JE, Diamandis EP (2004) Association of kallikrein expression in nipple aspirate fluid with breast cancer risk. *Int J Cancer* 108, 588–591.
- Schmitt M, Harbeck N, Daidone MG, Brünner N, Duffy NJ, Foekens JA, Sweep FCGJ (2004) Identification, validation, and clinical implementation of tumor-associated biomarkers to improve therapy concepts, survival, and quality of life of cancer patients: Tasks of the Receptor and Biomarker Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Int Journal of Oncology* 25, 1397-1406.
- Schultz RM and Liebman MN (1997) Structure-function relationship in protein families. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, Fourth Edition, Wiley-liss, 12-116.
- Sharma JN, Uma K, Noor AR, Rahmann AR (1996) Blood pressure regulation by the kallikrein-kinin system. *Gen Pharmacol* 27, 55-63.
- Shaw JLV and Diamandis EP (2007) Distribution of 15 Human Kallikreins in Tissues and Biological Fluids. *Clin Chem* 53, 1423-1432.
- Shvartsman HS, Lu KH, Lee J, Lillie J, Deavers MT, Clifford S, Wolf JK, Mills GB, Bast RC Jr., Gershenson DM, Schmandt R (2003) Overexpression of kallikrein 10 in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 90, 44–50.
- Sidiropoulos M, Pampalakis G, Sotiropoulou G, Katsaros D, Diamandis EP (2005) Downregulation of human kallikrein 10 (KLK10/NES1) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumour Biol* 26, 324–336.
- Silverthorn DU (1995) *Human physiology, an integrated approach*. New Jersey, Prentice Hall.
- Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Rudolph R (1996) Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat Biotechnol* 14, 329-34.
- Takagi T and Kubo K (1979) Sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes in 8 M urea with special reference to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 578, 68-75.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K (2001) Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 40, 15341–15348.

Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Akarawa T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28, 1-8.

Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I (1998) Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent--application to a human single-chain Fv fragment. *J Immunol Methods* 219, 119-29.

Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogot LM, Scarisbrick IA, Blaber M (2007) Activation Profiles and Regulatory Cascades of the Human Kallikrein-related Peptidases. *J Biol Chem* 282, 31852-64.

Yousef GM, Borgono CA, Scorilas A, Ponzzone R, Biglia N, Iskander L, Polymeris ME, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP (2002) Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 expression in breast tumours indicates association with poor prognosis. *Br J Cancer* 87, 1287–1293.

Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP (2000) Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 125–133.

Yousef GM and Diamandis EP (2001) The new human tissue kallikrein gene family: structure, function and association to disease. *Endocr Rev* 22, 184–204.

Yousef GM and Diamandis EP (2002) Expanded human tissue kallikrein family-novel potential cancer biomarkers. *Tumor Biol* 23, 185-192.

Yousef, GM and Diamandis EP (2002) Kallikreins, steroid hormones and ovarian cancer: is there a link? *Minerva Endocrinol* 27, 157-66.

Yousef GM and Diamandis EP (2003) An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumour markers. *Clin Biochemistry* 36, 443-452.

Yousef GM and Diamandis EP (2003) Tissue kallikreins: new players in normal and abnormal cell growth? *Thromb Haemost* 90, 7-16.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgono CA, Iskander L, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP, Katsaros D (2003) Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol* 119, 346–355.

Yousef GM, Luo LY, and Diamandis EP (1999) Identification of novel human kallikrein-like genes on chromosome 19q13.3-q13.4. *Anticancer Res* 19, 2843–2852.

Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgono CA, Kishi T, Memari N, Michael P, Sidiropoulos M, Kurlender L, Economopolou K, Kapadia C, Komatsu N, Petraki C, Elliott M, Scorilas A, Katsaros D, Levesque MA, Diamandis EP (2005) Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem* 39, 11–79.

Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Fracchioli S, Iskander L, Borgono C, Rigault de la Longrais IA, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP (2003) Prognostic value of the human kallikrein gene 15 expression in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 3119–3126.

Yousef GM, White NM, Michael IP, Cho JC, Robb JD, Kurlender L, Khan S, Diamandis EP (2005) Identification of new splice variants and differential expression of the human kallikrein 10 gene, a candidate cancer biomarker. *Tumour Biol* 26, 227-235.

---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
ARE	Androgen Response Elements
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
BRCA 1/2	<i>Breast cancer</i> Gene 1/2
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG-Inseln	Genomische Region mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleotiden
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GdnHCl	Guanidin-Hydrochlorid
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GTP	Guanosintriphosphat
His-Tag	Histidin-Tag (His <sub>6</sub> -Peptid)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatographie</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalten
KLK	Kallikrein-verwandte Peptidase (Protein)
<i>KLK</i>	Kallikrein-verwandte Peptidase (Gen)
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
LMW	Low molecular weight-Marker
M	Musculus (lat)
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MW	Molekulargewicht
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAA	Polyacryl-Amid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen Emissions Tomographie
pH	pH-Wert
Pro-KLK	Proform einer Kallikrein-verwandten Peptidase (Protein)
Pro- <i>KLK</i>	Proform einer Kallikrein-verwandten Peptidase (Gen)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNM	Klassifikation zur Tumor-Stadieneinteilung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

SBT	Substratbindende Tasche
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sog.	Sogenannt/e
Tab.	Tabelle
UPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

### Aminosäuren

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

## ***Lebenslauf***

### Persönliche Daten

Name:	Wagner
Vorname:	Susanne
Geburtsdatum/-ort:	26.02.1980 in Hirschau
Eltern:	Dr. Hans und Irene Wagner
Konfession:	römisch-katholisch
Familienstand:	ledig

### Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule Max-Josef, Amberg
1990 – 1999	Erasmus-Gymnasium, Amberg

### Hochschulbildung

10/99 – 9/00	Universität Regensburg, Studiengang <b>Diplombiologie</b>
10/00 – 3/04	Freie Universität Berlin, Studiengang <b>Humanmedizin</b>
10/02	Physikum
9/03	Erstes Staatsexamen
4/04 – 4/07	TU München, Studiengang <b>Humanmedizin</b>
4/06	Zweites Staatsexamen
4/07	Drittes Staatsexamen
5/07	Approbation

### Praktisches Jahr (2006- 2007)

<b>Chirurgie</b>	Prof. Heitland, Klinikum München-Bogenhausen
<b>Gynäkologie</b>	Prof. Buttigieg, St. Luke´s Hospital, Malta
<b>Innere Medizin</b>	Prof. Wechsler, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München

Famulaturen (2003 – 2005)

<b>Unfallchirurgie</b>	Krankenhaus St. Gertrauden, Berlin
<b>Allgemein- und Sportmedizin</b>	Praxis Dr. Aulinger, München
<b>Gynäkologie</b>	Klinikum Rechts der Isar, München
<b>Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde</b>	Praxis Dr. Naumann, München

Ärztliche Tätigkeit

Seit 8/2007	Assistenzärztin der Inneren Medizin, Kreiskrankenhaus Erding Prof. Dr. med. H. P. Emslander
-------------	---



## *Danksagung*

Während dem großen Projekt Doktorarbeit, das 2 Bundeskanzler(innen) und 4 Superstars gesehen hat, haben einige Menschen durch ihre Unterstützung, Ermutigung und Freundschaft einen ganz besonderen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet.

Mein Betreuer PD Dr. Viktor Magdolen, der mir in unermüdlichen Diskussionen eine Ahnung vermittelte, was wahrer Forschungsgeist bedeutet. Danke für die Geduld, die vielen geopferten Nerven, die Motivation und grenzenlose Unterstützung. Auch Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt als Leiter der Klinischen Forschergruppe an der Frauenklinik gilt mein Dank.

Sabine Creutzburg war im Laboralltag eine riesige Hilfe. Ihr Fachwissen, ihre Hilfsbereitschaft und Geduld war bei so manchen Versuchen lebensrettend. Vielen Dank!

Nicht zu vergessen Conny, Simone und Kathrin. Durch sie wurde die Zeit im Labor so einzigartig und für uns vier wohl unvergesslich. Danke für euere wunderbare Freundschaft, die, da bin ich sicher, noch viele Bundeskanzler(innen) überstehen wird.

Elisabeth, Christine und Johannes, beste Freunde, wichtige Berater, oft Rettungsanker und liebe Geschwister. Gemeinsam sind wir verschworen gegen den Rest der Welt.

Ganz besonders meine Eltern als meine treuesten Fans und engste Vertraute in jeder Lebenslage. Ich danke euch von Herzen für die liebevolle Unterstützung, die ich schon mein ganzes Leben lang erfahren durfte. Ihr habt mir alles ermöglicht, mir gleichzeitig Wurzeln und Flügel geschenkt. Ihr seid meine Superstars!