

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Bestimmung posttranslationaler Modifikationen von Chemokinen  
zur Identifikation neuer therapeutischer Targets im Kontext  
entzündlicher Krankheiten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.) für das Fachgebiet  
Medizinische Immunologie

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mario Steffen Grünberg  
geboren 07.06.1984 in Räckelwitz

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Barbara Seliger  
Gutachter 1: Prof. Dr. Barbara Seliger  
Gutachter 2: Prof. Dr. Claudia Wickenhauser  
Gutachter 3: Prof. Dr. Wolfgang Bäumer (FU Berlin)

09.07.2019

28.11.2019

## Referat

In entzündlichen Vorgängen im menschlichen Organismus ist eine kaum überschaubare Anzahl von Proteinen beteiligt, welche in die Entstehung, Dauer und das Abklingen der Inflammation involviert sind. Einen wesentlichen Anteil macht dabei die Gruppe der Chemokine aus. Diese Signalproteine sind essentiell bei der Aufrechterhaltung von Entzündungen. Sie werden infolge inflammatorischer Stimuli von Immunzellen exprimiert und aktivieren diese. Posttranslationale Modifikationen der Chemokine beeinflussen ihre grundlegenden Eigenschaften, wie bspw. die Stabilität und die Rezeptoraffinität. Ziel dieser Arbeit war es, die mögliche Aktivierung des Chemokins CCL14 durch Kallikrein-verwandte Peptidasen (KLK) nachzuweisen. Desweiteren sollte Glutaminylyklase-katalysierte (QC) Pyroglutamatbildung bei einer Auswahl von Chemokinen analysiert werden, welche als N-terminal erste Aminosäure Glutamin bzw. Glutaminsäure aufweisen. Für diese Untersuchungen wurden rekombinante Chemokine und KLK hergestellt. Zur Aufreinigung der Proteine wurden verschiedene chromatographische Strategien entwickelt. Gleichzeitig sollte deren Intaktheit und biologische Aktivität gewährleistet bleiben. Das aufgereinigte CCL14 und die KLK 5, 7, 8, 11 und 14 wurden miteinander inkubiert. Durch anschließende massenspektrometrische Analyse konnte die selektive Abspaltung der N-terminalen ersten acht Aminosäuren von CCL14 durch die KLK 5 und 8 ermittelt werden. Mit KLK-aktiviertem CCL14 konnte in Zellassays dessen chemotaktische Wirkung nachgewiesen werden. Weder die KLK, noch unbehandeltes CCL14 induzierten hingegen Chemotaxis. Erstmals konnte eine KLK-katalysierte CCL14-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Gegenwart von KLK5 und CCL14 in humanem nekrotischem bzw. entzündetem Gewebe konnte gezeigt werden. Die rekombinant hergestellten Chemokine CCL7, 8, 13, 15, 16, 25 und CXCL4 wurden mit QC behandelt. Anschließend konnte mittels Massenspektrometrie eine N-terminale Pyroglutamatbildung bei CCL25 und partiell bei CXCL4 nachgewiesen werden. Für diese beiden Chemokine wurde die Glutaminylyklase-katalysierte N-terminale Pyroglutamatbildung erstmals gezeigt. Die zwei evaluierten Enzym-katalysierten Modifikationen dieser proinflammatorischen Chemokine bewirken wahrscheinlich eine gesteigerte Rezeptoraffinität und eine höhere Halbwertszeit im Organismus. In diesem Kontext stellen sowohl KLK, als auch Glutaminylyklasen potentielle Targets bei der Therapie chronischer Entzündungen dar. Mit PQ50 und PQ912 sind beim Kooperationspartner Glutaminylyklase-Inhibitoren und in dieser Arbeitsgruppe mit LEKTI-Domänen KLK-Inhibitoren identifiziert worden, welche die Chemokinmodifikationen und somit entzündungsfördernde Reaktionen hemmen können.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Entzündung.....	1
1.2. Chemokine.....	2
1.2.1. Die Rolle der Chemokine bei Entzündungsreaktionen.....	4
1.2.2. Posttranslationale Modifikationen von Chemokinen .....	8
1.2.3. N-terminale Pyroglutamat-Modifikation von Chemokinen .....	8
1.2.4. Das Chemokin CCL14.....	9
1.3. Kallikrein-verwandte Peptidasen (KLK) .....	11
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>16</b>
3.1. Puffer und Lösungen .....	16
3.2. Antikörper.....	17
3.3. Zymographie .....	18
3.4. Chromatographie .....	18
3.5. Kulturmedien.....	19
3.6. Restriktionsendonukleasen .....	20
3.7. Primer .....	20
3.8. Plasmidvektoren.....	21
3.9. Mikroorganismen/ Zelllinien.....	22
3.10. Enzyme .....	22
3.11. Biopsiematerial .....	22
3.12. Molekularbiologische Methoden.....	23
3.12.1. Agarosegelelektrophorese .....	23
3.12.2. Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
3.12.3. PCR-Anwendungen .....	23
3.12.4. Aufreinigung von DNA .....	25
3.12.5. DNA-Modifikation.....	25
3.12.6. Transformation .....	26

3.13.	Mikrobiologische Arbeiten .....	27
3.13.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	27
3.13.2.	Kultivierung von <i>P. methanolica</i> .....	27
3.13.3.	Chemokinexpression mit <i>P. pastoris</i> .....	28
3.14.	Proteinchemische Verfahren .....	28
3.14.1.	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Kulturüberständen .....	28
3.14.2.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	28
3.14.3.	Protein-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau .....	29
3.14.4.	Protein-Färbung mit Silbernitrat .....	29
3.14.5.	Westen-Blot und Immunodetektion .....	29
3.14.6.	Zymographie .....	29
3.14.7.	Aktivitätsbestimmung der Kallikrein-verwandten Peptidasen .....	30
3.14.8.	Proteinisolation aus humanem Biopsiematerial .....	30
3.15.	Chromatographie .....	30
3.15.1.	Kationentauscherchromatographie .....	31
3.15.2.	Reversed-Phase-HPLC .....	31
3.15.3.	Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) .....	32
3.15.4.	Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	32
3.16.	Massenspektrometrie .....	33
3.17.	Zellassays .....	33
3.17.1.	Kalziumassay .....	33
3.17.2.	Zellmigrationsassay .....	34
3.17.3.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	35
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
4.1.	Heterologe Expression und Aufreinigung von Chemokinen .....	36
4.2.	Heterologe Expression und Aufreinigung von Kallikrein-verwandten Peptidasen ...	37
4.3.	Nachweis der proteolytischen Aktivität von Kallikrein-verwandten Peptidasen .....	41
4.4.	Proteolytische Aktivierung von CCL14 .....	42
4.5.	Enzymatische Pyroglutamatbildung am N-Terminus von Chemokinen .....	49
4.6.	Nachweis von Chemokinvarianten in entzündetem Gewebe .....	53

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>56</b>
5.1. Proteolytische Aktivierung von CCL14 durch Kallikrein-verwandte Peptidasen .....	56
5.2. Induktion von Chemotaxis durch KLK-aktiviertes CCL14.....	60
5.3. Enzymatische Pyroglutamatbildung.....	61
5.4. Nachweis von Chemokinvarianten in entzündetem und nekrotischem Gewebe .....	66
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>8. Thesen .....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	Absorption Unit
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Bovines Serum
HaCaT	Human adult low Kalzium high Temperature keratinocytes
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HOS	Human Osteosarcoma
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung Time of Flight
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>P. methanolica</i>	<i>Pichia methanolica</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
QC	Glutaminylyklase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifiers
SV	Säulenvolumen

TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenkonzentration
$\lambda$	Lambda (entspricht Wellenlänge)

# 1. Einleitung

## 1.1. Entzündung

Eine Entzündung ist die Antwort eines komplexen biologischen Organismus auf einen entzündungsauslösenden Reiz. Diese Auslöser sind z.B. Verletzungen, Allergene oder bakterielle bzw. virale Infektionen. Entzündliche Prozesse gehören zu den protektiven Mechanismen des menschlichen Körpers und sind ein Faktor der Genesung. Die Inflammation stellt somit einen Abwehrmechanismus dar, welcher die Funktion hat, den Schädigungsreiz zu beseitigen, dessen Ausbreitung zu unterbinden und eventuell eingetretenen Schäden entgegen zu wirken. Sie ist Bestandteil der Immunantwort des Organismus, kann jedoch im Verlauf bei Kontrollverlust in gesundheitlichen Nachteilen resultieren. Der Schaden für die betroffene Person überwiegt dann dem Nutzen. Therapien, welche auf einem anti-inflammatorischen Wirkmechanismus basieren, sind von großer Relevanz bei entzündlichen Prozessen.

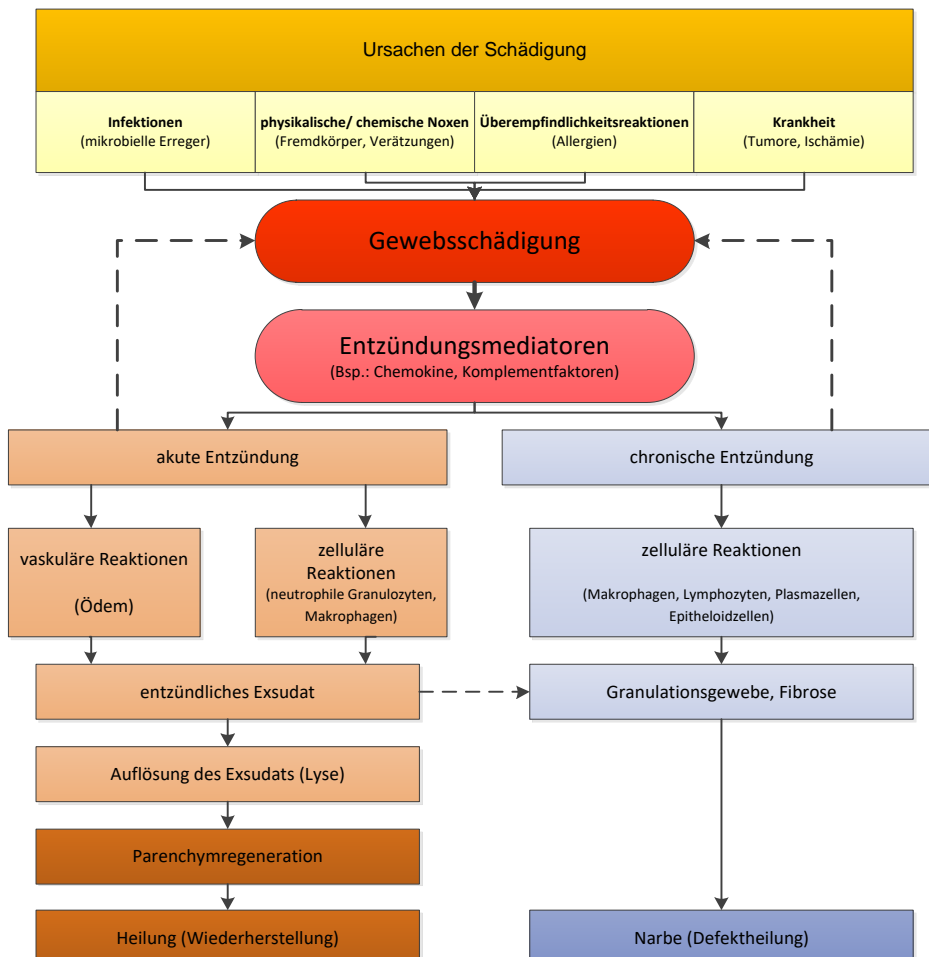


Abbildung 1: Schema der Ursache und des Ablaufes einer Entzündung nach BÖCKER *et al.* (1997)

Chemokine und Chemokin-modifizierende Proteine stellen im Kontext entzündlicher Erkrankungen einen potentiellen Angriffspunkt einer solchen Behandlung dar. Sie sind ein



zentrales Element der Entzündungsantwort und beeinflussen deren Dauer und Ausmaß. Als Entzündungsmediatoren aktivieren sie verschiedene Typen von Immunzellen und locken sie chemotaktisch an den Ort der Entzündung, um dort den entzündungsauslösenden Reiz zu beseitigen. Eine Dysregulation der Chemokinexpression oder eine veränderte Chemokinaktivität und -halbwertszeit haben oft eine überschießende Inflammation zur Folge. Der betroffene Organismus wird lokal oder systemisch geschädigt und die Entzündung wird chronisch.

Chronische Entzündungen sind von entscheidender Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn. Bei diesen Krankheitsbildern hat die Menge der durch Chemokine rekrutierten Leukozyten wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der Erkrankung [NORMAN & HICKEY, 2005]. Bei chronischen Entzündungen werden konsistent inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine freigesetzt, welche wiederum ein Abklingen der Inflammation verhindern. Angrenzende gesunde Bereiche des Gewebes werden geschädigt und mit zunehmender Dauer kommt es zur Bildung entarteter Zellen und zur Krebsentstehung [FEDERICO *et al.*, 2007].

Bei Autoimmunerkrankungen erzielen Therapien, die auf einem anti-inflammatorischen Wirkmechanismus basieren, eine Linderung von Beschwerden und beugen der Kanzerogenese vor [GONDA *et al.*, 2009]. Ein Beispiel sind Therapien mit monoklonalen Antikörpern, welche Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  oder IL-6 binden bzw. Interleukin-Rezeptoren blockieren und somit die Signalkaskade unterbrechen. Die Wirkmechanismen zielen auf eine Minderung der inflammatorischen Prozesse ab. Der bislang einzig zugelassene Antikörper, der einen Chemokinrezeptor (CCR4) blockiert ist Mogamulizumab [VELA *et al.*, 2015]. Weitere befinden sich in klinischen Phasen [UDDIN *et al.*, 2017].

### **1.2. Chemokine**

Chemokine sind eine rund 50 Mitglieder umfassende Gruppe peptidischer Botenstoffe und eine Unterfamilie der Zytokine. Unter den Chemokinen, welche aus ca. 75 bis 130 Aminosäuren bestehen, gibt es Homologien von 20 bis zu 90 % in der Aminosäuresequenz. Ihre wichtigste Funktion ist die Induktion der Chemotaxis bei Immunzellen. Sie werden infolge proinflammatorischer Stimuli von verschiedenen Gewebszellen sowie Leukozyten exprimiert und sezerniert. Chemokine wirken ihrerseits aktivierend auf bestimmte Leukozyten, wodurch deren Transmigration in das entzündliche Gewebe induziert wird [JOHNSTON & BUTCHER, 2002]. Sie sind der zentrale Faktor der Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse. Außerdem sind sie in eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen involviert. Dazu zählen bspw. die Wundheilung, Angiogenese, Embryonal- und Organentwicklung, Tumorgenese und Metastasierung [LE *et al.*, 2004].

Die Regulation der Chemokinexpression findet auf verschiedenen Ebenen statt. Diese sind die Regulation der Transkription und Translation, das alternative Splicing und die Enzymvermittelte posttranslationale Modifikation [MORTIER *et al.*, 2012]. Exprimiert werden Chemokine in verschiedenen Organen, Gewebearten und Zellen wie z.B. in Monozyten und Thrombozyten, den Lymphknoten [DAL SECCO *et al.*, 2009] und in Leber und Darm [CHO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2016]. Für eine rasche Sekretion infolge eines Reizes liegen inaktive Chemokinproformen konstitutiv in Endothelzellen oder Sekretgranula vor [OYNEBRATEN *et al.*, 2005]. Chemokine steuern den Austritt von Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Knochenmark und sind bedeutsam für die Lokalisierung und Aktivierung dieser Immunzellen im peripheren Gewebe. Sie werden in die drainierenden Lymphknoten gelockt, um dort eine adaptive Immunantwort zu initiieren [SOKOL & LUSTER, 2015].

Die Familie der Chemokine kann, ihrer physiologischen Funktion entsprechend in inflammatorische und homöostatische Signalproteine unterteilt werden. Die homöostatischen Chemokine werden konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert und sind vorrangig verantwortlich für die Migration von Leukozyten sowie von Stamm- und Progenitorzellen bei der Entwicklung von Organen [ANDERS *et al.*, 2014]. Die Mehrzahl der Chemokine sind inflammatorische Chemokine. Sie werden infolge von äußeren Reizen und zellulärem Stress, wie z.B. Verletzungen oder Infektionen exprimiert. Eine strikte Trennung zwischen diesen beiden Gruppen ist nicht möglich, da einige Chemokine im Organismus sowohl homöostatisch als auch inflammatorisch wirken können [BAGGIOLINI & LOETSCHER, 2000]. Je nach Position bestimmter Cysteinreste werden die Chemokine in C-, CC-, CXC- und CX3C- Chemokine unterteilt. Chemokine, welche ausschließlich im Menschen vorkommen sind u.a. CCL13, CCL14 und CCL15 [ZLOTNIK & YOSHIE, 2000].

Es sind 21 chemokin-bindende Rezeptoren bekannt. Die wichtigsten Rezeptoren bei der Signaltransduktion der Chemokine sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Siebentransmembrandomänentyp (GPCR), speziell die Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCR. Sie gehören unter den Rezeptoren zu den wichtigsten Angriffspunkten für Therapieansätze. Zwischen 50 und 60 % aller Medikamente, welche auf Rezeptor-Blocking abzielen sind gegen GPCR gerichtet [SALON *et al.*, 2011].

Die Gruppe der Chemokinrezeptoren ist wie die Chemokine selbst in vier Subtypen (CCR, CXCR, XCR und CX3CR) unterteilt [ZLOTNIK *et al.*, 2006]. Die Aktivierung der Rezeptoren durch Chemokine führt zu intrazellulärer Signalweiterleitung, Kalziummobilisierung, Zellaktivierung/-migration, gesteigerter Transkription von Genen, Migration von Rezeptoren auf der Zellmembran sowie der Freisetzung weiterer Chemokine. Unterschiedliche Zelltypen exprimieren eine Vielzahl verschiedener Chemokinrezeptoren. Diese können auch von Krankheitserregern (z.B. Malaria, HIV) als Eintrittspunkt zu einem Organismus genutzt werden [DEAN *et al.*, 1996]. Ein Chemokin kann an unterschiedliche Chemokinrezeptoren

binden. Es wurde gezeigt, dass Chemokinrezeptoren, die pro-inflammatorische Chemokine binden, eine weitaus höhere Anzahl an Liganden haben als jene, die homöostatische oder anti-inflammatorische Chemokine binden [NOMIYANA *et al.*, 2011].

Chemokinrezeptoren sind Vermittler bei der Migration und Lokalisation von Leukozyten. Daraus resultiert ihre essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Funktion des Immunsystems [BENNETT *et al.*, 2011]. Dendritische Zellen beispielsweise exprimieren eine Vielzahl von Chemokinen [THAISS *et al.*, 2011]. Zudem regulieren sie die Expression von Rezeptoren von pro-inflammatorischen Chemokinen herab (z.B. CCR1 und CCR5) und die von homöostatischen Chemokinen herauf (z.B. CCR7) [MANTOVANI *et al.*, 1998]. Die Expression von Chemokinrezeptoren in Immunzellen, welche chronisch entzündliches Gewebe infiltrieren, ist bei der Entstehung und Ausbreitung von Krebs involviert. Auch im Tumorgewebe selbst hat die Expression von einigen homöostatischen Chemokinrezeptoren Einfluss auf deren Fähigkeit zu metastasieren [ZLOTNIK *et al.*, 2011].

### **1.2.1. Die Rolle der Chemokine bei Entzündungsreaktionen**

Essentiell für den Verlauf einer Entzündung ist die Leukozytenrekrutierung in das betroffene Gebiet. Sie wird von regulatorischen Proteinen, wie Wachstumsfaktoren, Prostaglandinen, Chemokinen oder Komplementfaktoren induziert und gesteuert. Bei Immunreaktionen infolge einer Entzündung oder Infektion müssen Leukozyten an den betroffenen Ort rekrutiert werden und anschließend in sekundäre lymphatische Organe einwandern, um eine Immunantwort zu gewährleisten [NATHAN, 2002]. Die wichtigste Funktion übernehmen dabei die Chemokine. Sie steuern die Rekrutierung der Immunzellen und deren intrazelluläre Kontrollmechanismen. Die wesentlichen Elemente der Inflammation, wie deren Ausbreitung und Dauer sowie die Aktivierung und Chemotaxis von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, werden von Zytokinen und Chemokinen reguliert [PROOST *et al.*, 1996; ROT & VON ANDRIAN, 2004]. Dabei interagieren die Chemokine über spezifische GPCR mit verschiedenen Arten von Leukozyten.

Entscheidend für die Chemokinaktivität ist die Expression von Chemokinrezeptoren auf Immunzellen und die Bindung an GAGs (Glykosaminoglykane). Diese werden vermehrt in entzündlichem Gewebe gebildet und immobilisieren Chemokine. Daraus resultiert eine Steigerung der Chemokinkonzentration hin zum Ort der Entzündung [WEBER *et al.*, 2013].

Die Bindung eines Chemokins an dessen Rezeptor führt zur transendothelialen Migration von Leukozyten durch Wechselwirkungen mit Selektinen und Integrinen. Anschließend infiltrieren Leukozyten das entzündete Gewebe und folgen dabei dem Konzentrationsgradienten der Chemokine [VANDERCAPPELLEN *et al.*, 2008]. Einen spezifischen Chemokinrezeptor überexprimierende Zellen wandern zur lokal höchsten Konzentration des Liganden [SIEGENTHALER & BLUM, 2006]. Leukozyten haften an Endothelzellen und transmigrieren in Richtung der ansteigenden Chemokinkonzentration (siehe Abb. 2).

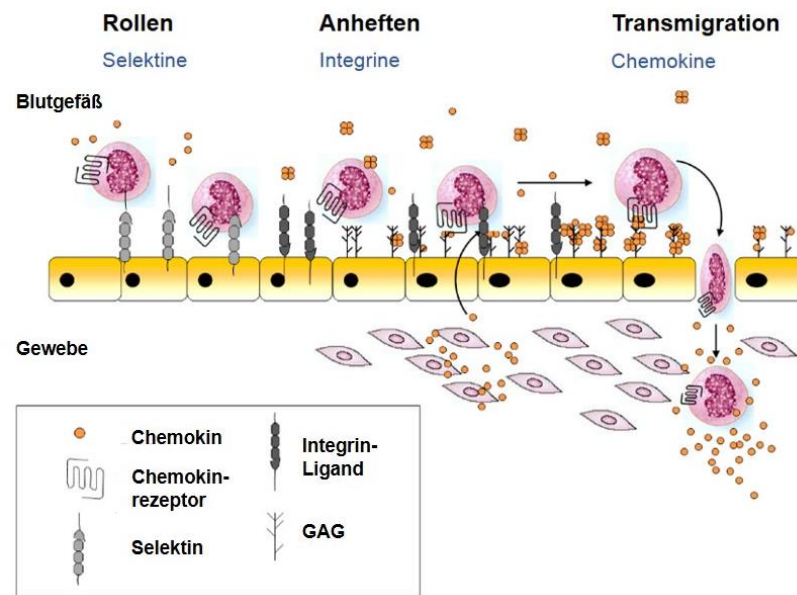


Abbildung 2: Leukozytenmigration in inflammatorisches Gewebe zum Ort der lokal höchsten Chemokinkonzentration nach PROUDFOOT *et al.* (2017)

Der Kontakt an die Endothelzellen wird durch Selektine vermittelt. Es existieren drei Arten von Selektinen: E- und P-Selektin kommen auf dem Endothel von Blutgefäßen vor, P-Selektin auch auf Thrombozyten und L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert. Selektine induzieren das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels der Blutgefäße. Durch Interaktion der Selektine mit Polysaccharidgruppen auf der Oberfläche von Leukozyten, werden sie an den Ort der Entzündung dirigiert [ZARBOCK *et al.*, 2011]. In diesen Vorgang sind ebenso Integrine involviert. Diese Membranproteine vermitteln die Anheftung der Leukozyten an das Gefäßendothel, was Voraussetzung für deren Extravasation in entzündetes Gewebe ist [MULLER, 2013].

Bei Erkrankungen, welche mit chronischen Entzündungen einhergehen, führt eine stark erhöhte Einwanderung und Aktivität von Leukozyten nach und nach zu einer schweren Schädigung des betroffenen Gewebes bis hin zum Verlust der Funktion. Die mobilisierten Immunzellen bilden bei mikrobiell bedingten Entzündungsreaktionen radikale Sauerstoffspezies zur Bekämpfung der Mikroorganismen. Die freien Radikale schädigen jedoch auch die eigene DNA im Zellkern, was zu Mutationen führt [REUTER *et al.*, 2010]. Chemokine als Lockstoffe und Aktivatoren für Leukozyten bzw. deren entsprechende Rezeptoren stellen daher potentielle Angriffspunkte zur Behandlung solcher Krankheiten dar.

Für entzündliche Erkrankungen sind Zusammenhänge mit Chemokinwirkungen und ihrer erhöhten Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe bekannt. Beispielhaft können u.a. Arteriosklerose [BRAUNERSREUTHER *et al.*, 2007], Morbus Crohn [APOSTOLAKI *et al.*, 2008], und Asthma bronchiale [PALMQVIST *et al.*, 2007] genannt werden. Es existieren sowohl Chemokine die das Tumorwachstum begünstigen, als auch Chemokine mit antitumoralen

Wirkmechanismen. Zudem fördern Chemokine beispielsweise die Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren oder steuern die Wanderung von Metastasen, da deren Zellen häufig Chemokinrezeptoren exprimieren [KOIZUMI *et al.*, 2007]. Tumorzellen sind in der Lage Abwehrmechanismen des Immunsystems zu unterdrücken. Sie exprimieren dazu Liganden, die Chemokinrezeptoren infiltrierter Leukozyten blockieren und verhindern somit deren antitumorale Wirkung. Infolge dessen migrieren dendritische Zellen nicht ins Lymphsystem und es kommt somit nicht zu einer Antigenpräsentation [SHIELDS *et al.* 2010; VILLABLANCA *et al.*, 2010]. Makrophagen ändern während der Tumorprogression ihre Plastizität und sezernieren verstärkt anti-inflammatorische Zytokine, was die Immunsuppression fördert [OPDENAKKER & VAN DAMME *et al.*, 2004].

Die in dieser Arbeit rekombinant exprimierten und untersuchten Chemokine CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL25 und CXCL4 sind in regulatorische Vorgänge von Entzündungsreaktionen sowie der Immunantwort involviert. Das Chemokin CCL7 spielt bei allergischen Reaktionen über die Anlockung und Aktivierung von Mastzellen eine bedeutende Rolle, trägt dort im Mausmodell zur verstärkten Sekretbildung bei [KUO *et al.*, 2017]. In Lebermetastasen von Dickdarmkrebs werden CCL7 und die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR3 überexprimiert. Das Chemokin kann daher als Biomarker in der Diagnostik herangezogen werden [CHO *et al.*, 2012]. CCL7 bewirkt bei Dickdarmkrebs die Infiltrierung von Immunzellen. Das Chemokin zeigt in diesem Zusammenhang antitumorale Eigenschaften, indem es die Kanzerogenität reduziert und das Tumorwachstum hemmt [HU *et al.*, 2002]. Es konnten jedoch auch tumorfördernde Eigenschaften von CCL7 bei der Ausbreitung von oralem Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden [JUNG *et al.*, 2010].

Wie CCL7, ist auch CCL8 von Bedeutung bei allergischen Reaktionen. Nach der Rezeptorbindung an CCR8, führt es zu einer Akkumulation von TH2-Zellen in der Haut und kann dort eine chronische Entzündungsreaktion induzieren [DEBES & DIEHL, 2011]. Über die Bindung an CCR5 aktiviert es verschiedene Subtypen von Leukozyten. So hat es bei Schleimhautentzündungen, insbesondere des Dickdarms, Einfluss auf den Verlauf und die Dauer der Entzündung [ASANO *et al.*, 2015].

Das Chemokin CCL13 lockt chemotaktisch Immunzellen an. Es wird bei Entzündungen gesteigert von Epithelzellen exprimiert [VANBERVLIET *et al.*, 2002]. CCL13 konnte in höheren Konzentrationen in Sekret während allergischer Reaktionen nachgewiesen werden. Weiterhin ist es in die Ausprägung und Verläufe von Rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose und Multiple Sklerose involviert [MENDEZ-ENRIQUEZ & GARCIA-ZEPEDA, 2013].

CCL15 wird konstitutiv in der Leber und im Darm exprimiert und zirkuliert, wie auch CCL14 im humanen Plasma [PARDIGOL *et al.*, 1998]. Die Modifikation des N-Terminus von CCL15 hat Auswirkungen auf dessen biologische Aktivität. Die N-terminale proteolytische Verkürzung von CCL15 kann, abhängig von der Spaltstelle sowohl in eine verstärkte, als auch

eine verminderte chemotaktische Aktivität bewirken [LEE *et al.*, 2002]. Der Infiltrierung von Monozyten in entzündetes Gewebe geht meist eine Zunahme von Neutrophilen voraus. Diese fördern die Chemotaxis der Monozyten durch die Aktivierung von CCL15 [RICHTER *et al.*, 2005]. Das Chemokin CCL15 kann als Biomarker bei Leberzellkarzinomen heran gezogen werden, da es in betroffenen Patienten stark überexprimiert ist [LI *et al.*, 2016]. Durch die Interaktion von CCL15 mit dem Rezeptor CCR1 kann die Metastasierung von Darmkrebszellen in die Leber gefördert werden [INAMOTO *et al.*, 2016].

Die CCL16-Expression wird von Entzündungsfaktoren wie IL-10 heraufreguliert. Es wird vermutet, dass dessen Hauptfunktion daher die Rekrutierung von Immunzellen in entzündete Regionen des Organismus ist. Das Chemokin verstärkt die Zytotoxizität von Effektor-T-Zellen. Deshalb wird angenommen, dass es ein Ansatzpunkt in der Krebstherapie sein kann, da es Immunzellen in das Tumorgewebe rekrutiert und die Reifung von T- und Antigenpräsentierenden Zellen beschleunigt [CAPPELLO *et al.*, 2006]. Andererseits weist CCL16 auch tumorinduzierende Eigenschaften auf. Über Signalweiterleitung mit dem Rezeptor CXCR5 auf Stromazellen wird die Metastasierung von Neuroblastomzellen in das Knochenmark vermittelt [AIROLDI *et al.*, 2008].

CCL25 gehört zu den Schleimhautchemokinen. Zuerst wurde es aus dem Thymus isoliert (Thymus-Expressed Chemokine, TECK), wo es überexprimiert wird und in die T-Zellentwicklung involviert ist. Eine weitere Region, in der es im Organismus verstärkt exprimiert wird, ist der Dünndarm [VICARI *et al.*, 1997]. So wird CCL25 u.a. bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Darmgewebe verstärkt exprimiert. Dort bedingt es im Zusammenspiel mit weiteren Chemokinen wahrscheinlich die erhöhte Chemotaxis von Effektor-T-Zellen [TRIVEDI *et al.*, 2016a]. Die Interaktion von CCL25 mit dessen Rezeptor CCR9 kann die Metastasierung von Melanomen fördern [AMERSI *et al.*, 2008].

Das Chemokin CXCL4 ist eines der ersten beschriebenen Chemokine und wurde ehemals als Human Platelet Factor 4 bezeichnet. Es ist das Chemokin, bei welchem zuerst sowohl angiogenetische als auch anti-angiogenetische Eigenschaften identifiziert wurden [VANDERCAPPELLEN *et al.*, 2011]. CXCL4 ist ein tetrameres Heparin-bindendes Chemokin, welches vom alpha-Granulum aktivierter Thrombozyten sezerniert wird und in die Blutgerinnung involviert ist [AMELOT *et al.*, 2007]. Von zentraler Bedeutung ist es bei der initialen Entzündungsreaktion bspw. nach Gefäßschädigung. Die umfassende biologische Funktion ist jedoch nicht vollständig geklärt [ZLOTNIK & YOSHIE, 2012]. Der anti-angiogenetische Effekt resultiert aus der Bindung an Integrine auf Blutgefäßen, was deren Interaktion mit anderen Liganden verhindert [AIDOU DI & BIKFALVI, 2010]. Bei entzündlichen Reaktionen im Endothelium verschiedener Gewebetypen induziert CXCL4 die Differenzierung von Monozyten zu inflammatorischen Makrophagen [KASPER *et al.*, 2010]. Interessanterweise kann CXCL4 die Expression von Chemokinrezeptoren auf Monozyten herunterregulieren. Das

hat zur Folge, dass diese nur eingeschränkt chemotaktisch durch CC-Chemokine angelockt werden [SCHWARTZKOPFF *et al.*, 2012].

Die genannten Chemokine haben alle eine gemeinsame Eigenschaft: Sie weisen als N-terminal erste Aminosäure Glutamin oder Glutaminsäure auf, welche zu Pyroglutamat zyklisiert werden können. Diese posttranslationale Modifikation hat Auswirkungen auf die Aktivität und Stabilität der Chemokine sowie deren Rezeptoraffinität.

### **1.2.2. Posttranslationale Modifikationen von Chemokinen**

Die posttranslationalen Modifikationen eines Chemokins modulieren dessen Aktivität, Stabilität und chemotaktisches Potential. Sowohl die Glykolisierung der Liganden, als auch modifizierte C- und N-Termini beeinflussen die Bindung eines Chemokins an dessen spezifische Rezeptoren. Die N-terminale Modifikation durch Proteasen ist ein wesentlicher Faktor für die Rezeptorspezifität und das Potenzial Chemotaxis zu induzieren bzw. die Signalweiterleitung auszulösen [PROOST *et al.*, 2006].

Neben dem Reiz, welcher die Produktion von Chemokinen induziert, beeinflussen chemokinmodifizierende Faktoren die Signalproteine: Sie können zur Degradation, Aktivierung oder Hemmung der Chemokine führen sowie zur Veränderung ihres Wirkmechanismus. Posttranslationale Modifikationen von Chemokinen kommen nicht ausschließlich bei pro-inflammatorischen Chemokinen vor, aber signifikant häufiger als bei homöostatischen und anti-inflammatorischen Chemokinen [VAN DAMME *et al.*, 2004; MORTIER *et al.*, 2011]. Durch spezifische Proteolyse kann ein Chemokin so konvertiert werden, dass eine biologisch inaktive Proform des Chemokins zu einem aktiven Protein wird.

Die Modifikation des N-Terminus von Chemokinen ist eine der wichtigsten biologischen Mechanismen, welcher Chemokinaktivitäten und deren Funktion moduliert. Die posttranslationale Modifikation der N-Termini, wie z.B. proteolytische Spaltung oder Acetylierung, beeinflusst die Lokalisation und Aktivität der Chemokine. Beispielsweise kann der N-Terminus proteolytisch durch Enzyme wie Aminopeptidasen, Plasmin, oder Metalloproteinasen abgespalten werden. Die hervorgehenden Isoformen unterscheiden sich in ihrer Rezeptoraffinität/-spezifität und ihrem Potential intrazelluläre Signalweiterleitung zu bewirken. Die chemotaktische Wirkung wird verringert oder verstärkt [WOLF *et al.*, 2008].

### **1.2.3. N-terminale Pyroglutamat-Modifikation von Chemokinen**

Chemokine mit N-terminalem Glutamin oder Glutaminsäure können durch Glutaminylyklase (QC) enzymatisch modifiziert werden. Dabei wird Glutamin unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  (hydrolytische Desaminierung) bzw. Glutaminsäure über  $\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung zu Pyroglutamat umgewandelt (siehe Abb. 3). Während N-terminales Glutamin in kurzer Zeit spontan zyklisieren kann, ist dieser Vorgang bei Glutaminsäure in Abwesenheit eines katalysierenden

Enzyms, wie QC, nicht möglich [CHELIUS *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2011]. Diese Modifikation kann die Aktivität und Stabilität der Chemokine erhöhen. Die Umwandlung von N-terminalen Glutamin- bzw. Glutamatresten bei Chemokinen bewirkt eine effektivere Bindung an deren Rezeptoren und schützt vor proteolytischer Degradation [BLASZCZYK *et al.*, 2000]. Die Zyklisierung des N-Terminus wird *in vivo* von QC katalysiert [SEIFERT *et al.*, 2009]. Bedingt durch Pyroglutamat am N-Terminus, können degradierende Proteinasen diese Chemokine nicht mehr effektiv hydrolysieren. Grund dafür ist, dass der gebildete Lactamring *in vivo* nicht protoniert vorliegt. Dieser protonierte Zustand jedoch ist für eine Substratbindung notwendig [VAN COILLIE, *et al.*, 1998; SCHILLING *et al.*, 2004].

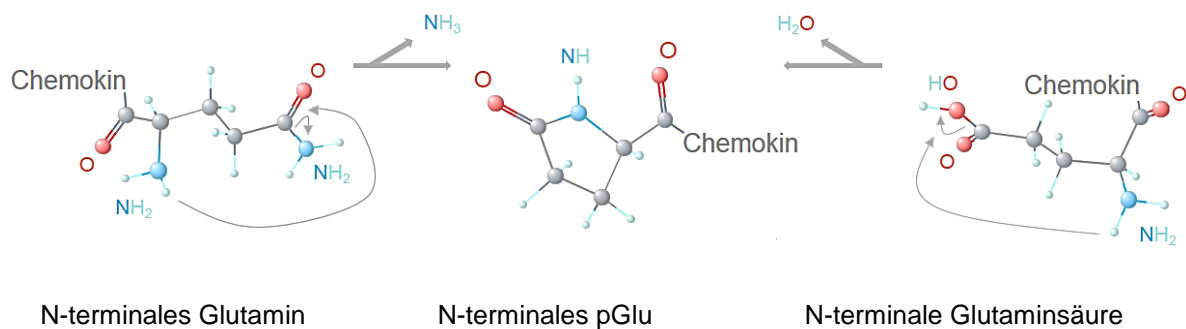


Abbildung 3: QC- katalysierte Pyroglutamatbildung unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  bei Glutamin (links) bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  bei Glutaminsäure; mit Pubchem ncbi 3D Viewer nach LIU *et al.* (2011).

Die humane QC ist ein monomeres Metalloenzym mit einem gebundenen Zinkion im aktiven Zentrum [POHL *et al.*, 1991]. Es gehört zu den Acyltransferasen und katalysiert die intramolekulare N-terminale Zyklisierung von Glutamin bzw. Glutaminsäure zu Pyroglutamat (pGlu) [SCHILLING *et al.*, 2004]. Eine Überexpression dieses Enzyms findet z.B. in Hypophyse, Hypothalamus und Hippocampus sowie in Thymus und Schilddrüsen statt [POHL *et al.*, 1991]. Das im aktiven Zentrum der QC gebundene Zinkion bewirkt wahrscheinlich die Protonierung der  $\gamma$ -Amidgruppe des Substrates. Somit nimmt es eine zentrale Rolle bei der katalytischen Aktivität der QC ein [BUCHHOLZ *et al.*, 2006].

#### 1.2.4. Das Chemokin CCL14

Das Chemokin CCL14 wird durch ein Gen auf dem CC-Chemokin-Cluster, welches auf dem Chromosom 17q11-q21 liegt, kodiert [BAGGIOLINI *et al.*, 1994]. Erstmals entdeckt wurde es in humanem Hämofiltrat von Patienten mit Niereninsuffizienz und trug daher ursprünglich den Namen Hemofiltrate CC Chemokine 1 (HCC-1). Es hat zwischen 29 und 46 % identische Aminosäuresequenzen mit den anderen humanen Chemokinen, wird aber im Gegensatz zu diesen konstitutiv in verschiedenen Gewebstypen und Organen, wie Milz, Leber und Darm exprimiert [SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996]. In humanem Plasma zirkuliert es in Konzentrationen bis zu 80 nM und es konnten verschiedene, verkürzte Formen von CCL14 nachgewiesen



werden: Neben der aus 74 Aminosäuren bestehenden murenen Form CCL14<sub>[1-74]</sub>, die Varianten CCL14<sub>[3-74]</sub> und CCL14<sub>[4-74]</sub>, welche jedoch nur 1 - 3 % des zirkulierenden CCL14 ausmachen und schwach an den Rezeptor CCR1 binden [RICHTER *et al.*, 2000]. Eine N-terminale Modifikation von CCL14 wurde bisher ausschließlich durch den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) von VAKILI und Mitarbeitern nachgewiesen. Andere, wie die proteolytische Spaltung nach der N-terminal zweiten Aminosäure Prolin durch CD26/dipeptidylpeptidase IV, werden nur vermutet [MORTIER *et al.*, 2016]. Eine weitere, in Hämofiltrat nachgewiesene Form war die N-terminal um die ersten acht Aminosäuren verkürzte Form CCL14<sub>[9-74]</sub> (siehe Abb. 4).

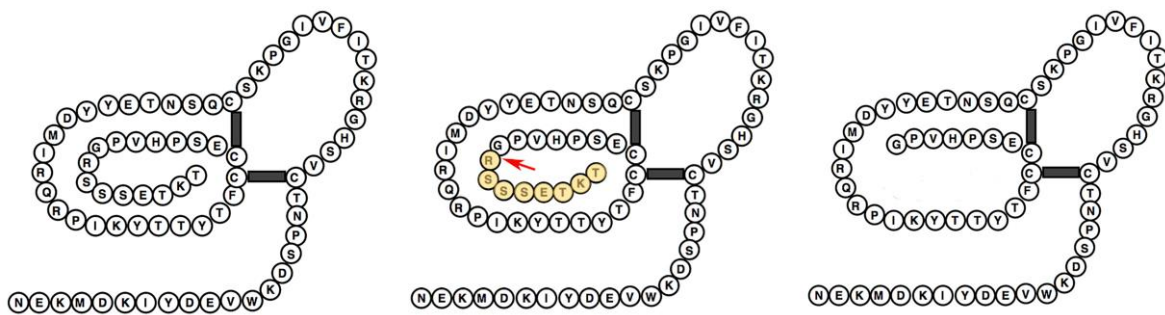


Abbildung 4: Die biologisch nahezu inaktive Form CCL14<sub>[1-74]</sub> wird nach Abspaltung der N-terminalen ersten acht Aminosäuren biologisch aktiv CCL14<sub>[9-74]</sub>.

Diese konnte, in einer im Vergleich zur murenen Form um den Faktor 100 bis 1000 niedrigeren Konzentration, nachgewiesen werden. Sie hat im Gegensatz zu den anderen Varianten jedoch die Eigenschaft, an die drei verschiedenen Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 zu binden [DETUEUX *et al.*, 2000]. Mit der höchsten Affinität bindet CCL14 an CCR5, gefolgt von CCR1 und CCR3 [SAVINO *et al.*, 2009]. Das murene CCL14<sub>[1-74]</sub> liegt bei Konzentrationen bis 100 nM als stabiles Dimer vor, CCL14<sub>[9-74]</sub> hingegen ist stabil als Monomer (siehe Abb 5). Diese Eigenschaft hat Auswirkungen auf die Aktivitäten beider Formen [BLAIN *et al.*, 2007].

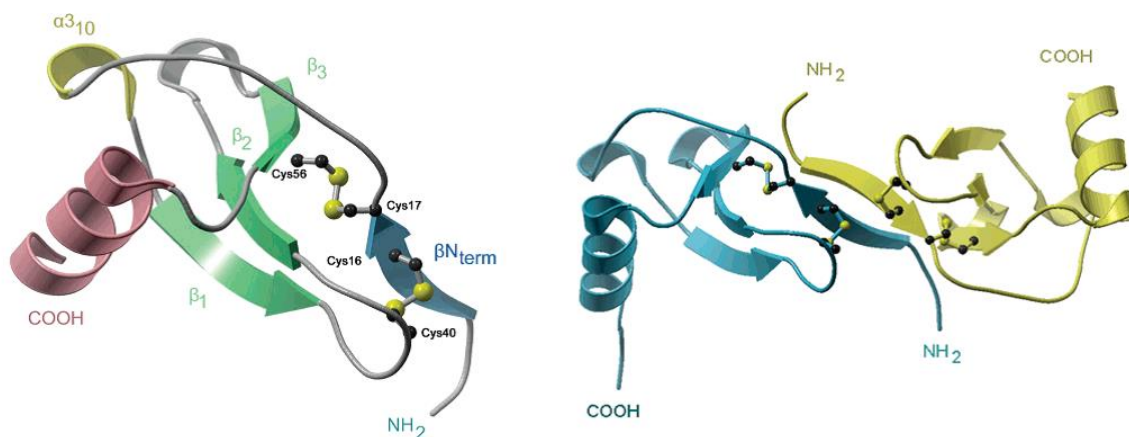


Abbildung 5: 3D-Struktur von CCL14<sub>[9-74]</sub> als Monomer (links) und dimerisiertem CCL14<sub>[1-74]</sub> (rechts) verbunden über das N-terminale  $\beta$ -Faltblatt [BLAIN *et al.*, 2007].

Während viele CC-Chemokine in niedrigen nanomolaren Konzentrationen bereits Chemotaxis oder Kalziumfreisetzung bei Leukozyten induzieren, erzeugt CCL14<sub>[1-74]</sub> diese schwach erst ab 100 nM und mehr [SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996]. Für eine signifikante biologische Wirksamkeit kann daher die um die N-terminal ersten acht Aminosäuren verkürzte von CCL14 in Betracht gezogen werden. Mögliche potentielle Aktivatoren können aufgrund ihrer Spaltspezifität nach der Aminosäure Arginin verschiedene Kallikrein-verwandte Peptidasen (KLK) darstellen.

### 1.3. Kallikrein-verwandte Peptidasen (KLK)

Kallikrein-verwandte Peptidasen sind wie Chemokine auch in entzündliche Prozesse involviert. Bedingt durch die KLK-vermittelte Degradation der extrazellulären Matrix während Entzündungen führen KLK nicht nur zu gesteigerter Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe, sondern regulieren sie auch über die Veränderung von Chemokinaktivitäten. Somit können über die Identifikation von natürlichen Chemokin- oder Kallikreinantagonisten auch Angriffspunkte für die Entwicklung von Medikamenten gegen AIDS, chronische Entzündungen und Krebs identifiziert werden [PROOST *et al.*, 2006].

KLK katalysieren Struktur- und Funktionsänderungen von Proteinen. Diese, zu den extrazellulären Serinproteasen zählenden Enzyme gehören der Gruppe der trypsin- bzw. chymotrypsin-ähnlichen Serinproteinasen S1A an [YOUSEF *et al.*, 2005]. Sie bilden auf Genomebene die größte, zusammenhängende Familie von Proteasen. Ihre kodierenden Gene werden nicht durch andere, nicht-KLK-codierende Gene unterbrochen [YOUSEF *et al.*, 2000]. KLK werden als Prä-Proenzyme kodiert. Das N-terminale Signalpeptid (Prä-Peptid) ist für die Sekretion verantwortlich, danach schließt sich ein kurzes Propeptid (mit Ausnahme von KLK5) vor der eigentlichen Serinproteinasedomäne an. Vergleichbar mit anderen proteolytischen Enzymen werden auch KLK nach der Abspaltung des Präsignalpeptids als nicht aktives Pro-Kallikrein (Zymogen) sezerniert. Die Bildung der aktiven Form des jeweiligen KLK erfolgt durch Proteolyse des Pro-Peptids im endoplasmatischen Reticulum. Für diese Reaktion muss eine Trypsin-ähnliche Aktivität vorliegen. Andererseits wurde festgestellt, dass KLK sich selbst aktivieren können oder durch andere KLK aktiviert werden [EMAMI & DIAMANDIS, 2007a].

Das KLK5 ist in der Lage sich selbst zu aktivieren (Autoaktivierung) und agiert als Aktivator der KLK KLK2, -3, -6, -7, -11, -12, und -14. Man kann es daher vermutlich als Initiator von Enzymaktivierungskaskaden in der Gruppe der KLK betrachten [MICHAEL *et al.*, 2006]. Ein Beispiel hierfür ist der positive Feedback-Loop der Aktivierung von KLK5, KLK7 und KLK14. Während des Abbaus von Corneodesmosomen bei der Hautabschilferung oder bakterieller Infektion der Haut, läuft eine Aktivierungskaskade ab. In diesen Prozessen kommt es zur proteolytischen Aktivierung von KLK. Nach autoproteolytischer Aktivierung kann KLK5 KLK7 und KLK14 aktivieren. KLK14 wiederum kann dann ebenfalls KLK5 aktivieren [EISSA *et al.*, 2011]. Die Expression von KLK wird von Steroidhormonen induziert. Die Transkription von

KLK5 wird von Östrogenen und Progestinen reguliert und es wird in verschiedenen Tumorgeweben wie Darm-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Nieren-, Prostata- und Blasenkrebs [YOUSEF & DIAMANDIS, 1999; MUKAI *et al.*, 2008], aber auch in der Haut, den Hoden und im Brustgewebe exprimiert [DEBELA *et al.*, 2006].

Die Trypsin-ähnlichen KLK (KLK2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15) spalten proteolytisch hinter einem positiv geladenem Rest des Substrats: Arginin oder Lysin in P1-Position. Die Chymotrypsin-ähnlichen KLK (KLK3, 7, 9) spalten Peptidbindungen mit Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin in P1-Position. Die KLK 1, 11 und 14 haben sowohl Trypsin- als auch Chymotrypsin-ähnliche Aktivitäten [PERONA & CRAIK, 1997].

KLK werden in unterschiedlichen Geweben und verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Rückenmarksflüssigkeit, Vaginalsekret, Atemwegssekret oder Tumorzitoseflüssigkeit sowie in den Blutkreislauf sezerniert [BORGONO *et al.*, 2004; CLEMENTS *et al.*, 2004]. Als Teil von Enzymkaskaden oder als einzelnes Enzym sind sie in die Fibrolyse, die zelluläre und humorale Immunantwort, und auch in die Embryonalentwicklung involviert. Zudem sind sie an der Wundheilung, aber auch bei der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer, zerebrovaskulärer und renaler Krankheiten beteiligt und werden als Biomarker in der Krebsdiagnostik analysiert [CARLSSON *et al.*, 2013; PRASSAS *et al.*, 2015]. In gesunder Haut ist u.a. KLK5 regulatorisch an der Desquamation beteiligt, da es Desmoglein-1, eine Komponente des desmosomalen Cadherins, degradiert [JIANG *et al.*, 2011].

Eine Dysregulation der KLK-Expression konnte auffällig oft in Tumorgeweben nachgewiesen werden [KALINSKA *et al.*, 2016]. Im Frühstadium von Krebs haben KLK Auswirkung auf die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und nehmen somit Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen [AVGERIS *et al.*, 2011]. Zum Beispiel spalten sie IGF-bindende Proteine und ermöglichen dadurch die mitogene Wirkung von IGFs. Ein Exempel dafür ist die Spaltung der pro-Wachstumsfaktoren IGFBP (1-5) durch KLK5 in Prostatakrebszellen, was zur gesteigerten Bioverfügbarkeit von Wachstumsfaktoren IGF führt. Dies wiederum hat eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge [MICHAEL *et al.*, 2006]. Die Hydrolyse extrazellulärer Matrix durch KLK führt zur erhöhten Freisetzung Matrix-gebundener Wachstumsfaktoren. Diese fördern das Tumorstadium [FUHRMAN-LUCK *et al.*, 2014]. Durch den KLK-bedingten Matrixabbau und der gesteigerten Porosität der Matrix, fördern sie die endotheliale Zellproliferation und Migration. *In vitro* bauen KLK Strukturkomponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix des Endothels ab [CLEMENTS *et al.*, 2004]. Durch KLK aktivierte Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs) lösen über weitere Signalkaskaden eine Mapkinase-Aktivierung aus, die zur gesteigerten Zellproliferation führt [OIKONOMOPOULOU *et al.*, 2010]. Besonders der Rezeptor PAR-2 wird von Trypsin-ähnlichen Proteinasen aktiviert [STEINHOFF *et al.*, 1999]. Die Stimulation von PAR-2 resultiert in der Aktivierung von Phospholipase-A2

(PL-A2). Dadurch kommt es zu einer verfrühten Lamellarkörperfreisetzung, was eine pathologische Hautstruktur nach sich zieht.

In Studien bezüglich der Substratspezifität von KLK wurde gezeigt, dass es zwischen der KLK-Expression und der Tumorentwicklung sowie deren Wachstum einen direkten Zusammenhang gibt. Bedingt durch die enzymatische Aktivität von KLK in proteolytischen Kaskaden werden verstärkt Bestandteile der extrazellulären Matrix gespalten. Daraus resultieren eine Minderung der physiologischen Barrierefunktion der extrazellulären Matrix und eine Störung der Zellkommunikation. Die Angiogenese im betroffenen Gewebe sowie die Invasivität von Krebszellen werden durch diese Vorgänge begünstigt [BORGONO & DIAMANDIS, 2004]. In die Metastasierung von Karzinomen sind KLK indirekt beteiligt, da sie die Ablösung von Tumorzellen aus deren Ursprungslokalisation fördern. Die Zellen können folglich in umgebende Gewebe und Lymphgefäße migrieren und in davon entfernt lokalisierte Regionen des Körpers gelangen wo sie zu einer Tumorneubildung führen [SCHMITT *et al.*, 1997].

KLK-Konzentrationen in Tumoren haben Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Ovarialkrebs. Es konnten Veränderungen der Konzentrationen während der Metastasierung festgestellt werden. Höhere Konzentrationen der Kallikreine 5-8, 10 und 11 deuteten nach invasivem Eingriff auf Resttumore hin und lagen im Plasma von Patienten mit voranschreitendem Krankheitsverlauf vor [DORN *et al.*, 2011]. Desweiteren stimulieren KLK durch Aktivierung von PAR-Rezeptoren die Invasion von Tumorzellen ins Gewebe [KAMATH *et al.*, 2001].

Ein Faktor bei der Regulation der Kallikreinaktivität ist die endoproteolytische Deaktivierung. Zum Beispiel kann KLK11 durch Plasmin oder KLK5 enzymatisch verkürzt und inaktiviert werden. KLK5 kann die Kallikreine 2 und 3 durch interne Spaltung inaktivieren [BRATTSAND & EGELRUD, 1999]. Eine wichtigere Rolle bei der Inaktivierung jedoch spielen Inhibitoren. Es konnte nachgewiesen werden, dass KLK durch den Kazal-Typ verwandten Inhibitor SPINK5/LEKTI gehemmt werden [EGELRUD *et al.*, 2005]. Beispielsweise werden die Kallikreine KLK5 und KLK7 von LEKTI Domäne 6 inhibiert [EGELRUD *et al.*, 2005]. *In vitro* bewirkten Zinkionen ( $Zn^{2+}$ ) [BRATTSAND & EGELRUD, 1999] sowie Zucker-basierte Peptidmimetika eine Reduktion der Enzymaktivität von KLK5 und KLK7 [OLIVEIRA *et al.*, 2013]. Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten und auf ihre Fähigkeit der Aktivierung von CCL14 untersuchten KLK gehören zur Gruppe der Gewebekallikreine und innerhalb dieser zu den (Chymo)Trypsin-ähnlichen Proteinasen. Sie weisen untereinander eine hohe Ähnlichkeit auf Gen- und auch auf Proteinebene auf. Diese kann in einer Homologie der Aminosäuresequenz bis zu 80 % resultieren.

## 2. Zielstellung

Posttranslationale Modifikationen von Chemokinen und die Auswirkungen auf physiologische Vorgänge sind für viele dieser Signalproteine nicht ausreichend geklärt. Von besonderer Bedeutung bei Aktivierung oder der Inhibition von Chemokinen ist die Modifikation deren N-Termini. Ziel dieser Arbeit war die modifizierende Wirkung von Glutaminylzyklase bzw. Kallikrein-verwandter Peptidasen (KLK) auf den N-Terminus verschiedener Chemokine zu untersuchen. Hierzu wurden zunächst die Chemokine und KLK rekombinant hergestellt und anschließend chromatographische Strategien entwickelt, um die Proteine mit einer hohen Reinheit aufzureinigen. Im Anschluss wurde mit chromogenen Farbstoffen und Zymographie überprüft, ob die KLK hydrolytische Aktivität aufweisen. Die Chemokine wurden hinsichtlich ihrer korrekten molekularen Masse und somit ihrer Intaktheit massenspektrometrisch analysiert.

Von Relevanz ist die enzymatische Aktivierung des Chemokins CCL14, da es als Prä-Protein bestehend aus 74 Aminosäuren im humanen Plasma zirkuliert [SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996] und in dieser Form nur eine sehr geringe biologische Aktivität aufweist. Werden die N-terminalen ersten acht Aminosäuren proteolytisch abgespalten, ist das resultierende, aus 66 Aminosäuren bestehende Chemokin, biologisch aktiv und kann an seine spezifischen Rezeptoren binden. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vom Siebentransmembrantyp. Die proteolytische CCL14-Aktivierung durch den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) wurde von VAKILI (2001) und RICHTER (2009) beschrieben. Der uPA wird jedoch nur in geringem Ausmaß in der Plazenta, in den Nieren sowie im Epithelium der Bronchien exprimiert. Das Chemokin CCL14 wird, wie KLK in vielen verschiedenen Gewebetypen konstant exprimiert (siehe: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=6358>, abgerufen am 15.12.2018). Humane Gewebekallikreine kommen im Gegensatz zu uPA in nahezu jedem menschlichen Gewebetyp konstitutiv vor [EMAMI & DIAMANDIS, 2007b]. Es sollte daher überprüft werden, ob die ubiquitär zirkulierenden KLK das Chemokin CCL14 aktivieren können. Nach Inkubation von CCL14 mit KLK wurde zunächst massenspektrometrisch analysiert, ob die spezifischen Molekülmassen von inaktivem und aktiviertem CCL14 ermittelt werden können. Im Anschluss wurde mit Hilfe von Zellassays die chemotaktische Wirkung von KLK-aktiviertem CCL14 überprüft.

Eine weitere Form der Modifikation des N-Terminus von Chemokinen ist die Glutaminylzyklase-katalysierte Pyroglutamatbildung bei Chemokinen mit N-terminalem Glutamin bzw. Glutaminsäure. Diese Modulation führt zu einer erhöhten Stabilität dieser Proteine und verhindert deren Sequenzierung nach Edman [PODELL & ABRAHAM, 1978]. Die Affinität von Proteinen an ihren spezifischen Rezeptor zu binden wird durch N-terminales Pyroglutamat gesteigert bzw. durch Pyroglutamat überhaupt erst ermöglicht [ABRAHAM & PODELL, 1981; VAN COILLIE *et al.*, 1998; BLASZCZYK *et al.*, 2000].

In dieser Arbeit sollte für eine Auswahl an Chemokinen, für welche dies noch nicht gezeigt wurde, die mögliche QC-katalysierte N-terminale Pyroglutamatbildung untersucht werden. Für die Analysen wurden die Chemokine heterolog exprimiert und aufgereinigt. Mit Ausnahme von CCL14 weisen die untersuchten Chemokine N-terminales Glutamin (CCL7, CCL8, CCL13, CCL15, CCL16, CCL 25) bzw. Glutaminsäure (CXCL4) auf. Somit sind sie potentielle Substrate für Glutaminylyklasen (QC). Die rekombinanten Chemokine wurden mit Glutaminylyklase inkubiert (exklusive CCL14). Anschließend wurden die Molekülmassen der Chemokine massenspektrometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sollten die spezifische Änderung der molekularen Masse der Chemokine aufzeigen, welche aus der N-terminalen Pyroglutamatbildung aus Glutamin bzw. Glutaminsäure resultiert.

Die in die Untersuchungen dieser Arbeit eingebundenen Kooperationspartner haben QC- (PQ50 und PQ912) und Kallikrein-Inhibitoren (LEKTI) [MÄGERT *et al.*, 1999 & 2005] ermittelt, welche potentielle Medikamente zur Inhibition der Chemokinmodifikationen darstellen. Diese Inhibitoren können aufgrund ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der Hemmung von Kallikrein 5 und 8 sowie QC im Kontext der Modifikation von den Chemokinen CCL14 bzw. CXCL4 und CCL25 untersucht werden. Durch die Inhibition der spezifischen Modifikationen des jeweiligen Chemokins, wird dessen Stabilität und Schutz vor Degradation beeinflusst, wahrscheinlich auch die Rezeptoraffinität. Im Vergleich zu Chemokin- bzw. Chemokinrezeptor-bindenden Antikörpern werden daher nicht komplette Signaltransduktionswege unterdrückt, sondern ausschließlich das Chemokin bzw. dessen spezifische Eigenschaften moduliert. Das kann möglicherweise in einer Reduktion an unerwünschten Nebenwirkungen einer Therapie resultieren. Die in dieser Arbeit erzielten Resultate bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Inhibition von Kallikrein-verwandten Peptidasen und Glutaminylyklase.

### 3. Material und Methodik

#### Feinchemikalien, Medienbestandteile und Zellkultur

Sämtliche Feinchemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, AppliChem und Merck in der Qualität p.a. bezogen. Für die Zellkultur verwendete Medien und Lösungen wurden von Genaxxon und Biochrom, die Verbrauchsmaterialien von Nunc und Sarstedt bezogen.

#### 3.1. Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzungen der in dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung (Hersteller)
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL Ampicillin (Serva)
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G250; 40 % (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Extraktionspuffer pH 7,4	10 mM NaCl; 1 % (v/v) Triton-X100; 50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 1 Proteinase-Inhibitor-Tablette/5mL (Roche cOMplete)
Kallikrein-Puffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,4
PBS pH 7,4 (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	10.000 U/mL / 10.000 µg/mL (Biochrom)
TAE pH 8,0 (50x)	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 100 mM EDTA
TBS pH 9,0 (10x)	1 M Tris; 1M NaCl; 200mM MgCl <sub>2</sub>
HBSS, Fluo-4-Direct Kalzium Assay Kit	Thermo Fisher
Zeocin-Stammlösung	100 mg/mL Zeocin (Invitrogen)

#### MALDI-TOF-Matrix

Es wurden 7,6 mg 2,5-Dihydroxyacetophenon (Bruker) in 374 µL HPLC-reinem Ethanol (Baker) und 125 µL einer 16 mg/mL Lösung von Diammoniumhydrogencitrat gelöst. In diese Matrix wurden die zu analysierenden Proteinproben eingebettet.

#### SDS-PAGE und Western Blot

Sammelgel:

38 % (v/v) Puffer pH 6,8 (0,5 M Tris, 0,4 % w/v SDS)
8 % Polyacrylamid 40 % (29:1 Acryamid/Bisarylamid)
0,24 % APS (w/v)
0,08 % TEMED (v/v)
q.s. ad dest. Wasser 100 %

Trenngel:

38 % Puffer (v/v) pH 8,8 (1,5 M Tris, 0,4 % w/v SDS)
35 % Polyacrylamid 40 % (29:1 Acryamid/Bisarylamid)
0,24 % APS (w/v)
0,08 % TEMED (v/v)
q.s. ad dest. Wasser 100 %

SDS-PAGE Laufpuffer 10x:

Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

Western Blot Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	150 mM
SDS	0,04 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

### 3.2. Antikörper

Zur Identifikation von Chemokinvarianten wurden spezifische Antiseren eingesetzt. Sie wurden für die Chemokine CCL7, CCL13, CCL15 und CCL16 hergestellt. Es wurden Teilfragmente von je zehn Aminosäuren aus den Chemokinen ausgewählt, die zum einen bei den funktionellen Formen vorkommen (C-terminal), zum anderen bei den N-terminal Glutaminylzyklisierten Formen (N-terminal mit <E). Die entsprechenden, gelisteten Peptide wurden vom Kooperationspartner Probiobdrug in größeren Milligramm-Mengen chemisch synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Aminosäuresequenz der zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptide

Peptid / Bezeichnung	Sequenz (N->C)
pE-CCL7	<EPVGINTSTT
C-CCL7	LDKKTQTPKL
pE-CCL13	<EPDALNVPST
C-CCL13	LGRKAHTLKT
pE-CCL15	<EFINDAETEL
C-CCL15	MKKLKPYSI
pE-CCL16	<EPKVPEWVNT
C-CCL16	NGQPQLLNSQ
<E = Pyroglutamat	



Folgende Antikörper wurden für die Western Blot-Analysen verwendet:

Tabelle 3: Liste der in den Western-Blot-Untersuchungen eingesetzten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-His (C-term) Mouse Monoclonal Antibody, Alkaline Phosphatase Conjugate	Invitrogen	1:20000
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-CCL7 (gesamt)	Pineda	1:500
anti-CCL7 (pGlu)	Pineda	1:500
anti-CCL13 (gesamt)	Pineda	1:500
anti-CCL13 (pGlu)	Pineda	1:500
anti-CCL15 (gesamt)	Pineda	1:500
anti-CCL15 (pGlu)	Pineda	1:500
anti-CCL16 (gesamt)	Pineda	1:500
anti-CCL16 (pGlu)	Pineda	1:500
anti-CCL14 (full length)	MaxPab	1:500
anti-hK5 / anti-hK8 / anti-pro-hK11	R&D Systems	1:500
anti-CCR1 (CD191)	Miltenyi Biotec	1:11
anti-CCR5 (CD195)	Miltenyi Biotec	1:11

### 3.3. Zymographie

Die Zymographie wurde mit SDS-Gelen, in welches Casein vernetzt eingebettet ist, durchgeführt. Sämtliche Gele und Agenzien, Probenpuffer NuPAGE, Renaturierungspuffer, Entwicklungspuffer, wurden von Invitrogen bezogen.

### 3.4. Chromatographie

Sämtliche für die Chromatographien eingesetzte Puffer wurden mit bidest. Wasser hergestellt und anschließend durch einen Steritopfilter (Merck) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert.

#### Kationenaustauschromatographie (CIEX)

Laufpuffer:

Natriumdihydrogenphosphat/ Di-Natriumhydrogenphosphat	50 mM	pH 6,0
--	-------	--------

Elutionspuffer:

NaCl	1,0 M
------	-------

### Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

Laufpuffer A:

Acetonitril	1 % (v/v)
TFA	0,1 % (v/v)

Elutionspuffer A:

Acetonitril	80 % (v/v)
TFA	0,1 % (v/v)

Laufpuffer B:

TFA	0,1 % (v/v)
Methanol	1 % (v/v)

Elutionspuffer B:

Ammoniumacetat	50 mM
Methanol	80 % (v/v)

Laufpuffer C:

Ammoniumacetat	50 mM
Isopropanol	1 % (v/v)

Elutionspuffer C:

Ammoniumacetat	50 mM
Isopropanol	80 % (v/v)

### Size-Exclusion-Chromatographie (SEC)

Laufpuffer:

PBS	pH 7,4
-----	--------

### Nickel-Chelat-Chromatographie (IMAC)

Laufpuffer:

Tris	100 mM	pH 7,4
Imidazol	50 mM	

Elutionspuffer :

Tris	100 mM	pH 7,4
Imidazol	300 mM	

## 3.5. Kulturmedien

Sämtliche Nährmedien wurden mit dest. Wasser hergestellt und anschließend für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Medienbestandteile, wie Spurenelemente oder Antibiotika zur Selektionsauswahl, wurden nach dem Abkühlen des jeweiligen Mediums 0,2 µm-filtriert und dem abgekühlten Medium zugegeben. Alle Medien wurden als Flüssigmedium und als Festmedium durch Zugabe von 1,5 - 2 % (w/v) Agar Agar eingesetzt.

Mikroorganismus	Medium
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lysogeny broth (LB)</li> </ul>
<i>P. pastoris</i> / <i>P. methanolica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minimal dextrose/ methanol (MD/ MM)</li> <li>• Yeast extract peptone dextrose (YPD)</li> <li>• Buffered minimal Methanol (BMM)</li> <li>• Buffered minimal dextrose/ methanol/ glycerin (BMDY/ BMMY/ BMGY)</li> </ul>

### Komplettmedium für CHO-Zellen

HAM's F12 Nutrient Mixture

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung bzw. 25 µg/mL Zeocin

### Komplettmedium für HOS-, Synoviozyten- und CHO-Zellen

Dulbecco's mod. Eagle Medium (DMEM)

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung

## 3.6. Restriktionsendonukleasen

Tabelle 4: Liste der eingesetzten Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
<i>EcoRI, MspI,</i>	Invitrogen
<i>Ascl, BsmBI, XbaI, XhoI</i>	New England Biolabs

## 3.7. Primer

Für die PCR-Amplifikationen wurden die folgenden Chemokin- und KLK-spezifischen Primer von Firma eurofins Genomics synthetisiert. Primer für Promotor- und Resistenzsequenzen lagen den Plasmidkits Lifesensors bzw. Invitrogen bei.

Tabelle 5: Liste der in den PCR-Anwendungen verwendeten Primer

Primer sense & antisense	Sequenz 5' → 3'
CCL7 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTCAGCCAGTTGGGATTAATAC
CCL7 (SUMO)	GCCACGTTCTAGATCAAAGCTTTGGAGTTTGGG
CCL7	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAGCCAGTTGGGATTAATAC
CCL7	GCCACGTGAATTCTCAAAGCTTTGGAGTTTGGG
CCL8	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAGCCAGATTCAGTTTCCATTCCAATCAC
CCL8	AGGAAGCTGTGATCTTCAAGACCAAACGGGGCAAGG
CCL13 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTCAGCCAGATGCACTCAACGTCCCATC
CCL13 (SUMO)	GCCACGTTCTAGATCAAGTCTTCAGGGTGTGAGCTTTCC
CCL13	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAGCCAGATGCACTCAACGT
CCL13	GCCACGTGAATTCTCAAGTCTTCAGGGTGTGAG
CCL14 (SUMO)	TCCTTACGTCTCGAGGTACCAAGACTGAATCCTCC
CCL14 (SUMO)	TGTTCTCTAGATCAGTTCTCCTTCATGTCCTTGAT

CCL14	TCCTTACTCGAGAAAAGAACCAAGACTGAATCCTCC
CCL14	TGTTCCGAATTCTCAGTT CTCCTTCATGTCCTTGAT
CCL15 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTCAGTTCATAAATGATGCAGAGAC
CCL15 (SUMO)	GCCACGTTCTAGATCATATTGAGTAGGGCTTCA
CCL15	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAGTTCATAAATGATGCAGAGAC
CCL15	GCCACGTGAATTCTCATATTGAGTAGGGCTTCAG
CCL16 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTCAGCCAAAAGTTCCTGAGTG
CCL16 (SUMO)	GCCACGTTCTAGATCACTGGGAGTTGAGGAGCTG
CCL16	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAGCCAAAAGTTCCTGAGTG
CCL16	GCCACGTGAATTCTCACTGGGAGTTGAGGAGCTG
CCL25 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTCAAGGTGTCTTTGAGGACTG
CCL25 (SUMO)	GCCACGTTCTAGATCACAGTCTGAATTAGCTGATAT
CCL25	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAAGGTGTCTTTGAGGACTG
CCL25	GGTATCTCTCGAGAAAAGACAAGGTGTCTTTGAGGACTGCTG
CXCL4 (SUMO)	GGTATCTCGTCTCGAGGTGAAGCTGAAGAAGATGGGGACC
CXCL4 (SUMO)	GGAACGTTCTAGACTAACTCTCCAAAAGTTTCTTAAT
CXCL4	GGAACGTGAATTCCTAACTCTCCAAAAGTTTCTTAAT
CXCL4	GGAACGTGAATTCCTAACTCTCCAAAAGTTTCTTAATTAT
KLK5	ACCGATGCTCGAGAAGAGAATCATCAATGGATCCGACTGCGA
KLK5	TCGCGGAACTAGTTCAGGAGTTGGCCTGGATGGTTTCTG
KLK7	ACCGATGCTCGAGAAGAGATGGGTGCTCACTGCCGCCACTG
KLK7	CCACGTAGAATTCTTAGCGATGCTTTTTCATGGTGTCATTTATCC
KLK8	TCCGGTTCTCGAGAAAAGAGTGCTGGGGGGTCATGAGTGCCAACC
KLK8	AGCCGAGGAATTCTCAGCCCTTGCTGCCTATGATCTTCTTGATCCA
KLK11	GATCGCACTCGAGAAAAGAGAGACCAGGATCATCAAGGGGTT
KLK11	TCGCGGAACTAGTCCATTGTTCTTCATCGTCTCCTGGATCC
KLK14	TGGCTTTCTCGAGAAAAGAATAATTGGTGGCCATACGTGCACCCG
KLK14	GGCTTTCTCGAGAAAAGAATAATTGGTGGCCATACGTGCACCCG

### 3.8. Plasmidvektoren

Tabelle 6: Liste der für die Klonierung von Amplifikaten und Transformation von Hefen, Bakterien und Zelllinien eingesetzten Vektoren.

Plasmid	Hersteller/ Kit
pCR4-TOPO TA Vector	Invitrogen/ TOPO TA Cloning Kit for Sequencing
pMET $\alpha$ B	Invitrogen/ <i>Pichia methanolica</i> Expression Kit
pZeoSV2(+)	Invitrogen/ pZeoSV2(+) Vector Kit
pP-ahSUMO3	LifeSensors/ <i>Pichia pastoris</i> Expression System

### 3.9. Mikroorganismen/ Zelllinien

Tabelle 7: Zur Expression von rekombinanten Proteinen und der Bestimmung deren Aktivität eingesetzte Mikroorganismen und Zelllinien.

Organismus/ Stamm	Herkunft
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen
<i>Pichia methanolica</i> PMAD11	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> X33	Hochschule Anhalt, Köthen
A549	UFZ, Leipzig
CHO K1	Probiodrug AG, Halle/ Saale
HaCaT, Synoviozyten	Uniklinik, Halle/ Saale
HOS CD4+ CCR5+; HOS CD4+ CCR1+	Pharis Biotec, Hannover
THP-1	UFZ, Leipzig

### 3.10. Enzyme

Tabelle 8: Liste der eingesetzten Enzyme.

Enzym	Hersteller
SUMO Protease 2	LifeSensors
humane Glutaminylzyklase	Probiodrug AG, Halle/ Saale
Thermolysin	Promega

### 3.11. Biopsiematerial

Humanes biopsisches Material wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Can Cedidi und Frau Prof. Dr. med. Ursula Mirastschijski vom Zentrum Plastische und Ästhetische Chirurgie am Universitätsklinikum Bremen Mitte zur Verfügung gestellt.

## **3.12. Molekularbiologische Methoden**

### **3.12.1. Agarosegelelektrophorese**

Für die Präparation und zur Analyse wurden DNA-Fragmente nach ihrer Größe in horizontalen, 1,0 - 1,7 % (w/v) Agarose/1xTAE-Gelen aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurden den Gelen vor dem Aushärten 0,5 µg/mL Ethidiumbromid zugefügt. Die Auftrennung erfolgte mit TAE-Laufpuffer bei 110 V in Elektrophoresekammern der Firma Carl Roth. Zur Abschätzung der relativen Größe der DNA wurden die DNA-Leitern 100 bp extended und 1 kbp (Fa. Fermentas) verwendet.

### **3.12.2. Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

Aus den kultivierten Zelllinien HaCaT, A549 und CHO wurde die Gesamt-RNA mittels RNA-Minikit (Fa. Bio&SELL) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

#### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels Plasmid Mini-Prep-Kit NucleoSpin (Fa. Macherey-Nagel) aus 1-5 mL Übernachtskultur nach Herstellerprotokoll.

#### **Isolierung von genomischer DNA**

Die Präparation genomischer DNA wurde mit dem PeqGOLD Tissue DNA-Kit (Fa. Peqlab) durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

#### **Photometrische Messung von Nukleinsäuren und Proteinlösungen**

Isolierte Nukleinsäuren wurden hinsichtlich ihrer Konzentration und Reinheit mit den Geräten NanoDrop 1000 (Fa. Thermo Fisher Scientific) oder Spektralphotometer DS-11 (Fa. DeNovix) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm analysiert. Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden bei der Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm mit dem Spektralphotometer LKB Ultrospec III (Fa. Pharmacia) analysiert. Als Referenz diente der jeweilige Puffer, in welchen das Protein suspendiert war.

### **3.12.3. PCR-Anwendungen**

#### **Standard-PCR**

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) [MULLIS *et al.*, 1986] dient der selektiven exponentiellen Vervielfachung definierter DNA-Sequenzen *in vitro*. Wenn nicht anders

erwähnt, wurde zur Amplifikation eine Taq-Polymerase in einem Mastermix mit dNTPs und dem entsprechenden Puffer der Firmen Fermentas oder Peqlab verwendet. Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Chemokin- und KLK-DNA-Sequenzen für die Transformation von *P. methanolica* und *P. pastoris* erfolgte mit dem KAPA HiFi PCR-Kit (Fa. Peqlab). Beispielhaft sind zwei Standardreaktionsansätze (50µl) mit den verwendeten Polymerasen angegeben.

Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von Chemokin- bzw. Kallikrein-codierenden Sequenzen für die Vektorligation

Komponente	Volumen
DNA-Template (5-500 ng/µL)	1 µL
Sense-Primer (10 pmol/µL)	2 µL
Antisense-Primer (10 pmol/µL)	2 µL
1 U/µl KAPA HiFi DNA Polymerase	1 µL
5X KAPA HiFi Buffer	10 µL
10 mM KAPA dNTP Mix	1,5 µL
bidest. Wasser	ad 50 µL

Tabelle 10: PCR-Reaktionsansatz zur Überprüfung der Transformation bzw. Transfektion nach Plasmidisolierung aus den Transformanden bzw. Colony-PCR

Komponente	Volumen
DNA-Template (5-500 ng/µL)	1 µL
Sense-Primer (10 pmol/µL)	2 µL
Antisense-Primer (10 pmol/µL)	2 µL
DreamTaq green PCR Mastermix	25 µL
bidest. Wasser	ad 50 µL

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler SpeedCycler 2 (Fa. Analytikjena/ Biometra) unter Verwendung verschiedener Programme in Abhängigkeit des zu amplifizierenden Templates.

### Kolonie-PCR

Aus einer Bakterienkolonie wurde mit einem sterilen Glasstäbchen punktuell eine geringe Menge Biomasse abgetragen und anschließend in ein mit PCR-Mix (siehe Standard PCR) gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 Min. bei 99°C aufgeschlossen, dann wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Primer waren der jeweilige fragmentspezifische Sense- und Antisenseprimer bzw. ein vektorspezifischer Antisenseprimer.

### **RT-PCR**

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse-Transkriptase aus einer RNA die komplementäre DNA (cDNA) generiert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript First Strand Synthesis System Kit (Fa. Invitrogen). Für einen 20 µl Ansatz wurde jeweils 2-5 µg Gesamt-RNA und 1-2 µg Oligo(dt)18-Primer in 12 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 Min. bei 70°C denaturiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach der Herstellerangabe. Die cDNA-Synthese wurde mit Standard-PCR mit dem Primerpaar  $\beta$ -Tubulin-1S/ $\beta$ -Tubulin-2AS überprüft. Konnten im Agarosegel Banden bei ca. 340 bp nachgewiesen werden, wurde von einer erfolgreichen cDNA-Synthese ausgegangen.

### **Sequenzier-PCR**

Für die Erzeugung von Kettenabbruchfragmenten zur Kapillarsequenzierung wurde das DTCS-Quick Start-Kit (Fa. Beckmann-Coulter) verwendet. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Amplifikate, wurden zwischen 50 ng und 100 ng gereinigtes PCR-Fragment bzw. 400 ng Plasmid als Template-DNA eingesetzt. Plasmide wurden zusätzlich für 10 Min. bei 85°C denaturiert. In einen 10 µL Reaktionsansatz wurde 4 µL DTCS-Mastermix, 50 pmol Sense- oder Antisenseprimer und bidest. Wasser zugegeben.

## **3.12.4. Aufreinigung von DNA**

### **DNA-Aufreinigung mit Silikagel**

Spezifische Banden wurden aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein tariertes Reaktionsgefäß überführt und erneut gewogen. Zur Aufreinigung von DNA-Amplifikaten aus Agarosegelen wurde das Kit Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Fa. Promega) verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

## **3.12.5. DNA-Modifikation**

### **Enzymatische Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen**

Für eine Klonierung wurde sowohl der jeweilige Vektor (pMet $\alpha$ B, pZeoSV2 oder pP- $\alpha$ SUMO3), als auch das zu klonierende DNA-Fragment mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Die Inkubation erfolgte in der Regel im Thermoblock bei 37°C oder 55°C für 15 - 30 Minuten. Die DNA wurde nach jedem Inkubationsschritt gereinigt (siehe Punkt 4.1.4.).

### **Ligation und Linearisierung von Plasmid-DNA**

Für die Ligation wurde das zu inserierende DNA-Fragment in 3-molarem Überschuss zum Vektor mit Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Fa. Fermentas) in einem Ansatz mit einem



Volumen von 10 µl gemischt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Das so ligierte Plasmid mit inseriertem, proteinkodierendem Abschnitt wurde anschließend zur Transformation von *E. coli* oder *P. pastoris* eingesetzt. Zur Transformation der Hefen *P. methanolica* (5 µg pMet $\alpha$ B mit 10 U *Ascl*) und *P. pastoris* (10 µg pP- $\alpha$ SUMO3 mit 10 U *MssI*) wurden die nach Restriktionsanalysen ausgewählten Plasmide durch enzymatische Hydrolyse in entsprechendem Puffer linearisiert. Der Ansatz wurde 1 h bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

### **DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von PCR-Amplifikaten oder Plasmid-DNA erfolgte mit dem 8-Kapillar-Sequenzierer CEQ 8000 (Fa. Beckmann-Coulter). Bedingt durch das Sanger-Prinzip, auf dem die Funktionsweise des Geräts beruht [SANGER *et al.*, 1977], mussten die Proben zuvor eine Sequenzier-PCR mit nachfolgender DNA-Aufreinigung durchlaufen. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte automatisiert nach der Standardherstellermethode LFR-1. Die Auswertung der Fluoreszenzdiagramme wurde mit der SEQ8000 Genetic Analysis System-Software (Fa. Beckmann-Coulter) durchgeführt. DNA-Fragmente von >350 bp wurden extern von Fa. Seqlab sequenziert.

### **3.12.6. Transformation**

#### **Transformation von *E. coli***

Gefrorene, transformationskompetente *E. coli* Top 10 oder *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden auf Eis angetaut. Danach wurden 5 µl des Ligationsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und nochmals für 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei einer Temperatur von 42°C. Die Zellen wurden umgehend wieder auf Eis abgekühlt. Dann wurden 250 µl auf 37°C temperiertes SOC-Medium (Fa. Invitrogen) zugegeben und der Ansatz für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 37°C schüttelnd bei 140 rpm. Auf selektiven LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/mL) oder Zeocin (25 µg/mL) wurde Flüssigkultur ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nur erfolgreich transformierte Zellen mit Antibiotikaresistenz bildeten Kolonien.

#### **Transformation der Hefen *P. methanolica* und *P. pastoris***

Nach Protokollangaben der Expressionskits für *P. methanolica* (Fa. Invitrogen) und *P. pastoris* (Fa. LifeSensors) wurden elektrokompetente *P. methanolica* PMAD11 mit 5 µg linearisierter Plasmid-DNA bzw. 10 µg für *P. pastoris* X33, mittels Elektroporation transformiert. Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Parametern mit dem EasyJecT Prima (Fa. EquiBio): Spannung: 1800 V, Kapazität: 50 µF. Unmittelbar nach der Elektroporation erfolgte das

Ausplattieren transformierter Hefesuspension auf MD- bzw. YPDS-Selektiv-Agarplatten. Die Platten wurden für 3 - 5 Tage bei einer Temperatur von 30°C inkubiert.

### **Transfektion von CHO-Zellen**

Zur Transfektion der CHO-Zellen wurde Roti-Fect PLUS (Fa. Roth) Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden zur Selektion HAM's F12-Komplettmedium mit Zeocin kultiviert.

## **3.13. Mikrobiologische Arbeiten**

### **3.13.1. Kultivierung von *E. coli***

#### **Allgemeine Kulturbedingungen**

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten. Transformierte Zellen wurden in antibiotikahaltigem Low-Salt-Medium kultiviert. Dieses enthielt 100 µg/mL Ampicillin bei Verwendung des Vektors pCR4-Topo und 25 µg/mL Zeocin bei den Vektoren pZeoSV2 und pP-ahSUMO3. Positive Klone wurden kryokonserviert.

#### **Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen**

Transformationskompetente *E. coli* DH5α wurden mit Hilfe des Kits Roti-Transform (Fa. Roth) nach Herstellerangaben hergestellt.

### **3.13.2. Kultivierung von *P. methanolica***

Die folgenden Protokolle sind im Wesentlichen an die Herstellerangaben des *Pichia* Expression Kits (Fa. Invitrogen) angelehnt.

#### **Allgemeine Kulturbedingungen**

Im Allgemeinen erfolgte die Anzucht bei 30°C schüttelnd in YPD-Flüssigmedium bzw. auf YPD-Agarplatten. Nach der Transformation wurden die Hefeklone auf Adenin-freiem Minimalmedium (MD-Agarplatten) selektiert. Die weitere Kultivierung der *P. methanolica*-Klone erfolgte in MD-Flüssigmedium. Positive Klone wurden kryokonserviert.

#### **Herstellung kompetenter *P. methanolica*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter *P. methanolica*-Zellen des Stamms pMAD11 erfolgte den Herstellerangaben des *Pichia* Expression Kits (Fa. Invitrogen) entsprechend.

### **Chemokin- und KLK-Expression mit *P. methanolica***

Der Vektor pMet $\alpha$ B mit CCL- bzw. KLK-DNA-Abschnitten wurde ins Genom der Hefe inseriert. Die heterolog exprimierten, rekombinanten Chemokine und KLK wurden ins Medium sezerniert. Hierfür wurde BMDY-Medium mit einzelnen Kolonien von MD-Selektionsagar beimpft und im Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Die Vorkulturen wurden zum Animpfen der Erlenmeyerkolben für die Expression der jeweiligen Proteine in BMDY-Medium verwendet. Die Induktion der Expression wurde durch Zugabe von Methanol in das BMDY-Medium oder durch das Abzentrifugieren der Biomasse und resuspendieren in BMMY getestet.

### **Herstellung kompetenter *P. pastoris*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter *P. pastoris* erfolgte nach LIN-CEREGHINO *et al.* (2005).

### **3.13.3. Chemokinexpression mit *P. pastoris***

Mit einzelnen, auf YPDS-Platten mit einer Zeocinkonzentration von bis zu 100  $\mu$ g/mL wachsende Kolonien wurden in BMGY schüttelnd bei 220 rpm Vorkulturen hergestellt. Mit je 10 mL der Vorkultur wurden 100 mL BMM in sterilen Erlenmeyerkolben beimpft. Diese wurden für 48 h schüttelnd bei 30°C und 220 rpm kultiviert und täglich zweimal mit 0,1 % (v/v) Methanol gefüttert.

## **3.14. Proteinchemische Verfahren**

### **3.14.1. Aufkonzentrierung und Entsalzung von Kulturüberständen**

Volumen und Leitfähigkeit der Kulturüberstände aus den Schüttelkolben wurden in Vorbereitung auf die Aufreinigung der Zielproteine reduziert. Dies erfolgte durch Pufferaustausch mit Ultrafiltrations-Zentrifugenröhrchen mit MWCO= 3 kDa bei Chemokinen (Fa. Millipore, Centricon) bzw. 10 kDa bei KLK (Fa. Sartorius, Vivaspin 20). Volumina größer als 500 mL wurden mittels Dialyse über Nacht in Dialyseschlauch MWCO 3500 (Fa. Spectrum Medical) rührend gegen 50 mM Tris pH 7,4; 50 % (w/v) PEG 600 (Fa. Merck) entsalzt.

### **3.14.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteinproben wurden mittels reduzierender SDS-PAGE unter Verwendung der Methode nach LAEMMLI (1970) analysiert. Die Auftrennung erfolgte in 12,5% (w/v) SDS-Polyacrylamid-Gelen mittels vertikaler Gelelektrophorese in der EasyPhor PAGE Mini (Fa. Biozym). Jeweils 20  $\mu$ L der Proteinprobe wurde mit 10  $\mu$ L 2x NuPAGE-Ladepuffer (Fa. Invitrogen) versetzt, für 5 Min. bei 98°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese

wurde 2 h bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Zur Abschätzung der Molekülmasse diente der Proteinmarker ProSieve Quadcolor (Fa. Lonza).

### **3.14.3. Protein-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau**

Für das Anfärben der Proteine wurden die Gele über Nacht in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung Roti-Blue (Fa. Carl Roth) schüttelnd inkubiert und anschließend entfärbt.

### **3.14.4. Protein-Färbung mit Silbernitrat**

Mit der Silberfärbung ist es möglich, geringe Mengen von Protein ab 0,2-0,6 ng in einem PAA-Gel mit Hilfe von Silberionen anzufärben. Die Färbung wurde mit dem Roti-Black N Kit (Fa. Roth) nach Herstellerangaben mit dem Protokoll für "freie PAA -Gele" durchgeführt.

### **3.14.5. Westen-Blot und Immunodetektion**

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Hilfe des EasyPhor PAGE Mini Tank-Blot Modul (Fa. Biozym) für 35 min bei 15 Volt auf eine PVDF-Membran transferiert. Die geblottete Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen mit Magermilchpulver 3 % (w/v) in PBS schüttelnd über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für je 10 Min. mit PBS und PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Danach wurde die Membran mit den in PBS mit 1% (w/v) Magermilchpulver verdünnten Primär-Antikörpern für 2 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (2 mg/mL, Fa. Sigma-Aldrich) schüttelnd in PBS-Puffer mit 1% (w/v) Magermilchpulver in der Verdünnung 1:1000 für 2 h. Die Membran wurde anschließend erneut, einmal mit PBS und einmal mit TBS-Puffer pH 9,0 für 10 Min. gewaschen. Abschließend wurde die Membran in 25 mL TBS-Puffer pH 9,0 mit BCIP/NBT-Solution 1:100 inkubiert, bis Banden zu erkennen waren.

### **3.14.6. Zymographie**

Bei der Zymographie handelt es sich um eine Spezialform der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen, mit der biologisch aktive Proteinase sichtbar gemacht werden können [KLEINER & STETLER-STEVENSON, 1994]. Hierzu wird ein Substrat (hier Casein) während der Polymerisation in einem Polyacrylamidgel vernetzt. Die Durchführung der Zymographie erfolgte nach Herstellerangaben (Fa. Invitrogen). Nach der Renaturierung der Proteinase im Gel, konnten sie das im Gel eingebettete Casein hydrolysieren. Diese Lyse-Zonen erscheinen nach der Entwicklung transparent, im Gegensatz zu den restlichen blauen Bereichen des Gels mit nicht hydrolysiertem Substrat.

### 3.14.7. Aktivitätsbestimmung der Kallikrein-verwandten Peptidasen

Ein Nachweis der enzymatischen Aktivität der rekombinanten KLK erfolgte durch die Messung der enzymatischen Spaltung der chromogenen Substrate: S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA x 2 HCl) und S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x 2 HCl) von Fa. Chromogenix. Bei der Hydrolyse der Peptidbindung wird p-Nitroanilin abgespalten, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm spektralphotometrisch detektiert wird. Die Zunahme der Absorption  $E$  ( $\lambda = 405$  nm) ist ein Maß für die Proteinaseaktivität. Die Messungen wurden in einem Plattenreader (Synergy 2 Multi-Mode, Fa. BioTek) unter Verwendung von 96-Well-Platten (Fa. Nunc) bei 37°C durchgeführt.

#### Komponenten:

S2288 oder S2302 jeweils 100  $\mu$ M

Reaktionspuffer: 300 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0

Kallikrein-verwandte Peptidase

#### Reaktionsansatz:

50  $\mu$ L Reaktionspuffer, 25  $\mu$ L Substrat, 25  $\mu$ L KLK (Endkonzentration KLK:  $\sim$ 10  $\mu$ M)

### 3.14.8. Proteinisolation aus humanem Biopsiematerial

Zur Isolation der Proteine aus humanem Biopsiematerial (siehe Pkt. 3.11) wurde mit einem Skalpell 1 g des jeweiligen Gewebes entnommen und zerkleinert. Danach wurde das Material mit 1,5 mL Extraktionspuffer versetzt und im verschlossenen Gefäß für 10 Min. mit Ultraschall behandelt und anschließend für 15 Min. (160 rpm) Schüttelinkubator inkubiert. Feste Bestandteile wurden nach diesem Schritt für 10 Min. bei 3500 g abzentrifugiert. Die Proben wurden anschließend zur Entfernung von Zelldebris filtriert. Die Filtrate wurden nochmals zur Aufkonzentrierung der enthaltenen Proteine Volumen-reduziert. Jeweils 1,5 mL einer Probe wurden mittels Ultrafiltrations-Zentrifugenröhrchen mit einem MWCO von 3 kDa (Fa. Millipore, Centricon) auf ein Volumen von 300  $\mu$ L reduziert.

## 3.15. Chromatographie

Für die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Chemokine und Kallikrein-verwandten Peptidasen kamen unterschiedliche Techniken der Flüssigchromatographie zum Einsatz. Der erste Schritt, die Kationentauscherchromatographie wurde zur Aufkonzentrierung der im aufzureinigenden Material positiv geladenen Bestandteile, darunter die Zielproteine, angewandt. Im nachfolgenden Schritt, der Reversed-Phase-Chromatographie, wurden alle Proteine des Eluats der Kationentauscherchromatographie von hydrophilen Medienbestandteilen separiert.

Im dritten Schritt zur Trennung der im Proteingemisch befindlichen KLK von unerwünschten Proteinen kam die Size-Exclusion-Chromatographie (Größenausschluss-Chromatographie) zum Einsatz. Die in der Probe vorliegenden Proteine wurden hierbei aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Radien und der daraus resultierenden Retentionszeiten in der Chromatographiesäule voneinander separiert.

Das Äquilibrieren und Waschen der Säulen erfolgte mit den in Punkt 2.4 gelisteten Puffern mit einem definierten Volumen bezogen auf ein Säulenvolumen (SV). Ein SV entspricht dem Volumen des in der Säule gepackten Trennmediums ( $1 \text{ SV} = \pi \cdot r^2 \cdot h$ ).

Die mit einem His-Tag rekombinant exprimierten Chemokine wurden in einer aus zwei Schritten bestehenden Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Punkt 4.4.4.).

### **3.15.1. Kationentauscherchromatographie**

Die Zellen der Fermentation wurden durch Zentrifugation vom Überstand separiert wie in Punkt 4.3.1 beschrieben behandelt. Da die exprimierten Chemokine und KLK einen isoelektrischen Punkt (pI) im basischen pH-Bereich aufweisen, wurden die Retentate aus der Ultrafiltration für die Kationentauscher-chromatographie mit 2 M Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt. Das jeweilige Zielprotein lag dadurch mit einer positiven Ladung vor.

Der pH-justierte, konzentrierte Überstand wurde mit einer linearen Flussrate von 100 cm/h (Trennmedium: SP Sepharose HP, Fa. GE Healthcare) auf die Säule aufgetragen. Zur Entfernung nicht spezifisch gebundener Bestandteile wurde die Säule mit 2 - 3 SV Laufpuffer gespült. Zur Elution der Proteine wurde die Salzkonzentration des Elutionspuffers in einem linearen Gradienten von 0,0 auf 1,0 M NaCl bei einer linearen Flussrate von 100 cm/h erhöht. Das Eluat wurde fraktioniert, um die unterschiedlich stark gebundenen Proteine, voneinander zu separieren. Die Fraktionen wurden mit Western-Blot oder silbergefärbten SDS-Gelen untersucht und anschließend für weitere Chromatographieschritte und Untersuchungen eingesetzt. Für Probenvolumina < 100 mL kam die FPLC-Anlage Äkta Prime (Fa. GE Healthcare) zum Einsatz, für größere Volumina die Chromatographieanlage BioCad250 (Fa. Applied Biosystems). Es wurden mit SP Sepharose HP (Fa. GE Healthcare) gepackte Säulen verwendet, welche mit 5 SV Laufpuffer äquilibriert wurden. Für Vorversuche wurden HiTrap SP HP-Säulen (Fa. GE Healthcare) mit einem SV von 5 mL verwendet. Für die Aufkonzentrierung von Proteinen aus Probenvolumina 2 L wurden Vantage A2-column (Fa. Millipore) mit einem SV von 1,84 L eingesetzt.

### **3.15.2. Reversed-Phase-HPLC**

Zur weiteren Aufreinigung der Eluate der Kationentauscherchromatographie wurde die präparative Reversed-Phase-HPLC angewandt. Die eingesetzten Trennmedien waren Source RPC15 (Fa. GE Healthcare) und C18 (Fa. Sigma Aldrich) gepackt in Edelstahlsäulen

mit je einem SV von 0,177 L. Als mobile Phase wurden drei verschiedene Laufpuffer getestet. Zum einen bidest. Wasser mit 1 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % TFA (v/v), bidest. Wasser mit 1 % Methanol (v/v) und 50 mM Ammoniumacetat oder bidest. Wasser mit 1 % (v/v) Isopropanol und 50 mM Ammoniumacetat eingesetzt. Zur Elution der an das Trennmedium gebundenen Bestandteile wurden bidest. Wasser mit Acetonitril mit 20% (v/v) und 0,1 % TFA (v/v), bidest. Wasser mit 1 % (v/v) Methanol und 50 mM Ammoniumacetat oder Wasser mit Isopropanol mit 80% (v/v) und 50 mM Ammoniumacetat eingesetzt. Die Kationentauschereluat wurden mit einer linearen Flussrate von 150 cm/h (Säulendurchmesser: 5 mm; Säulenlänge: 125 mm) auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde danach mit 5 SV Laufpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Substanzen zu entfernen. Zur Fraktionierung der aufgetragenen Probe wurde ein Gradient von Laufpuffer zu Elutionspuffer (0 – 80 %) appliziert und 42 Fraktionen zu je 1,8 mL gesammelt. Diese wurden anschließend lyophilisiert. Zur Vorbereitung für Size-Exclusion-Chromatographie wurden die gebundenen Proteine mittels Stoßelution eluiert, mit dem Ziel ein möglichst geringes Elutionsvolumen zu erzielen. Hierfür wurde bei einer linearen Flussgeschwindigkeit von 150 cm/h ein Gradient von 0 % Elutionspuffer zu 100 % Elutionspuffer in einer Minute appliziert.

### **3.15.3. Size-Exclusion-Chromatographie (SEC)**

Das Trennmedium Superdex 75 Prep Grade (Fa. GE Healthcare) war gepackt in eine XK26/70-Säule (Fa. GE Healthcare). Da die Kallikrein-verwandten Peptidasen wurden mittels SEC aufgereinigt, da sie nach der Reversed-Phase HPLC mit Elutionsgradienten keine Aktivität mehr aufwiesen. Hierzu wurden die positiv geladenen Proteine in den Fermentationsüberständen mittels Kationentauscherchromatographie aufkonzentriert. Das erhaltene Eluat wurde mittels Reversed-Phase HPLC über Stoßelution (ohne Gradienten) entsalzt, da keine Trennung einzelner Proteine voneinander erzielt und die Kontaktzeit zum Lösungsmittel möglichst gering gehalten werden sollte. Das gesamte Eluat der Entsalzung wurde für die SEC lyophilisiert und in 5 mL PBS resuspendiert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Es wurden 42 Fraktionen zu je 3,34 mL gesammelt. Die Fraktionen welche KLK enthielten, wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung ermittelt.

### **3.15.4. Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Chemokine, die N-terminal mit einem Histidin-Tag fusioniert waren, wurden über Nickel-Chelat-Säulen isoliert. Dafür wurden vorgepackte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen His Trap HP (Fa. GE Healthcare) für die FPLC und Gravity-Flow-Säulen (Econo-Pac, Fa. BioRad) gefüllt mit Ni<sup>2+</sup>-IDA (Fa. Genaxxon) eingesetzt. Nickelionen können im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidin-Resten des Proteins interagieren. Die mobilen Phasen waren der IMAC-Laufpuffer und -elutionspuffer. Eluiert wurde mit einem ansteigenden Imidazol-Gradienten bei

Aufreinigung über FPLC und mittels Stoßelution unter hydrostatischem Druck. In einem ersten Schritt wurde das jeweilige Chemokin, welches N-terminal mit einem SUMO-Leaderprotein und einem His-Tag exprimiert wurde auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Waschpuffer zur Entfernung unspezifisch gebundener Medienbestandteile, folgte die Elution mit IMAC-Elutionspuffer. Die Eluate wurden mittels Ultrafiltration umgepuffert und das SUMO-Protein samt His-Tag mit SUMO-Protease2 proteolytisch abgespalten. Dabei wurde der enzymatischen Spaltreaktion pro 1 µg Chemokin-Fusionsprotein 0,1 µg Protease zugefügt und der Reaktionsansatz (Volumen 20 - 30 mL) für 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der jeweilige Ansatz erneut auf die IMAC-Säule aufgetragen. Da jetzt das Chemokin ohne His-Tag vorlag, passierte es die Säule ohne an das Trennmedium zu binden. Die SUMO-Protease und das SUMO-Leader-Protein mit His-Tag hingegen banden am Trennmedium und wurden so von Zielprotein separiert.

### **3.16. Massenspektrometrie**

Alle MALDI-TOF-Untersuchungen wurden am Fraunhofer IZI (Halle/ Saale) am Gerät Voyager De Pro (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden 1 µL der Probe mit 1 µL 2% (v/v) Trifluoressigsäure sowie 1 µL Maldimatrix gemischt, anschließend hiervon 0,5 µL auf den Stahlprobenträger pipettiert und an der Luft getrocknet. Als Messmethode wurde der lineare MALDI-TOF Messmodus durchgeführt, wobei die Messparameter an die Routinemethode nach Herstellervorgaben "LP\_5-20 kDa" angelehnt waren. Die Parameter wurden in Hinblick auf Signal-Rausch-Verhältnis sowie Auflösung empirisch optimiert.

### **3.17. Zellassays**

#### **3.17.1. Kalziumassay**

Zur Untersuchung des Potentials von heterolog exprimiertem CCL14 eine Zellstimulation auszulösen, wurden Kalziumassays durchgeführt. Hiermit kann die intrazelluläre Kalziumausschüttung, welche durch einen exogenen Stimulus ausgelöst wird, nachgewiesen werden. Es wurden nach Kultivierung  $1,62 \times 10^7$  HOS CD4+ CCR5+ Zellen in 2 mL HBSS-Puffer aufgenommen und mit 1 µM Fluo-4 für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und im nächsten Schritt in 4,35 mL HBSS aufgenommen und pro FACS-Röhrchen 435 µL der Zellsuspension zugegeben. Diese wurden für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden je 300 nM CCL14<sub>[1-74]</sub> und CCL14<sub>[9-74]</sub> (synthetisch bzw. KLK5-aktiviert) zugegeben. Umgehend wurde über 100 Sekunden mittels FACS-Analyse die intrazelluläre Kalziumausschüttung über die relative Absorption des Farbstoffes Fluo-4 ermittelt. Dieser hat durch Bindung freier Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welche nach Rezeptorbindung von Chemokinen an GPCR



(in diesem Fall CCR5) ausgeschüttet werden, einen Fluoreszenzanstieg zur Folge. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde mittels FACS-Analyse über den FL1-H-Kanal bei einer Wellenlänge von 516 nm von ermittelt und aufgezeichnet.

### 3.17.2. Zellmigrationsassay

Für die Zellmigrationsassays und Durchflusszytometrie kam die monozytäre Zelllinie THP-1 zum Einsatz. Die chemotaktische Wanderung der Zellen durch Transwells mit einer Porengröße von 8 µm (Fa. Corning) in RPMI mit 0,5 % (v/v) FBS wurde bestimmt. Induziert wurde die Chemotaxis durch synthetisches CCL14<sub>[9-74]</sub> als Referenz sowie durch KLK5- oder KLK8-aktiviertes CCL14<sub>[9-74]</sub>. Als Negativkontrollen wurde jeweils die Wanderung der Zellen ermittelt, welche ausschließlich mit CCL14<sub>[1-74]</sub>, KLK5 oder KLK8 stimuliert wurden (siehe Abb. 6). Es wurden 600 µL RPMI mit 0,5 % (v/v) FBS in die untere Kammer der Transwells pipettiert und für 20 Minuten im Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) inkubiert. Anschließend wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen in 100 µL RPMI (5 % v/v FBS) in die obere Kammer überführt und für 10 Minuten inkubiert (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C). Dem Medium der unteren Kammer wurden das rekombinante CCL14, KLK5, KLK8 sowie KLK-aktiviertes CCL14 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden wurden die Zellen aus den Kammern transferiert und der chemotaktische Index mittels FACS über das Verhältnis von spezifischer (mit CCL14 und KLK) zu unspezifischer Wanderung (ohne Zugabe von Chemokin) bestimmt. Konzentrationen von 0,5 % (v/v) BSA verglichen mit 0,5 % (v/v) FBS, führten zu einer vergleichbaren Migrationsrate (Negativkontrolle).

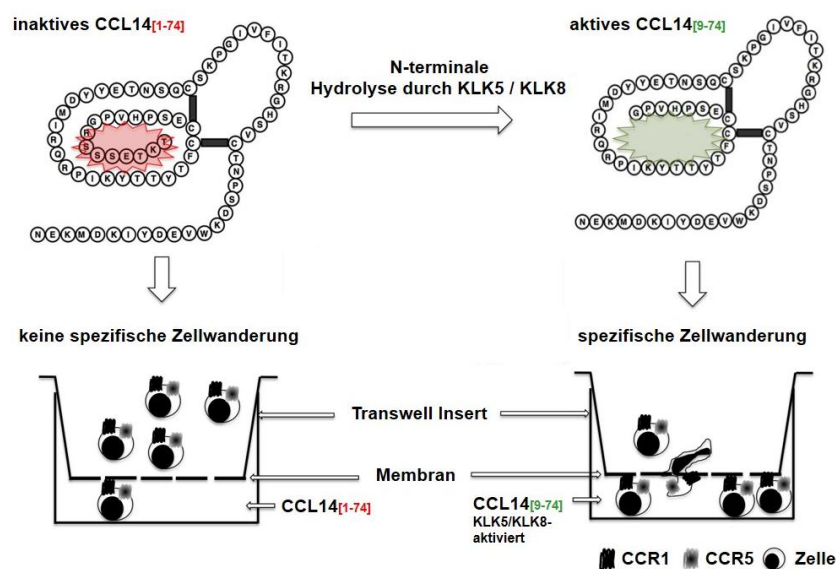


Abbildung 6: Induktion der Chemotaxis von THP-1-Zellen durch Transwells infolge Exposition mit KLK5- bzw. KLK8-aktiviertem CCL14 [GRÜNBERG & QUANDT *et al.*, 2018]

### **3.17.3. Durchflusszytometrie (FACS)**

Die FACS-Untersuchungen für die Migrationsassays und CCR-Expression wurden nach QUANDT *et al.* (2007) durchgeführt. Für die Chemokinrezeptorexpression wurden  $10^5$  Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, mit Fc $\gamma$ -block geblockt und mit den rezeptorspezifischen Antikörpern (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Die Zellmigration aus den Migrationsassays wurde entweder durch sammeln der Zellen zum selben Zeitpunkt mit anschließender Messung bestimmt oder durch exakte Zellzahlbestimmung mittels Beads (Truecount, Fa. BD Bioscience). Tote Zellen wurden bei jeder Untersuchung durch Propidiumiodid-Färbung identifiziert und von den gemessenen Werten subtrahiert. Die Proben wurden mit BD FACS Aria Fusion bzw. LSR Fortessa gemessen und anschließend mit FACS-Diva bzw. FlowJo analysiert.

## 4. Ergebnisse

Zur Amplifikation von KLK- und Chemokin-codierender DNA wurde cDNA aus der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT eingesetzt. Mit den in Punkt 2.7 gelisteten Primern konnten mutationsfreie Amplifikate generiert werden, welche für die Chemokine und KLK kodieren.

### 4.1. Heterologe Expression und Aufreinigung von Chemokinen

Mit spezifischen Antikörpern konnten im Western-Blot Banden im zu erwartenden Molekülmassenbereich der Chemokine sichtbar gemacht werden.

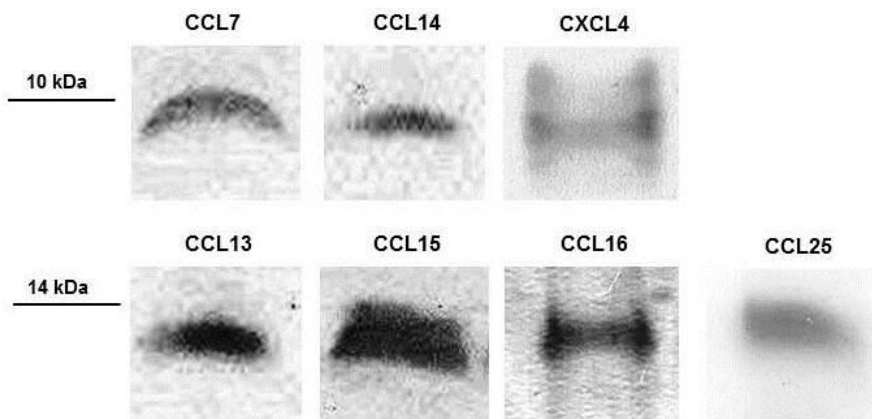


Abbildung 7: Western-Blot-/ SDS-PAGE-Analysen der rekurrierten, aufgereinigten Chemokine CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL25 und CXCL4 nach enzymatischer Abspaltung des His-Tags und SUMO-Leaderproteins durch SUMO-Protease 2 mit spezifisch gegen das jeweilige Chemokin gerichteten polyklonalen Antikörpern (Ausnahme CXCL4 und CCL25: SDS-PAGE-Silberfärbung).

Die Chemokine CXCL4 und CCL25 wurden in einer silbergefärbten SDS-PAGE nachgewiesen (siehe auch Abb. 8), da für diese Chemokine keine Antikörper vorhanden waren.

Die Aufreinigung der mit der Hefe *P. methanolica* exprimierten Proteine erfolgte wie in Punkt 3.5 beschrieben in mehreren aufeinander folgenden Schritten. Nach der Kationenaustauscherchromatographie zur Separation der Proteine mit positiver Ladung erfolgte die Fraktionierung der Proben mittels präparative Umkehrphasen-HPLC.

Die Chemokine, welche mit *P. pastoris* unter Verwendung des Vektors pP-ahSUMO3 wurden wie in Punkt 4.4.4 beschrieben aufgereinigt. Während das SUMO-Leaderprotein mit dem His-Tag nach 15 Minuten fast vollständig von CCL14 abgespalten war, wurden bei CXCL4 60 Minuten Inkubationszeit benötigt. In den Spuren 1 und 5 sind im Silber-gefärbten Gel Banden zu sehen, welche in Addition der Molekülmasse den Chemokinen CXCL4 bzw. CCL14 von ~10 kDa plus dem SUMO-Leaderprotein mit 6xHis-Tag von ~15 kDa entsprechen. Die entsprechenden Einzelbanden nach enzymatischer Reaktion mit SUMO-Protease2 sind in den Spuren 2 - 4 und 6 - 8 zu erkennen.

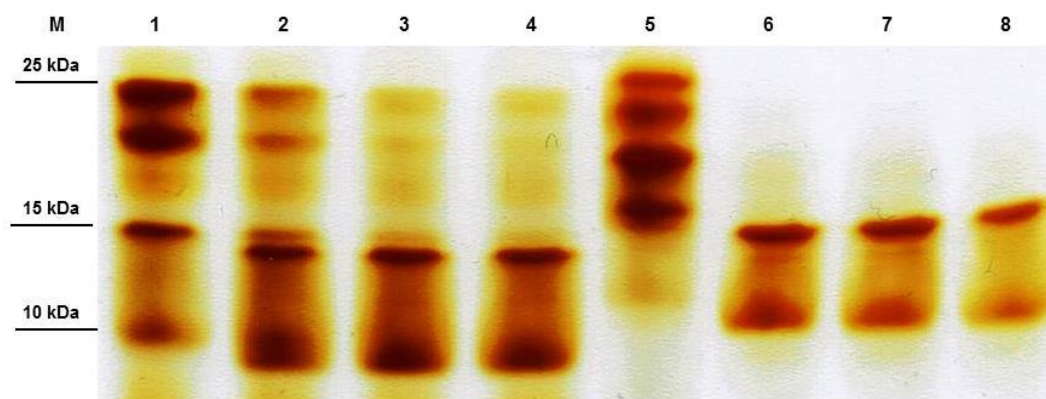


Abbildung 8: SDS-PAGE-Silberfärbung des Gels nach der Auftrennung der Chemokine CXCL4 und CCL14 nach Zugabe von SUMO-Protease2. Die Spuren 1 und 5 nach dem Start der Inkubation, die Spuren 2 und 6 nach 15 min, die Spuren 3 und 7 nach 30 min sowie die Spuren 4 und 8 nach 60 min Inkubation. Im Bereich von 15 kDa sind das abgespaltene SUMO-Leaderprotein mit 6x-HIS-Fragment und im Bereich von 10 kDa das jeweilige Chemokin zu erkennen (Nachweis der aufgereinigten Chemokine CCL7, 13, 14, 15, 16 mittels Western-Blot, siehe Abb. 7).

Die Doppelbanden lassen auf unterschiedliche Glykolisierungsstufen des Proteins schließen. Anschließend wurde eine erneute IMAC durchgeführt, womit der abgespaltene SUMO-Anteil mit His-Tag entfernt wurde. Dieses wurde umgehend durch Ultrafiltration mit bidest. Wasser entsalzt und anschließend lyophilisiert. Nach identischem Protokoll erfolgte die Aufreinigung der Chemokine CCL7, CCL8, CCL13, CCL15, CCL16 und CCL25 und deren Nachweis mittels Western-Blot oder silbergefärbter SDS-PAGE (siehe Abb. 8).

#### 4.2. Heterologe Expression und Aufreinigung von Kallikrein-verwandten Peptidasen

Mit *P. methanolica* konnten die KLKs 5, 7, 8, 11 und 14 rekombinant hergestellt werden. Zusätzlich lieferte auch mit CHO exprimiertes KLK11 in SDS-Gel Banden im zu erwartenden Molekülmassenbereich (Daten nicht gezeigt). Zur Aufkonzentrierung der KLK wurde die Kationentauscherchromatographie (siehe Punkt 4.4.1.) durchgeführt. In der Abbildung 9 ist ein Beispielchromatogramm zur Testung der Bindungs- und Elutionseigenschaften von KLK mit dem Chromatographiemedium SP Sepharose HP zu sehen. Wie zu erkennen, passierten beim Auftrag auf die Chromatographiesäule nicht bindende Bestandteile die Säule (Fraktionen 1 bis 12). Während der Einstellung eines linearen Gradienten an Elutionspuffer (von 0 % auf 100 % 1 M NaCl in den Fraktionen 12 bis 14), eluierten an die Säule gebundene Proteine. In den Fraktionen 13 und 14 konnten in SDS-Coomassie-Gelen Banden im Bereich von 30 bis 40 kDa ermittelt werden, welche den molekularen Massen der KLK entsprechen. Es wurden jedoch zusätzliche Banden in anderen Molekülmassenbereichen in den SDS-Gelen detektiert.

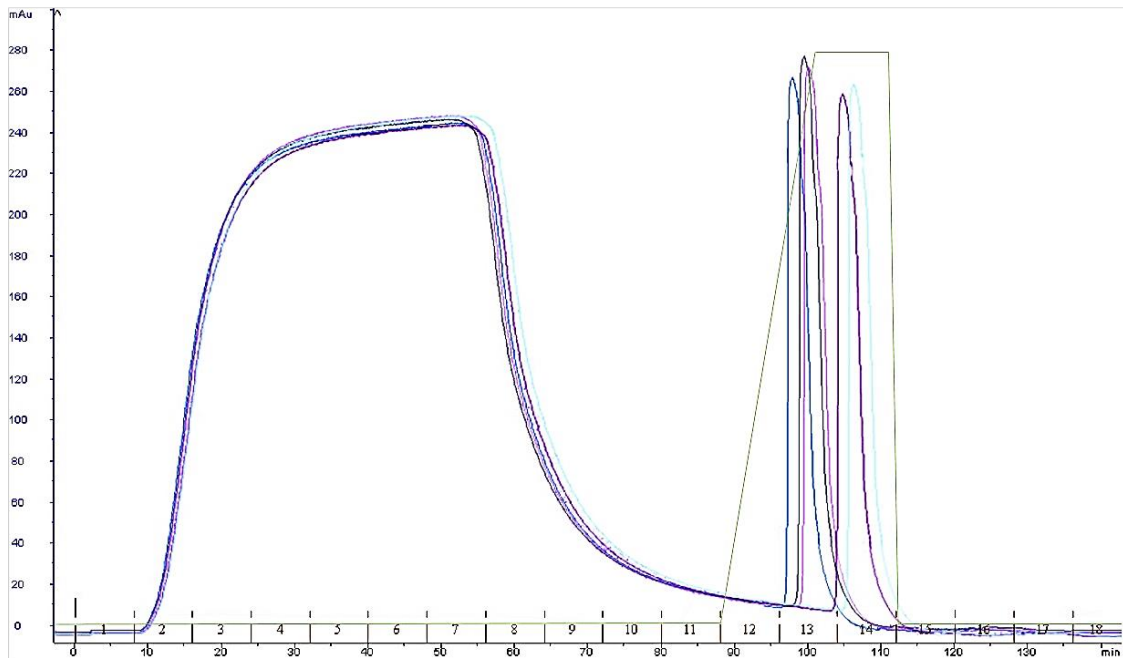


Abbildung 9: Overlay der Chromatogramme der Kationenauscherchromatographie zur Überprüfung der Bindungs- und Elutionseigenschaften der KLK an das Chromatographiemedium SP Sepharose HP. In den Fraktionen 1 - 11 passierten nicht bindende Bestandteile die Säule und wurden durch den Waschschrift ausgetragen. Ab der Zudosierung von 1 M NaCl (Gradient: grüne Linie), eluierten die KLK in den Fraktionen 13 und 14, was im Anstieg der UV-Signale in diesen Fraktionen zu erkennen ist.

Mit der Kationenauscherchromatographie wurden die KLK stark aufkonzentriert. Die Eluate enthielten jedoch auch unerwünschte Bestandteile, welche in den weiteren chromatographischen Trennschritten von den KLK separiert werden sollten.

Hierzu wurde die Size-Exclusion-Chromatographie angewandt. Zur Vorbereitung des Schrittes wurden die Eluate zur Volumenreduktion mittels RP-HPLC entsalzt und anschließend lyophilisiert. Für diesen vorbereitenden, chromatographischen Entsalzungsschritt wurden die zwei Trennmaterialien C18 und Source RPC15 getestet. Aufgrund der besseren Eigenschaften hinsichtlich der Elutionsbedingungen wurde das Trennmedium Source RPC15 gewählt, da die KLK mit den gewählten Elutionspuffern nur unvollständig vom Material C18 eluiert werden konnten. Um den Verlust der Enzymaktivität der KLK zu minimieren, wurden die Eluate umgehend lyophilisiert. Die Kontaktzeit zum organischen Lösungsmittel sollte gering gehalten werden. Das hinsichtlich des Erhalts der biologischen Aktivität der KLK geeignetste Puffersystem war die Kombination Isopropanol/ Ammoniumacetat (Lauf- und Elutionspuffer C). Für einen weiteren Aufreinigungsschritt wurde die Durchführbarkeit der SEC im Kontext der nacheinander geschalteten Aufreinigungsschritte der KLK evaluiert. Zuerst wurde diese Methode hinsichtlich ihrer Effizienz die KLK von den übrigen, im Eluat der RP-Chromatographie enthaltenen unerwünschten Bestandteile zu separieren, mit einer KLK5-Probe getestet. Das nach der Entsalzung gewonnene Lyophilisat wurde in 5 mL SEC-Laufpuffer (PBS) rekonstituiert und auf die Säule aufgetragen. Es wurde eine volumetrische

Flussrate von 1 mL/min angelegt und 40 Fraktionen von je 3,34 mL gesammelt. Mittels SDS-PAGE-Silberfärbung konnte in den Fraktionen 23 und 24 KLK5 identifiziert werden (siehe Abb. 10).

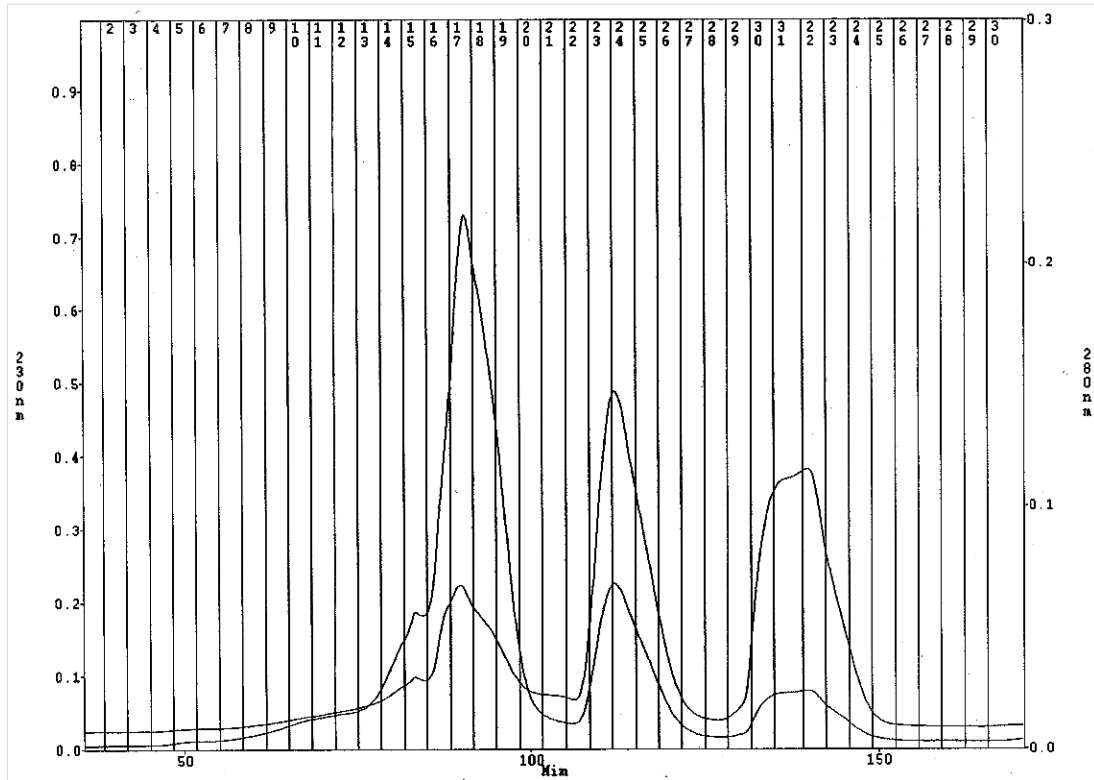


Abbildung 10: Chromatogramm der analytischen SEC von KLK5 bei den Absorptionswellenlängen 230 nm (Beginn bei ca. Minute 80, höchster Peak) und 280 nm (Beginn bei ca. Minute 80, niedrigerer Peak), 3 mm UV-Messzelle; Elution von KLK5 nach ca. 112 Min. in den Fraktionen 23 und 24 (mittlerer, hoher Peak); Peaks links- bzw. rechtsseitig von KLK-Peak mit von KLK5 separierten Proteinen und Peptiden mit größerem bzw. geringerem hydrodynamischen Radius.

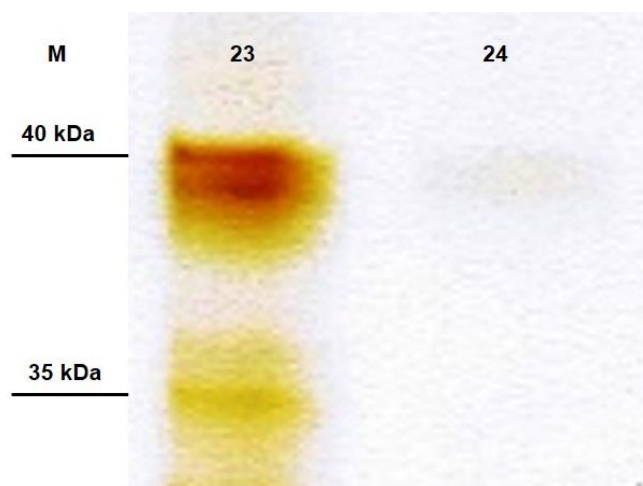


Abbildung 11: SDS-PAGE-Silberfärbung der Fraktionen 23 und 24 aus der Size-Exclusion-Chromatographie von KLK5. Fraktion 23 weist bei gleichem Probenvolumen im zu erwartenden Molekülmassenbereich von 35 - 40 kDa von KLK5 unter reduzierenden Bedingungen eine intensivere Bande auf als Fraktion 24. Weitere Banden in anderen Bereichen wurden nicht detektiert, was eine hohe Reinheit des KLK5 nach der Size-Exclusion-Chromatographie indiziert.

Sowohl in Fraktion 23, als auch in Fraktion 24 konnte eine Bande im zu erwartenden Molekülmassenbereich von ca. 38 kDa detektiert werden. Neben der deutlichen Bande mit der Probe aus Fraktion 23, war in Fraktion 24 nur eine sehr schwache Bande zu erkennen. Zusätzlich war in Fraktion 23 eine schwächere Bande im Molekülmassenbereich von ca. 35 kDa zu sehen, was auf die autoaktivierte Form des KLK zurück zu führen sein könnte (siehe auch MICHAEL *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Reinheit des KLK5 erzielt wurde, da in der reduzierenden SDS-PAGE außer den in der Abb. 11 gezeigten Banden keine weiteren sichtbar wurden. Die weiteren, untersuchten KLK wurden unter den o.g. Bedingungen aufgereinigt und jeweils die zwei Fraktionen des Mittleren der drei Peaks vereinigt (analog zu Fraktionen 23 und 24 bei KLK5). Aus Gründen der technischen Gegebenheiten wurde von jeder der 40 Einzelfraktionen die Absorption spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm bestimmt. Hierfür wurden Küvetten (Fa. Sarstedt) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Gemessen wurde relativ gegen den SEC-Laufpuffer PBS.

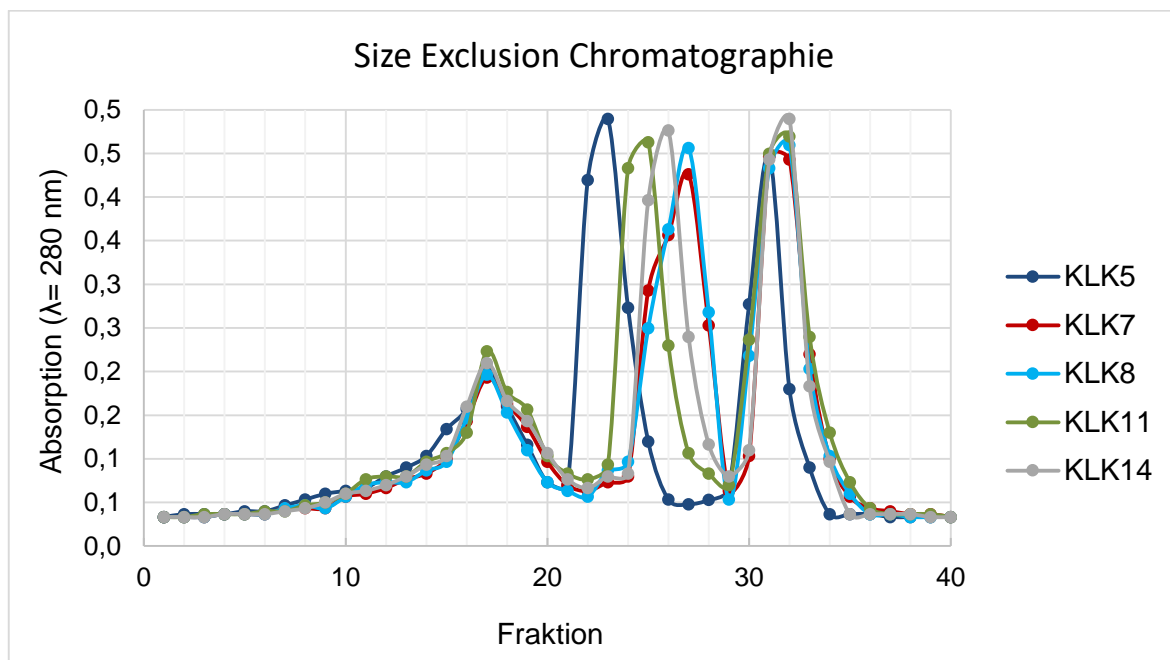


Abbildung 12: SEC-Chromatogramme der aufgereinigten Kallikrein-verwandten Peptidasen: zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Absorptionswerte von Proben der Chromatographien spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und aufgetragen.

Es zeigte sich, dass bei jedem KLK eine vergleichbare Menge an Verunreinigungen (Fraktionen 5 - 20 und 29 - 37) vom Zielprotein (Fraktionen 21 - 28), separiert wurde, was aus den identischen vorangegangenen Aufreinigungsschritten sowie den identischen Fermentationsbedingungen und -medien resultierte. Die KLK-Konzentrationen waren jedoch gering und betragen jeweils ~ 0,2 bis 0,3 mg/mL.



### 4.3. Nachweis der proteolytischen Aktivität von Kallikrein-verwandten Peptidasen

Die proteolytische Aktivität der rekombinanten KLK wurde mit Zymographie und chromogenen Substraten untersucht. Die Kallikreinproben waren die jeweiligen aufkonzentrierten Elutionsfraktionen aus der Kationenaustauscherchromatographie. Die untersuchten KLK können spezifisch nach einem Arginin spalten (P1-Position, Datenbankanalyse MEROPS, RAWLINGS & BARRETT, 2000). Daher wurden die Substrate S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) und S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x 2 HCl) gewählt, bei welchen durch Hydrolyse nach Arginin p-Nitroanilin frei wird. Als Negativkontrolle diente ein äquivalentes Volumen Reaktionspuffer mit Substrat.

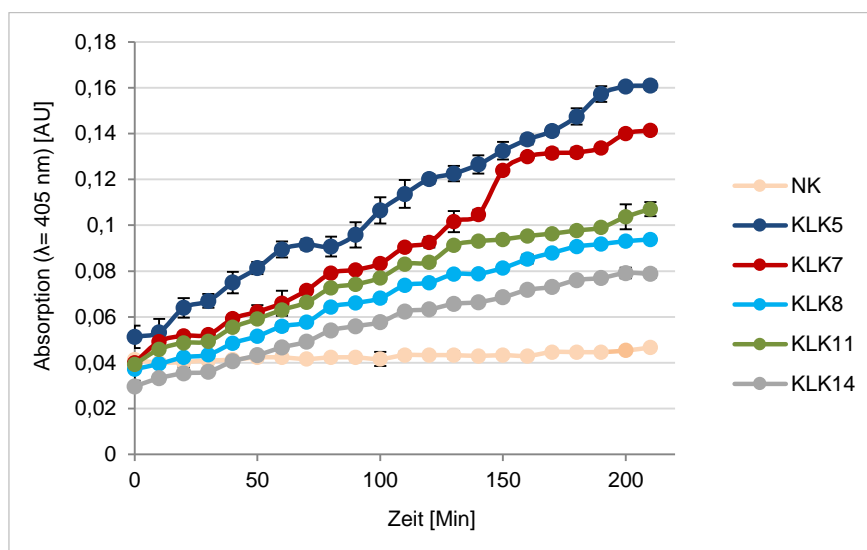


Abbildung 13: Absorptionsmessung des durch KLK vom chromogenen Substrat S2288 abgespaltenen p-Nitroanilin in Abhängigkeit von der Zeit. Die Messung zeigte eine deutliche Aktivität der KLK.

Mit dem Substrat S2302 konnte im Gegensatz zu S2288 keine proteolytische Reaktion mit den untersuchten KLK nachgewiesen werden. Mit S2288 bewirkte KLK5 den höchsten gemessenen enzymatischen Substratumsatz. Hier konnte ein Anstieg der Absorption um 0,16 AU detektiert werden. Das KLK7 bewirkte eine Absorptionserhöhung um 0,14 AU während die anderen untersuchten KLK nur zu einem geringfügig erhöhten Substratumsatz zur Folge hatten. Alle mit chromogenen Substraten überprüften KLK wurden hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität auch mittels Zymographie-Gelen untersucht.

Waren die KLK nach der Kationenaustauscherchromatographie proteolytisch aktiv, konnten sie das im Gel vernetzte Casein degradieren. Es konnten im Zymographiegel lediglich bei zwei der untersuchten KLK eine Hydrolyse des Caseins nachgewiesen werden. Sowohl KLK14 aus der *P. methanolica*-Fermentation als auch Thermolysin-aktiviertes KLK11 aus CHO bewirkten einen enzymatischen Caseinabbau im zu erwartenden Molekülmassenbereich von 37 - 40 kDa (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurde die zur Aktivierung von



KLK11 eingesetzte Menge von 10 ng/mL Thermolysin eingesetzt. Alle anderen exprimierten und untersuchten KLK hydrolysierten in den Zymographieuntersuchungen kein Casein. Es konnten keine Lysebanden sichtbar gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Mit der KLK11-Expression in CHO konnten nur ähnlich geringe Ausbeuten (~ 0,2 - 0,3 mg/mL) wie mit den *P. methanolica*-Fermentationen erzielt werden. Im Gegensatz zu KLK11 aus der Hefeexpression, wies KLK11 aus CHO jedoch proteolytische Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse von Casein aus. KLK11 aus *P. methanolica* erzeugte im Zymographiegel keine Lysebanden.

#### 4.4. Proteolytische Aktivierung von CCL14

Die KLK wurden hinsichtlich ihres Potentials untersucht die inaktive Proform CCL14<sub>[1-74]</sub> in die aktive N-terminal um acht Aminosäuren verkürzte Form CCL14<sub>[9-74]</sub> zu konvertieren. Hierfür wurden CCL14 und das jeweilige KLK in äquimolarem Verhältnis (jeweils 1 µM) für 60, 120 und 180 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde CCL14 für die entsprechende Dauer bei 37°C in Kallikrein-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels MALDI-TOF analysiert. Die Proteine können während der Desorption aus der MALDI-Matrix doppelt protoniert werden. Sie bewegen sich infolge dessen im Vergleich zum einfach protonierten Analyten mit der doppelten Geschwindigkeit durch das Flugfeld im TOF-Analysator. Hieraus ergibt sich die Ermittlung von jeweils zwei Peaks aus einem Analyten. Die ermittelte Molekülmasse entspricht in diesen Fällen jeweils der Hälfte des einfach protonierten Proteins. Es wurden für jede CCL14-Aktivierung drei MALDI-TOF-Analysen durchgeführt und ein je ein repräsentatives Spektrum in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Wie in Abbildung 14A zu sehen, konnte in der Negativkontrolle keine Veränderung der Molekülmasse des Chemokins CCL14 festgestellt werden. Die beiden Peaks mit den höchsten Intensitäten zeigen Massen von 8675,2 Da und 4337,5 Da, wobei der erste mit der theoretischen, relativen Masse von 8673,7 Da von CCL14<sub>[1-74]</sub> korreliert. Der zweite detektierte Peak mit der Masse 4337,5 Da entspricht ca. der Hälfte der zu erwartenden Masse.

Nach einer Stunde Inkubation von CCL14<sub>[1-74]</sub> mit KLK5 konnte keine Abspaltung der N-terminal ersten acht Aminosäuren durch KLK5 nachgewiesen werden. Hingegen wurde nach einer Inkubationszeit von 2 h ein Massenshift detektiert (siehe Abb. 14B). Zwei Peaks der Messung wiesen mit 8674,6 Da und 4337,1 Da (2-fach protoniertes Protein) Massen auf, welche mit der theoretischen relativen Masse von 8673,7 Da von CCL14<sub>[1-74]</sub> korrelieren. Weiterhin jedoch konnten zwei Peaks mit hoher Intensität detektiert werden, welche Massen von 7797,6 Da und 3898,6 Da aufwiesen, die mit der relativen Masse des N-terminal um acht Aminosäuren verkürzten Form von CCL14<sub>[9-74]</sub> korrelieren (7796,8 Da). Das Verhältnis von CCL14<sub>[1-74]</sub> zur verkürzten Form CCL14<sub>[9-74]</sub> betrug hierbei ca. 1,5:1.

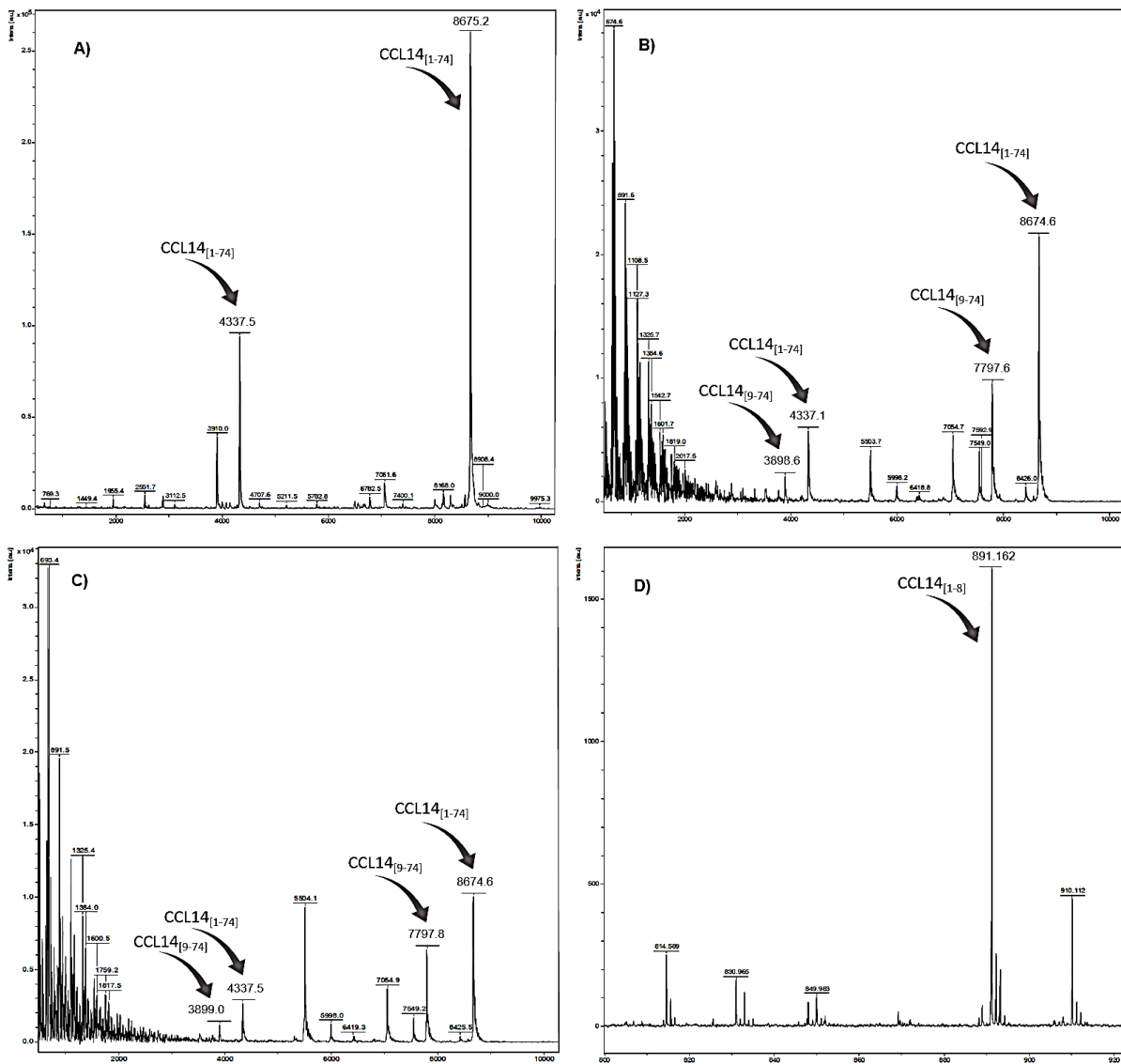


Abbildung 14: MALDI-TOF-Analysen nach Inkubation von rekombinantem CCL14<sub>[1-74]</sub> in Kallikrein-Puffer A) Negativkontrolle: die Inkubation für 3 h bei 37° C ohne Zugabe von KLK5 bewirkte keine Veränderung der Molekülmasse von CCL14. MALDI-TOF-Analysen nach Inkubation von rekombinantem CCL14<sub>[1-74]</sub> mit rekombinantem KLK5 in Kallikrein-Puffer in äquimolarem Verhältnis bei 37 C° B) Nach 2 h: zwei Peaks zeigen die Molekülmassen von CCL14<sub>[1-74]</sub> und zwei Peaks die von CCL14<sub>[9-74]</sub>. C) Nach 3 h: Zwei Peaks zeigen die Molekülmassen von CCL14<sub>[1-74]</sub> und zwei Peaks die von CCL14<sub>[9-74]</sub> mit Zunahme der Peakintensitäten von CCL14<sub>[9-74]</sub>. D) Die Molekülmasse des durch KLK5 abgespaltenen N-terminalen, acht Aminosäuren großen Fragments von CCL14 wurde identifiziert.

Nach einer Inkubationszeit von 3 h verschob sich dieses Verhältnis weiter in Richtung von CCL14<sub>[9-74]</sub>, so dass beide Varianten nach diesem Zeitraum in nahezu gleichen Anteilen in der Probe vorlagen (siehe Abb. 14C). In diesen Reaktionsansätzen konnte auch das abgespaltene N-terminale, acht Aminosäuren lange Fragment nachgewiesen werden. Dieses hat eine theoretisch zu erwartende Molekülmasse von 894,8 Da. Die im Massenspektrum detektierte Masse von ~891,2 Da korreliert damit (siehe Abb. 14D).

Wie bei KLK5, konnte auch bei KLK8 nach 60 Minuten Inkubation noch keine Abspaltung der N-terminalen acht Aminosäuren nachgewiesen werden (siehe Abb. 15A). Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde eine geringe Veränderung der Massen in der Probe detektiert. Ein Peak der Messung zeigte eine Masse von 7797,5 Da, welche mit der relativen Masse der N-terminal um acht Aminosäuren verkürzten Form von CCL14<sub>[9-74]</sub> korreliert (7796,8 Da) (siehe Abb. 15B).

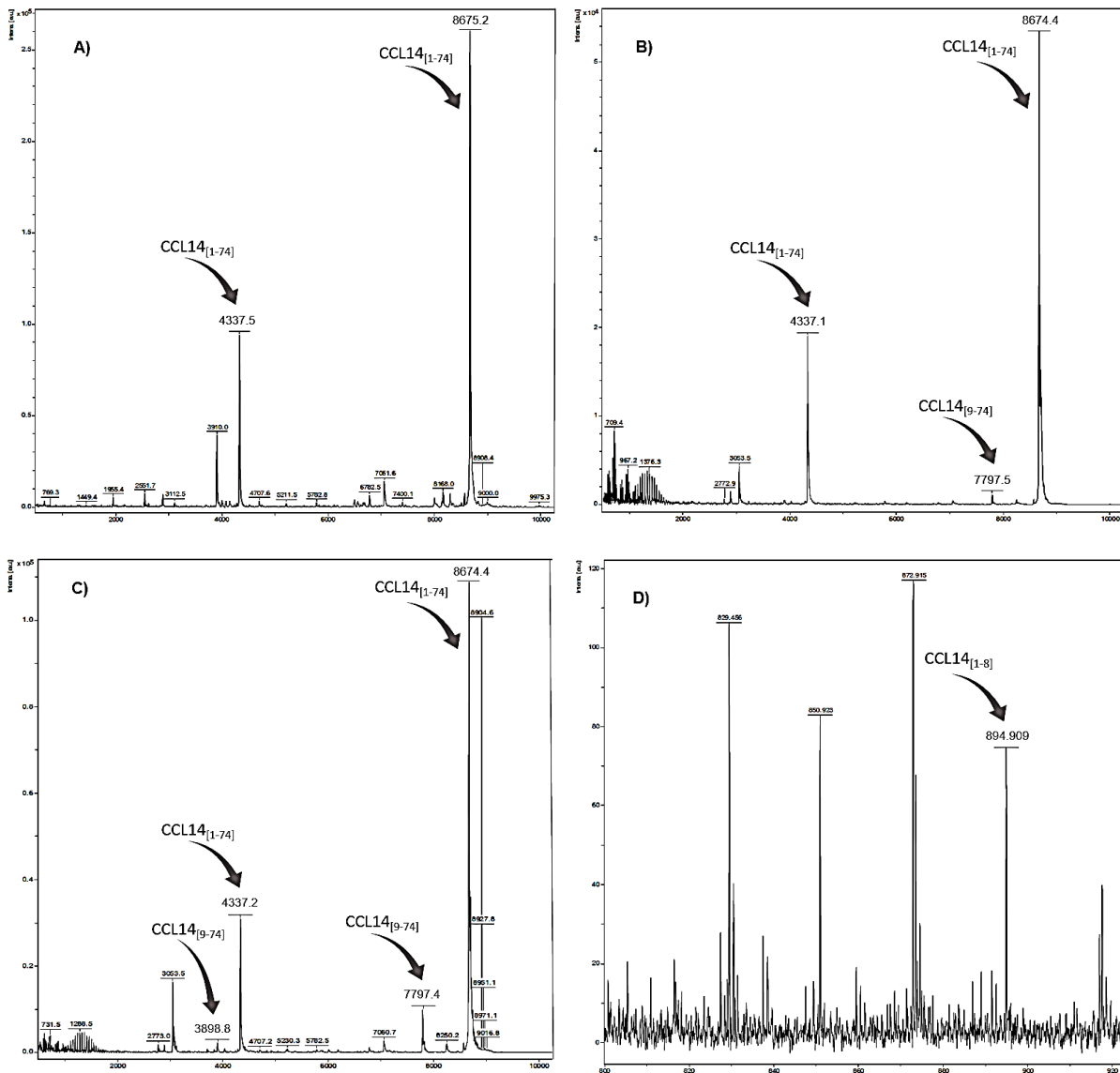


Abbildung 15: MALDI-TOF-Analysen nach Inkubation von rekombinantem CCL14<sub>[1-74]</sub> in Kallikrein-Puffer A) Negativkontrolle: die Inkubation für 3 h bei 37° C ohne Zugabe von KLK8 bewirkte keine Veränderung der Molekülmasse von CCL14. MALDI-TOF-Analysen nach Inkubation von rekombinantem CCL14<sub>[1-74]</sub> mit rekombinantem KLK8 in Kallikrein-Puffer in äquimolarem Verhältnis bei 37 C° B) Nach 2 h: zwei Peaks zeigen die Molekülmassen von CCL14<sub>[1-74]</sub> und ein Peak die von CCL14<sub>[9-74]</sub>. C) Nach 3 h: Zwei Peaks zeigen die Molekülmassen von CCL14<sub>[1-74]</sub> und zwei Peaks die von CCL14<sub>[9-74]</sub> mit Zunahme der Peakintensitäten von CCL14<sub>[9-74]</sub>. D) Die Molekülmasse des durch KLK8 abgespaltenen N-terminalen, acht Aminosäuren großen Fragments von CCL14 wurde identifiziert.

Nach 3 h Inkubation stieg die Intensität des Peaks des CCL14<sub>[9-74]</sub> von 0,1 AU auf 0,16 AU. Die Peaks mit der höchsten Intensität (8674,4 Da und 4337,2 Da 2-fach protoniert) entsprachen der Molekülmasse von CCL14<sub>[1-74]</sub> (siehe Abb. 15C). In den Proben konnte jeweils ebenfalls das N-terminal abgespaltene, aus acht Aminosäuren bestehende, Fragment nachgewiesen werden (siehe Abb. 15D). Die ermittelte Masse betrug 894,9 Da. Die theoretische relative Masse des Fragments beträgt 894,8 Da.

Die Analysen zeigen, dass sowohl KLK5, als auch KLK8 die N-terminal ersten acht Aminosäuren von CCL14<sub>[1-74]</sub> selektiv abgespalten haben. Unter den gewählten Versuchsbedingungen resultierte die proteolytische Aktivität von KLK5 nach 3 h Inkubation in einem annähernd gleichen Verhältnis von CCL14<sub>[1-74]</sub> zu CCL14<sub>[9-74]</sub>. Im gleichen Zeitraum führte KLK8 zu einer geringeren Konvertierung von CCL14<sub>[1-74]</sub> zu CCL14<sub>[9-74]</sub> (ca. 10 %). In den Untersuchungen mit beiden KLK konnte in massenspektrometrischen Analysen die spezifische Masse des N-terminal abgespaltenen Fragments nachgewiesen werden, was die Ergebnisse bestätigt. Desweiteren wurde in der Negativkontrolle gezeigt, dass eine Inkubation von CCL14<sub>[1-74]</sub> im gewählten Puffersystem für 3 h bei 37 °C keinen Einfluss auf das Chemokin und somit der detektierten Masse hatte. Die N-terminale Abspaltung ist somit ausschließlich auf die proteolytische Aktivität der KLK zurückzuführen.

Durch Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung in HOS CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> konnte ermittelt werden, dass das rekombinante KLK5-aktivierte CCL14<sub>[9-74]</sub> an den Rezeptor CCR5 band und eine Signaltransduktion induzierte.

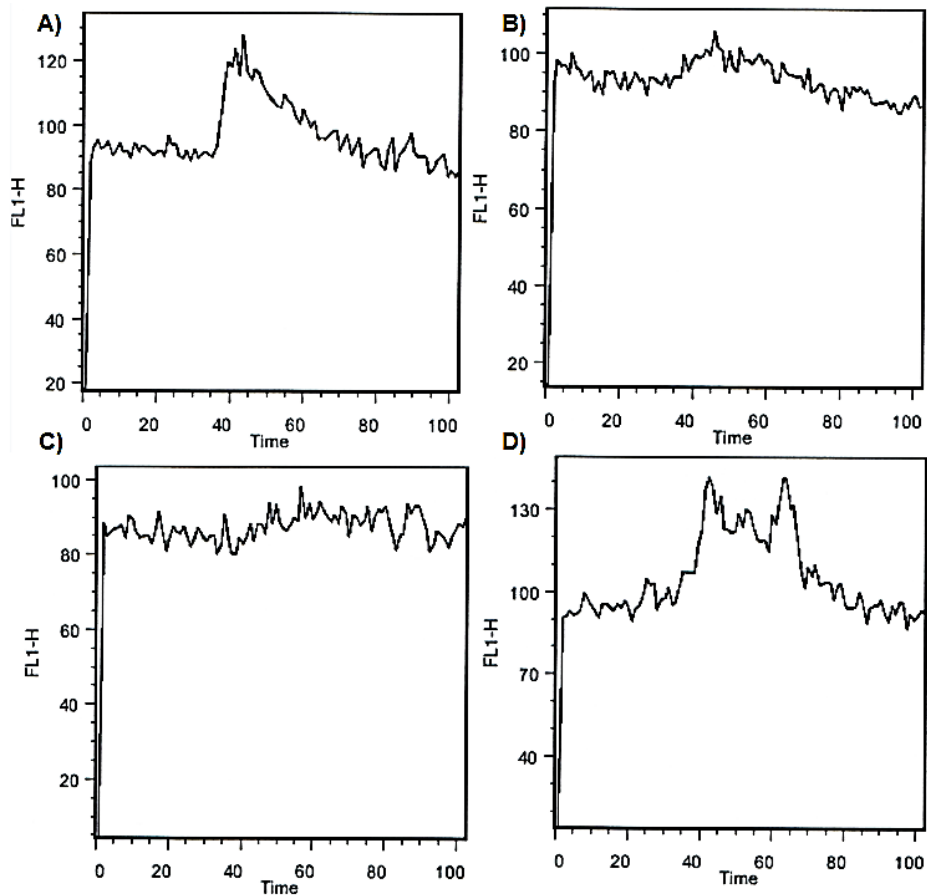


Abbildung 16: Kalziumassay - HOS CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> Zellen wurden mit KLK5 und CCL14 stimuliert und die relative Absorption des Farbstoffes Fluo-4 gemessen. A) KLK5-aktiviertes CCL14 hatte eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung und dem damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge. D) synthetisches CCL14<sub>[9-74]</sub> bewirkte dies ebenfalls. B) und C) HBBS-Puffer bzw. CCL<sub>[1-74]</sub> bewirkten keine Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung.

Im zeitlichen Verlauf zwischen 30 und 70 Sekunden zeigte sich eine gesteigerte Kalziumfreisetzung. Das synthetische CCL14<sub>[9-74]</sub> führte nach Zugabe zur Zellsuspension ebenfalls zur Ausschüttung von Kalziumionen. Auch hier kam es in einem vergleichbaren zeitlichen Verlauf zu einem Anstieg der relativen Intensität der Fluoreszenz durch den Farbstoff Fluo-4. Weder der HBSS-Puffer noch das rekombinante CCL14<sub>[1-74]</sub> konnten eine Kalziumfreisetzung induzieren. Der Einfluss von KLK5 auf die Kalziumausschüttung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da KLK u.a. auch den PAR2-Rezeptor aktivieren können (siehe auch Punkt 6.1.). Diese Aktivierung hätte ebenfalls eine Kalziumausschüttung zur Folge.

Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität von KLK-aktiviertem CCL14 wurden mit Zellmigrationsassays durchgeführt. Mit dem, wie in Punkt 3.3.3 beschrieben generierten CCL14<sub>[9-74]</sub> wurden Migrationsversuche mit der monozytären Zelllinie THP-1 in Transwell-Inserts durchgeführt. Im Anschluss wurde der chemotaktische Index mittels FACS über das Verhältnis von spezifischer (Inkubation mit CCL14/ KLK) zu unspezifischer

Wanderung (ohne Zugabe von Chemokin) bestimmt. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die alleinige Präsenz von KLK5 eine Zellwanderung auslöste: In keiner der mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von KLK5 exponierten Zellen, konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine erhöhte Migration nachgewiesen werden (siehe Abb. 17).

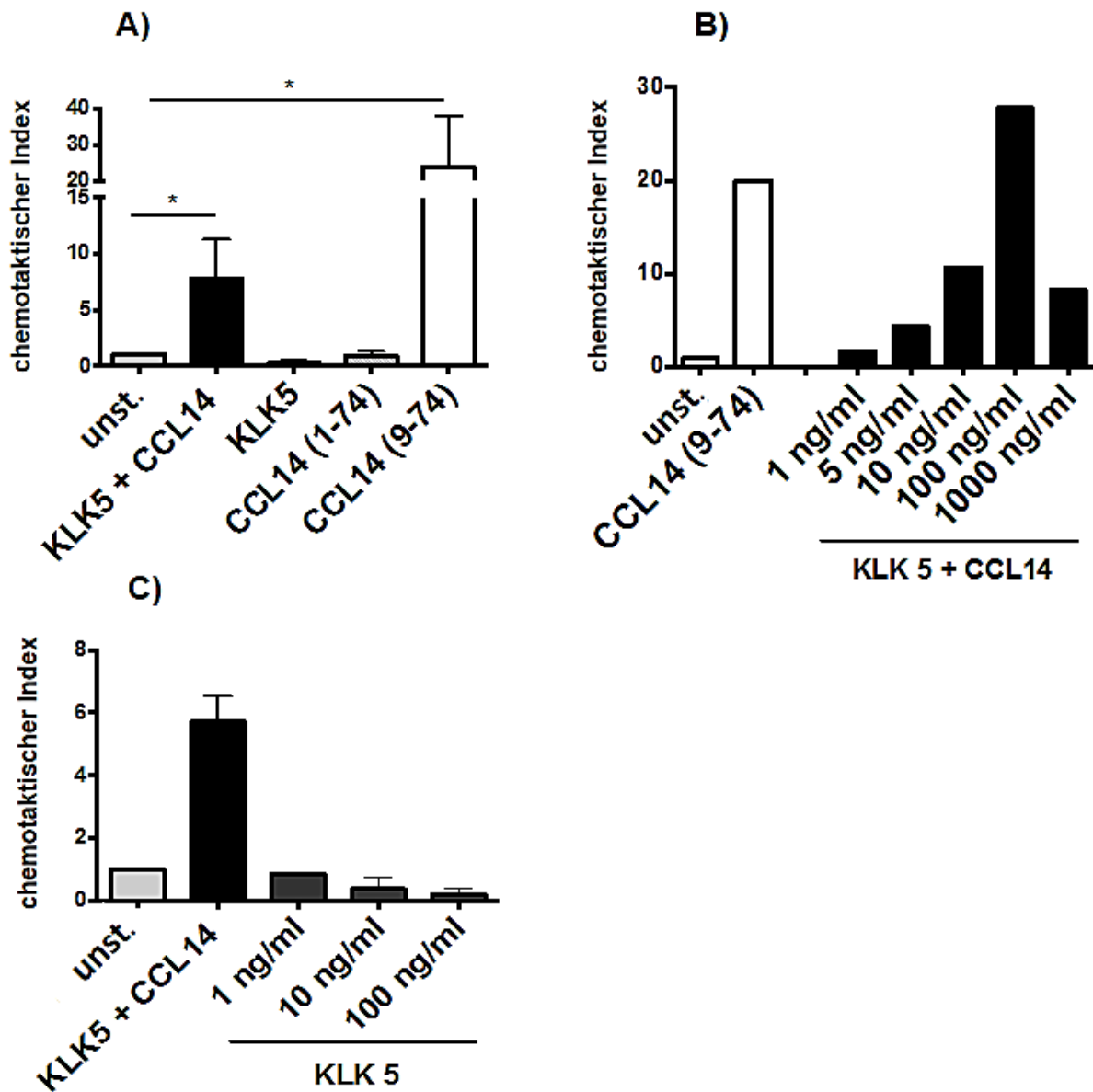


Abbildung 17: Ermittlung des chemotaktischen Index mittels Zellmigrationsassays mit Transwell-Inserts und THP-1-Zellen nach Exposition mit CCL14 und KLK5-aktiviertem CCL14. A) Signifikanter Anstieg des chemotaktischen Index nach Exposition der Zellen mit rekombinantem, KLK5-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub> sowie synthetischem CCL14<sub>[9-74]</sub> (Konzentration jeweils: 10 ng/mL; \* p < 0,05). B) Steigerung der Chemotaxis mit steigender Konzentration an KLK5-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub>. C) Keine Chemotaxis bei ausschließlicher Exponierung mit KLK5 und ohne Zugabe von KLK bzw. CCL14 (unst.).

Wie in Abbildung 17 zu sehen, induzierte KLK5-aktiviertes CCL14 Chemotaxis bei den Zellen. Bei einer Konzentration von 10 ng/mL lösten weder KLK5 noch die inaktive CCL14-Proform eine Zellwanderung aus. Die Kontrollprobe von aktivem CCL14 (synthetisch), zeigte in der

gleichen Konzentration ein signifikant höheres Potential, Chemotaxis auszulösen. Bei einer Konzentration von 100 ng/mL an KLK5-aktiviertem CCL14 steigerte sich die Anzahl gewanderter Zellen gegenüber derjenigen, welche durch 10 ng/mL der Kontrollprobe CCL14<sub>[9-74]</sub> erreicht wurde. Eine weitere Erhöhung des Chemokins auf eine Konzentration auf 1000 ng/mL führte hingegen zu einer Reduktion des chemotaktischen Index. Die Anzahl der gewanderten Zellen war vergleichbar mit der bei einer Konzentration von 10 ng/mL CCL14<sub>[9-74]</sub>.

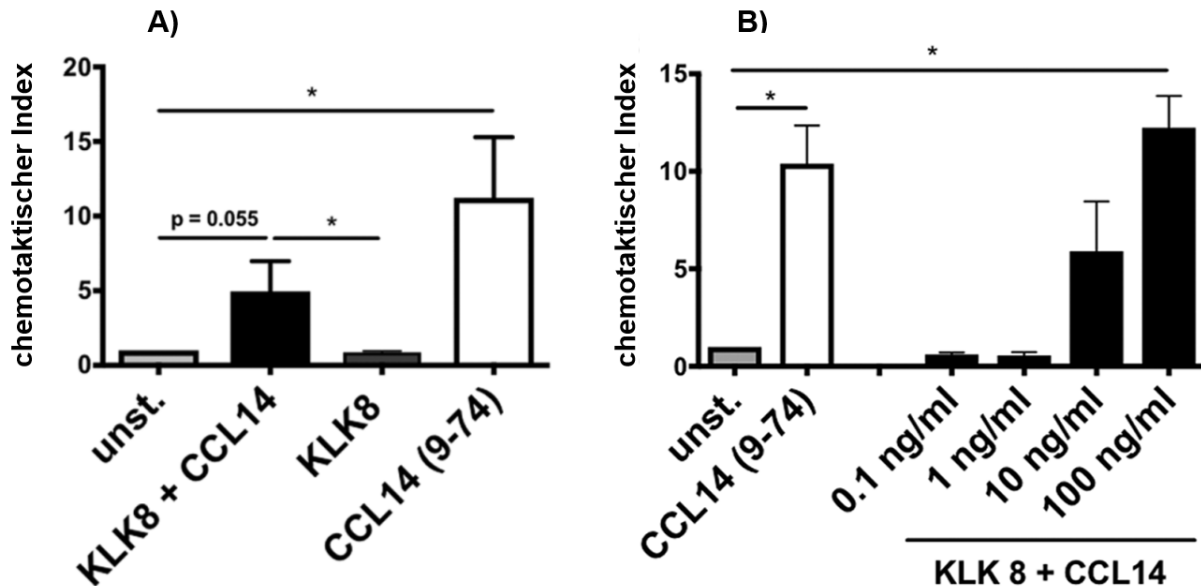


Abbildung 18: Ermittlung des chemotaktischen Index mittels Zellmigrationsassays mit Transwell-Inserts und THP-1-Zellen nach Exposition mit KLK8, KLK8-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub> sowie synthetischem CCL14<sub>[9-74]</sub>. A) Signifikanter Anstieg des chemotaktischen Index nach Exposition der Zellen mit rekombinantem, KLK8-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub> sowie synthetischem CCL14<sub>[9-74]</sub> (Konzentration jeweils: 10 ng/mL; \*  $p < 0,05$ ). B) Steigerung der Chemotaxis mit steigender Konzentration an KLK8-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub>. Keine Chemotaxis bei ausschließlicher Exposition mit KLK8 und ohne Zugabe von KLK8 bzw. CCL14 (unst.).

Wie in Abb. 17 und 18 zu erkennen ist, induzierte synthetisches CCL14<sub>[9-74]</sub> die stärkste Zellmigration. Bei einer Konzentration von 100 ng/mL war ein nahezu identischer chemotaktischer Index von 10 bis 12 bei KLK8-aktivierten CCL14<sub>[9-74]</sub> nachweisbar.

Die Negativkontrolle zeigte, dass KLK8 in einer Konzentration von 10 ng/mL keinen Einfluss auf die Zellen hatte und die Zellwanderung auf CCL14<sub>[9-74]</sub> zurückzuführen war. Wie in den vorangegangenen Experimenten konnte auch hier bei einer Konzentration 100 ng/mL

KLK-aktiviertem CCL14<sub>[9-74]</sub> der höchste chemotaktische Index nachgewiesen werden.

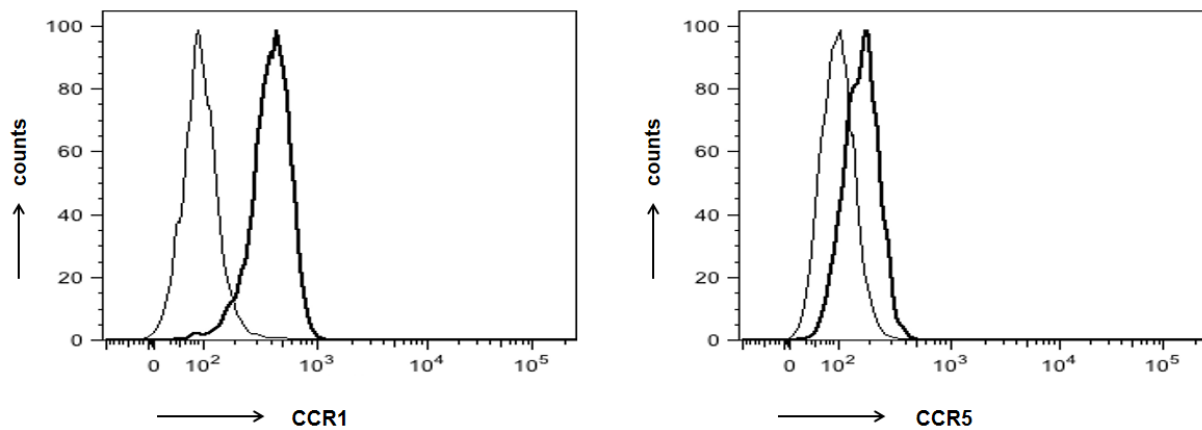


Abbildung 19: Die Expression der Rezeptoren CCR1 und CCR5 auf den THP1-Zellen wurde mittels CCR-spezifischen Antikörpern durch FACS-Analyse gezeigt (grau: Isotypenkontrolle).

Die Expression der CCL14-bindenden Rezeptoren CCR1 und CCR5 auf den THP-1-Zellen konnte mit spezifischen Antikörpern in FACS-Analysen nachgewiesen werden.

#### 4.5. Enzymatische Pyroglutamatbildung am N-Terminus von Chemokinen

Die untersuchten Chemokine (Ausnahme CCL14) weisen Glutamin bzw. Glutaminsäure als N-terminal führende Aminosäure auf. Sie stellen deshalb potentielle Substrate für Glutaminylzyklase (QC) dar. Die Chemokine CCL7, CCL15, CCL16, CCL25 und CXCL4 konnten rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden.

Trotz der Detektion von Banden im SDS-PAGE-Coomassie bzw. Western-Blot, konnten für die Chemokine CCL8 und CCL13 in den MALDI-TOF-Untersuchungen jedoch keine zugehörigen spezifischen Molekülmassen detektiert werden. Abzielend auf N-terminale Pyroglutamatbildung wurden die Chemokine mit QC inkubiert. Die Reaktionen wurden in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 für 2 h bei 37°C durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg des jeweiligen Chemokins mit 0,05 und 0,1 µM humaner QC inkubiert. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls 1 µg Chemokin unter identischen Bedingungen, jedoch ohne Zugabe von QC für 2 h inkubiert. Die Proben wurden wie in Punkt 3.6 beschrieben in den MALDI-TOF-Untersuchungen auf mögliche Pyroglutamatbildung analysiert.

Die Abspaltung von NH<sub>2</sub> und H bei Glutamin hat eine Reduktion der molekularen Masse um 17 Da zur Folge (m<sub>N</sub>= 14 Da; m<sub>H</sub>= 1 Da). Bei der Umwandlung von Glutaminsäure zu Pyroglutamat wird OH und H abgespalten. Diese Reaktion bewirkt eine Verringerung der Molekülmasse um 18 Da (m<sub>O</sub>= 16 Da; m<sub>H</sub>= 1 Da). Die MALDI-TOF-Spektren werden fortfolgend nur für die Chemokine CCL25 und CXCL4, bei denen eine QC-katalysierte pGlu-Bildung am N-Terminus nachgewiesen werden konnte, gezeigt.



Die theoretisch zu erwartende molekulare Masse von CCL7 beträgt 8952,5 Da. In der Negativkontrolle konnte mit 8937,0 kDa eine Masse detektiert werden, welche um 15,5 Dalton geringer war (Daten nicht gezeigt). Hervorgerufen könnte dies durch eine spontane Pyroglutamatbildung am N-Terminus während der enzymatischen Abspaltung des SUMO-Leaderproteins oder dem Umpufferungsschritt vor der Lyophilisierung.

In der Kontrollprobe von CCL7 konnte die theoretische Molekülmasse von 8952,5 Da nicht nachgewiesen werden. Die mit QC inkubierte CCL7-Probe wies ebenfalls eine unspezifische Masse auf. Diese war um 592,0 Da geringer als in der Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Die Änderung der Masse kann nicht mit einer Zyklisierung des N-Terminus begründet werden.

Nach der chromatographischen Aufreinigung und massenspektrometrischen Analyse des rekombinanten CCL15 konnte die bei diesem Chemokin zu erwartende theoretische Molekülmasse von 10156,0 Da nicht nachgewiesen werden. Die detektierte Masse von 8871,0 Da (Daten nicht gezeigt) korreliert mit C-terminal um 10 Aminosäuren verkürztem CCL15. Ein C-terminales Fragment von CCL15, bestehend aus der Aminosäuresequenz CMKKLKPYSI würde der Massendifferenz von ermittelter zu theoretischer Molekülmasse entsprechen (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q16663>, abgerufen am 15.12.2018). Diese These wurde jedoch nicht mittels Aminosäuresequenzierung des heterolog exprimierten CCL15 untersucht.

Proben aus den Fermentationen von verschiedenen Hefeklonen, welche positiv auf die Insertion der CCL15-DNA in ihr Genom getestet wurden, lieferten im Western-Blot Banden mit CCL15-spezifischen Antikörpern. Diese Banden waren jedoch unscharf und reichten vom zu erwartenden Molekülmassenbereich von 10 kDa bis hin zu ca. 8 kDa. Keine der Proben lieferte jedoch die zu erwartende theoretische Masse in MALDI-TOF-Analysen.

Nach der Inkubation von rekombinantem CCL15 mit QC konnte eine Masse von 8856,0 Da detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Sie war 15 Da geringer, als die in der Negativkontrolle ermittelte Masse. Bei der Pyroglutamatbildung aus Glutamin am N-Terminus unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_2$  wäre eine Reduktion der Masse um 18 Da bzw. 17 Da zu erwarten gewesen. Die ermittelte Reduktion der Molekülmasse um 15 Da, entspricht der Masse von Stickstoff.

Das aufgereinigte rekombinante CCL16 verschiedener Expressionsklone lieferte in massenspektrometrischen Analysen Ergebnisse, welche mit 13.291,0 Da (Daten nicht gezeigt) erheblich höher sind, als die theoretische zu erwartende molekulare Masse von 11.202,0 Da. Zudem konnte durch die Inkubation mit QC keine Pyroglutamatbildung am N-Terminus katalysiert werden. In Western-Blot-Analysen mit CCL16-spezifischen Antikörpern konnten Banden im zu erwartenden Molekülmassenbereich von ca. 11 kDa von CCL16 sichtbar gemacht werden (siehe Abb.7 unter Punkt 5.1), welche sich in den MALDI-TOF-Analysen nicht bestätigen ließen.

Nach der Inkubation von rekombinantem CCL25 mit humaner QC konnte eine Modifikation des N-Terminus des Chemokins nachgewiesen. Das N-terminale Glutamin wurde QC-katalysiert durch hydrolytische Desaminierung in Pyroglutamat umgewandelt.

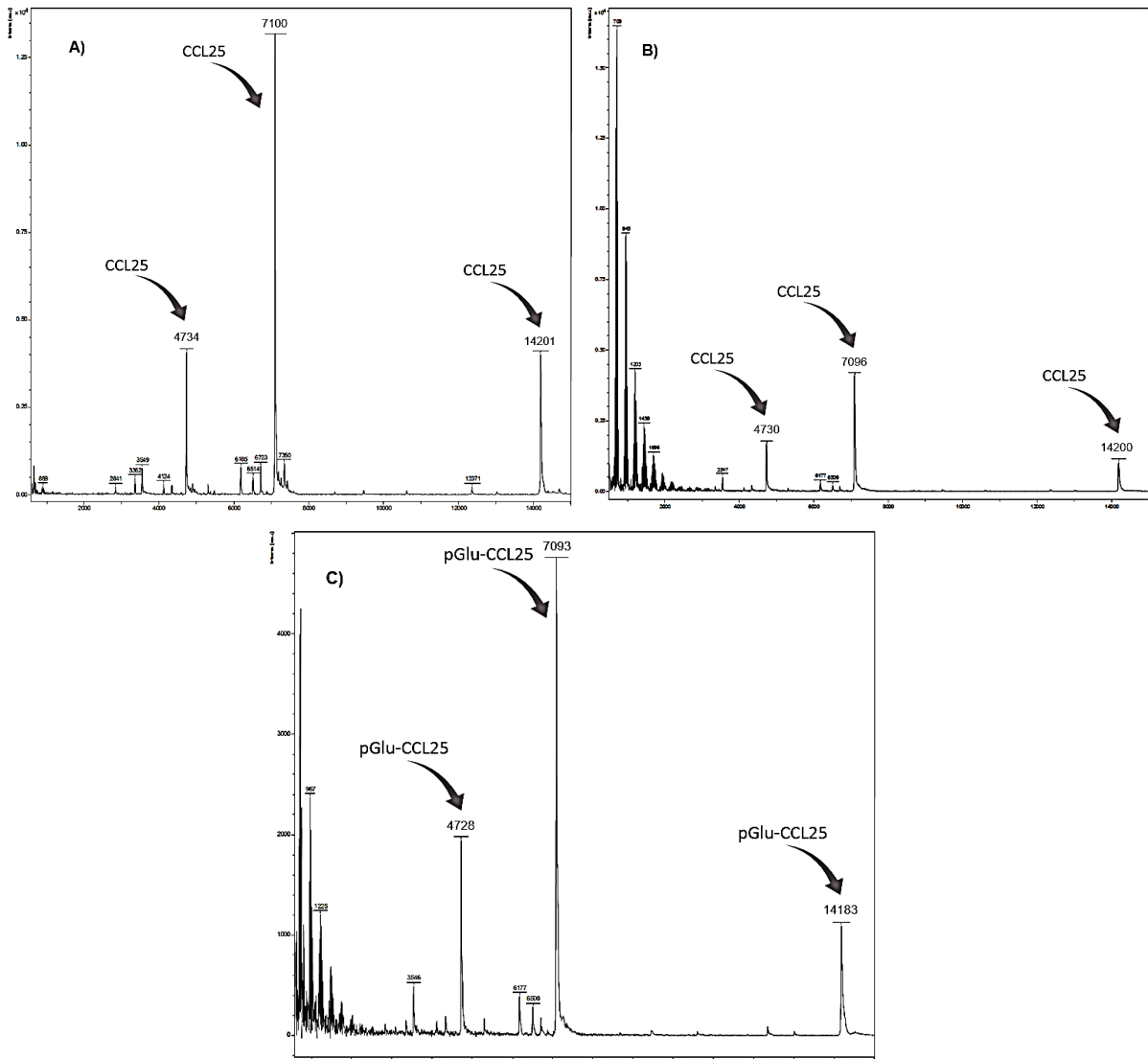
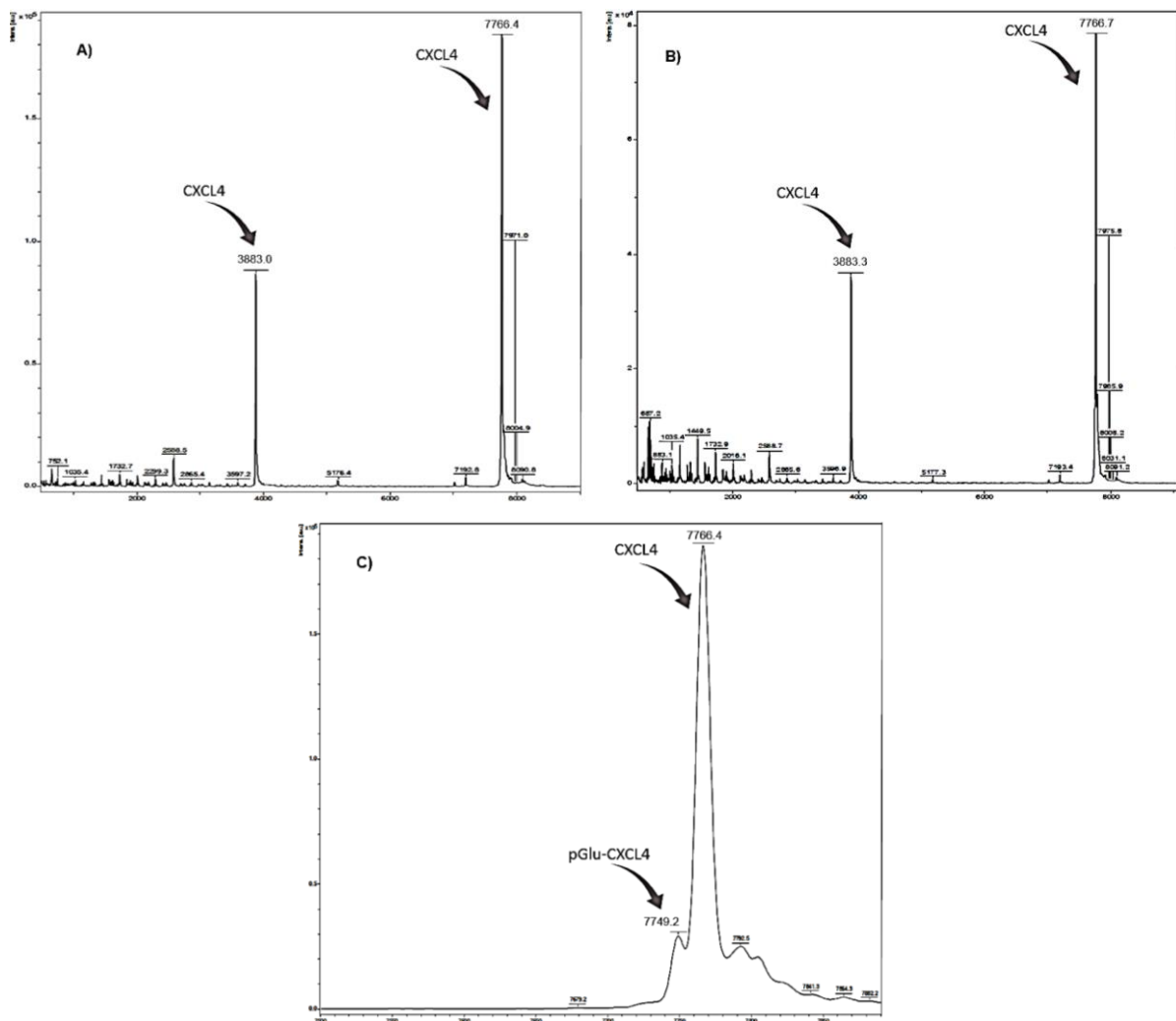


Abbildung 20: MALDI-TOF-Analysen von rekombinantem CCL25 in Tris-Puffer A) Die molekulare Masse von CCL25 konnte detektiert werden. B) Negativkontrolle: die Inkubation für 2 h bei 37° C ohne Zugabe von QC bewirkte keine Veränderung der Molekülmasse von CCL25. C) Bildung von pGlu-CCL25: nach 2 h Inkubation mit humaner QC bei 37°C konnte die molekulare Masse von CCL25 mit N-terminalem Pyroglutamat detektiert werden.

In der massenspektrometrischen Analyse von rekombinant hergestelltem CCL25 und der Negativkontrolle (Inkubation ohne QC) zeigten jeweils drei Peaks molekulare Massen von 14.201,0 Da (7100,0 Da zweifach und 4734,0 Da dreifach protoniertes Molekül) bzw. 14.200,0 (7096,0 Da zweifach und 4730,0 Da dreifach protoniertes Molekül). Diese detektierten Massen korrelieren mit der theoretisch zu erwartenden Molekülmasse von 14.202,4 Da. Ein Einfluss der Inkubationszeit im gewählten Puffersystem auf den N-Terminus des Chemokins konnte über die Inkubationsdauer von 2 h somit ausgeschlossen werden.

Die Pyroglutamatbildung aus Glutamin, der N-terminal ersten Aminosäure von CCL25, resultierte in einer Reduktion der Molekülmasse um 17 Da. Nach Inkubation des CCL25 mit QC konnten in den drei Hauptpeaks mit 14.183,0 Da (7093,0 Da  $\pm$  2-fach und 4728,0 Da  $\pm$  3-fach protoniertem Molekül) Massen detektiert werden, welche ein um die zu erwartenden 17 Da geringeres Molekulargewicht aufwiesen. Mit der Analyse von QC-behandeltem CCL25 konnte somit die QC-katalysierte Pyroglutamatbildung am N-Terminus des Chemokins nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation von rekombinantem CXCL4 mit humaner QC konnte eine partielle Modifikation des N-Terminus des Chemokins nachgewiesen. Die N-terminale Glutaminsäure wurde QC-katalysiert teilweise unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O in Pyroglutamat umgewandelt.



In der massenspektrometrischen Analyse von rekombinant hergestelltem CXCL4 und der Negativkontrolle (Inkubation ohne Zugabe von QC) zeigten die jeweils drei Peaks mit der höchsten Signalintensität Massen von 7766,4 bzw. 7766,7 Da, welche mit der theoretische zu erwartenden molekularen Masse von 7765,2 Da korrelieren. Ein Einfluss der Inkubationszeit im gewählten Puffersystem auf den N-Terminus des Chemokins konnte über die Dauer von 2 h somit ausgeschlossen werden. Das mit QC inkubierte CXCL4 lieferte gleichfalls die Masse 7766,4 Da, wies jedoch zum Teil eine Reduktion der Masse um 17 Da auf (siehe Abb. 20). Die Analyse zeigte eine partielle N-terminale Pyroglutamatbildung.

Der in Abbildung 20 dargestellte Hauptpeak und der erkennbare Schulterpeak mit der Masse, welche CXCL4 mit glutaminylyzyklisiertem N-Terminus entspricht, ließ darauf schließen, dass nur ein Teil des in der Probe befindlichen CXCL4 QC-katalysiert modifiziert wurde.

#### 4.6. Nachweis von Chemokinvarianten in entzündetem Gewebe

Die untersuchten Chemokine sind von Bedeutung bei entzündlichen Erkrankungen und chronischer Inflammation. Ihre N-terminal glutaminylyzyklisierten Varianten sind stabiler als die mit N-terminaler Glutaminsäure bzw. Glutamin und stellen somit medizinische Targets im Kontext dieser pathologischen Prozesse dar. Aus diesem Grund wurden verschiedene, operativ entfernte humane Gewebeproben sowie Synoviozyten aus Rheumatoider Arthritis (RA) hinsichtlich der Präsenz der Chemokine untersucht. Als Positiv-Kontrollen für die Western-Blot-Untersuchungen wurden die heterolog mit *P. methanolica* (pGlu-Formen) und *P. pastoris* hergestellten und anschließend aufgereinigten Chemokine zu je ~ 2 µg pro Spur aufgetragen.

Tabelle 11: Liste der hinsichtlich der Präsenz von Chemokinen und KLK5 untersuchten Gewebeproben mit Lokalisation und Art der Entzündung bzw. des Krankheitsbildes.

Nr.	Probenart	Alter	Geschlecht
1	Wundrand Unterschenkel links, Haut/ Unterhaut/ Faszie	78 J.	männlich
2	Verbrennungsnekrose Oberschenkel rechts	78 J.	weiblich
3	Wundrand Brustwand, Dermis/ Epidermis/ Faszie/ Muskulatur	78 J.	männlich
4	Ulcus Arm rechts Wundengewebe, Dermis/ Epidermis/ Faszie	51 J.	männlich
5	infizierter Wundrand	58 J.	weiblich
6	Ulcus Fuß rechts, Dermis/ Epidermis/ infizierte Faszie	74 J.	männlich
7	Leiste links, Wundengewebe	32 J.	weiblich
8	Sitzbein links, Wundengewebe	68 J.	weiblich
9	Ulcus Sitzbein links, chronische Wundheilungsstörung Dermis/ Epidermis/ Faszie	68 J.	weiblich
10	Verbrennung 2°b Übergang Arm-Brust, Dermis/ Epidermis	73 J.	männlich

Probe Chemokin	1	2	3	7	8	10	PK gesamt	PK pGlu
CCL7	-	-	-	-	-			
CCL13								
CCL14	-			-	-	-		-
CCL15	-	-	-	-	-	-		
CCL16	-	-	-	-	-	-		
KLK5	-			-	-	-	-	-

Abbildung 22: Mit den in Tabelle 11 gelisteten Proteinisolaten aus den humanen Gewebeproben wurden Western-Blot-Analysen mit CCL-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Sämtliche Proben wurden getestet. Proben, welche keine Banden lieferten sind mit (-) gekennzeichnet. Positivkontrollen (PK) wurden mit dem jeweiligen Chemokin und dessen glutaminylyzyklisierter Form durchgeführt.

Mit den in Pkt. 2.2 gelisteten Antikörpern konnten in sechs der zehn Gewebeproben Banden detektiert werden. Das Chemokin CCL13 konnte in sechs Proben nachgewiesen werden. Es konnten Banden im Molekülmassenbereich von 9 kDa ermittelt werden, was für CCL13 unter reduzierenden Bedingungen zu erwarten ist.

Mit CCL14-spezifischen Antikörpern konnten in den Proben zwei und drei Banden im zu erwartenden Bereich von 8 kDa sichtbar gemacht werden. In diesen beiden Proben konnten ebenfalls mit KLK5-spezifischen Antikörpern Banden sichtbar gemacht werden. Die Banden wiesen jedoch im Vergleich zu allen mit Chemokin-spezifischen Antikörpern erzeugten Banden eine geringere Intensität auf.

Für CCL7 konnten in der Probe zehn sowohl im zu erwartenden Molekülmassenbereich von ca. 9 kDa, als auch im Bereich der entsprechenden Dimergröße von ca. 18 kDa Banden visualisiert werden. Banden von N-terminal glutaminylyzyklisierten Chemokinen konnten nicht nachgewiesen werden.

Desweiteren wurden Synoviozyten aus rheumatoider Arthritis nach einer Passage für 24 h in serumfreiem DMEM kultiviert: je einmal mit und ohne Zugabe von PMA (c= 50 ng/mL). Die Zellen wurden anschließend wie o.g. mit Extraktionspuffer behandelt. Die Medienüberstände wurden filtriert und mittels Zentrifugenröhrchen durch Volumenreduktion

um den Faktor 10 aufkonzentriert. Die erhaltenen Proben wurden ebenfalls mittels Western-Blot mit chemokin-spezifischen Antikörpern untersucht.

Sowohl in den aufkonzentrierten Medienüberständen als auch aus den Zellextrakten der Synoviozyten der 4 verschiedenen Patienten, konnten lediglich bei Patient D in den Überständen, sowohl mit, als auch ohne PMA-Aktivierung der Zellen Banden mit CCL16-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Sie wiesen eine geringe Intensität im zu erwartenden Molekülmassenbereich von 11 kDa (Daten nicht gezeigt) auf.

## 5. Diskussion

### 5.1. Proteolytische Aktivierung von CCL14 durch Kallikrein-verwandte Peptidasen

Das Chemokin CCL14<sub>[1-74]</sub> wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe stark exprimiert. Die Abspaltung des N-terminalen Octapeptids nach einem Argininrest resultiert in einer signifikanten Aktivitätssteigerung. Viele der Trypsin-ähnlichen und entzündungsrelevanten KLK weisen diese Spaltspezifität (Arginin in P1-Position) auf. Das macht sie zu relevanten Kandidaten für neue medizinische Targets. VAKILI und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) die enzymatische Abspaltung der N-terminalen ersten acht Aminosäuren von CCL14 bewirkt. Es wurden bis dato noch keine weiteren Proteinase mit dieser Spaltaktivität bei CCL14 nachgewiesen. Die Eigenschaft verschiedener KLK nach einem Arginin zu spalten, wurde hinsichtlich der CCL14-Aktivierung weiter untersucht.

Bei der Umsetzung des chromogenen Farbstoffes S2288 zeigten die aufgereinigten Kandidaten KLK7 und KLK11 biologische Aktivität, konnten aber CCL14 nicht aktivieren. In allen Untersuchungen zur KLK-bedingten CCL14-Aktivierung wurden identische Puffer eingesetzt. Der pH-Wert und Salzkonzentrationen können Einflussfaktoren auf die KLK-Aktivität ausgeschlossen werden. Am chromogenen Substrat ist nach der Aminosäure Arginin p-Nitroanilin gebunden, was nach der Abspaltung vom Substrat Licht absorbiert. Die Spaltstelle des Substrates war aufgrund der molekularen Struktur für die getesteten KLK immer zugänglich. CCL14 hingegen besteht aus 74 Aminosäuren und kann unter den gewählten Pufferbedingungen möglicherweise verschiedene Faltungen bzw. 3D-Strukturen ausbilden. Daher kann die Spaltstelle für die Proteinase möglicherweise unzugänglich sein.

Desweiteren konnte festgestellt werden, dass nach den chromatographischen Aufreinigungsschritten, welche auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, die KLK bei den Eluenten Acetonitril und Methanol vollständig ihre enzymatische Aktivität verloren. Nur der Elutionspuffer C: Isopropanol in Verbindung mit Ammoniumacetat als alternative Puffersubstanz zu TFA erhielt die Aktivität der KLK. Die geringere Polarität des Isopropanols verglichen mit Methanol und Acetonitril könnte zum Erhalt der Enzymaktivität der KLK geführt haben. TFA findet häufig Einsatz bei der Aufreinigung von Proteinen mit RP-Chromatographie, ist jedoch chemisch aggressiv und kann zur Bildung von Proteinkomplexen führen [GARCIA *et al.*, 2002]. Ammoniumacetat puffert im Bereich pH 7,0. TFA hingegen ist stark sauer, kann jedoch die Bindung an das Trennmedium begünstigen und somit eine verbesserte Separation einzelner Proteine voneinander bewirken. Der durch TFA bedingte niedrige pH-Wert könnte zum Verlust der enzymatischen Aktivität der KLK geführt haben. Desweiteren sind die bei RP-Chromatographie üblicherweise eingesetzten Eluenten chemisch aggressiv und können sich inhibierend auf die biologische Aktivität der Enzyme auswirken [FAUSNAUGH *et al.*, 1984].

Während KLK11 und 14 nach der Kationentauscherchromatographie in Zymographiegelen das Substrat Casein enzymatisch hydrolysierten, konnten sie nach dem finalen Chromatographieschritt CCL14 nicht konvertieren. Das ist möglicherweise auf eine geringere Stabilität dieser KLK gegenüber den rigiden Bedingungen während der RP-Chromatographie, wie die Exponierung mit organischem Lösungsmittel oder hohem Druck, zurückzuführen. Andererseits konnten KLK5 und KLK8 in der Zymographie keine Hydrolyse des Substrats bewirken, aktivierten jedoch CCL14. Es muss überprüft werden, ob sich eine alternative Aufreinigung anstelle RP-Chromatographie positiv auf die KLK-Aktivität auswirkt.

Bei der schonenden Aufreinigung der KLK mittels Size-Exclusion-Chromatographie muss ein möglichst geringes Probenvolumen auf die Chromatographiesäule appliziert werden, um die Effektivität der Trennleistung des Verfahrens zu gewährleisten. Dafür musste zunächst das Volumen durch Evaporation reduziert werden oder ein Lyophilisat generiert werden. Aufgrund von nicht entfernten Verunreinigungen nach der Kationentauscherchromatographie, konnten keine stabilen Lyophilisate erzeugt werden. Die in diesen resuspendierten Lyophilisaten befindlichen KLK wiesen weder im Zymographiegel, noch bei chromogenen Substraten enzymatische Aktivität auf. Evaporiertes Intermediat wies eine hohe Viskosität auf und war nicht mehr auf die Chromatographiesäule applizierbar. Eine Möglichkeit, den Schritt RP-Chromatographie zu ersetzen, ist die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC). Die bei der Kationentauscherchromatographie eluierten Proteine müssen in Hochsalzelutionspuffer unlöslich vorliegen und hydrophobe Reste präsentieren, welche an das HIC-Trennmedium binden. Gebundene KLK können mit einem Puffer mit geringer Ionenstärke eluiert werden. Nachteile sind jedoch auch hier die schlechten Lyophilisierungseigenschaften des anorganischen Elutionspuffers, der Einsatz hoher Mengen an Salz sowie eine geringe Effizienz der HIC-Technik in Kombination mit den geringen KLK-Ausbeuten der Hefefermentation. Die KLK 7, 11 und 14 bleiben im Hinblick auf mildere Aufreinigungstechniken weiterhin Kandidaten für die Aktivierung von CCL14<sub>[1-74]</sub>.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die KLK 5 und 8 CCL14<sub>[1-74]</sub> in die aktive Variante CCL14<sub>[9-74]</sub> konvertieren. KLK5 spaltete das N-terminale Octapeptid nach Arginin ab. Unter den verwendeten Pufferbedingungen mit physiologischem pH-Wert konvertierte 1  $\mu$ M KLK5 im Zeitraum von 3 h die Hälfte des in der Probe befindlichen CCL14 (äquimolares Verhältnis zur Protease), obwohl es eine höhere C-terminale Spaltspezifität bei Proteinen aufweist [DEBELA *et al.*, 2008].

DEBELA und Mitarbeiter (2006) zeigten, dass KLK5 pro-HGFA durch Spaltung nach Arginin aktiviert. HGFA wiederum ist der Aktivator des Faktors pro-HGF/SF, welcher kritisch für die Morphogenese und Regeneration von verschiedenen Geweben und des Tumorwachstums ist. Pro-HGFA zirkuliert wie CCL14 als inaktives Prä-Protein im Blut. Im molaren Verhältnis von 1:10 KLK5 zu Substrat setzte das KLK in 2 h ca. 40 % des pro-HGFA



um. Es wurde ermittelt, dass diese Enzymreaktion durch Zugabe einer negativ geladenen Substanz, in diesem Fall 10 µg/mL Dextransulfat, auf 97 % gesteigert wird [KAWAGUCHI & KATAOKA, 2014]. Da in der extrazellulären Matrix eine vorwiegend negativ geladene Umgebung vorliegt [KATAOKA *et al.*, 2003], könnte untersucht werden, ob die Zugabe einer negativ geladenen Substanz bei der CCL14-Aktivierung durch KLK5 möglicherweise zu einer Erhöhung der KLK-Effektivität führt.

Die Gewebetypen, in denen CCL14 und die Kallikreine KLK5 und KLK8 gemeinsam lokal und verstärkt exprimiert werden, sind das Brustgewebe und die Haut:

(CCL14: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=6358>;

KLK5: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=2581>;

KLK8: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=11202> abgerufen am 21.12.2018).

Eine Absenkung des pH-Wertes von 7,2 - 7,4 (physiologisch) auf 5,6 (in der Epidermis) zeigte in den Untersuchungen von CAUBET (2004) keine messbare Verstärkung der Degradation von Corneodesmosin durch KLK5 im Massenverhältnis 1:2. Dies vermuten auch SAKABE und Mitarbeiter (2013), welche die proteolytische Aktivierung von Profilaggrin durch KLK5 in Keratinozyten nachwiesen. Eine Reduktion des pH-Wertes resultierte auch dort nicht in einer gesteigerten KLK5-Effizienz. Den pH-Wert des in dieser Arbeit verwendeten Kallikrein-Puffers den *in vivo* vorherrschenden pH-Verhältnissen anzupassen, führt somit nicht zwingend zu einer gesteigerten Aktivität von KLK5. Untermauert wird die These von Datenbankanalysen (Brenda Enzyme Database, <https://www.brenda-enzymes.org>, abgegrufen am 12.03.2017), welche die pH-Optima von Kallikreinen zwischen 7,1 und 8,5 aufzeigt. Es wird zudem gezeigt, dass ein pH-Wert  $\leq 5,4$  die enzymatische Aktivität von KLK hemmt. Desweiteren hat die Ionenstärke im jeweiligen Milieu einen Einfluss auf die Aktivität und Stabilität von Proteinasen. Eine dahin gehende Untersuchung bedarf jedoch statistischer Methoden, wofür zur Datenerhebung hohe Mengen an Protein bzw. Proteinase und Substrat benötigt werden [TALLEY & ALEXOV, 2010].

In Western-Blot-Untersuchungen mit bioptischen Geweben aus humaner Dermis und Epidermis konnten mit CCL14-spezifischen Antikörpern Banden bei zwei der Proben sichtbar gemacht werden. Die untersuchten Proben wurden aus entzündlichem bzw. Wundgewebe extrahiert. Das Ergebnis korreliert mit den o.g. erwähnten Datenbankanalysen, wonach CCL14 in Hautgewebe verstärkt exprimiert wird. Mit KLK5-spezifischen Antikörpern konnten ebenfalls Banden nachgewiesen werden. Auch hier bestätigen sich die Datenbankanalysen. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide untersuchten Kandidaten auf Proteinebene nachweisbar sind. In der Haut ist die Genexpression der KLK5 und KLK8 sowie CCL14 bei Patienten mit atopischer Dermatitis bzw. pruritischer Psoriasis hochreguliert [NATTKEMPER *et al.*, 2018]. Eine gleichzeitige Expression der Gene für die KLK und CCL14 in einem der beiden

Krankheitsbilder wurde nicht gezeigt. Eine Interaktion der KLK und des CCL14 ist jedoch aufgrund der Lokalität der pathologischen Vorgänge wahrscheinlich (siehe Vgl. Punkt 5.5.7.).

KLK8 aktivierte im definierten Zeitraum im Vergleich zu KLK5 weniger CCL14. Es ist beteiligt an der Entwicklung und Plastizität des Gehirns sowie der Pathogenese von Alzheimer [LITTLE *et al.*, 1997; YOUSEF *et al.*, 2003]. Es dient potentiell als Indikator für Krebs, bspw. Dickdarm-, Eierstock- und Lungenkrebs [KOUNTOURAKIS *et al.*, 2009; PLANQUE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017].

EISSA und Mitarbeiter (2011) konnten für rekombinantes KLK8 zeigen, dass es in der Zymographie Gelatine hydrolysiert und außerdem das chromogene Substrat VPR-AMC bei einem pH-Optimum von pH 8,5 aktiviert. Eine Möglichkeit ist, dass Gelatine besser durch KLK8 degradiert werden kann, als das in dieser Arbeit untersuchte Casein. KLK8 und Gelatinasen werden im Gehirn exprimiert [FRANKOWSKI *et al.*, 2012]. Im Gegensatz zu Casein ist Gelatine möglicherweise auch ein natürliches Substrat für KLK8. Es kann in Betracht gezogen werden, dass durch einen Umpufferungsschritt zu einem höheren pH-Wert (8,5) das in der Arbeitsgruppe von EISSA generierte KLK8 einen geringeren Aktivitätsverlust hatte als das in der vorliegenden Arbeit. Es wurde dort auch gezeigt, dass sich KLK8 bei pH 7,4 autolytiert und dieser Effekt bei Absenkung bzw. Erhöhung des pH-Wertes supprimiert wurde. Ein Phosphat-gepuffertes System andererseits bewirkte jedoch bei pH 7,4 eine um Faktor 2,5 höhere Aktivität des KLK8, als Tris-Puffer bei identischem pH-Wert. Ein Phosphat-basierter Puffer könnte somit möglicherweise auch eine erhöhte CCL14-Aktivierung durch KLK8 bewirken. Das *in vitro* pH-Optimum des KLK8 von pH 8,5 beim Substratabbau ist wesentlich höher als der physiologische pH-Wert (~7,2 - 7,4) und der in der Haut vorherrschende pH-Wert (4,5 - 6,9) [OHMAN & VAHLQUIST, 1994].

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Kallikrein-verwandte Peptidasen ein Chemokin aktivieren können. Für andere Proteinasen wurden bereits eine Chemokin- und Zytokin-modifizierende Wirkungen nachgewiesen, die zur Aktivierung bzw. Inaktivierung führen. Sie erzeugen dabei durch proteolytische Spaltung stabile oder instabile Spaltprodukte. Beispielsweise inaktiviert Matrixmetalloprotease-9 das Chemokin CCL7 durch Hydrolyse [MCQUIBBAN *et al.*, 2000] und DPP4 aktiviert IL-3 [BROXMEYER *et al.*, 2012]. SCHULTZ und Mitarbeiter (2013) zeigten, dass das an dem Chemokin-Like Rezeptor CMKLR1 bindende Chemerin durch KLK7 über Abspaltung von C-terminal 6 Aminosäuren nach Phenylalanin aus pro-Chemerin erzeugt wird. KLK7 spaltet mit der höchsten Spezifität nach Phenylalanin sowie Arginin, aktivierte jedoch CCL14<sub>[1-74]</sub> in den durchgeführten Analysen nicht. Auch KLK11 und KLK14 aktivierten CCL14 nicht, trotz Arginin in P1-Position (Datenbankanalyse MEROPS, RAWLINGS & BARRETT, 2000). KLK können nur an den Struktur-abhängig für sie zugänglichen Regionen des Substrats enzymatisch spalten. Da KLK5 das CCL14 aktiviert hat, kann davon ausgegangen werden, dass die Substratbindungsstelle auch für die anderen untersuchten

KLK zugänglich war. Ein möglicher Grund warum diese CCL14 nicht aktivierten, kann der Verlust der enzymatischen Aktivität der KLK durch die Aufreinigungsschritte sein. Es gibt jedoch auch Indikatoren, dass die KLK 4, 5, 6 und 7 mit einer höheren Spezifität am C-Terminus von Proteinen nach einem Arginin spalten [DEBELA *et al.*, 2008]. Eine Phosphatgepufferte Reaktionsmatrix könnte hinsichtlich einer gesteigerten Effektivität der Proteolyse getestet werden, da das physiologische Milieu somit realistischer abgebildet wird (siehe Vgl. EISSA *et al.*, 2011). Die für die CCL14-Aktivierung mit KLK benötigte Dauer von zwei bis drei Stunden erscheint für einen physiologischen Prozess zu lang.

Im vaskulären Endothelium, im Epithelium vom Endometrium und in dezidualisierten Stromazellen wurde eine verstärkte Expression von CCL14 nachgewiesen [JONES *et al.*, 2004]. Die Genexpression der KLK 5, 7, 8 und 10 sowie die des CCL14-aktivierenden Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (uPA) und dessen Rezeptor uPAR ist in den Zellen von oralem Plattenepithelzellkarzinom (OSCC) heraufreguliert [PETTUS *et al.*, 2009]. Der Einfluss auf die Pathologie konnte nicht geklärt werden. Gewebetypen, in denen gleichzeitig sowohl KLK, als auch CCL14 exprimiert werden, sind verschiedene Epithelien und Endothelien. So aktiviert KLK5 bei mikrobiell bedingter Entzündung antimikrobiell wirkende Cathelicidin-Peptide [YAMASAKI *et al.*, 2006]. KLK5 kann bei der Ausbreitung von Metastasen von Plattenepithelkarzinomen über die Desmoglein-1-Aktivierung beteiligt sein. Die Zell-Zell-Kohäsion wird stark vermindert und Tumorzellen können migrieren [JIANG *et al.*, 2011]. CCL14 ist bei Endometriose und bei Eierstockkarzinomen verstärkt heraufreguliert. Genau wie KLK5 und KLK8 wird es dort als Krebsmarker analysiert [LOESSNER *et al.*, 2018]. Eine Interaktion beider Proteine in diesem Zusammenhang wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

CCL14 kann neben den bekannten CCR-Rezeptoren auch an den Duffy-Rezeptor DARC binden [ZLOTNIK & YOSHIE, 2012]. Dieser Rezeptor fungiert als ein transendothelialer Transporter von Chemokinen und hat Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung in das Endothel von Blutgefäßen. Desweiteren hat dieser Rezeptor eine regulierende Wirkung auf die Wanderung von Chemokinen vom Gewebe in das Blut [PRUENSTER *et al.*, 2009]. Die Bindung von CCL14-Varianten an DARC-exprimierende Zellen (bspw. MDCK-DARC) könnte *in vitro* untersucht werden, um einen weiteren möglichen Effekt der CCL14-Modifikation zu ermitteln.

## **5.2. Induktion von Chemotaxis durch KLK-aktiviertes CCL14**

Die Untersuchungen zur biologischen Aktivität des rekombinanten, KLK5- bzw. KLK8-aktivierten CCL14 erfolgte mittels Zellmigrationsassays. In den Voruntersuchungen wurden Osteosarkomzellen HOS CD4+CCR5+ eingesetzt, welche den CCL14-spezifischen Rezeptor CCR5 überexprimieren. Hier zeigte sich, dass bedingt durch eine steigende CCL14<sub>[9-74]</sub>-Konzentration der chemotaktische Index anstieg (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von den

KLK auf die Wanderung der Zellen durch die Transwells konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, weshalb für die folgenden Untersuchungen THP-1-Zellen verwendet wurden.

KLK-aktiviertes CCL14<sub>[9-74]</sub> induzierte bei den monozytären THP-1-Zellen Chemotaxis. Während sich durch die Erhöhung der Konzentration von KLK5 aktiviertem CCL14 von 10 auf 100 ng/mL der Migrationsindex der Zellen verdreifachte, steigerte er sich durch diese entsprechende Konzentrationserhöhung (10 auf 100 ng/mL) von KLK8-aktiviertem CCL14 um den Faktor zwei. Da das Chemokin jeweils mit der gleichen Menge an KLK aktiviert wurde, kann ein Einfluss einer veränderten KLK-Konzentration in den untersuchten Proben ausgeschlossen werden. KLK ohne Chemokin bewirkte ebenfalls keine Chemotaxis der Zellen. Da wie in Punkt 6.1 beschrieben KLK5 CCL14 effektiver in die aktive Form konvertierte als KLK8, war die Anzahl gewanderter Zellen aufgrund der höheren CCL14<sub>[9-74]</sub>-Konzentration höher. Bei den mit KLK-aktiviertem CCL14 exponierten Zellen zeigte sich jeweils eine für die Dosis-Wirkungs-Beziehung typische Glockenkurve.

Da KLK die Angiogenese in Tumoren durch die Aktivierung von uPA über eine proteolytische Kaskade fördern [BORGONO & DIAMANDIS, 2004], stellen sie potentielle Drug-Targets bei der Behandlung von Krebs dar. Die gesteigerte Expression von CCL14 und KLK5 bei Patienten mit Brustkrebs gibt Hinweise auf einen möglichen Ansatzpunkt [MANES *et al.*, 2003]. Als Beispiel konnte hier durch die Bindung der JmjC-Demethylase JARID1B an den LSD1/NuRD-Bindungskomplex die Hemmung von CCL14 erzielt werden, was zu einer Verringerung der Angiogenese und Metastasierung von Brustkrebszellen *in vivo* führte [LI *et al.*, 2011]. LI und Mitarbeiter (2014) zeigten, dass CCL14 und CCL3 die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in Zellen vom Multiplen Myelom fördern. Es wird vermutet, dass die Inhibition dieser beiden Chemokine eine Reduktion Myelom-assoziiertes Makrophagen zur Folge hat, woraus eine erhöhte Anfälligkeit der Krebszellen gegenüber Chemotherapie resultieren kann.

### 5.3. Enzymatische Pyroglutamatbildung

Das ubiquitäre Vorkommen von Pyroglutamat in lebenden Zellen von Archaeobakterien bis hin zum Menschen ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt, aber dessen Rolle in den Organismen ist bis dato nur unzureichend aufgeklärt [KUMAR & BACHHAWAT, 2012]. Pyroglutamat am N-Terminus von bioaktiven Peptiden, Hormonen und Chemokinen steht im Kontext mit deren Protektion vor Abbau durch Exopeptidasen und trägt zur korrekten Proteinkonformation bei, was essentiell für die Rezeptorbindung ist [ABRAHAM & PODELL, 1981; VAN COILLIE, *et al.*, 1998]. Spezifisch ist dieser Effekt für Chemokine wie CCL2 und CX3CL1 gezeigt worden [CYNIS *et al.*, 2013; KEHLEN *et al.*, 2017]. Diese posttranslationale Modifikation ist entscheidend für die biologische Aktivität. Zudem wurde am Beispiel von dimersiertem CCL8 gezeigt, dass dieses Chemokin mit N-terminalem Pyroglutamat in der Lage ist, eine stabilere Konformation

seines Rezeptor-bindenden Arealis aufrecht zu erhalten, als CCL8 mit N-terminalem Glutamin [CHEN *et al.*, 2012]. Desweiteren hat die Umwandlung von Pyroglutamat zurück zu Glutamin eine Minderung der pro-inflammatorischen Eigenschaften von CCL8 zur Folge [VAN COILLIE *et al.*, 1998]. Die N-terminale Pyroglutamatbildung spielt bei Chemokinen möglicherweise auch eine Rolle bei der Regulierung der Makrophagenaktivierung und -migration [CHEN *et al.*, 2012].

Glutaminylyklyasen katalysieren die Bildung von Pyroglutamat am N-Terminus von Peptiden und Proteinen. Der genaue molekulare Mechanismus des Vorgangs ist bis dato nur unzureichend aufgeklärt. Während es Studien gibt, welche die QC-katalysierte pGlu-Bildung am N-Terminus von gefalteten Proteinen *in vitro* aufzeigen [SCHILLING *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2012], deuten andere Ergebnisse darauf hin, dass die Reaktion *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits co-translational stattfindet, bevor ein vollständig strukturiertes Protein vorliegt [WELKER *et al.*, 2007].

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte eine QC-katalysierte N-terminale Pyroglutamatbildung bei CCL25 und CXCL4 gezeigt werden. Bei den weiteren untersuchten Chemokinen CCL7, CCL8, CCL13, CCL15 und CCL16 konnte das nicht realisiert werden. Zur rekombinanten Produktion der Chemokine wurde ein Hefeexpressionssystem gewählt. Hiermit kann im Gegensatz zu bakteriellen Expressionssystemen, wie bspw. mit *E. coli* eine korrekte Disulfidverbrückung und für Eukaryonten spezifische Glykolisierung erzeugt werden. Das Glykolisierungsmuster unterscheidet sich zwar von dem der Säugerzellen, kann jedoch trotzdem zur chemotaktischen Potenz beitragen [ECKART *et al.* 1996]. Diese beiden Eigenschaften sind, neben dem korrekten N-Terminus des Proteins, von Relevanz für die Induktion der Chemotaxis [SHIH *et al.*, 2014] und sprechen daher für die heterologe Expression mit Hefen. Es wird vermutet, dass eine Bildung von Disulfidbrücken und die Glykolisierung von rekombinanten Proteinen deren Stabilität erhöht bspw. bei wechselnden Pufferbedingungen oder Temperaturen [OHEDA *et al.*, 1990].

Wie in Abb. 20 zu sehen, verringerte sich die molekulare Masse von CCL25 nach Inkubation mit QC um 17 Da. Die Differenz der ermittelten Molekülmassen entspricht der theoretischen Masse von  $\text{NH}_3$ , welches bei der enzymatischen Umwandlung von Glutamin zu Pyroglutamat frei wird (siehe Punkt 1.2.3). Die MALDI-TOF-Analyse zeigt, dass das in der Probe befindliche CCL25 vollständig durch QC in die N-terminal glutaminylyklysierte Variante umgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte das MALDI-TOF-Spektrum, dass CXCL4 nach Inkubation mit QC nur zum Teil N-terminal modifiziert wurde. Die mit QC inkubierte Probe ergab neben dem Hauptpeak einen weiteren, weniger intensiven Peak, der eine um 18 Da reduzierte Masse aufzeigte. Die Differenz der Massen entspricht der eines Moleküls Wasser, welches bei der QC-katalysierten Umwandlung von Glutaminsäure zu Pyroglutamat frei wird. Die QC bewirkte hier im Gegensatz zur Reaktion mit CCL25 eine geringere Pyroglutamatbildung am N-Terminus des Proteins. Ein wesentlicher Grund dafür ist die

chemische Stabilität der N-terminal führenden Aminosäuren der Chemokine CCL25 und CXCL4. Während Glutamin, welches die N-terminal erste Aminosäure von CCL25 ist, chemisch instabil ist, gehört die bei CXCL4 N-terminale Glutaminsäure zu den chemisch stabilen Aminosäuren [LI *et al.*, 1995]. Da die Pyroglutamatbildung aus Glutaminsäure mehr Zeit beansprucht als aus Glutamin, kann angenommen werden, dass eine längere Inkubationszeit von CXCL4 mit QC zu einem höheren Anteil von pGlu-CXCL4 geführt hätte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tris-Puffersystem gewählt, um den Einfluss von Phosphat-Ionen auf die Pyroglutamatbildung auszuschließen. Diese haben mit hoher Wahrscheinlichkeit eine katalysierende Wirkung bei der Bildung von Pyroglutamat bzw. können diese auch spontan in Abwesenheit von QC induzieren [KHANDKE *et al.*, 1989; SEIFERT *et al.*, 2015]. SCHILLING und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass das pH-Optimum von Papaya-QC für die Pyroglutamatbildung aus Glutamin bei pH 8,0 und für Glutaminsäure bei pH 6,0 liegt. Beide QCs binden ihr Substrat wahrscheinlich im N-terminal unprotonierten Zustand [SCHILLING *et al.*, 2003]. Humane QC hat ihr pH-Optimum bei pH 8,0 bei der Pyroglutamatbildung aus Glutamin [FISCHER & SPIESS, 1987]. Glutamin kann unter mild sauren pH-Bedingungen spontan, ohne katalysierende Wirkung von QC zyklisieren [SEIFERT *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010]. In dieser Arbeit wurden pH-Bedingungen gewählt, die nah am physiologischen pH-Wert sind.

N-terminales Pyroglutamat bei CCL25 führt zur verbesserten Rezeptorbindung an CCR9 und ist über diese Interaktion in das Voranschreiten von Leukämie involviert [MIETHING *et al.*, 2014]. Eine weitere wichtige Rolle von CCL25 ist es, die Wanderung von Effektor- und Memory-T-Zellen zu ermöglichen und somit Einfluss auf das Homing, die Entwicklung und die Homöostase von T-Zellen zu nehmen [PAPADAKIS *et al.*, 2003]. CCL25 wird im Dünndarm von Patienten mit Morbus Crohn gesteigert exprimiert. Der CCL25-CCR9-Signalweg wird daher als Angriffspunkt für die Regulierung der Immunantwort im Dünndarm in Betracht gezogen [SVENSSON & AGACE, 2006]. Ähnlichkeiten existieren bei dieser Chemokin-Rezeptor-Interaktion in der Schleimhaut des Dickdarms. Dort wurde im Mausmodell ein Einfluss auf die entzündliche Immunantwort durch die Regulierung verschiedener Untergruppen dendritischer Zellen gezeigt [WURBEL *et al.*, 2011]. CCR9-Inhibitoren könnten bei der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen einen Ansatzpunkt bieten [TRIVEDI *et al.*, 2016b]. In klinischen Studien konnten mit dem CCR9-Antagonisten CCX282-B jedoch noch keine durchgehend konsistenten Ergebnisse hinsichtlich der Remission erzielt werden [WENDT & KESHAV, 2015]. CCR9-exprimierende Leukozyten werden in entzündlichem Darmgewebe vermehrt chemotaktisch angezogen und verstärken dort die Inflammation, wie bspw. bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Speziell mit Biopsieproben von Patienten mit Morbus Crohn wurde gezeigt, dass die CCL25-Konzentrationen bis zu 250-fach höher waren, als bei gesunden

Probanden [BEKKER *et al.*, 2015]. Der Einfluss des N-Terminus, speziell der eines N-terminalen Pyroglutamats auf die Rezeptorbindung dieser Signalwege ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Verglichen mit anderen Chemokinen mit N-terminalem Pyroglutamat, führt die Modifikation bei CCL25 mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls zu einer erhöhten Stabilität und Schutz vor Abbau durch Peptidasen sowie verbesserter Rezeptoraffinität (Vgl. CHEN *et al.*, 2012).

Vergleichbar sind diese Auswirkungen bei CXCL4. Es ist das erste Chemokin, welchem mehrere verschiedene Wirkmechanismen zugeordnet werden konnten. Von Bedeutung ist es bei der Hemmung der Angiogenese, da CXCL4 die Proliferation und Migration von Endothelzellen supprimiert [WANG & HUANG, 2013]. CXCL4 schützt Monozyten vor Apoptose und fördert deren Differenzierung zu HLA-DR Makrophagen [AIDOUDI & BIKFALVI, 2010]. Außerdem induziert thrombozytäres CXCL4 die Bildung von M4-Makrophagen aus Monozyten. ERBEL und Mitarbeiter (2015) zeigten, dass CXCL4-induzierte M4-Makrophagen Einfluss auf die Stabilität von atherosklerotischen koronarerteriellen Plaques bei Schlaganfall- und Infarktpatienten haben. CXCL4 stellt dahingehend einen Marker für die inflammatorische Aktivität in Blutgefäßen dar. Es ist zudem ein potentieller Indikator für das Frühstadium von Tumorwachstum [CERVI *et al.*, 2008] und ein mögliches Target bei der Hemmung des Wachstums von Tumoren, der Heilung chronischer Entzündungen [VANDERCAPPELLEN *et al.*, 2011] sowie ein angiostatischer Wirkstoff in der Krebstherapie [WANG & HUANG, 2013]. Die diesbezüglich für Signalweiterleitung relevanten Rezeptoren sind CXCR3 und CXCR3B [VAN RAEMDONCK *et al.*, 2014]. Für die Interaktion mit anderen Proteinen und Rezeptoren von Relevanz sind zwei Bereiche von CXCL4: Die hydrophobe Region des C-Terminus und die Cysteinseitenkette des N-Terminus interagieren mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 [AIDOUDI & BIKFALVI, 2010]. Die Rolle bei der Induktion von Chemotaxis und der Rezeptoraffinität sind für den N-Terminus bzw. N-terminales Pyroglutamat auch bei CXCL4 noch nicht geklärt. Es kann angenommen werden, dass auch bei diesem Chemokin ein N-terminales Pyroglutamat das Protein vor Degradation schützt und es somit *in vivo* eine höhere Halbwertszeit aufweist. Zudem könnte es zu einer gesteigerten Rezeptoraffinität führen, wie dies bspw. für CCL8 gezeigt wurde [CHEN *et al.*, 2012].

Die weiteren untersuchten Chemokine zeigten unter den gewählten Bedingungen keine verstärkte pGlu-Bildung bzw. konnten von den exprimierten und aufgereinigten CCLs lediglich Molekülmassen detektiert werden, welche nicht mit den theoretischen molekularen Massen korrelierten. Es handelte sich bei diesen Proteinen wahrscheinlich um nicht natürlicherweise vorkommende Varianten des jeweiligen Chemokins. Bei CCL7 konnte die theoretische Molekülmasse von 8952,5 Da nicht nachgewiesen werden, obwohl im Western-Blot mit CCL7-spezifischen Antikörpern Banden in diesem Molekülmassenbereich sichtbar gemacht wurden. Schon in der Negativkontrolle, ohne Zugabe von QC, wurde massenspektrometrisch eine

Molekülmasse ermittelt, welche um 15,5 Dalton geringer als die zu erwartende war. Wie in Pkt. 3.5.4 beschrieben könnte während der Abspaltung des SUMO-Proteins mit 6xHis-Tag oder während der Umpufferung in Vorbereitung für die Lyophilisation eine spontane Pyroglutamatbildung am N-Terminus stattgefunden haben. Diese Effekte traten bei SHIH und Mitarbeitern (2005) mit eu- und prokaryotischen Expressionssystemen ebenfalls auf.

Bei CCL15 konnte die entsprechende molekulare Masse von 10,17 kDa nicht identifiziert werden. Die bestimmte Masse von 8871,0 Da entspricht der C-terminal 10 Aminosäuren verkürzten Peptidvariante von CCL15. Es besteht die Möglichkeit, dass am C-Terminus das Fragment CMKKLKPYSI abgespalten wurde. Grund hierfür könnten Hefe-eigene Endopeptidasen sein. Diese Peptidasen könnten auch bei den Chromatographieschritten nicht vollständig entfernt worden sein und das aufgereinigte Protein während der Zyklisierungsversuche mit QC hydrolysiert haben. Zum anderen ist nicht ausgeschlossen, dass die SUMO-Protease, welche zur Entfernung des Leaderproteins mit 6xHis-Tag eingesetzt wurde, das o.g. Fragment auch nicht selektiv abspaltete.

*In vivo* konnten verschiedene N- und C-terminal verkürzte Formen von CCL15 nachgewiesen werden, welche je nach posttranslationaler Modifikation stärker oder schwächer chemotaktisch wirken [PARDIGOL *et al.*, 2005]. In der mit QC inkubierten CCL15-Probe konnte mit 8866,0 Da eine Masse identifiziert werden, welche um 15 Da geringer ist, als die in der Negativkontrolle ermittelte. Bei der Pyroglutamatbildung aus Glutamin am N-Terminus durch hydrolytische Desaminierung ist eine Reduktion der Molekülmasse um 17 Da zu erwarten. Die in den Analysen bestimmte Massendifferenz von 15 Da entspricht der Masse von Stickstoff. Messfehler im MALDI-TOF um 1 bis 1,5 Dalton sind bei diesen Untersuchungen möglich. Da hier jedoch die Massenabweichung  $\geq 2$  Da ist, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf Messungenauigkeiten zurück geschlossen werden. Aufgrund der leicht sauren pH-Bedingungen bei der Umpufferung zur Vorbereitung auf die Lyophilisation, ist auch eine Dissoziation der H<sup>+</sup>-Protonen von der Aminogruppe vor der QC-Reaktion unwahrscheinlich.

Das rekombinante CCL16 aus verschiedenen Expressionsklonen lieferte in den massenspektrometrischen Analysen Werte, welche mit 13.291,0 Da erheblich höher waren, als die theoretische zu erwartende molekulare Masse von 11.198,0 Da. Wie bei CCL15 wichen die ermittelten molekularen Massen somit deutlich von denen im Western-Blot ermittelten ab. Vor der Transformation der Hefe wurde eine DNA-Sequenzanalyse des Plasmids durchgeführt. Damit konnte ein veränderter Reading-Frame und ein falsch gesetztes Stop-Codon im Expressionsvektor ausgeschlossen werden. Die höhere Molekülmasse des aufgereinigten Chemokins ist nicht auf ein fehlerhaftes Expressionssystem zurückzuführen. Ein möglicher Grund könnte ein nicht selektives Schneiden der SUMO-Protease sein, welches nicht das komplette Leader-Protein entfernte. Somit hätte das Chemokin mit zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren vorgelegen.



Die rekombinante Herstellung von Chemokinen mit nicht modifiziertem N-terminalem Glutamin oder Glutaminsäure ist komplex, siehe: BLASZCZYK *et al.* (2000), CHEN *et al.* (2012) und SHIH *et al.* (2014). Die Proteine in den einzelnen Phasen der Aufreinigung waren für Zeiträume von bis zu 2 Stunden höheren Temperaturen, Drücken und organischen Lösungsmitteln ausgesetzt. Die Lyophilisierung und die Lagerungsbedingungen sollten die Haltbarkeit und Stabilität der rekombinanten Proteine gewährleisten. Degradationsprozesse während Frier-/Taufvorgängen und den Versuchen können nicht ausgeschlossen werden. So sind bspw. Chemokine anfällig gegenüber wechselnden Temperaturen bei der Lagerung [PANICKER *et al.*, 2007]. In ungekühlten Plasmaproben konnte eine drastische Abnahme intakter aktiver Chemokine festgestellt werden [THAVASU *et al.*, 1992].

#### **5.4. Nachweis von Chemokinvarianten in entzündetem und nekrotischem Gewebe**

Zur Untersuchung der Präsenz von Chemokinen in inflammatorischem oder nekrotischem humanem Gewebe wurden Western-Blot-Untersuchungen mit Proteinisolaten durchgeführt. In diesen Analysen konnten in Proben unterschiedlicher Patienten Banden nachgewiesen werden. In Probe 10, die aus Gewebe aus einer Verbrennung zweiten Grades der Dermis und Epidermis gewonnen wurde, konnten für CCL7 Banden im Bereich der Monomergröße und im höhermolekularen Gewichtsbereich, welche dem doppelten Gewicht von CCL7 entsprach sichtbar gemacht werden. CCL7 spielt eine wichtige Rolle während der inflammatorischen Phase der Wundheilung der Haut. Zusammen mit CCL2 und IL-6 wird es in diesem Wundheilungsvorgang von dermalen Fibroblasten verstärkt exprimiert [PLOEGER *et al.*, 2013], womit die Präsenz in der Probe begründet sein kann. Anders als die in ihrer Aminosäuresequenz zu CCL7 sehr ähnlichen Chemokine CCL2, CCL8 und CCL13, bindet CCL7 jedoch vorwiegend als Monomer an den Rezeptor CCR2 [SALANGA *et al.*, 2014]. Das detektierte CCL7 hat somit als aktive Monomervariante und möglicherweise auch als inaktive, dimerisierte Form (Banden nicht gezeigt) im Gewebe vorgelegen.

CCL13, ebenfalls Ligand des Rezeptors CCR2 (auch CCR1 und CCR3), konnte in sechs der zehn Proben nachgewiesen werden. Wie CCL7 ist es in die entzündliche Phase der Wundheilung in der menschlichen Haut involviert und wird von Fibroblasten exprimiert. Hier ist es von zentraler Bedeutung bei der Rekrutierung von dendritischen Zellen in entzündetes Gewebe und deren Aktivierung. Im Vergleich zu CCL7 wird CCL13 verstärkt in chronisch entzündlichem Gewebe exprimiert, insbesondere im Epithel [MENDEZ-ENRIQUEZ & GARCIA-ZEPEDA, 2013]. Aus diesem Grund wird es als medizinisches Target bei der Behandlung chronisch entzündlicher Krankheiten betrachtet. Die für diese Untersuchungen verwendeten Proben wurden Patienten wegen nicht abklingender Inflammationen im Wundbereich operativ

entfernt. In diese chronischen Entzündungsprozesse kann das nachgewiesene, pro-inflammatorische CCL13 involviert gewesen sein.

Im Gewebe von Wundrändern der Haut konnte CCL14 nachgewiesen werden. Das Ergebnis bestätigt die erwähnten Datenbankanalysen, wonach CCL14 in entzündlichem Hautgewebe verstärkt exprimiert wird (siehe Punkt 5.2). KROEZE und Mitarbeiter (2012) zeigten, dass 24 h nach Verletzung der Haut u.a. die Konzentration von CCL14 im Gewebe anstieg. Bei der Hautneubildung fand die Rezeptorbindung von CCL14 bei der von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung ausschließlich mit dem Rezeptor CCR1 statt. CCL14 ist am Prozess der Neubildung von Haut nach Verletzungen beteiligt. Im Gegensatz zu CCL24, CXCL1, CXCL8 und CXCL12 förderten CCL14 sowie CCL20, CCL22, CCL27 und CXCL10 jedoch nicht die Proliferation von Keratinozyten. Bei Lungenkrebs werden Makrophagen, welche den Rezeptor CCR1 überexprimieren, durch CCL14 in das Tumorgewebe chemotaktisch angelockt [LI *et al.*, 2016]. In Papillomen der Atemwege ist CCL14 stark herunterreguliert, was die Infiltrierung durch TH1-Zellen und Makrophagenaktivierung hemmt [DEVOTI *et al.*, 2008].

In den Patientenproben, in denen CCL14 nachgewiesen werden konnte, wurden im Western-Blot mit KLK5-spezifischen Antikörpern auch sehr schwache Banden für KLK5 sichtbar gemacht. Es wurde nachgewiesen, dass die Genexpression von KLK5 und KLK8 in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis herauf reguliert ist - im Hautgewebe von pruritischer Psoriasis hingegen die Genexpression von CCL14 [NATTKEMPER *et al.*, 2018]. Die potentielle Interaktion der KLK und CCL14 in diesen oder anderen pathologischen Vorgängen in der Haut ist nicht geklärt.

Die Chemokine CCL15 und CCL16 wurden nicht nachgewiesen. Die Gründe dafür liegen möglicherweise darin, dass diese beiden Chemokine vorwiegend in Leber, Lunge, Dick-/Dünndarm bzw. Leber, Thymus und Milz exprimiert werden und somit die untersuchten Gewebearten mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht betreffen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Kallkrein-verwandten Peptidasen 5 und 8 Aktivatoren des Chemokins CCL14 sind. Die biologische Aktivität des KLK-aktivierten CCL14 konnte mittels Zellmigrationsassays nachgewiesen werden. Es induzierte eine signifikante Chemotaxis bei monozytären THP-1-Zellen. In Kooperation mit der UK Halle wird zukünftig mittels CCR1- und CCR5-exprimierender HOS-Zellen die intrazelluläre Kalziumausschüttung und die Induktion der Chemotaxis untersucht. Es muss jedoch ermittelt werden, ob andere pH-Bedingungen oder erhöhte KLK-Konzentrationen während der proteolytischen Aktivierung von CCL14 Einfluss auf die Effektivität der Reaktion bzw. die KLK-Aktivität haben. Der negative Einfluss der Aufreinigungsschritte auf die Enzymaktivität der KLK muss verringert und eine schonendere Alternative zur RP-Chromatographie in Betracht gezogen werden. Die Methodik muss hohe Ausbeuten und eine schonende Reduktion des Eluatvolumens ermöglichen. Eine Möglichkeit stellt die Ultrafiltration dar, mit welcher sich das Volumen reduzieren lässt, jedoch Aggregation des Zielproteins zur Folge haben kann.

KLK14 hat die höchste Spezifität nach einem Arginin zu spalten (P1-Position; Datenbankanalyse MEROPS, RAWLINGS & BARRETT, 2000). Daher stellt KLK14 weiterhin einen potentiellen Kandidaten zur Aktivierung von CCL14 dar. Die mögliche CCL14-Aktivierung könnte mit alternativ aufgereinigtem oder von einem Anbieter bezogenen KLK14 untersucht werden.

Mittels Western-Blot-Analysen konnten CCL14 und KLK5 in den gleichen entzündeten Gewebsschichten der Haut eines Patienten nachgewiesen werden. Die gesteigerte Genexpression von KLK5 und CCL14 bei pathologischen Vorgängen in der Haut ist bekannt. Die mögliche Interaktion ist jedoch noch nicht nachgewiesen. Eine Verifizierung des simultanen Vorliegens beider Proteine im Gewebe und der Nachweis der dortigen Aktivierung des Chemokins durch KLK5 sind zukünftig von Interesse.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass bei CCL25 und zum Teil CXCL4 eine N-terminale Pyroglutamatbildung durch Glutaminylzyklase katalysiert wird. Hier kann durch eine Variation des pH-Wertes während der Reaktion sowie der Proteinkonzentrationen eine mögliche Erhöhung der Effizienz der enzymatischen Aktivität von QC untersucht werden. Da bis dato kein Einfluss des N-Terminus von CXCL4 und CCL25 auf deren chemotaktische Potenz und die Rezeptoraffinität bekannt ist, könnte mit Zelllinien, welche die entsprechenden Rezeptoren CXCR3/ CXCR3B bzw. CCR9 exprimieren ein Einfluss auf die Induktion der Chemotaxis bzw. die intrazelluläre Kalziumausschüttung bestimmt werden. Desweiteren kann durch Exponierung der beiden Chemokine gegenüber Exopeptidasen oder humanem Plasma überprüft werden, ob und inwieweit N-terminales Pyroglutamat zu einer erhöhten Proteinstabilität führt.

Die Suppression posttranslatiionaler Chemokinmodifikationen kann im Kontext chronisch entzündlicher Erkrankungen einen Ansatzpunkt zur Behandlung darstellen. Bislang steht die Blockierung von Chemokinrezeptoren im Fokus und nicht die Inhibierung enzymatischer Modifikationen von Chemokinen [siehe Punkt 1.1; PROUDFOOT *et al.*, 2010]. Auch die Inhibition von KLK durch verschiedene Medikationen wie bspw. Small Molecules oder Peptide stellt eine potentielle Möglichkeit bei der Behandlung von Krebs dar (siehe Punkt 5.2; LOESSNER *et al.*, 2018). Blockiert man einen Chemokinrezeptor wird auch die Bindung weiterer, erwünschter Liganden supprimiert. Das kann eine Vielzahl potentieller Nebenwirkungen nach sich ziehen, wie bspw. toxische epidermale Nekrolyse [VELA *et al.*, 2015]. Die bekannten QC-Inhibitoren PQ50 und PQ912 sowie die Kallikrein-inhibierenden LEKTI-Domänen beeinflussen hingegen nur die Modifikation der Chemokine und somit deren Stabilität, Aktivität und wahrscheinlich auch die Rezeptoraffinität. Inhibitoren von QC und KLK wirken spezifischer in den Signalweiterleitungswegen. Im Gegensatz zum Rezeptor-Blocking werden diese nicht ganzheitlich unterdrückt, sondern gezielt die unerwünschten Modifikationen inhibiert. Daher haben sie möglicherweise weniger unerwünschte Nebenwirkungen. Die Inhibition der Pyroglutamatbildung bei Chemokinen durch QC und der CCL14-aktivierenden KLK stellen potentiell neue therapeutische Strategien bei der Therapie von inflammatorischen Vorgängen oder chronischen Entzündungen dar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abraham GN, Podell DN (1981) Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Mol Cell Biochem* 38:181–190.
- Aidoudi S, Bikfalvi A (2010) Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 104(5):941-948.
- Airoidi I, Cocco C, Morandi F, Prigione I, Pistoia V (2008) CXCR5 may be involved in the attraction of human metastatic neuroblastoma cells to the bone marrow. *Cancer Immunol Immunother* 57(4):541–548.
- Amelot AA, Tagzirt M, Ducouret G, Kuen RL, Le Bonniec BF (2007) Platelet factor 4 (CXCL4) seals blood clots by altering the structure of fibrin. *J Biol Chem* 282(1):710-720.
- Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, Faries MB, Morton DL, Hoon DS (2008) Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin Cancer Res* 14:638–645.
- Anders HJ, Romagnani P, Mantovani A (2014) Pathomechanisms: homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. *Trends Mol Med* 20(3):154-165.
- Apostolaki M, Manoloukos M, Roulis M, Wurbel MA, Müller W, Papadakis KA *et al.* (2008) Role of beta7 integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 134:2025-2035.
- Asano K, Takahashi N, Ushiki M, Monya M, Aihara F, Kuboki E, Moriyama S, Iida M, Kitamura H, Qiu CH, Watanabe T, Tanaka M (2015) Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat Commun* 6:7802.
- Avgeris M, Papachristopoulou G, Polychronis A, Scorilas A (2011) Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clin Proteomics* 8(1):5.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.
- Baggiolini M, Loetscher P (2000) Chemokines in inflammation and immunity. *Immunology Today* 21(9): 418-420.
- Bekker P, Ebsworth K, Walters MJ, Berahovich RD, Ertl LS, Charvat TT, Punna S, Powers JP, Campbell JJ, Sullivan TJ, Jaen JC, Schall TJ (2015) Mediators of Inflammation Volume 2015 Article ID 628340.
- Bennett LD, Fox JM, Signoret N (2011) Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology* 134:246–256.
- Blain KY, Kwiatkowski W, Zhao Q, La Fleur D, Naik C, Chun TW, Tsareva T, Kanakaraj P, Laird MW, Shah R, George L, Sanyal I, Moore PA, Demeler B, Choe S (2007) Structural and functional characterization of CC chemokine CCL14. *Biochemistry* 46(35):10008-10015.
- Blaszczyk J, van Coillie E, Proost P, Damme JV, Opdenakker G, Bujacz GD, Wang JM, Ji X (2000) Complete crystal structure of monocyte chemotactic protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors. *Biochemistry* 39:14075-14081.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (1997) Repetitorium Pathologie. Verlag: München, Urban und Fischer.
- Borgono CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 11:876-90.
- Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP (2004) Human Tissue Kallikreins: Physiologic Roles and Applications in Cancer. *Mol Cancer Res* 2:257-280.

- Brattsand M, Egelrud T (1999) Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274(42):30033-30040.
- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S (2007) The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 97:714-721.
- Broxmeyer HE, Hoggatt J, O'Leary HA, Mantel C, Chitteti BR, Cooper S, Messina-Graham S, Hangoc G, Farag S, Rohrabough SL *et al.* (2012) Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis. *Nat Med* 18(12):1786-1796.
- Buchholz M, Heiser U, Schilling S, Niestroj AJ, Zunkel K, Demuth HU (2006) The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem* 49:664–677.
- Cappello P, Fraone T, Barberis L, *et al.* CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177(9):6143-6151.
- Carlsson S, Maschino A, Schröder F, Bangma C, Steyerberg EW, *et al.* (2013) Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: results from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer section Rotterdam. *Eur Urol* 64(5):693-9.
- 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(5):1235-44.
- Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A, Naumov GN *et al.* (2008) Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood* 111:1201–1207.
- Chelius D, Jing K, Lueras A, Rehder DS, Dillon TM, Vizek A, Rajan RS, Li T, Treuheit MJ, Bondarenko PV (2006) Formation of pyroglutamic acid from N-terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies. *Anal Chem* 78(7):2370-2376.
- Chen YL, Huang KF, Kuo WC, Lo YC, Lee YM, Wang AH (2012) Inhibition of glutaminyl cyclase attenuates cell migration modulated by monocyte chemoattractant proteins. *Biochem J* 442:403-412.
- Cho YB, Lee WY, Choi SJ, Kim J, Hong HK, Kim SH, Choi YL, Kim HC, Yun SH, Chun HK, Lee KU (2012) CC chemokine ligand 7 expression in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 28(2):689-694.
- Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y (2004) The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 265–312.
- Cynis H, Kehlen A, Haegele M, Hoffmann T, Heiser U, Fujii M, Shibasaki Y, Yoneyama H, Schilling S, Demuth HU (2013) Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Int J Exp Pathol* 94(3):217-225.
- Dal Secco V, Soldani C, Debrat C, Asperti-Boursin F, Donnadiou E *et al.* (2009) Tunable Chemokine Production by Antigen Presenting Dendritic Cells in Response to Changes in Regulatory T Cell Frequency in Mouse Reactive Lymph Nodes. *PLoS One* 4(11): e7696.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA *et al.* (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273(5283):1856-1862.
- Debela M, Magdolen V, Schechter N, Valachova M, Lottspeich F, Craik CS, Choe Y, Bode W, Goettig P (2006) Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences. *J Biol Chem* 281(35):25678-25688.

- Debela M, Beaufort N, Magdolen V, Schechter NM *et al.* (2008) Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biol Chem* 389(6):623-632.
- Debes GF, Diehl MC (2011) CCL8 and skin T cells - an allergic attraction. *Nat Immunol* 12(2):111-2.
- Detheux M, Ständker L, Vakili J, Münch J, Forssmann U, Adermann K *et al.* (2000) Natural proteolytic processing of hemofiltrate CC chemokine 1 generates a potent CC chemokine receptor (CCR)1 and CCR5 agonist with anti-HIV properties. *J Exp Med* 192(10):1501-1508.
- DeVoti JA, Rosenthal DW, Wu R, Abramson AL, Steinberg BM, Bonagura VR (2008) Immune dysregulation and tumor-associated gene changes in recurrent respiratory papillomatosis: a paired microarray analysis. *Mol Med* 14(9-10):608-617.
- Dorn J, Harbeck N, Kates R, Gkazepis A, Scorilas A, Soosaipillai A *et al.* (2011) Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol* 22(4):877-883.
- Eckart MR, Bussineau CM (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol* 7(5):525-530.
- Egelrud T, Brattsand M, Kreutzmann P, Walden M, Vitzithum K, Marx UC, Forssmann WG, Mägert HJ (2005) hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br J Dermatol* 153(6):1200-1203.
- Eissa A, Amodeo V, Smith CR, Diamandis EP (2011) Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade. *J Biol Chem* 286(1):687-706.
- Emami N, Diamandis EP (2007a) Human Kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. *Mol Onc* 1:269-287.
- Emami N, Diamandis EP (2007b) Human tissue kallikreins: a road under construction. *Clin Chim Acta* 381:78-84.
- Erbel C, Wolf A, Lasitschka F, Linden F, Domschke G, Akhavanpoor M, Doesch AO, Katus HA *et al.* (2015) Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol* 186:219-225.
- Fausnaugh JL, Kennedy LA, Regnier FE (1984) Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *J Chromatogr* 317:141-155.
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C (2007) Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 121:2381-2386.
- Fischer WH, Spiess J (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci* 84(11):3628-3632.
- Frankowski H, Gu YH, Heo JH, Milner R, Del Zoppo GJ (2012) Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol* 814:221-33.
- Fuhrman-Luck RA, Loessner D, Clements JA (2014) Kallikrein-Related Peptidases in Prostate Cancer: From Molecular Function to Clinical Application. *EJIFCC* 25(3):269-281.
- Garcia MC, Hogenboom AC, Zappey H, Irth H (2002) Effect of the mobile phase composition on the separation and detection of intact proteins by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 957(2):187-99.
- Gonda TA, Tu S, Wang TC (2009) Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle* 8:2005-2013.
- Grünberg M, Quandt D, Cynis H, Demuth HU, Kindermann A, Magdolen V, Forssmann WG, Seliger B, Mägert HJ (2018) Kallikrein-related peptidases are activators of the CC chemokine CCL14. *Eur J Immunol* 48(9):1592-1594.

- Hu JY, Li GC, Wang WM, Zhu JG, Li YF, Zhou GH and Sun QB (2002) Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis. *World J Gastroenterol* 8:1067–1072.
- Inamoto S, Itatani Y, Yamamoto T, Minamiguchi S, Hirai H, Iwamoto M *et al.* (2016) Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through the CCL15-CCR1 Chemokine Axis. *Clin Cancer Res* 22(2):492-501.
- Jiang R, Shi Z, Johnson JJ, Liu Y, Stack MS (2011) Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 286(11):9127-9135.
- Johnston B, EC Butcher (2002) Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 14:83-92.
- Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. (2004) Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 89(12):6155-6167.
- Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D, Kim J (2010) Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* 127(2):332-344.
- Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J (2016) Kallikreins - The melting pot of activity and function. *Biochimie* 122:270-282.
- Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A (2001) Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 61:5933–5940.
- Kasper B, Winoto-Morbach S, Mittelstädt J, Brandt E, Schütze S, Petersen F (2010) CXCL4-induced monocyte survival, cytokine expression, and oxygen radical formation is regulated by sphingosine kinase 1. *Eur J Immunol* 40:1162-1173.
- Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H (2003) Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metast Rev* 22:223–236.
- Kawaguchi M, Kataoka H (2014) Mechanisms of hepatocyte growth factor activation in cancer tissues. *Cancers (Basel)* 6(4):1890-1904.
- Kehlen A, Haegele M, Böhme L, Cynis H, Hoffmann T, Demuth HU (2017) N-terminal pyroglutamate formation in CX3CL1 is essential for its full biologic activity. *Biosci Rep* 37(4).
- Khandke KM, Fairwell T, Chait BT, Manjula BN (1989) Influence of ions on cyclization of the amino terminal glutamine residues of tryptic peptides of streptococcal PepM49 protein. Resolution of cyclized peptides by HPLC and characterization by mass spectrometry. *Int J Pept Protein Res* 34(2):118-123.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218(2):325-329.
- Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I (2007) Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci* (11):1652-1658.
- Kountourakis P, Psyrris A, Scorilas A, Markakis S, Kowalski D *et al.* (2009) Expression and prognostic significance of kallikrein-related peptidase 8 protein levels in advanced ovarian cancer by using automated quantitative analysis. *Thromb Haemost* 101(3):541-546.
- Kroeze KL, Boink MA, Sampat-Sardjoepersad SC, Waaijman T, Scheper RJ, Gibbs S (2012) Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *J Invest Dermatol* 132(1):216-225.
- Kumar A, Bachhawat AK (2012) Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Curr Sci* 102:288–297.



- Kuo CH, Collins AM, Boettner DR, Yang YF, Ono SJ (2017) Role of CCL7 in Type I Hypersensitivity Reactions in Murine Experimental Allergic Conjunctivitis. *J Immunol* 198(2): 645–656.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J (2004) Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 1(2):95-104.
- Li S, Schoeneich C, Borchardt RT (1995) Chemical in stability of proteins. *Pharm News* 2(5):12-16.
- Li X, Lin C, O'Connor PB (2010) Glutamine deamidation: Differentiation of Glutamic acid and  $\gamma$ -Glutamic acid in peptides by electron capture dissociation. *Anal Chem* 82(9): 3606–3615.
- Li Q, Shi L, Gui B, Yu W, Wang J, Zhang D, Han X, Yao Z, Shang Y (2011) Binding of the JmjC demethylase JARID1B to LSD1/NuRD suppresses angiogenesis and metastasis in breast cancer cells by repressing chemokine CCL14. *Cancer Res* 71(21):6899-6908.
- Li Y, Zheng Y, Yang L, Wang Q, Bi E, Li T, Lu Y, Qian J, Zhang M, Yang M, Yi Q, Cai Z (2014) Chemokines CCL14 and CCL3 Facilitate Monocytes/Macrophage Infiltration in Multiple Myeloma Bone Marrow. *Blood* 124:3380.
- Li B, Severson E, Pignon JC, Zhao H, Li T, Novak J, Jiang P, Shen H, Aster JC, Rodig S, Signoretti S, Liu JS, Liu XS (2016) Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol* 17(1):174.
- Li Y, Yu HP, Zhang P (2016) CCL15 overexpression predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 10(3):488-92.
- Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* 38(1): 44–48.
- Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, Dobbins JR, Wyrick T, Miller JR, MacKellar W, Hepburn D *et al.* (1997) Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 272(40):25135-25142.
- Liu YD, Goetze AM, Bass RB, Flynn GC (2011) N-terminal glutamate to pyroglutamate conversion in vivo for human IgG2 antibodies. *J Biol Chem* 286(13):11211-11217.
- Liu X, Quan B, Tian Z, Xi H, Jia G, Wang H, Zhang L, Liu R, Ma C, Han F, Li H, Yuan F (2017) Elevated expression of KLK8 predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 88:595-602.
- Loessner D, Goettig P, Preis S, Felber J, Bronger H, Clements JA, Dorn J, Magdolen V (2018) Kallikrein-related peptidases represent attractive therapeutic targets for ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets* 22(9):745-763.
- Mägert HJ, Ständker L, Kreutzmann P, Zucht HD, Reinecke M, Sommerhoff CP, Fritz H, Forssmann WG (1999) LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 274:21499-21502.
- Mägert HJ, Drögemüller K, Raghunath M (2005) Serine Proteinase Inhibitors in the Skin: Role in Homeostasis and Disease, *Curr Protein Pept Sci* 6:241-254.
- Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-Mouton C, Jimenez-Baranda S, Garzon A, Lacalle RA, Harshman K, Ruiz A, Martinez AC (2003). CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med* 198:1381-1389.
- Mantovani A, Allavena P, Vecchi A, Sozzani (1998) Regulation of chemokine receptor expression in dendritic cells. *Res Immunol* 149:639.
- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289(5482):1202-1206.

- Mendez-Enriquez E, García-Zepeda EA (2013) The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology* 21(6):397-406.
- Michael IP, Pampalakis G, Mikolajczyk SD, Malm J, Sotiropoulou G *et al.* (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(18):12743-12750.
- Miething C, Scuoppo C, Bosbach B, Appelman I, Nakitandwe J, Ma J, Wu G *et al.* (2014) PTEN action in leukemia dictated by the tissue microenvironment. *Nature* 510(7505): 402-406.
- Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P (2011) Effect of posttranslational processing on the in vitro and in vivo activity of chemokines. *Exp Cell Res* 317(5):642-654.
- Mortier A, Van Damme J, Proost P (2012) Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* 145:2-9.
- Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P, Struyf S (2016) CD26/dipeptidylpeptidase IV-chemokine interactions: double-edged regulation of inflammation and tumor biology. *J Leukoc Biol* 99(6):955-969.
- Mukai S, Fukushima T, Naka D, Tanaka H, Osada Y, Kataoka H (2008) Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. *FEBS J* 275(5):1003-17.
- Muller WA (2013) Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol* 50(1):7–22.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
- Nattkemper LA, Tey HL, Valdes-Rodriguez R, Lee H, Mollanazar NK, Albornoz C, Sanders KM *et al.* (2018) The Genetics of Chronic Itch: Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch. *J Invest Dermatol* 138(6):1311-1317.
- Nomiyama H, Osada N, Yoshie O (2011) A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev Comp Immunol* 35:705–715.
- Norman MU, Hickey MJ (2005) Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens* 66(3):163-172.
- Oheda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, Kojima T, Orita T, Tomonou K, Yamazaki T, Ochi N *et al.* (1990) O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J Biol Chem* 265(20):11432-11445.
- Ohman H, Vahlquist A (1994) In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 74(5):375-379.
- Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Hollenberg MD (2010) Kallikrein-related peptidases: proteolysis and signaling in cancer, the new frontier. *Biol Chem* 391:299–310.
- Oliveira JP, Freitas RF, Melo LS, Barros TG, Santos JA, Juliano MA, Pinheiro S, Blaber M, Juliano L, Muri EM, Puzer L (2013) Isomannide-based peptidomimetics as inhibitors for human tissue kallikreins 5 and 7. *ACS Med Chem Lett* 5(2):128-132.
- Opdenakker G, Van Damme J (2004) The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines, *Int J Dev Biol* 48: 519-527.
- Oynebraten I, Barois N, Hagelsteen K, Johansen FE, Bakke O, Haraldsen G (2005) Characterization of a novel chemokine-containing storage granule in endothelial cells: evidence for preferential exocytosis mediated by protein kinase A and diacylglycerol. *J Immunol* 175(8):5358-5369.
- Palmqvist C, Wardlaw AJ, Bradding P (2007). Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol* 151:725-736.
- Panicker G, Meadows KS, Lee DR, Nisenbaum R, Unger ER (2007) Effect of storage temperatures on the stability of cytokines in cervical mucous. *Cytokine* 37(2):176-179.

- Papadakis KA, Landers C, Prehn J, Kouroumalis EA, Moreno ST, Gutierrez-Ramos JC, Hodge MR, Targan SR (2003) CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J Immunol* 171:159-165.
- Pardigol A, Forssmann U, Zucht HD, Loetscher P, Schulz-Knappe P, Baggiolini M, Forssmann WG, Mägert HJ (1998) HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6308–6313.
- Perona JJ, Craik CS (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J Biol Chem* 272:29987-29990.
- Pettus JR, Johnson JJ, Shi Z, Davis JW, Koblinski J, Ghosh S, Liu Y, Ravosa MJ, Frazier S, Stack MS (2009) Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histol Histopathol* 24(2):197-207.
- Planque C, Choi YH, Guyetant S, Heuzé-Vourc'h N, Briollais L, Courty Y (2010) Alternative splicing variant of kallikrein-related peptidase 8 as an independent predictor of unfavorable prognosis in lung cancer. *Clin Chem* 56(6):987-997.
- Ploeger DT, Hosper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA (2013) Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal* 11(1):29.
- Podell DN, Abraham GN (1978). A technique for the removal of pyroglutamic acid from the amino terminus of proteins using calf liver pyroglutamate amino peptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 81(1):176–185.
- Pohl T, Zimmer, M, Mugele K, Spiess, J (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10059–10063.
- Prassas I, Eissa A, Poda G, Diamandis EP (2015) Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature Reviews Drug Discovery* 14: 183-202.
- Proost P, Wuyts A, van Damme J (1996). The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res* 26(4):211-23.
- Proost P, Struyf S, Van Damme J (2006) Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6):997-1001.
- Proudfoot AE, Power CA, Schwarz MK (2010) Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs* 19(3):345-355.
- Proudfoot AE, Johnson Z, Bonvin P, Handel TM (2017) Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals (Basel)* 9;10(3).
- Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, Richmond A, Graham GJ, Segerer S, Nibbs RJ, Rot A (2009) Duffy antigen-receptor for chemokines transports chemokines and supports their pro-migratory activity. *Nat Immunol* 10:101-108.
- Quandt D, Hoff H, Rudolph M, Fillatreau S, Brunner-Weinzierl MC (2007) A new role of CTLA-4 on B cells in thymus-dependent immune responses in vivo. *J Immunol* 179:7316–7324.
- Rawlings ND, Barrett AJ (2000) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 28(1): 323-325.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49(11):1603-1616.
- Richter R, Schulz-Knappe P, John H, Forssmann WG (2000) Posttranslationally processed forms of the human chemokine HCC-1. *Biochemistry*. 39(35):10799-805.
- Richter R, Bistrrian R, Escher S, Forssmann WG, Vakili J, Henschler R, Spodsberg N *et al.* (2005) Quantum proteolytic activation of chemokine CCL15 by neutrophil granulocytes modulates mononuclear cell adhesiveness. *J Immunol* 175(3):1599-608.

- Richter R, Casarosa P, Ständker L, Münch J, Springael JY *et al.* (2009) Significance of N-terminal proteolysis of CCL14a to activity on the chemokine receptors CCR1 and CCR5 and the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Immunol* 183:1229-1237.
- Rot A, von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 22:891-928.
- Sakabe J, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y (2013) Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 288(24):17179-17189.
- Salanga CL, Dyer DP, Kiselar JG, Gupta S, Chance MR, Handel TM (2014) Multiple glycosaminoglycan-binding epitopes of monocyte chemoattractant protein-3/CCL7 enable it to function as a non-oligomerizing chemokine. *J Biol Chem* 289(21):14896-14912.
- Salon JA, Lodowski DT, Palczewski K (2011) The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol Rev* 63(4):901-937.
- Savino B, Borroni EM, Torres NM, Proost P, Struyf S, Mortier A *et al.* (2009) Recognition versus adaptive up-regulation and degradation of CC chemokines by the chemokine decoy receptor D6 are determined by their N-terminal sequence. *J Biol Chem* 284(38):26207-26215.
- Schilling S, Manhart S, Hoffmann T, Ludwig HH, Wasternack C, Demuth HU (2003) Substrate specificity of glutaminyl cyclases from plants and animals. *Biol Chem* 384: 1583-1592.
- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth HU (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563: 191–196.
- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C (1997) Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 78:285–296.
- Schultz S, Saalbach A, Heiker JT, Meier R, Zellmann T, Simon JC, Beck-Sickingher AG (2013) Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks an ionic linkage and results in C-terminal rearrangement. *Biochem J* 452(2):271-280.
- Schulz-Knappe P, Mägert HJ, Dewald B, Meyer M, Cetin Y, Kubbies M, Tomczkowski J, Kirchhoff K, Raida M, Adermann K, Kist A, Reinecke M, Sillard P, Pardigol A, Ugucioni M, Baggiolini M, Forssmann WG (1996) HCC-1, a Novel Chemokine from Human Plasma. *J Exp Med* 183(1):295-9.
- Schwartzkopff F, Petersen F, Grimm TA, Brandt E (2012) CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate Immun* 18(1):124-139.
- Seifert F, Schulz K, Koch B, Manhart S, Demuth HU, Schilling S (2009) Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry* 48(50):11831-11833.
- Seifert F, Demuth HU, Weichler T, Ludwig HH, Tittmann K, Schilling S (2015) Phosphate ions and glutaminyl cyclases catalyze the cyclization of glutaminyl residues by facilitating synchronized proton transfers. *Bioorg Chem* 60:98-101.
- Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA (2010) Induction of lymphoid-like stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328(5979):749–52.
- Shih YP, Wu HC, Hu SM, Wang TF, Wang AH (2005) Self-cleavage of fusion protein in vivo using TEV protease to yield native protein. *Protein Science* 14:936-941.
- Shih YP, Chou CC, Chen YL, Huang KF, Wang AH (2014) Linked production of pyroglutamate-modified proteins via self-cleavage of fusion tags with TEV protease and autonomous N-terminal cyclization with glutaminyl cyclase in vivo. *PLoS One* 9(4): e94812.

- Siegenthaler W, Blum HE: Klinische Pathophysiologie. 9. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2006, S. 529 ff.
- Singh UP, Singh NP, Murphy EA, Price RL, Fayad R, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2016) Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 77:44-49.
- Sokol CL, Luster AD (2015) The Chemokine System in Innate Immunity. *CSH Perspectives in Biology* 7, doi: 10.1101/cshperspect.a016303.
- Steinhoff M, Corvera C, Thoma M, Kong W, McAlpine B, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8:282-294.
- Svensson M & Agace WW (2006) Role of CCL25/CCR9 in immune homeostasis and disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2(5):759-73.
- Talley K & Alexov E (2010) On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins* 78(12): 2699–2706.
- Thaiss CA, Semmling V, Franken L, Wagner H, Kurts C (2011) Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Front Immunol* 2: 31.
- Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR. Measuring cytokine levels in blood. (1992) Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *J Immunol Methods* 153:115-124.
- Trivedi PJ, Bruns T, Ward S, Mai M, Schmidt C, Hirschfield GM, Weston CJ, Adams DH (2016a) Intestinal CCL25 expression is increased in colitis and correlates with inflammatory activity. *J Autoimmun* 68:98-104.
- Trivedi PJ, Schmidt C, Bruns T (2016b) Letter: the therapeutic potential of targeting CCL25/CCR9 in colonic inflammatory bowel disease - reading between the lines. *Aliment Pharmacol Ther* 44(3):307-308.
- Uddin M, Betts C, Robinson I, Malmgren A, Humfrey C (2017) The chemokine CXCR2 antagonist (AZD5069) preserves neutrophil-mediated host immunity in non-human primates. *Haematologica* 102(2):e65-e68.
- Vakili J, Ständker L, Detheux M, Vassart G, Forssmann WG, Parmentier M (2001) Urokinase plasminogen activator and plasmin efficiently convert hemofiltrate CC chemokine 1 into its active processed variant. *J Immunol* 167:3406-3413.
- Van Coillie E, Proost P, Van Aelst I, Struyf S, Polfliet M *et al.* (1998) Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Biochemistry* 37: 12672–12680.
- Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G (2004) Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol* 14:201-208.
- Van Raemdonck K1, Gouwy M, Lepers SA, Van Damme J, Struyf S. (2014) CXCL4L1 and CXCL4 signaling in human lymphatic and microvascular endothelial cells and activated lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein (MAP) kinases, Src and p70S6 kinase. *Angiogenesis* 17(3):631-640.
- Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Ai't-Yahia S, De Bouteiller O, Vicari A, Caux C (2002) Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* 32(1):231–242.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 267(2):226-244.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S (2011) The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(1):1-18.

- Vela M, Aris M, Llorente M, Garcia-Sanz JA, Kremer L (2015) Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front Immunol* 6:12.
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, (1997) TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291–301.
- Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, Sanvito F, Ponzoni M *et al.* (2010) Tumor-mediated liver X receptor- $\alpha$  activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16(1):98-105.
- Wang Z, Huang H (2013) Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): an angiostatic chemokine for cancer therapy. *Cancer Lett* 331(2):147-153.
- Weber M, Hauschild R, Schwarz J, Moussion C, de Vries I, Legler DF, Luther SA, Bollenbach T, Sixt M (2013) Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339(6117):328-332
- Welker E, Hathaway L, Xu G, Narayan M, Pradeep L, Shin HC, Scheraga HA (2007) Oxidative folding and N-terminal cyclization of onconase. *Biochemistry* 46: 5485-5493.
- Wendt E, Keshav S (2015) CCR9 antagonism: potential in the treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Exp Gastroenterol* 8:119-130.
- Wolf M, Albrecht S, Marki C (2008) Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions, *Int J Biochem Cell Biol* 40:1185-1198.
- Wurbel MA, McIntire MG, Dwyer P, Fiebiger E (2011) CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS One* 6(1):e16442.
- Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL (2006) Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB journal* 20:2068–2080.
- Yousef GM, Diamandis EP (1999) The new kallikrein-like gene, KLK-L2. Molecular characterization, mapping, tissue expression, and hormonal regulation. *J Biol Chem* 274:37511-6.
- 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* 276:125–33.
- Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP (2003) Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 329(1-2):1-8.
- Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgono CA, Kishi T, Memari N, Michael IP, Sidiropoulos M, Kapadia C, Economopolou K, Kapadia C *et al.* (2005) Human tissue kallikreins: From gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem* 39:11-79.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118:6743-6751.
- Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2):121-127.
- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. (2006) The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7(12):243.
- Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B (2011) Homeostatic chemokine receptors and organspecific metastasis. *Nat Rev Immunol* 11:597–606.
- Zlotnik A, Yoshie O (2012) The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*. 36(5):705-716.

## 8. Thesen

1. Die Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK5 und KLK8 sind in der Lage das Chemokin CCL14 zu aktivieren.
2. Die Kallikrein-verwandten Peptidasen KLK5 und KLK8 haben ein unterschiedlich hohes Potential CCL14 zu aktivieren.
3. Kallikrein-aktiviertes CCL14 kann, im Gegensatz zu seiner Proform, Chemotaxis bei Zellen induzieren.
4. Weitere Kallikrein-verwandte Peptidasen, neben KLK5 und KLK8, sind potentielle Aktivatoren von CCL14.
5. Humane Glutaminylzyklase katalysiert die enzymatische Pyroglutamatbildung an den N-Termini der Chemokine CCL25 und CXCL4.
6. Die Hemmung posttranslationaler Modifikationen von Chemokinen kann im Kontext entzündlicher Erkrankungen eine therapeutische Maßnahme darstellen.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß §5 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zur Durchführung der Arbeit und zur Erstellung der Dissertationsschrift wurden nur die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht. Ich erkläre hiermit auch, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Mario Grünberg

---

Ort, Datum

### **Erklärung über vorausgegangene Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

---

Mario Grünberg

---

Ort, Datum



## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

**Geboren:**

am 07.06.1984  
in Räckelwitz

**Staatsangehörigkeit:**

deutsch

**Familienstand:**

ledig



### Berufserfahrung

---

05/2017 – heute

**Prozessingenieur Downstream Entwicklung bei Rentschler Biopharma SE**

Ingenieur bei der Entwicklung von Aufreinigungsstrategien und Analytik von Biopharmazeutika: Chromatographie und Filtrationstechniken im Labormaßstab im GLP-regulierten Umfeld; Erstellen von Arbeitsanweisungen, Vorgabedokumenten, Berichten und Präsentationen

10/2015 – 04/2017

**Prozessingenieur Downstream Produktion Rentschler Biopharma SE**

Ingenieur bei der Herstellung von Biopharmazeutika: Chromatographie- und Filtrationstechniken im Produktionsmaßstab im GMP-regulierten Umfeld; Planung von Produktionskampagnen; Erstellung von SOPs; Abweichungs- und Change-Management

07/2011 – 07/2015

**Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) der Hochschule Anhalt & Pharos Biotec GmbH Hannover**

Erstellung rekombinanter Expressionssysteme; chromatographische Aufreinigung von Proteinen; immunologischer, zellbasierter und massenspektrometrischer Nachweis von Proteinmodifikationen; Betreuung studentischer Abschlussarbeiten; Budgetplanung und Organisation von Laborgeräten und Verbrauchsmaterialien

## Hochschulstudium

---

- 04/2009 – 04/2010      **Hochschule Anhalt Köthen, Anhalt University of Applied Sciences**  
Master-Studium der Biotechnologie  
Abschluss: Master of Science (M.Sc.), Gesamtnote: 1,7
- 10/2008 – 03/2009      **Management Center Innsbruck (MCI), Internationale Hochschule GmbH**  
Master-Studium (M. Sc.) der Umwelt-, Verfahrens- und Biotechnologie (Fachrichtung Biotechnologie)
- 09/2004 – 09/2008      **Hochschule für Technik und Wirtschaft Mittweida (FH)**  
Diplomstudiengang der Umwelttechnik/Biotechnologie  
Abschluss: Dipl.-Ing. (FH), Gesamtnote: 2,0

## Praktika

---

- 05/2010 – 05/2011      **Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) Berlin**  
Anfertigung der Masterarbeit im Fachbereich Biologische Arbeitsstoffe, Thema: „Methodenetablierung zum Nachweis proinflammatorischer Zytokine aus Air-Liquid-Kultursystemen humaner Lungenzellen“ Note: 1,0
- 05/2011 – 06/2011      **Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig**  
Praktikum im Fachbereich Umweltimmunologie  
Real-Time-quantitative-PCR (qPCR)
- 02/2008 – 09/2008      **Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig**  
Diplomsemester im Fachbereich Umweltbiotechnologie, Thema: „Dis- und semikontinuierliche Fermentation zur Herstellung von Citronensäure mit *Yarrowia lipolytica* aus Glucose unter Verwendung von Biosensor-online-Monitoring“  
Beurteilung: sehr gut
- 08/2006 – 02/2007      **Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Leipzig**  
Berufspraktisches Studiensemester im Fachbereich Umweltmikrobiologie, Thema: „Mikrobenökologie - Entwicklung einer Methode zur Testung von Lotka-Volterra Modellen mit Hilfe von Mikroorganismen“

## Referenzen

---

Grünberg M, Quandt D, Cynis H, Demuth HU, Kindermann A, Magdolen V, Forssmann WG, Seliger B, Mägert HJ (2018) Kallikrein-related peptidases are activators of the CC chemokine CCL14. *European Journal of Immunology* 48(9):1592-1594.

Grünberg M, Quandt D, Cynis H, Demuth HU, Forssmann, WG, Seliger B, Mägert HJ  
Kallikrein-related peptidases are potent activators of the CC-chemokine CCL14.  
Lecturer at the Symposium „Tumor Immunology meets Oncology XIII“  
Medical Faculty Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 04.-06. Mai 2017.

Quandt D, Grünberg M, Cynis H, Demuth HU, Forssmann WG, Mägert HJ, Seliger, B  
A new function for Kallikrein as activator of chemokine CCL14. Poster: 47th Annual  
Meeting of the German Society for Immunology, Erlangen, 12.-15. September 2017.

Moeller L, Grünberg M, Zehnsdorf A, Aurich A, Bley T, Strehlitz B (2011)  
Repeated Fed-Batch Fermentation using Biosensor Online Control for Citric Acid  
Production by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biotechnology 153:133-137.

Moeller L, Grünberg M, Zehnsdorf A, Strehlitz B, Bley T (2010) Biosensor  
Online Control of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica* Using  
Semicontinuous Fermentation. Engineering in Life Sciences 10(4):311-320.

### Fortbildungen

---

10/2018	Kontinuierliche Chromatographie (MCSGP, iCCC)
03/2018	Quality by Design, Design of Experiments
06/2010	Gefährdungsbeurteilung bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen bei der Ärztekammer Berlin

### Zivildienst

---

08/2003 – 05/2004	Kommunale Dienste Kamenz (KDK)
-------------------	--------------------------------

### Schulbildung

---

08/1995 – 06/2003	Gotthold-Ephraim-Lessing-Gymnasium Kamenz Abschlussnote: 2,0
08/1991 – 07/1995	3. Grundschule Kamenz

### Sprachen & EDV

---

Englisch	Wort und Schrift sehr gut
Russisch	Grundkenntnisse
MS-Office	sehr gute Kenntnisse
Unicorn, SAP, LIMS	sehr gute Kenntnisse



Mario Grünberg

## **Danksagung**

Ein herzlicher Dank gilt all denen, die mit ihrer Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Besonders Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert für die Überlassung des Themas, seine stetige Hilfsbereitschaft, Diskussionsbereitschaft, Geduld und vor allem die schöne Zeit.

Ein großer Dank gilt in besonderem Maße Frau Prof. Dr. Barbara Seliger, die die Betreuung der Arbeit seitens dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg übernommen hat. Aus ihrem Team gilt ein Dank Frau Dr. Dagmar Quandt für die Durch- und Einführung in Migrationsassays und der Auswertung der erhobenen Daten sowie Frau PD Dr. Dagmar Riemann für die wissenschaftlichen Anregungen und das Zurverfügungstellen von Synoviozyten.

Dem Pharis Biotec-Team um Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann danke ich für die Möglichkeit diverse chromatographische Techniken zu Erlernen und MALDI-TOF-Analysen sowie Zellassays durchzuführen, insbesondere Rolf Kopittke, Björn Beensen und Dr. Tina Peer.

Bedanken möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth, Dr. Holger Cynis und Dr. Thurid Moenke-Wedler vom Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI für die Überlassung humaner Glutaminylzyklase, der Möglichkeit der Durchführung von MALDI-TOF-Analysen sowie dem wissenschaftlichen Austausch.

Bei Prof. Dr. Can Cedidi und Prof. Dr. Ursula Mirastschijski vom Zentrum Plastische und Ästhetische Chirurgie des Universitätsklinikums Bremen Mitte bedanke ich mich für die Bereitstellung von humanem Gewebe.

Vielen lieben Dank an Sabine Grabner und Jessica Zwanzig für die Untertützung und die tolle Zeit im Labor.