

V. Zusammenfassung

Corin ist eine im menschlichen Herzen exprimierte Mosaik-Serinprotease, die in der Nähe des N-Terminus eine integrale Transmembrandomäne aufweist. Die extrazelluläre Region von Corin umfasst zwei Frizzled-verwandte Domänen, acht LDL-Rezeptor-Motive, eine Scavenger-Rezeptor-Domäne so wie eine Trypsin-verwandte Serinprotease-Domäne am C-Terminus. In früheren Zellkulturstudien wandelte Corin pro-ANP zu biologisch aktivem ANP um, was darauf hindeutete, daß es sich bei Corin um die langgesuchte pro-ANP-Konvertase handeln könnte. Diese Vermutung wurde durch eine erst kürzlich durchgeführte Corin-Knockout-Studie bestätigt. In Mäusen, denen das Corin-Gen fehlte, war die Umwandlung von pro-ANP zu ANP aufgehoben. In der ersten Hälfte der hier vorgelegten Arbeit untersuchten wir die Notwendigkeit der Transmembrandomäne und der Aktivierungsspaltung von Corin für dessen proteolytische Prozessierung von pro-ANP. Wir haben gezeigt, daß eine rekombinante lösliche Corin-Variante, die nur die extrazelluläre Region aufwies, in Zellassays in der Lage war, rekombinantes pro-ANP zu prozessieren. Die Mutation R801A in der konservierten Aktivierungssequenz hingegen, verursachte den Funktionsverlust von Corin. Dadurch wurde demonstriert, daß die proteolytische Spaltung für die Aktivität von Corin erforderlich ist. Diese Ergebnisse führten zu der Konstruktion, Exprimierung und Reinigung einer löslichen Corin-Mutante, EKsolCorin, in der die konservierte Corin-Aktivierungssequenz durch eine EK-Erkennungsstelle ersetzt war. Die Aktivierung von gereinigtem EKsolCorin erfolgte durch EK und war abhängig von deren Konzentration. Aktiviertes EKsolCorin hydrolysierte Peptidsubstrate, wenn diese ein Arg oder Lys in der P1-Position aufwiesen. Die katalytische Aktivität von Corin wurde durch Serinprotease-Inhibitoren, jedoch nicht durch Aspartatprotease- und Metalloprotease-Inhibitoren gehemmt. Wir untersuchten außerdem die durch EKsolCorin katalysierte Spaltung von pro-ANP und konnten zeigen, daß EKsolCorin pro-ANP sequenzspezifisch prozessierte, wobei biologisch aktives ANP erzeugt wurde. Diese proteolytische Aktivität von Corin wurde in der

Anwesenheit von Blutplasma, mit oder ohne Heparin, nicht inhibiert. Gemeinsam legen diese Ergebnisse nahe, daß die Transmembrandomäne für die biologische Aktivität von Corin nicht erforderlich ist, jedoch für einen Mechanismus zur spezifischen Lokalisierung von Corin von Bedeutung sein könnte. Die proteolytische Spaltung des Arg801 hingegen ist ein essentieller Schritt, um die Aktivität von Corin zu kontrollieren.

In der zweiten Hälfte dieser Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung der Domänstrukturen innerhalb des Corin-Propeptides für die Prozessierung von pro-ANP untersucht. Wir konstruierten, exprimierten und reinigten eine weitere lösliche Corin-Variante, EKshortCorin, die nur aus der Proteasedomäne bestand und ebenfalls eine EK-Erkennungssequenz an der konservierten Aktivierungsstelle enthielt. Nach der Aktivierung mit EK war EKshortCorin in einem funktionellen Assay nicht fähig, pro-ANP zu spalten. Im Gegensatz dazu, wies EKshortCorin in Assays mit chromogenen Substraten eine ähnliche katalytische Aktivität und Substratspezifität wie EKsolCorin auf. Die Empfindlichkeit von EKshortCorin gegenüber Protease-Inhibitoren ähnelte ebenfalls der von EKsolCorin, was auf die korrekte Proteinfaltung der Proteasedomäne hinweist. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß bestimmte Domänen innerhalb des Corin-Propeptides für die Prozessierung von pro-ANP erforderlich sind, wohingegen die Erkennung von kleinen Substratmolekülen nicht von der Anwesenheit des Propeptides abhängt. Daraufhin konstruierten wir mehrere Reihen von Corin-Mutanten, in denen eine oder mehrere Domänen des Propeptides entfernt waren und untersuchten deren Aktivität für die Spaltung pro-ANP. Corin-Mutanten, bei denen z.B. die Fz1- oder die Fz2-Domäne nicht vorhanden war, wiesen eine Aktivität von ~40 % bzw. ~32 % auf, während Corin-Mutanten, in denen das LDLR-Motiv 1, 2, 3, 4 oder 5 fehlte, ~47, ~13, ~50, ~71 bzw. ~80 % Aktivität zeigten. Weiterhin erzeugten wir Mutationen in den LDLR-Motiven 1 bis 4, wobei wir ein konserviertes Asp, welches zur Ca^{2+} -Koordination erforderlich ist, gezielt gegen ein Tyr austauschten. Die Corin-Mutanten D300Y, D336Y, D373Y und D410 wiesen eine pro-ANP-Spaltungsaktivität von ~25, ~11, ~16 bzw. ~75 % auf. Somit konnten wir zeigen, daß die Fz-Domänen und LDLR-Motive 1-5 des Corin-Propeptides kritische Strukturelemente für die Erkennung des physiologischen Substrates pro-ANP durch Corin sind.